



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y POSGRADO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN DE NITRÓGENO

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN recA DE R. phaseoli.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

M. en C. JAIME MARIANO MARTÍNEZ SALAZAR

03081

6

2ej.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

ANTECEDENTES	1
INTRODUCCION	2
- Mecanismos generadores de variabilidad genómica	2
- Mecanismos de recombinación homóloga	4
- Inestabilidad genómica en <u>Rhizobium</u>	9
RESULTADOS	12
- Molecular cloning and characterization of the <u>recA</u> gene of <u>Rhizobium phaseoli</u> and construction of <u>recA</u> mutants.	12
RESULTADOS ADICIONALES	18
- Clonación y caracterización de una región que confiere resistencia a mutagenos.	19
- Construcción de cepas de <u>R. phaseoli</u> con la mutación <u>recA::Spc^r</u>	20
- Estudio del papel del gen <u>recA</u> en diferentes eventos de recombinación.	27
a) recombinación intermolecular de plásmidos pequeños.	28
b) análisis molecular de eventos obtenidos sin marcadores de selección positiva.	29
c) amplificación y delección de una región flanqueada por secuencias homólogas en el plásmido simbiótico.	34
d) formación de cointegrados entre plásmidos grandes durante la conjugación.	42
DISCUSION	53
BIBLIOGRAFIA	63

ANTECEDENTES

Las bacterias del género Rhizobium son capaces de establecer una asociación simbiótica con las raíces de plantas leguminosas. En la simbiosis se forman unas estructuras llamadas nódulos, en donde la bacteria realiza la fijación biológica del nitrógeno (20).

En las cepas de Rhizobium es común observar una alta variabilidad morfológica, así como una alta frecuencia de pérdida de las propiedades simbióticas de la bacteria. Además, uno de los fenómenos más frecuentes al usar cepas de Rhizobium como inoculantes, es la alta pérdida de la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno (2,10,12,21,26,33,41).

Se ha reportado que Rhizobium tiene un elevado número de secuencias de DNA reiterado, el nivel de reiteración es poco común en bacterias (12). Este nivel de DNA reiterado se ha asociado con la generación de los rearrreglos genómicos que afectan las propiedades de nodulación y fijación de nitrógeno. Sin embargo, los mecanismos moleculares, así como los genes que participan en la formación de rearrreglos genómicos son desconocidos.

En E. coli se han reportado varios genes que promueven la recombinación homóloga. De éstos genes el producto del gen recA desempeña un papel central y de gran importancia en los procesos de recombinación homóloga (25,39). Este gen se ha encontrado en muchas especies bacterianas desempeñando el mismo papel (25).

La clonación y caracterización del gen recA, así como la obtención de mutantes recA nos permitirá evaluar la participación de éste gen en la inestabilidad genómica generada por procesos de recombinación homóloga. Además, la inactivación del gen recA en Rhizobium podría generar cepas con menor inestabilidad simbiótica.

INTRODUCCION

1.- MECANISMOS GENERADORES DE VARIABILIDAD GENOMICA.

En las bacterias, como en todos los organismos vivos, la información genética es transmitida establemente de una generación a otra. Sin embargo, la estabilidad no es absoluta; es más, la inestabilidad es un requisito para la evolución biológica. Múltiples factores promueven la inestabilidad genética, mientras que otros la limitan. De tal forma que, si no ocurriera la inestabilidad, los microorganismos podrían tener dificultades para adaptarse a los cambios medio ambientales, mientras que una alta inestabilidad, podría causar letalidad en los microorganismos.

Generalmente las bacterias tienen un genoma haploide y la variabilidad genética puede ser generada por mutaciones puntuales, infidelidad en la replicación y procesos de recombinación genética. Otra manera de obtener variabilidad genética en una bacteria, es la adquisición de genes por transformación, transducción y conjugación. La integración de los genes dentro del genoma bacteriano se realiza por diferentes mecanismos de recombinación genética.

Transformación. Es la penetración de DNA desnudo a la célula. Algunas especies como Streptococcus pneumoniae, Bacillus subtilis y Haemophilus influenza poseen la capacidad de ser transformadas a una alta frecuencia. Después de la penetración del DNA de doble cadena (dsDNA) en forma lineal a la célula, una de las cadenas es degradada, mientras que la otra se integra al cromosoma. En otras especies como Escherichia coli y Salmonella typhimurium después de un tratamiento, las células pueden ser transformadas con DNA circular cerrado (15).

Transducción. Es la transferencia de DNA de una bacteria a otra por medio de bacteriófagos. Algunos bacteriófagos como P22, P1 y T4, por su mecanismo de replicación y encapsidación son capaces de incorporar DNA genómico dentro de la capsida. El fago al infectar una célula inyecta dsDNA en forma lineal. Si el DNA tiene regiones homólogas con el genoma bacteriano, puede efectuarse la recombinación homóloga (15).

Conjugación. Es la transferencia de DNA de una bacteria a otra por un mecanismo que requiere de contacto celular. Los elementos necesarios para realizar este proceso, están generalmente localizados en plásmidos que poseen el sitio para la iniciación de la transferencia, oriT, y los genes que codifican para las proteínas específicas de la conjugación (i.e. los plásmido F y R100 contienen aproximadamente 20 genes). Otros plásmidos como ColE1 y CloDF13 que sólo tienen la región de movilización, son movilizables por un plásmido conjugativo. En éste proceso el DNA se transfiere como DNA de cadena sencilla (ssDNA) en la dirección 5'→ 3' y requiere de la síntesis de DNA en ambas células (continua en la donadora y discontinua en la receptora). Algunos plásmidos como el F, son capaces de integrarse al cromosoma (Hfr) y transferir parte de este DNA cromosomal a la célula receptora (15,16,50,51).

En bacterias se conocen tres mecanismos de recombinación genética: transposición, recombinación sitio-específica y recombinación homóloga.

Transposición. Los elementos genéticos móviles (transposones y secuencias de inserción) pueden insertarse o insertar una copia en cualquier región del genoma. Este evento requiere de una transposasa codificada por el elemento y es recA independiente (15).

Recombinación sitio-específica. Se realiza entre dos moléculas que no requieren de homología y es independiente de la proteína RecA. Este proceso necesita de una

recombinasa específica que reconoce una pequeña secuencia homóloga. Ejemplos de este tipo de recombinación son; la integración del fago lambda al cromosoma de E. coli, el cambio de antígenos flagelares en S. typhimurium, la resolución de cointegrados mediados por Tn3, la expresión de los genes de fijación de nitrógeno en cianobacterias, etc. (35).

Recombinación homóloga. Este intercambio genético se lleva a cabo entre secuencias homólogas y requiere de la participación de varias proteínas. Se ha descrito que la región mínima para la recombinación homóloga es de aproximadamente 50 pb. En E. coli se han propuesto tres vías de recombinación y que dependen de la proteína RecA (39,40).

2.- MECANISMOS DE RECOMBINACION HOMOLOGA.

Los fenotipos que han permitido la selección de células deficientes en recombinación son: incremento en la sensibilidad a agentes que dañan el DNA (rayos X, luz ultravioleta, agentes alquilantes, etc.), disminución en la viabilidad celular, y pérdida de la capacidad de propagación de fagos (39,40).

En E. coli en base a los estudios realizados en las cepas mutantes, se han propuesto tres vías de recombinación (RecBCD, RecF y RecE) en donde participan varias proteínas. Además, cada una de las vías tienen preferencia por un tipo de sustrato (39,40).

Vía RecBCD. Las mutantes en los genes recB y/o recC son sensibles a luz UV y rayos X y muestran una disminución de 10 a 1000 veces en la frecuencia de recombinación conjugacional. En esta vía participan las proteínas RecA, RecBCD, SSB, DNA girasa, DNA topoisomerasa I y DNA ligasa (39,40).

La proteína RecBCD tiene las siguientes actividades: a) exonucleasa tipo V dependiente de ATP, esta actividad hidroliza dsDNA lineal y ssDNA lineal a oligonucleótidos, b)

topoisomerasa de dsDNA lineal, c) endonucleasa específica de dsDNA lineal, esta actividad sólo es observada cuando la proteína funciona como topoisomerasa y cuando el DNA tiene la secuencia "chi" (5'-GCTGGTGG-3'). La enzima corta a 3 o 4 nucleótidos de la región 3' de la secuencia "chi" (1,46). La proteína RecBCD también es capaz de reconocer y cortar a menor frecuencia secuencias muy similares a la secuencia "chi" (7). Proteínas con la actividad de endonucleasa específica similar a RecBCD, las cuáles reconocen y cortan cerca de la secuencia "chi", se han encontrado en otras especies como Salmonella y Shigella (24,38).

La frecuencia de recombinación en las cepas con mutaciones en los genes recB, recC o recD (10^{-2} a 10^{-3}), puede ser restaurada al nivel de la cepa silvestre por otras mutaciones en el genoma, denominadas sbcA, sbcB y sbcC (39,40).

Vía RecE. Esta vía es observada en las mutantes recB recC sbcA, las mutaciones en el gen sbcA inactivan el represor del gen recE. El producto del gen recE es una exonucleasa tipo VIII, cuya actividad de exonucleasa de dsDNA y ssDNA es independiente de ATP. Estos genes son parte de un profago críptico llamado rac (por "recombination activity"). Otras enzimas que participan en esta vía son, RecA, RecF, RecJ, RecO y RecQ (39,40).

Vía RecF. La activación de esta vía de recombinación se observa en la triple mutante sbcB sbcC recB y/o recC. La mutación sbcB causa la desaparición de la actividad de una exonucleasa tipo I, la cuál degrada ssDNA a partir del extremo 3'-OH. La actividad del gen sbcC es desconocida. Otros genes como recA, recF, recJ, recQ, recQ y ruv participan en esta vía de recombinación (39,40).

La recombinación conjugacional y la de plásmidos pequeños (menores de 20-kb) presentan un comportamiento diferente en cada una de las vías de recombinación. Por

ejemplo, la inactivación de la proteína RecBCD no altera la recombinación de plásmidos, en cambio las mutaciones en los genes recA, recE, recJ o recQ la reducen marcadamente. Esto sugiere que en las células silvestres la recombinación conjugacional se efectúa por la vía RecBCD, mientras que la recombinación de plásmidos por la vía RecF. En la vía RecE, la recombinación de plásmidos pequeños ocurre en ausencia de la proteína RecA, además en esta vía, la recombinación intraplasmídica es 30 veces más frecuente que en la vía RecBCD (cepas silvestres) (9,17,39,40).

Aunque se han observado tres vías de recombinación, algunos genes pueden participar en dos o más vías. Por ejemplo, el gen recA participa de manera importante en las tres vías, mientras que los genes recE, recJ, recO y recQ son utilizados en las vías RecE y RecF, pero no en la vía RecBCD (39,40). Muchos genes involucrados en recombinación también son necesarios en los sistemas SOS y de reparación (recA, recE, recQ, ssb, rev, etc.) (8,36,39,40,48).

La proteína RecA. En E. coli las mutaciones en el gen recA tienen un fenotipo pleiotrópico, los cuáles son: a) incapacidad de transducción por bacteriófagos, b) incremento en la sensibilidad a agentes que dañan el DNA (rayos-X, luz UV, etc.) c) disminución de la mutagénesis por luz UV, y d) incapacidad de propagación de bacteriófagos (25,39).

La proteína RecA tiene una importante participación en diferentes procesos celulares, como son; a) el apareamiento e intercambio de cadenas entre moléculas de DNA homólogo b) la reparación lesiones del DNA en forma directa, c) la activación de los sistemas de reparación del DNA (SOS y umuDC) y d) la inactivación de algunos represores como, LexA, UmuD y cI. La inactivación de LexA y UmuD provoca la des-represión de los genes de reparación y del sistema SOS (8,25,29,36,39,48).

El conocer las funciones del gen recA, así como los fenotipos de las mutantes en E. coli, ha permitido identificar análogos del gen en muchas especies bacterianas. El gen se ha encontrado ampliamente distribuido en cepas de las familias Enterobacteriaceae, Psudomonadaceae, Rhizobiaceae, Vibrionaceae, Neisseriaceae, Bacteroidaceae, Methylomonadaceae, y en otras especies como, Bacillus subtilis, Anabaena variabilis, Synechococcus sp, etc., así como en algunos eucariotes (25,39).

En todos los genes recA clonados, hay una conservación de muchas de las funciones fisiológicas de la proteína RecA (i.e. sinaptasa en la recombinación homóloga y las funciones de reparación del DNA). Esto sugiere que el gen es muy conservado evolutivamente. El análisis de la secuencia nucleotídica o de aminoácidos del gen recA de varias especies, indica que varios dominios y/o regiones están altamente conservados. La homología a nivel de aminoácidos varía entre un 56% (E. coli y Synechococcus sp) y un 100% (E. coli y Shigella flexneri) (25,39).

En E. coli la región entre los aminoácidos 204 a 230 parece estar involucrada en la actividad de co-proteasa de LexA y cI, pero no en la afinidad por los represores. Este dominio es altamente conservado (arriba del 82%) entre las diferentes proteínas RecA reportadas a la fecha (25,39).

Un péptido de 24 aminoácidos (aminoácidos 257 a 280) de la proteína RecA de E. coli es capaz de unir ATP, éste péptido se encuentra muy conservado entre las proteínas RecA de enterobacterias, pero no en especies alejadas filogenéticamente. Dentro de esta región se ha identificado al aminoácido Tyr264 como el sitio de unión al ATP; este aminoácido está presente en todas las proteínas RecA, excepto en Synechococcus sp (25,39). Los aminoácidos Cys90, Cys116, Cys129 de la proteína RecA de E. coli se han involucrado en

el dominio que participa en la hidrólisis del ATP. La sustitución de estos aminoácidos no afecta la actividad de ATPasa, pero si la afinidad por el ATP, lo que sugiere que no forman parte directa en la catálisis. Estos aminoácidos no están conservados entre las proteínas RecA de diferentes especies analizadas. El posible efecto de estos aminoácidos puede ser por una alteración en la estructura conformacional (25,39).

Los primeros 30 aminoácidos de la región NH₂-terminal, están altamente conservados (arriba del 70%) entre las diferentes especies analizadas. En E. coli la región de los primeros 40 aminoácidos del NH₂-terminal se han implicado en la unión de la proteína al ssDNA, y mutaciones en los aminoácidos 25 a 40 alteran esta actividad (25,39).

El gen recA de E. coli es regulado negativamente por la proteína LexA, la cuál es parte del sistema SOS. Los eventos que inducen la expresión del gen recA son: agentes que dañan el DNA (luz UV, rayos-X y agentes alquilantes) son capaces de generar oligonucleótidos de ssDNA que interaccionan con la proteína RecA. Esta interacción activa a la proteína para que funcione como co-proteasa sobre LexA. La inactivación de LexA causa la inducción gen recA, así como la de otros genes del sistema SOS (dinA, dinB, dinD, uvrA, uvrB, recN, recQ, ruv, ssb, ect.) (8,25,29,36,39,48).

En los genes de E. coli regulados por LexA, se ha encontrado una secuencia en la región 5'-terminal que es reconocida por LexA (secuencia SOS), esta se ha localizado en el gen recA de diferentes especies. Sin embargo, algunas especies como, Thiobacillus ferrooxidans, Anabaena variabilis, Synechococcus sp, Agrobacterium tumefaciens, y Rhizobium meliloti no la tienen (25,27,34). En el caso de Synechococcus sp, el gen recA tiene una secuencia parecida a la secuencia consenso que es reconocida por sigma 32 ("stress" por calor) (27). En el caso de T. ferrooxidans, el gen recA es incapaz de

inducirse en presencia de mitomicina C (34). Sin embargo, en A. variabilis el gen recA es inducible con agentes como, mitomicina C, metil-metanosulfonato y luz UV (25). Los datos anteriormente mencionados nos sugiere que la secuencia consenso SOS y el gen lexA no son tan conservados en las especies bacterianas. Sin embargo, es posible que existan análogos funcionales de LexA.

3.- INESTABILIDAD GENOMICA EN RHIZOBIUM.

En la mayoría de los organismos el nitrógeno es asimilado a partir de los compuestos inorgánicos, amonio y nitrato, o de los compuestos orgánicos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Sin embargo, un número pequeño de microorganismos (aerobios, anaerobios o facultativos, algunas cianobacterias y bacterias fotosintéticas) son capaces de asimilar nitrógeno atmosférico y reducirlo a amonio. La fijación biológica de nitrógeno en algunas bacterias se lleva a cabo en vida libre, mientras que en otras se realiza en asociación simbiótica con plantas. Tres géneros de la familia Rhizobiaceae (Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium) son capaces de infectar plantas de la familia Leguminosae y formar una estructura diferenciada y especializada llamada nódulo (en la raíz o tallo), en donde se realiza la fijación del nitrógeno molecular (20,21,32).

En las cepas de Rhizobium, se han encontrado de 1 a 6 plásmidos, con un rango de peso molecular que varía de 100 a 1500-kb, éste DNA extracromosomal puede representar el 40% del DNA total. En Rhizobium y Azorhizobium, los plásmidos contienen la mayoría de los genes involucrados en la nodulación y fijación de nitrógeno (20,21,32). En algunos casos la información simbiótica es codificada en un sólo plásmido, éste es el caso del plásmido simbiótico (pSim) de la cepa CFN299 de R. phaseoli que confiere a

Agrobacterium tumefaciens la capacidad de nodular y fijar nitrógeno (21).

Una característica del genoma de Rhizobium es la presencia de una gran cantidad de secuencias de DNA repetidas. Para algunas cepas de R. phaseoli, R. meliloti, y A. tumefaciens, se estima que hay 200 familias repetidas con un promedio de 3.5 elementos por familia (12). Recientemente, se han localizado en el pSim de la cepa CFN42 de R. phaseoli 24 familias reiteradas, estas representan el 12% de todas las familias reiteradas en el genoma (13, ver Fig. 5). También, el plásmido simbiótico de R. fredii contiene un alto número de secuencias repetidas (21). En B. japonicum 28 elementos repetidos pertenecientes a 5 familias se encuentran alrededor de los genes de la nitrogeasa (nif)(21). El alto nivel de secuencias reiteradas se ha correlacionado con la inestabilidad genómica, la cuál puede generarse por recombinación homóloga entre las secuencias repetidas.

Una observación común en las cepas de Rhizobium es la gran variabilidad morfológica de las colonias, así como un alto número de rearrreglos genómicos que afectan las propiedades simbióticas (2,3,4,10,12,18,21,26,28,33,41,42,43,53). Además, uno de los fenómenos más frecuentes al usar cepas de Rhizobium como inoculantes de leguminosas, es la rápida pérdida de la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno (20,21).

La inestabilidad simbiótica en condiciones de "stress" por temperatura en R. trifolii, está determinada por la pérdida total o parcial del pSym (10,53). Bajo las mismas condiciones de "stress" en la cepa CFN23 de R. phaseoli, un rearrreglo en el pSim que causa la pérdida de la capacidad de nodular se observa a alta frecuencia. Este rearrreglo involucra la pérdida de los genes nif y la amplificación de ciertas secuencias, sin que exista una alteración en el tamaño del pSim (41,43). Por otro lado, se ha observado que en condiciones normales de laboratorio las cepas 8002 y 1233 de R. phaseoli presentan una

delección en el pSim que afecta la capacidad de nodulación; esta ocurre a alta frecuencia (0.5%) (3,4,18). Otros tipos de rearrreglos genómicos han sido detectados por hibridización en otras cepas de R. phaseoli (12). En B. japonicum delecciones que ocurren a alta frecuencia son generadas por la recombinación entre las secuencias repetidas que rodean a los genes nif (21).

Otros eventos de dinámica genómica en Rhizobium son causados por la introducción de un plásmido dentro de la célula. Por ejemplo, en R. leguminosarum eventos de recombinación entre dos plásmidos simbióticos causan rearrreglos, que en algunos casos forman plásmidos simbióticos híbridos (26,28). Otro ejemplo, es el caso en B. japonicum en donde el plásmido RP1 se integra al cromosoma y una parte de DNA cromosomal se incorpora a un megaplásmido (2).

Aunque hay muchas evidencias de inestabilidad simbiótica y de una gran dinámica interna en el genoma de Rhizobium, los mecanismos moleculares, así como los genes que participan son desconocidos. En esta área son necesarios más estudios para poder establecer los diferentes componentes de la dinámica, variabilidad y evolución del genoma.

En el presente trabajo describimos algunos enfoques para el estudio de la dinámica genómica de R. phaseoli. El primer enfoque fue la clonación y caracterización el gen recA. La caracterización del gen nos permitió construir un plásmido que fuera útil para la homogenización de la mutación recA::Sp^r en diferentes cepas R. phaseoli. Las mutantes recA fueron usadas para evaluar la participación del gen en diferentes eventos de recombinación. Además, se describen algunos rearrreglos del plásmido simbiótico que ocurren durante su transferencia por conjugación.

Molecular Cloning and Characterization of the *recA* Gene of *Rhizobium phaseoli* and Construction of *recA* Mutants

JAIME M. MARTÍNEZ-SALAZAR,* DAVID ROMERO, MARIA DE LOURDES GIRARD,
AND GUILLERMO DÁVILA

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apto Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

Received 18 October 1990/Accepted 2 March 1991

The *Rhizobium phaseoli recA* gene has been cloned by interspecific complementation of the Fec phenotype of bacteriophage lambda. The cloned gene restored the recombination proficiency and conferred resistance to DNA-damaging agents (methyl methanesulfonate and nitrofurantoin) to an *Escherichia coli recA* mutant. The direction of transcription and the localization of the *recA* gene were determined by mutagenesis with phage MudIIPR13 and heterologous hybridization with an *E. coli recA* probe. An *R. phaseoli recA::Spe^r* mutation was introduced in two *R. phaseoli* strains by homogenization. The *R. phaseoli recA* mutants were more sensitive to DNA-damaging agents and exhibited a 100-fold reduction in recombination frequency as compared with their parental strains. A deletion of the symbiotic plasmid abolishing nodulation was found at high frequency (10^{-2}) in *R. phaseoli* CFN42. This event was *recA* dependent. In *R. phaseoli* CFN285, two events of symbiotic instability were found at high frequency (10^{-3}): one was a deletion in the symbiotic plasmid, and the other was the loss of whole symbiotic plasmid. In the CFN285 *recA::Spe^r* mutant, only the loss of the symbiotic plasmid was observed.

The product of the *Escherichia coli recA* gene is involved in several functions of DNA metabolism. The RecA protein is required for processes of homologous recombination, DNA repair, and induction of prophages, bacteriocins, and SOS genes, as well as for the coordination of cell division events (6, 41, 45).

The purified RecA protein is a DNA-dependent ATPase that in vitro promotes the invasion of duplex DNA by homologous single-stranded DNA and its activated form (apparently by binding to single-stranded DNA) and accelerates the cleavage of the LexA repressor, causing the induction of SOS genes. The activated RecA protein is also responsible for the proteolysis of the lambda repressor, promoting the lytic growth of the prophage (6, 41, 45).

The important functions played by the *recA* gene in cell metabolism suggest that a *recA* gene may be conserved in many species. In fact, interspecific complementation of *E. coli recA* mutants has been used to obtain *recA* genes from at least 16 bacterial species, including five members of the *Enterobacteriaceae* family (9, 21), two members of the *Rhizobiaceae* family (2, 10), and other species (1, 15, 16, 23, 24, 31, 35).

A high degree of DNA reiteration is a general characteristic of the *Rhizobiaceae* genome (11, 27). This feature has been reported only for a few other bacterial species, such as *Halobacterium* and *Streptomyces* species (38, 39). Moreover, a high frequency of rearrangements has been found to be associated with the presence of repeated DNA (12, 38). Genomic instability and rearrangements that affect nodulation or nitrogen fixation abilities have been observed in several *Rhizobium* species (25, 27, 37, 42).

In this report we describe the isolation of the *Rhizobium phaseoli recA* gene. The cloned gene complements an *E. coli recA* mutant for recombination and DNA repair activities. Stable *R. phaseoli recA* mutants were obtained by a novel

procedure which allows a positive selection for site-specific marker exchange. These mutants show a reduction in recombination proficiency. Two events of symbiotic instability that affect nodulation abilities were analyzed: one was *recA* dependent, and the other was *recA* independent.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids. The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. Bacteriophage P1virA was a gift of F. Bastarrachea.

Media. *E. coli* strains were grown in LB or M9 media (29) at 37°C. When needed, amino acids were added to a final concentration of 0.2% (wt/vol). *Rhizobium* strains were grown in PY medium (30) at 30°C. Antibiotics were used for selection at the following concentrations: nalidixic acid (Nal), 15 µg/ml; streptomycin (Str), 100 µg/ml; spectinomycin (Spc), 100 µg/ml; kanamycin (Km), 15 µg/ml; ampicillin (Ap), 100 µg/ml; tetracycline (Tc), 10 µg/ml; and chloramphenicol (Cm), 30 µg/ml. Methyl methanesulfonate (MMS) or nitrofurantoin (NFT) were used at different concentrations, ranging from 0.005 to 0.05% and 1.0 to 140 µg/ml, respectively. β-Galactosidase-positive strains were identified by growth on LB plates with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) at 25 µg/ml (29). Production of melanin in *R. phaseoli* was done as described by Lamb et al. (25) with the following modifications. The colonies were grown on PY medium supplemented with 20 µg of CuSO₄ per ml and 100 µg of L-tyrosine per ml. After 4 days of growth, the colonies were lysed with a Whatman filter containing 10% sodium dodecyl sulfate (SDS).

Microbiological techniques. Plasmid DNA transformations of CaCl₂-treated *E. coli* cells were performed by the protocol of Maniatis et al. (26). Hfr mating tests of *E. coli* strains were done in LB medium as described by Miller (29) with a donor-to-recipient ratio of 1:10. Cells were incubated for 1 h at 37°C without shaking, and transconjugants were selected by the acquisition of amino acid prototrophies.

* Corresponding author.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used

Strains or plasmid	Relevant genotype	Source or reference
<i>R. phaseoli</i>		
CFN42	Str ^r Nal ^r Nod ⁺ Fix ⁺	33
CFN285	Nal ^r Nod ⁺ Fix ⁺	11
CFNX101	The same as CFN42, but <i>recA</i>	This work
CFNX102	The same as CFN285, but <i>recA</i>	This work
CFNX103	Derivative of strain CFN42 deleted in pSym; Nod ⁻ Mel ⁻	This work
CFNX104	Derivative of strain CFN285 cured of pSym; Nod ⁻	This work
CFNX105	Derivative of strain CFN285 deleted in pSym; Nod ⁻	This work
CFNX106	Derivative of strain CFNX102 cured of pSym; Nod ⁻	This work
<i>E. coli</i>		
RR1	F ⁻ <i>leu proA2 lacY1 rspL20</i> (Str ^r)	3
HB101	The same as RR1 except <i>recA13</i>	4
CSH62	HfrH	Cold Spring Harbor Laboratory
MX971	<i>thi-1 Δ(pro-lac)</i>	F. Bastarrachea
MC4100 (Mucts)	<i>Δ(argF-lac) U169 relA1 rpsL150</i> (Str ^r) (Mucts)	34
M8820 (Mu+)	<i>araD139 Δ(araCOIBA-leu) 7679 Δ(proAB argF-lacIPOZYA) XIII rspL</i> (Str ^r) (Mu)	34
Plasmids		
pSUP202	Ap ^r Cm ^r Tc ^r mob ⁺ ; ColE1 origin unable to replicate in <i>Rhizobium</i> spp.	40
pHP45Ω	Ap ^r Spc ^r /Str ^r	32
pGUS3	<i>sacRB Spc^r/Str^r Km^r/Gen^r Tm^r Ap^r</i>	37
pRK2013	Tra ⁺ Km ^r ; ColE1 origin	7
pCR3	Ap ^r ; carries 3.0-kb <i>Bam</i> HI <i>E. coli recA⁺</i> gene	18
pCQ15	Ap ^r Tc ^r ; carries 4.7-kb <i>Eco</i> RI <i>R. phaseoli nifH</i> gene	33
pBX404-7	Tc ^r ; 5'-deleted Km ^r /Neo ^r ; 3'-deleted Km ^r /Neo ^r ; RK2 origin	46
pPR13	MudIIPR13; Ap ^r Cm ^r	34
pMS16	Ap ^r Tc ^r ; ColE1 origin bears 2.9-kb <i>Eco</i> RI <i>R. phaseoli recA⁺</i> gene	This work
pMS20	Ap ^r Tc ^r ; ColE1 origin bears 4.8-kb <i>Eco</i> RI <i>R. phaseoli recA⁺</i> gene	This work
pMS26	The same as pM16 but bears 2.0-kb <i>Hind</i> III Spc ^r /Str ^r into <i>recA</i> gene and 5.7-kb <i>Bam</i> HI <i>sacRB</i> Km ^r Spc ^r /Str ^r Tm ^r into Tc ^r gene	This work

Conjugational transfer of pSUP202 plasmid derivatives from *E. coli* to *R. phaseoli* were obtained by triparental mating by using plasmid pRK2013 as helper (7).

Phage P1*virA* was propagated in *E. coli* MX971. Plating efficiency and transduction assays were done as described by Miller (29).

Mutagenesis of pMS20 with phage MudIIPR13 was carried out as described by Ratet et al. (34). MC4100(Mucts)(MudIIPR13)/pMS20 was thermoinduced at 42°C for 80 min, and mini-Mu lysates were used for transduction to M8820(Muc⁺) strain.

The *R. phaseoli* CFN42 genomic library in λ1059 was previously constructed (33) and propagated in *E. coli* Q359 as described by Karn et al. (19).

Nodulation and nitrogen fixation assays. *Phaseolus vulgaris* (cv. Negro Jamapa) plants were inoculated and grown as described by Noel et al. (30), and the nodules were assayed for nitrogen fixation by using the acetylene reduction technique.

Recombinant DNA methods. The recombinant phages were purified by cesium chloride density gradient centrifugation, and the DNA was obtained by phenol extraction (19). Plasmid DNA was isolated by an alkaline-SDS lysis method (26). For large-scale preparations, the plasmid DNA was purified by ethidium bromide-cesium chloride density gradient centrifugation (26). Restriction endonucleases and T4 DNA ligase were purchased from Amersham Corp., and the reaction conditions were as specified by the manufacturer.

Plasmid profile and colony and Southern hybridization. Colony hybridization was carried out by the method of Grunstein and Hogness (17). *R. phaseoli* plasmid profiles were obtained by the method of Eckhardt (8) and transferred to nitrocellulose filters by the method of Southern (43). Genomic or plasmid DNA was digested with the indicated

restriction endonucleases. Digested DNA was subjected to electrophoresis in 1% agarose gels (26) and transferred to nitrocellulose filters by the method of Southern (43). Probes were labeled with [α-³²P]dCTP by nick translation (36). For low-stringency hybridizations, the filters were prehybridized for 4 h at 42°C in a mixture containing 30% formamide, 5× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate), 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5× Denhardt solution (1× Denhardt solution is 0.02% Ficoll, 0.02% bovine serum albumin, and 0.02% polyvinylpyrrolidone), and 100 μg of denatured salmon sperm DNA per ml. The filters were hybridized for 16 h at 42°C in the same solution with the labeled probe and washed once with 2× SSC-0.1% SDS for 15 min at room temperature and twice with 2× SSC-0.1% SDS for 15 min at 50°C. The high-stringency hybridizations were done in phosphate buffer as previously described (11). Autoradiography in the presence of intensifying screens was carried out at -70°C.

RESULTS

Isolation of the *R. phaseoli recA* gene. The *R. phaseoli recA* gene was isolated by complementation of a λ *red gamma* mutant. Lambda *red gamma* mutants are able to replicate in wild-type *E. coli* but are unable to grow in *E. coli recA* mutants (Fec⁻ phenotype) (44).

An *R. phaseoli* CFN42 genomic library with the bacteriophage λ1059 as vector was previously constructed (33). In this library, the 17-kb *Bam*HI fragment that contains *red* and *gamma* genes was substituted by *Bam*HI genomic fragments. The recombinant phages were plaqued on *E. coli* wild-type (RR1) and *recA13* (HB101) strains. Fec⁺ phages were found at a frequency of 1/1,000 PFU. One Fec⁺ phage (λRpreCA) was partially digested with *Eco*RI and cloned in

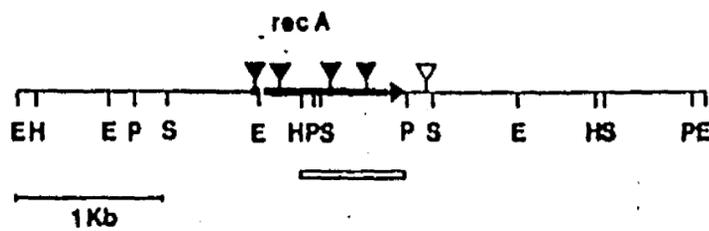


FIG. 1. Restriction map of *R. phaseoli recA* gene. Localization and direction of transcription of the *recA* gene (→), the region of homology to the *E. coli recA* probe (□), and insertion of phage MudIIPR13 that inactivates the *recA* gene (▼) or that do not inactivate the *recA* gene (▽) are shown. Abbreviations: E, *EcoRI*; P, *PstI*; H, *HindIII*; S, *Sall*.

pSUP202. Plasmids with the functional *recA* gene were selected by their ability to confer resistance to NFT (1 $\mu\text{g/ml}$) to strain HB101. Two plasmids, pMS20 and pMS16, were selected for further studies. Plasmid pMS20 carries four *EcoRI* fragments (0.65, 1.15, 1.25, and 1.75 kb), and plasmid pMS16 carries two *EcoRI* fragments (1.15 and 1.75 kb) (data not shown). NFT-resistant clones with a single *EcoRI* fragment were not found.

Mapping of the *R. phaseoli recA* gene. Figure 1 shows the restriction map of the *recA* region located in plasmid pMS20. The pMS20 plasmid digested with several restriction endonucleases was hybridized with an *E. coli recA* probe (0.56-kb *PstI-EcoRI* fragment from pCR3) at low stringency. The region that hybridized to the *recA* probe is shown in Fig. 1.

Phage MudIIPR13 was used to mutagenize the *R. phaseoli recA* gene in pMS20. pMS20::MudIIPR13 clones were transferred to HB101 by transformation and tested for sensitivity to NFT and for β -galactosidase activity. Restriction maps of NFT-sensitive and β -galactosidase-positive clones were obtained. Figure 1 shows the direction of transcription of the *recA* gene and of the MudIIPR13 insertions. The 1.15-kb *EcoRI* fragment contains the 5' end of the *recA* gene, while the rest (approximately 1.0 kb) is located in the 1.75-kb *EcoRI* fragment.

Complementation studies of the *R. phaseoli recA* gene. The ability of the *R. phaseoli recA* gene present in pMS16 to complement both a defective DNA repair function and a recombination function was studied. The presence of pMS16 in strain HB101 increased the resistance to MMS and NFT but did not restore it to the level found in the parental strain (Fig. 2A and B).

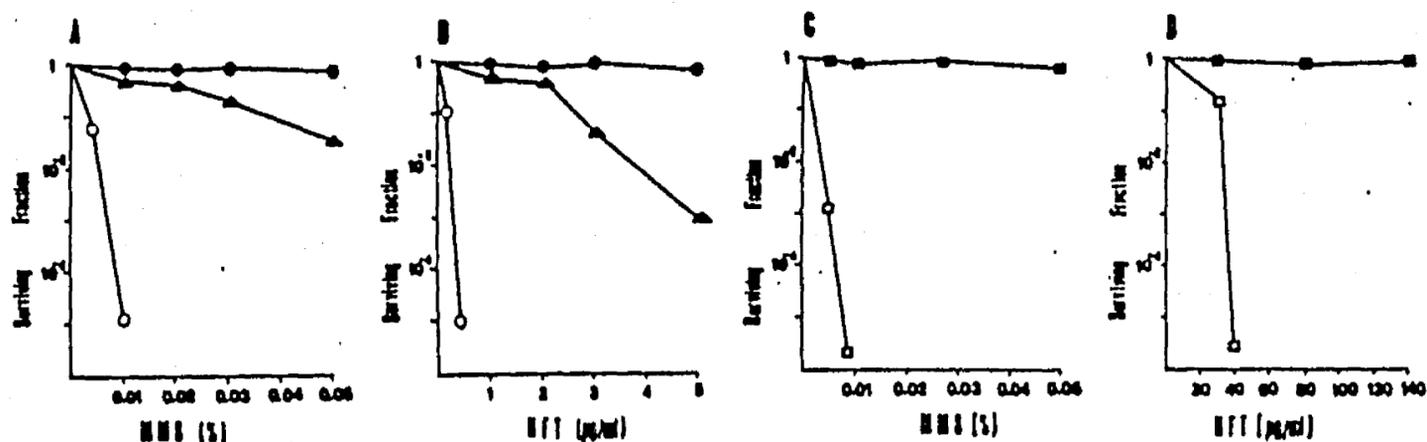


FIG. 2. Viability of *recA*⁺ and *recA*⁻ cells in the presence of MMS and NFT. Survival curves are shown of *E. coli* RR1 (●), HB101/pMS16 (▲), and HB101 (○) in the presence of MMS (A) and NFT (B). Survival curves are also shown of *R. phaseoli* CFN42 (■) and CFN101 (□) in the presence of MMS (C) and NFT (D). Bacteria from a log-phase liquid culture were spread on LB or PY plates with MMS or NFT.

TABLE 2. Recombination proficiency of *E. coli* strains^a

Strain	Conjugational recombination frequency ^b	Transductional recombination frequency ^c	P1 plating efficiency ^d (PFU/ml)
RR1	9.5×10^{-3}	8.6×10^{-6}	8.9×10^6
HB101/pMS16	1.7×10^{-3}	5.2×10^{-6}	6.2×10^6
HB101	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-9}$	1.0×10^2

^a Average of three experiments.

^b CHS62 (HfrH) strain was the donor. Values are numbers of *Leu*⁺ *Str*^r recombinants per donor.

^c P1 phage lysate was used as donor. Values are numbers of *Leu*⁺ *Str*^r recombinants per donor.

^d Dilutions of a P1 phage were plated.

The efficiency of P1 phage lytic growth is controlled by the general recombination system of the host cell and requires a functional *recA* gene (5). Plasmid pMS16 restored the plaque formation of P1 in HB101 at a level that is only 30% lower than that observed in the wild-type strain (Table 2).

The ability of the *R. phaseoli recA* gene to promote homologous recombination was determined by standard Hfr mating and P1 transduction experiments. Plasmid pMS16 in strain HB101 was able to complement conjugational and transductional recombination. However, the recombination proficiency level found was lower than that observed in the parental strain (Table 2).

Construction of *R. phaseoli recA* mutants. We constructed *R. phaseoli recA* mutants by a novel procedure which allows a direct positive selection for site-specific marker exchange. The pSUP plasmids (40) are intermediate vectors used commonly for site-specific mutagenesis because of their inability to replicate in *Rhizobium* species (suicide vector). However, in this homogenization procedure, clones with the substituted region (double recombinants) are obtained at low frequency as compared with those that have integrated in the homologous region along with the vector (single recombinants). This problem was solved by cloning in the vector a conditionally lethal gene, the *Bacillus subtilis* levansucrase gene (*sacRB*) (13). In several species, the product of the *sacRB* gene confers sensitivity to sucrose and allows a positive selection for clones that have lost it by plating on medium containing sucrose. Furthermore, the *recA* gene was interrupted by a marker gene that in low copy number confers a high level of resistance.

Plasmid pMS26 is a derivative of pMS16 carrying a 2.0-kb

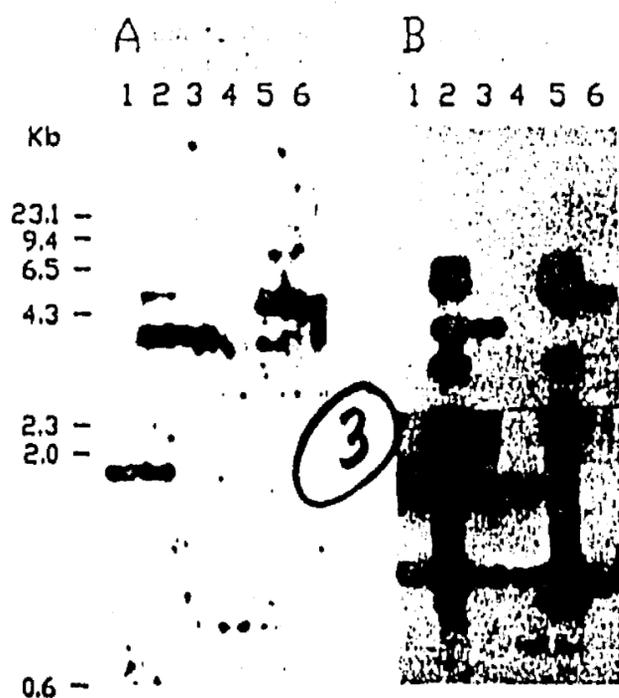


FIG. 3. Characterization of *R. phaseoli* *recA* mutants. Southern hybridization of *Eco*RI-cleaved *Rhizobium* genomic DNAs with *E. coli* *recA* (A) and pMS26 (B) probes. Lanes: 1, CFN42; 2, CFN42::pMS26; 3, CFNX101; 4, CFN285; 5, CFN285::pMS26; 6, CFNX102. The lower autoradiogram of panel B had 10-fold-longer exposure.

*Hind*III *Spc*^r/*Str*^r fragment from pHP45Ω (32) cloned into the *Hind*III site of the *recA* gene and a 5.7-kb *Bam*HI *sacRB* *Km*^r *Spc*^r/*Str*^r *Tm*^r fragment from pGUS3 (37) inserted into the *Bam*HI site located in the *Tc*^r gene of the vector. This *recA*::*Spc*^r allele is unable to complement the HB101 strain for MMS resistance or recombination proficiency.

R. phaseoli CFN42 and CFN285 were chosen for construction of *recA* mutants. The mutagenesis was carried out by homogenization in two steps. In the first step, plasmid pMS26 was transferred to *R. phaseoli* strains by triparental mating, and clones with pMS26 insertion into genomic *recA* gene were selected for *Nal*^r and *Spc*^r. The frequencies of pMS26 insertion in CFN42 and CFN285 were 2.0×10^{-4} and 6.0×10^{-6} , respectively. In the second step, the single recombinant CFN42::pMS26 and CFN285::pMS26 strains were grown in PY medium with 10% sucrose to select the vehicle and wild-type *recA* deletion. For both strains, CFN42::pMS26 and CFN285::pMS26, sucrose-resistant clones were found at a frequency of 2.0×10^{-4} and 3.6×10^{-5} , respectively. Approximately 50% of the sucrose-resistant clones had a *Spc*^r *Km*^r *Ap*^r phenotype and are therefore a substitution of the *recA* wild-type gene by the *recA*::*Spc*^r mutated gene.

Figure 3 shows the Southern blot hybridization of strains CFN42 and CFN285 and their derivatives hybridized with *E. coli* *recA* or pMS26 probes. The CFN42::pMS26 strain had the vector (*Eco*RI fragments of 5.48, 4.78, and 2.89 kb) and both *recA*⁺ (*Eco*RI fragments of 1.15 and 1.75 kb) and *recA*::*Spc*^r (*Eco*RI fragment of 3.75 kb) (Fig. 3, lane 2). The CFNX101 strain showed that the wild-type *recA* fragment was substituted by a *recA*::*Spc*^r fragment (Fig. 3A, lane 3) and that the vector was deleted (Fig. 3B, lane 3). Hybridization at high stringency showed that strain CFN285 was homologous with the CFN42 *recA* region (*Eco*RI fragments of 0.72, 1.15, and 1.7 kb) (Fig. 3B, lane 4). Moreover, the 0.72-kb *Eco*RI fragment was homologous with the *E. coli*

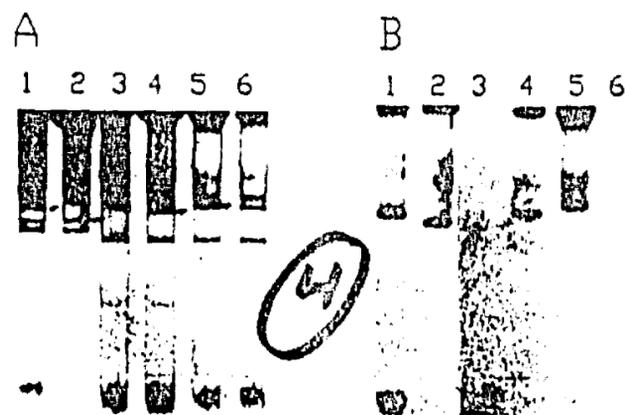


FIG. 4. Instability in the symbiotic plasmid in *R. phaseoli* strains. (A) Plasmid profile stained with ethidium bromide; (B) hybridization of plasmid profile with a symbiotic probe (0.27-kb *Sal*I fragment of *nifH* gene). Lanes: 1, CFN42; 2, CFNX103; 3, CFNX104; 4, CFNX105; 5, CFN285; 6, CFNX106. The arrows show the symbiotic plasmid.

recA probe (Fig. 3A, lane 4). In the CFN285::pMS26 strain, the integration of plasmid pMS26 into the genomic *recA* gene was obtained by recombination between the 1.7-kb *Eco*RI fragment from CFN285 and the 3.75-kb *Eco*RI fragment from pMS26. This recombination generated two new *Eco*RI fragments of 0.92 and 4.5 kb (Fig. 3B, lane 5). In this strain, two *Eco*RI fragments (0.72 and 4.5 kb) hybridized with the *recA* probe (Fig. 3A, lane 5). In strain CFNX102, the vector and 0.72-kb *Eco*RI (*recA* wild type) fragments were not found, but *Eco*RI fragments of 1.15 and 4.5 kb (*recA*::*Spc*^r) were maintained (Fig. 3, lane 6).

Genetic characterization of *R. phaseoli* *recA* mutants. The CFNX101 strain was more sensitive to MMS and NFT than the wild-type strain (Fig. 2C and D). Both *E. coli* and *R. phaseoli* strains showed similar sensitivities to MMS, but *R. phaseoli* strains were resistant to higher concentrations of NFT than the *E. coli* strains. The survival curves of strains CFN285 and CFNX102 in response to MMS and NFT were similar to those of strains CFN42 and CFNX101, respectively (data not shown). The pBX404-7 plasmid was used to determine the recombination proficiency in *R. phaseoli* *recA*⁺ and *recA* mutants. This plasmid contains two unequally truncated and overlapping fragments of the *Km*^r/*Neo*^r gene from Tn5. The restoration of a functional *Km*^r/*Neo*^r gene is obtained by interplasmid recombination (46). The frequencies of recombination in strains CFN42 and CFNX101 were 2.9×10^{-4} and 1.01×10^{-6} , respectively, and in strains CFN285 and CFNX102 were 2.2×10^{-4} and 2.0×10^{-6} , respectively.

The CFNX101 and CFNX102 strains were analyzed for their symbiotic properties in *P. vulgaris*. Both *recA* mutants were able to induce phenotypically normal nodules with a 4-day delay. These nodules fix nitrogen at the same level as those formed by their parental strains.

Nitrogenase (*nif*) and melanin (*mel*) genes are closely linked in the symbiotic plasmid (pSym) of several *R. phaseoli* strains (25, 27). Instability that affects the pSym was tested by the loss of melanin production or the *nifH* gene. In strain CFN42, of 1,500 single colonies tested, 26 (1.7×10^{-2}) were *Mel*⁻, while in strain CFNX101, of 3,500 colonies examined, no *Mel*⁻ clones were found ($<2.8 \times 10^{-4}$). These *Mel*⁻ clones had a deletion of about 120 kb in the plasmid pSym (390 kb) and were unable to nodulate *P. vulgaris*. A representative strain (CFNX103) is shown in Fig. 4, lane 2.

Because melanin production in strain CFN285 is low, the pSym instability of this strain and of its *recA* derivative was tested by colony hybridization with the *nifH* probe. In CFN285, of 1,100 single colonies tested, 5 (5×10^{-3}) were *nifH* mutants, and in CFNX102, of 1,100 colonies examined, 2 (1.8×10^{-3}) were *nifH* mutants. Two types of *nifH* mutant clones were found in strain CFN285. Type I had the same plasmid profile as the parental strain (CFN285) but did not hybridize with the *nifH* probe (Fig. 4, lane 3). In addition, Southern blots that used the homologous pSym as probe (470 kb) showed the loss of the whole plasmid (data not shown). Type II had a deletion in the pSym of about 100 kb (Fig. 4, lane 4). These data suggest that another plasmid shares the same electrophoretic mobility of pSym. The *nifH* mutant clones in strain CFNX102 were similar to the type I clones of strain CFN285 (Fig. 4, lane 6). In addition, type I and type II clones of both strains were unable to nodulate *P. vulgaris*.

DISCUSSION

We cloned the *R. phaseoli recA* gene by *Fec*⁺ phenotype complementation of bacteriophage lambda and subcloned it to confer resistance to a DNA-damaging agent (NFT) in an *E. coli recA* mutant. In most cases, the cloning of *recA* genes has been done by interspecific complementation of *E. coli recA* mutants for resistance to DNA-damaging agents (2, 9, 10, 15, 16, 21, 23, 24, 31, 35), except for *Haemophilus influenzae*, where the *recA* gene was isolated by *Fec* phenotype complementation (1).

The *R. phaseoli recA* gene in an *E. coli recA* mutant background was able to restore recombination proficiency and DNA repair activities. The complemented functions tested were not at the level of those of a wild-type *E. coli* strain, perhaps because of low interaction with the substrates or low expression of the gene in the *E. coli* background. We used the 0.56-kb *EcoRI-PstI* fragment of the *E. coli recA* gene as probe (this fragment contains the ATPase, ATP binding, and protease domains [20, 22]) that hybridized to *R. phaseoli* under low-stringency conditions.

R. phaseoli CFN42 and CFN285 have different *EcoRI* fragments (1.75 and 0.72 kb, respectively) homologous to the *E. coli recA* probe. However, Southern hybridization at high stringency showed that both strains were highly conserved in the *recA* gene region. This conservation allowed the construction of the CFNX102 strain by gene replacement by using the *recA* gene of strain CFN42.

We described a new homogenization procedure that is based on the positive selection for loss of the *sacRB* genes. In this procedure, the vector that has the *sacRB* genes was used to obtain the double recombinants from single recombinants. The positive selection is an advantage for selecting double recombinants in systems where they occur at low frequency.

The *R. phaseoli recA* mutants constructed were hypersensitive to DNA-damaging agents (MMS and NFT) and had a lower recombination frequency than their parents. We used the restoration of the *Km*^r/*Neo*^r gene in the plasmid pBX404-7 to measure the intermolecular recombination frequency (46). By use of this system, Xu et al. (46) reported a reduction in the recombination frequency of approximately 800- and 1,000-fold in *E. coli* and *Agrobacterium tumefaciens recA* mutants, respectively. With this system, we observed a reduction of 100-fold for CFNX101 and 300-fold for CFNX102 in their recombination frequencies. The remaining recombination activity shown by *R. phaseoli recA* mutants could be due to other recombination genes.

The *R. phaseoli recA* mutants had a nodulation delay and were able to fix nitrogen in *P. vulgaris*. We think that the nodulation delay is due to low viability of the strains. That the *recA* gene regulates some genes involved in nodulation is a possible alternative. In this regard, the pectin lyase gene of the plant pathogen *Erwinia carotovora*, that is involved in the pathogenicity, appears to be regulated by the *recA* gene (28).

The pSym instability in strain CFN42 was tested by the loss of melanin production. The event was a deletion in the pSym of about 120 kb that occurs with a cumulative frequency of 1.7×10^{-2} and was *recA* dependent. This rearrangement was similar to others previously found in our laboratory (37).

Two events of symbiotic instability were detected in strain CFN285, a deletion event of about 100 kb in the pSym (type II) and the loss of whole pSym (type I). We found the type I event in strain CFNX102 only; therefore the loss of the pSym was *recA* independent. In pSym, several families of reiterated sequences have been found (14); some of these sequences (those that are in a direct orientation) may participate in homologous recombination to generate a deleted pSym. A different approach is required to stabilize the symbiotic phenotype in those strains that lose the pSym. The participation of the *recA* gene in symbiotic instability in other *R. phaseoli* strains is now under study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Gomez-Eichelmann and J. Mora for constructive discussions and R. Palacios and L. Segovia for helpful comments on the manuscript.

J.M.-S. was a recipient of a doctoral studentship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia. Partial financial support for this research was provided by the U.S. National Academy of Sciences/National Research Council by means of a grant from the U.S. Agency for International Development.

REFERENCES

1. Barcak, J. G., J. F. Tomb, C. S. Laufer, and H. O. Smith. 1989. Two *Haemophilus influenzae* Rd genes that complement the *recA*-like mutation *rec-1*. *J. Bacteriol.* 171:2451-2457.
2. Better, M., and D. R. Hellinski. 1983. Isolation and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 155:311-316.
3. Bollivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. J. Betlach, H. L. Heynecker, H. W. Boyer, J. H. Crosa, and S. Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113.
4. Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussolx. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.
5. Cohen, G. 1983. Electron microscopy study of early lytic replication forms of bacteriophage P1 DNA. *Virology* 131:159-170.
6. Cox, M. M., and I. R. Lehman. 1987. Enzymes of general recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 56:229-264.
7. Ditta, G. S., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Hellinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7347-7355.
8. Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584-588.
9. Eitner, G., B. Alder, V. A. Lanzov, and J. Hoffmeister. 1982. Interspecies *recA* protein substitution in *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Mol. Gen. Genet.* 185:481-486.
10. Farrand, K. S., S. O'Morchoe, and J. McCutchan. 1989. Construction of an *Agrobacterium tumefaciens* C58 *recA* mutant. *J. Bacteriol.* 171:5314-5321.
11. Flores, M., V. González, S. Brom, E. Martínez, D. Piñero, D.

- Romero, G. Dávila, and R. Palacios. 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* 169:5782-5788.
12. Flores, M., V. González, M. A. Pardo, A. Lelja, E. Martínez, D. Romero, D. Plüero, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 170:1191-1196.
 13. Gay, P., D. LeCoq, M. Stelmets, T. Berkelman, and C. I. Kado. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164:918-921.
 14. Girard, M. D., M. Flores, S. Brom, D. Romero, R. Palacios, and G. Dávila. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *J. Bacteriol.* 173:●●●-●●●.
 15. Goldberg, I., and J. J. Mekalanos. 1986. Cloning of the *Vibrio cholerae* *recA* gene and construction of a *V. cholerae* *recA* mutant. *J. Bacteriol.* 165:715-722.
 16. Goodman, J. K. H., J. P. Parker, J. A. Southern, and D. R. Woods. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA*-like gene from *Bacteroides fragilis*. *Gene* 58:265-271.
 17. Grunstein, M., and D. S. Hogness. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3961-3965.
 18. Horii, T., T. Ogawa, and H. Ogawa. 1980. Organization of the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:313-317.
 19. Karn, J., S. Brenner, L. Barnett, and C. Cesareni. 1980. Novel bacteriophage λ cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5172-5176.
 20. Kawashima, H., T. Horii, T. Ogawa, and H. Ogawa. 1984. Functional domains of *Escherichia coli* *recA* protein deduced from the mutational sites in the gene. *Mol. Gen. Genet.* 193:288-292.
 21. Keener, S. L., K. P. McNamee, and K. McEntee. 1984. Cloning and characterization of *recA* genes for *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli* B/r. *J. Bacteriol.* 160:153-160.
 22. Knight, L. K., R. M. Hess, and K. McEntee. 1988. Conservation of an ATP-binding domain among RecA protein from *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* K-12 and B/r. *J. Bacteriol.* 170:2427-2432.
 23. Kokjohn, T. A., and R. V. Miller. 1985. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* 163:568-572.
 24. Koomey, J. M., and S. Falkow. 1987. Cloning of the *recA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* and construction of gonococcal *recA* mutants. *J. Bacteriol.* 169:790-795.
 25. Lamb, J. W., G. Hombrecher, and A. W. B. Johnston. 1982. Plasmid-determined nodulation and nitrogen-fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. *Mol. Gen. Genet.* 186:449-452.
 26. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 27. Martínez, E., D. Romero, and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:59-93.
 28. McEvoy, J. L., H. Murata, and A. K. Chatterjee. 1990. Molecular cloning and characterization of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase gene that responds to DNA-damaging agents. *J. Bacteriol.* 172:3284-3289.
 29. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 30. Noel, K. D., F. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
 31. Owttrim, W. G., and J. R. Coleman. 1987. Molecular cloning of a *recA*-like gene from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 169:1824-1829.
 32. Prentki, P., and H. M. Krisch. 1984. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29:303-313.
 33. Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leemans, M. A. Cevallos, M. A. Pardo, R. Azpiroz, M. L. Girard, E. Calva, and R. Palacios. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1170-1174.
 34. Ratet, P., J. Schell, and F. J. de Bruijn. 1988. Mini-Mulac transposons with broad-range origins of conjugal transfer and replication designed for gene regulation studies in Rhizobiaceae. *Gene* 63:41-52.
 35. Resnik, D., and D. R. Nelson. 1988. Cloning and characterization of the *Aeromonas caviae* *recA* gene and construction of an *A. caviae* *recA* mutant. *J. Bacteriol.* 170:48-55.
 36. Rigby, P. W. J., M. Diekmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick-translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
 37. Romero, D., S. Brom, J. M. Martínez-Salazar, M. D. Girard, R. Palacios, and G. Dávila. 1991. Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 173:●●●-●●●.
 38. Saplenza, C., M. R. Rose, and W. F. Doolittle. 1982. High-frequency genomic rearrangements involving archaebacteria repeat sequence elements. *Nature (London)* 229:182-185.
 39. Schrempf, H. 1985. Reiterated sequences within the genome of *Streptomyces*, p. 131. In K. F. Chater, C. A. Cullis, D. A. Hopwood, A. W. B. Johnston, and N. W. Woolhous (ed.), Genetic rearrangements. The Fifth John Innes Symposium. Croom-Helm, London.
 40. Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. 1983. A broad host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1:784-791.
 41. Smith, G. R. 1988. Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol. Rev.* 52:1-28.
 42. Soberón-Chávez, G., R. Nájera, H. Olivera, and L. Segovla. 1986. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.* 167:487-491.
 43. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
 44. Szybalski, E. II., and W. Szybalski. 1979. A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene* 7:217-270.
 45. Walker, G. C. 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48:60-93.
 46. Xu, B., C. Paszty, and P. F. Lurquin. 1988. A plasmid-based method to quantitate homologous recombination frequencies in Gram-negative bacteria. *Biotechniques* 6:752-760.

RESULTADOS ADICIONALES

En el trabajo adjunto se describe principalmente la clonación y caracterización del gen recA de R. phaseoli, así como la construcción del plásmido pMS26 que facilitó la homogenización de la mutación recA::Spc^r en diferentes cepas de R. phaseoli. La construcción de las cepas con la mutación recA::Spc^r fue con el objetivo de conocer cual es la participación del gen recA en diferentes eventos de recombinación (intermolecular de plásmidos pequeños, intramolecular en el plásmido simbiótico, e intermolecular de plásmidos grandes durante la conjugación). En esta sección se describen los siguientes resultados:

- 1.- Caracterización del plásmido pC1-1. Este plásmido contiene información genética que confiere la resistencia a mutágenos, lo que sugiere que podría estar involucrada con la recombinación.
- 2.- Obtención de cepas de R. phaseoli con la mutación recA::Spc^r. La construcción de las mutantes recA en las diferentes cepas de R. phaseoli se realizaron utilizando al plásmido pMS26. Las cepas elegidas para la homogenización, son polimórficas y con diferente homología en la región del gen.
- 3.- Análisis de diferentes eventos de recombinación. Las cepas construidas se utilizaron para estudiar la participación del gen recA en los siguientes eventos de recombinación:
 - Recombinación intermolecular de plásmidos pequeños.
 - Amplificación de una región flanqueada por secuencias repetidas en el plásmido simbiótico.
 - Deleción de una región flanqueada por secuencias repetidas en el plásmido simbiótico.

- Formación de cointegrados y rearrreglos moleculares entre plásmidos grandes de R. phaseoli durante la transferencia del plásmido simbiótico.

El estudio de los diferentes eventos de recombinación en R. phaseoli, así como la dependencia de éstos por la proteína RecA, fue con el objeto de comprender mejor la dinámica molecular de los plásmidos, en especial la del plásmido simbiótico, ya que algunos rearrreglos en este plásmido podrían afectar las capacidades de nodulación y fijación de nitrógeno.

1.- CLONACION Y CARACTERIZACION DE UNA REGION QUE CONFIERE RESISTENCIA A MUTAGENOS.

La mayoría de las cepas deficientes en recombinación son sensibles a agentes mutagénicos. La restauración de la resistencia a los mutágenos permite seleccionar de un banco genómico aquellas clonas que contienen el gen silvestre. La Dra. Guadalupe Espín generó un banco genómico de la cepa CFN42 construido con fragmentos de EcoRI y clonados en el plásmido pSUP205. El banco genómico fué transferido a la cepa de E. coli HB101 (recA13) por transformación seleccionando aquellas clonas que confirieron la resistencia a 1 µg/ml de nitrofurantoina (NFT). De este experimento se seleccionó sólo la clona denominada pC1-1.

El plásmido pC1-1 tiene aproximadamente 40-kb (Fig. 1) y confiere a la cepa HB101 la resistencia a metil-metanosulfonato (MMS) y NFT (Fig. 2). El nivel de restauración a los mutágenos fue de un 50% comparado con la cepa silvestre (RR1). Este plásmido en la cepa HB101 fue incapaz de complementar las funciones de recombinación conjugacional

(mediada por Hfr) o transduccional (mediada por P1). En condiciones de baja severidad (formamida 20%, 42°C), el probador gen recA de E. coli (0.56-kb PstI/EcoRI del pCR3) hibridizó con un fragmento de EcoRI de 1.5-kb del pC1-1, el cuál no corresponde al observado en el genoma de R. phaseoli (fragmento de 1.75-kb de EcoRI)(Fig. 1). Estos datos sugieren que el plásmido pC1-1 tiene algún gen que proporciona la resistencia a los mutágenos y que no complementa las funciones de recombinación. Además, la hibridización con el gen recA puede estar dada por la homología de un dominio y que posiblemente el fragmento de 1.5-kb contiene parte de este gen.

2.- CONSTRUCCION DE CEPAS DE R. phaseoli CON LA MUTACION recA::Spc.

Las cepas de R. phaseoli elegidas para la homogenización de la mutación recA::Spc fueron; CFN2001 (derivada de CFN42, sin el pSim, ni el p42a), CFN2370 (derivada de CFN23, sin pSim) y CFN299 (ver Tabla I). La mutagenesis del gen recA se realizó por reemplazamiento genético, usando el plásmido pMS26, como anteriormente se mencionó.

El plásmido pMS26 fué movilizadado con la ayuda del plásmido pRK2013 a las cepas de Rhizobium. Las clonas con la inserción del pMS26 (recombinantes sencillas) se seleccionaron en PY NaI(20 µg/ml) Spc (50 µg/ml). La frecuencia de integración del pMS26 en las cepas isogénicas CFN42 y CFN2001 fue idéntica, pero en las otras cepas disminuyó de 30 a 1000 veces, posiblemente porque las dos regiones (recA) en donde se efectuó la recombinación, no son 100% homólogas. La excisión del plásmido pMS26 y del gen recA funcional (dobles recombinantes) fue seleccionada en PY con sacarosa al 10%. En la Tabla 2 aparecen la frecuencias de sacarosa-resistentes para las diferentes cepas. La frecuencia de excisión disminuyó 10 veces cuando ésta se efectuó entre genes heterólogos.

Tabla 1. Cepas de *R. phaseoli* usadas en el trabajo.

cepa	fenotipo relevante
CFN42	aislado natural, Nal ^r
CFN285	aislado natural
CFN2370	derivada de la CFN23
CFN299	aislado natural
CFN2001	derivada de CFN42, pero sin pSim y p42a
CFNX5	derivada de CFN42, con pSimX5 (<i>nifHc::GDYN1</i>)
CFNX4	derivada de CFN42, con pSimX4 (<i>nifHa::GDYN1</i>)
CFNX6	derivada de CFN42, con pSimX6 (<i>nifHb::GDYN1</i>)
CFNX101	derivada de CFN42, pero <i>recA::Spc^r</i>
CFNX102	derivada de CFN285, pero <i>recA::Spc^r</i>
CFNX103	derivada de CFN42, pero pSim deletado, Mel ^r , Nod ^r
CFNX104	derivada de CFN285, pero pSim curado
CFNX105	derivada de CFN285, pero pSim deletado, Nod ^r
CFNX106	derivada de CFNX102, pero pSim deletado
CFNX107	derivada de CFN2001, pero <i>recA::Spc^r</i>
CFNX108	derivada de CFNX107, pero Ery ^r
CFNX109	derivada de CFNX107, con pSimX5
CFNX112	derivada de CFNX107, pero con pSimX5 y p42a
CFNX114	derivada de CFN2001, pero con pSimX5::p42a
CFNX115	derivada de CFNX107, pero con pSimX5::p42a
CFNX116	derivada de CFNX107, pero con pSimX5::p42a
CFNX117	derivada de CFNX108, pero con pSimX5::p42a
CFNX118	derivada de CFNX108, pero con pSimX5::p42a
CFNX119	derivada de CFNX108, pero con pSimX5::p42a
CFNX120	derivada de CFNX107, pero con pSimX5del::p42a
CFNX122	derivada de CFN2001, pero con pSimX4
CFNX123	derivada de CFNX107, pero con pSimX4
CFNX124	derivada de CFN2001, pero con pSimX5
CFNX125	derivada de CFNX107, pero con pSimX5
CFNX126	derivada de CFN2001, pero con pSimX6
CFNX127	derivada de CFNX107, pero con pSimX6
CFNX128	derivada de CFN2370, pero <i>recA::Spc^r</i>
CFNX129	derivada de CFN299, pero <i>recA::Spc^r</i>
CFNX130	derivada de CFN299, pero <i>recA::Spc^r</i>

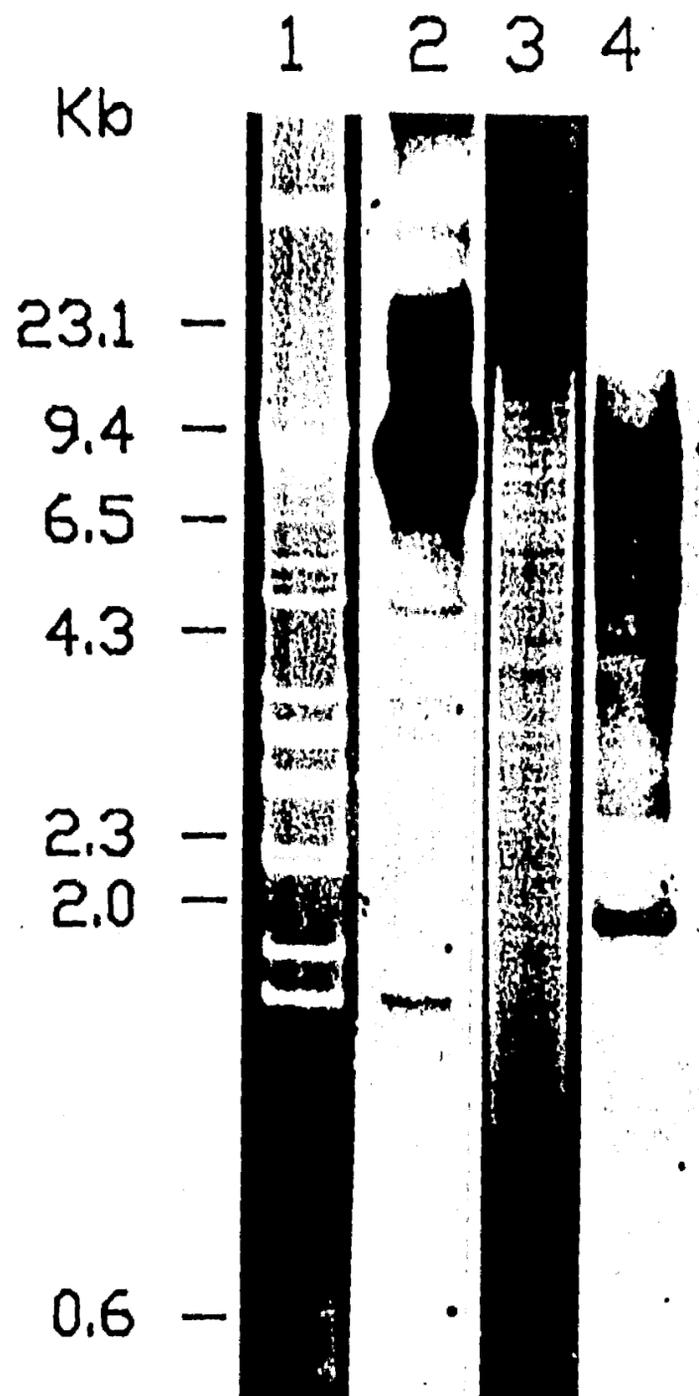


Figura 1.- Caracterización del plásmido pC1-1. DNAs digeridos con EcoRI y teñidos con bromuro de etidio del plásmido pC1-1 (1) y de la cepa CFN42 (3). (2) y (4) Autorradiogramas de la hibridización con el probador del gen recA de E. coli (0.56kb EcoRI/PstI del pCR3) de los carriles 1 y 3, respectivamente. Las condiciones de hibridización fueron de baja severidad (formamida 20%, 42°C).

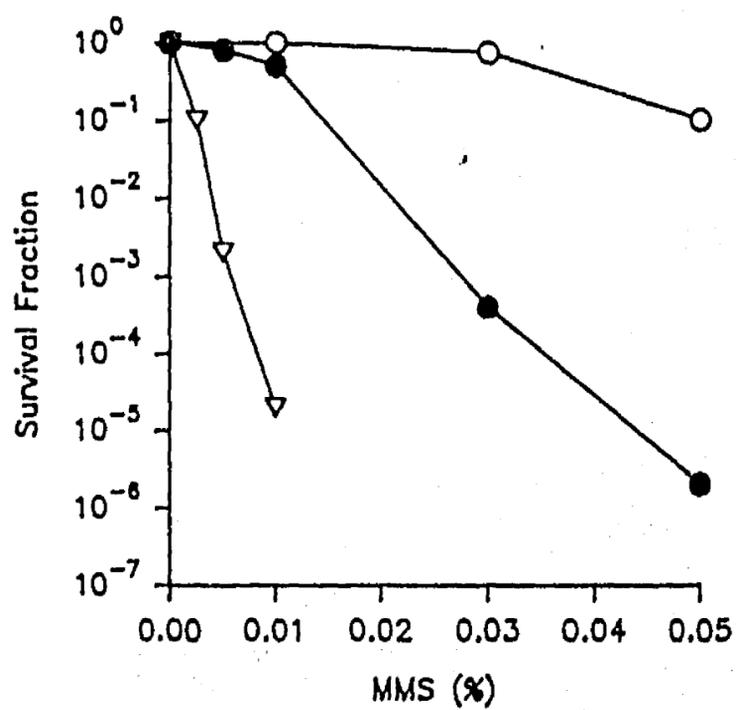
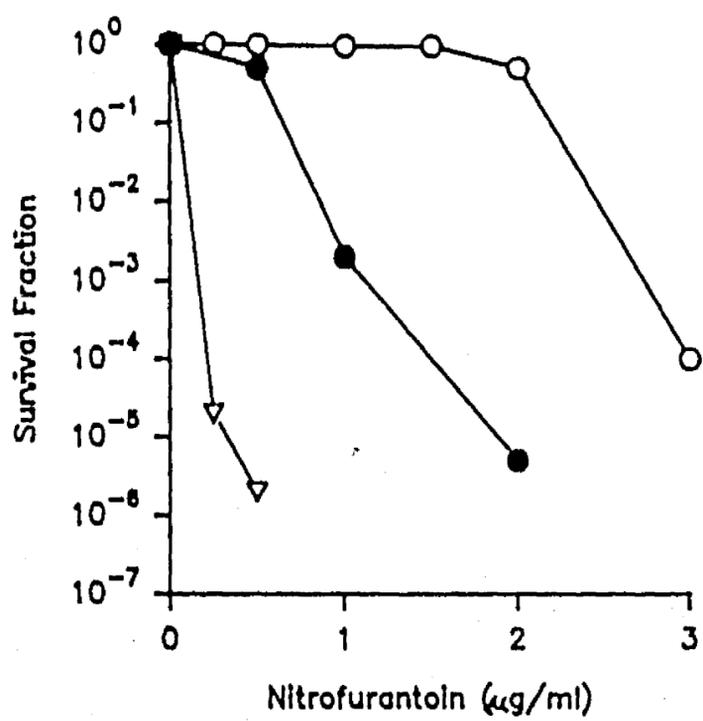


Figura 2. Curvas de viabilidad para nitrofurantoina (A) y metil-metanosulfonato (B). (○), RR1; (●), HB101/pC1-1; (▽), HB101. Las células de un cultivo en fase exponencial fueron diluidas y plateadas en LB con MMS o NFT.

Sin embargo, una clona recombinante sencilla de la cepa CFN299, denominada CFN299::pMS26C1, presentó una alta frecuencia de formación de clones sacarosa-resistentes (1000 veces más frecuente que en la clona CFN299::pMS26C2), ésta inestabilidad no correlacionó con un incremento en la frecuencia de recombinación interplasmídica obtenida con el plásmido pBX404-7 (2×10^{-4}). Aproximadamente el 50 % de las clonas sacarosa-resistentes fueron, Sp^r Km^r MMS^r y por lo tanto conservaron la mutación recA::Spc^r.

El análisis molecular de la inserción y excisión del plásmido pMS26 en la construcción de las mutantes recA se realizó por medio de hibridaciones tipo Southern.

En la cepa CFN2001, la inserción del plásmido pMS26 se efectuó en la región de recA. La cepa CFNX107 (recA::Spc^r) derivada de la CFN2001, fué generada por la recombinación entre los dos genes recA repetidos de la cepa CFN2001::pMS26 que causó la delección del gen recA silvestre y del pMS26 (Fig. 3, carril 6). Esta homogenización fue idéntica a la descrita previamente en la cepa CFN42.

Tabla 2. Frecuencia de inserción y excisión del plásmido pMS26 en diferentes cepas de Rhizobium phaseoli ^a.

cepa	Frecuencia inserción ^b	Frecuencia excisión ^c
CFN42	2×10^{-4}	2.0×10^{-4}
CFN2001	2×10^{-4}	2.0×10^{-4}
CFN285	6×10^{-6}	3.6×10^{-5}
CFN2370	6×10^{-6}	3.0×10^{-5}
CFN299	2×10^{-7}	CFN299::pMS26C2 1.1×10^{-5} CFN299::pMS26C1 2.5×10^{-2}

^a Valores promedio de 2 ó 3 experimentos.

^b Expresada como número de recombinantes por donadora

^c Expresada como número de sacarosa-resistentes por célula.

La cepa CFN2370 presentó tres fragmentos de EcoRI (0.7, 1.15 y 1.7-kb) homólogos a la región de recA del pMS26 (Fig. 3, carril 1). El plásmido pMS26 se integró por una recombinación entre los fragmentos de EcoRI de 0.7-kb (del genoma) y de 3.75-kb (del pMS26). Este evento generó dos nuevos fragmentos de EcoRI (1.0 y 3.4-kb) no presentes en el plásmido o genoma (Fig. 3, carril 2). La excisión del pMS26 y del gen recA silvestre se observó por la pérdida de los fragmentos de EcoRI de 0.7 (recA silvestre), 1.0, 3.5, 5.2, y 5.9-kb (fragmentos del vehículo) y la conservación el fragmento híbrido de 3.4-kb de EcoRI (recA::Spc') (Fig. 3, carril 3). La mutante recA::Spc' derivada de la CFN2370 se denominó CFNX128.

La cepa CFN299 tiene dos fragmentos de EcoRI (0.7 y 0.8-kb) homólogos a la región recA de la CFN42 (Fig. 3 carril 7). Los resultados del análisis molecular de las recombinantes sencillas derivadas de la cepa CFN299 (CFN299::pMS26C1 y CFN299::pMS26C2) son poco claros. En la cepa CFN299::pMS26C1 el plásmido pMS26 posiblemente se integró por medio del fragmento 5.3-kb de EcoRI del vector, el cuál cambió de peso molecular (5.1-kb EcoRI) y generó un fragmento de 1.9-kb de EcoRI (Fig. 3, carril 8). Análisis de dos clonas sacarosa-resistentes (CFNX129 y CFNX130) derivadas de la CFN299::pMS26C1 con fenotipo RecA' (Sp' Km' Ap' MMS'), presentaron un patrón de restricción inesperado. En ambas clonas analizadas (CFNX129 y CFNX130) se perdió el fragmento de 0.7-kb EcoRI homólogo a la región de recA de la CFN42 y de E. coli. Sin embargo, varios fragmentos de EcoRI del vehículo se conservaron en ambas clonas (1.9, 3.5-kb) (Fig. 3, carril 9 y 10). Estos cambios son difíciles de explicar con un sólo evento de recombinación, es posible que hayan ocurrido varios eventos, los cuales permitieron conservar parte del vector. Independientemente de estos datos, las cepas

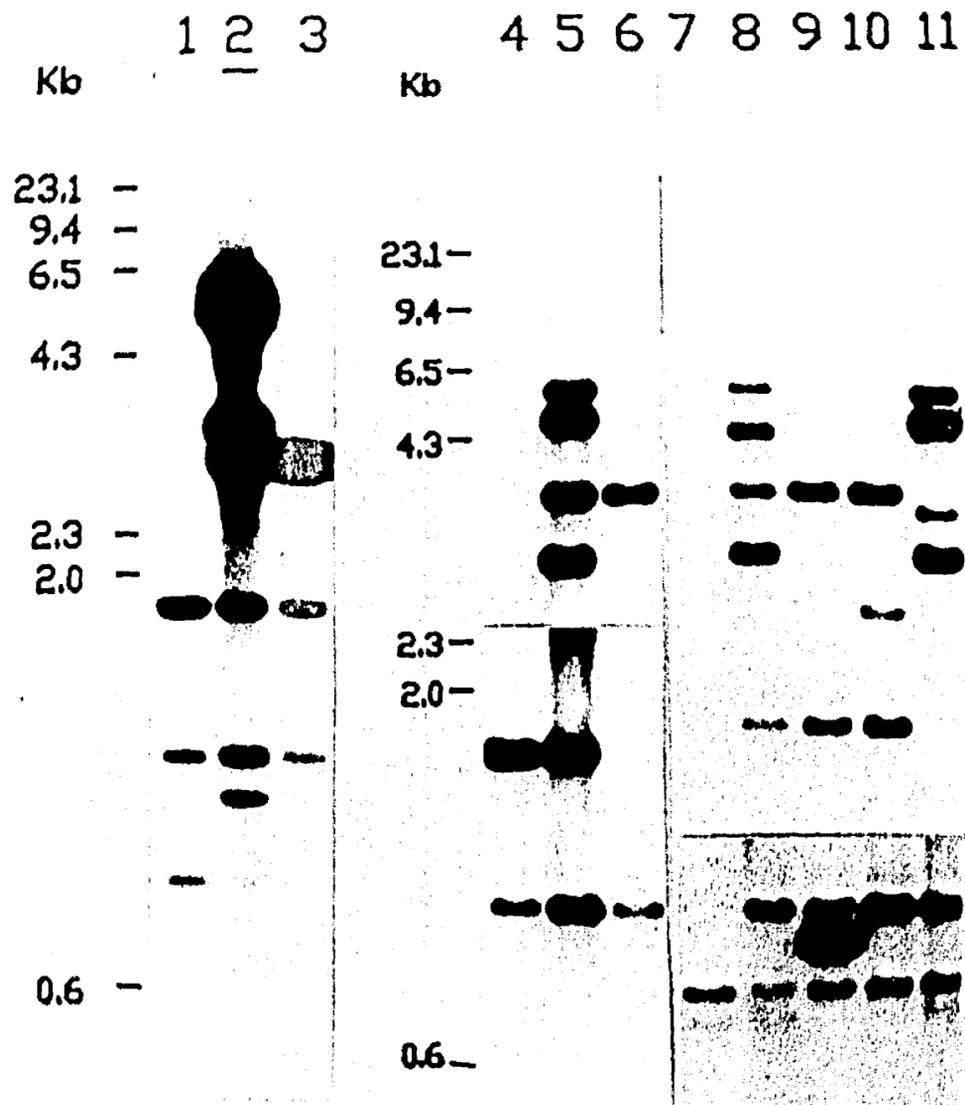


Figura 3.- Caracterización de las mutantes *recA* de *R. phaseoli*. Autorradiografía de la hibridación tipo Southern de los DNAs totales digeridos con *EcoRI* e hibridizados con el plásmido pMS26. Carriles: 1, CFN2370; 2, CFN2370::pMS26; 3, CFNX128; 4, CFN2001; 5, CFN2001::pMS26; 6, CFNX107; 7, CFN299; 8, CFN299::pMS6C1; 9, CFNX129; 10, CFNX130; 11, CFN299::pMS26C2. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad (Amortiguador de fosfatos, 65°C).

CFNX129 y CFNX130 fueron sensibles a agentes mutagénicos y tienen una disminución de 100 veces en la frecuencia de recombinación (Tabla 3). La clona CFN299::pMS26C2, mostró que el fragmento de 3.75-kb EcoRI (recA::Spc^r) del pMS26, disminuyó de peso molecular (3.5-kb EcoRI) y los dos fragmentos homólogos de la región recA de la CFN42 no tiene alteración alguna (Fig. 3, carril 11). Estos datos indican que la región recA de las cepas CFN299 y CFN42 tienen poca homología y que los diferentes rearrreglos observados en la homogenización pueden deberse a ésta baja homología.

Las cepas con la mutación recA::Spc^r fueron más sensibles a los mutágenos MMS y NFT que la cepa parental y el nivel de sensibilidad fue similar a las cepas CFN42 y su derivada recA.

3.- ESTUDIO DEL PAPEL DEL GEN recA EN DIFERENTES EVENTOS DE RECOMBINACION.

Las cepas de R. phaseoli con la mutación recA::Spc^r fueron utilizadas para analizar el papel de la proteína RecA en diferentes eventos de recombinación. Estos estudios nos permitirá conocer y comprender mejor los rearrreglos genómicos que generan la inestabilidad simbiótica. La recombinación intermolecular de plásmidos pequeños fue cuantificada con el plásmido pBX404-7 (externo del genoma de R. phaseoli), mientras que la recombinación intramolecular e intermolecular dentro del genoma de R. phaseoli fue realizada en el pSim. Esta sección contiene los siguientes puntos:

- a) Recombinación intermolecular en plásmidos pequeños.
- b) Análisis molecular de eventos que ocurren en Rhizobium obtenidos sin marcadores de selección positiva.

c) Amplificación y deleción de una región flanqueada por secuencias homólogas en el plásmido simbiótico.

d) Formación de cointegrados entre plásmidos grandes durante la conjugación del plásmido simbiótico.

a) Recombinación intermolecular en plásmidos pequeños.

La frecuencia de recombinación intermolecular de las cepas fue determinada por la restauración del gen Km del plásmido pequeño pBX404-7 (13.9-kb). Este plásmido contiene el gen Km en dos fragmentos separados en dirección opuesta, y con una pequeña región de homología (52). Las frecuencias obtenidas en las cepas con la mutación *recA::Spc'* fueron 100 veces menores que las encontradas en la cepa parental (Tabla 3). En la cepa silvestre CFN299, la frecuencia de recombinación fue 5 veces menor a la observada en las otras cepas.

Tabla 3. Frecuencia de recombinación de las cepas de *R. phaseoli*, cuantificadas por la restauración del gen Km del pBX404-7 ^a.

cepa	recA ⁺	recA ⁻
CFN42	2.9 x 10 ⁻⁴	1.0 x 10 ⁻⁶
CFN2001	2.4 x 10 ⁻⁴	2.1 x 10 ⁻⁶
CFN285	2.2 x 10 ⁻⁴	2.0 x 10 ⁻⁶
CFN2370	1.8 x 10 ⁻⁴	2.5 x 10 ⁻⁶
CFN299	4.1 x 10 ⁻⁵	5.3 x 10 ⁻⁷

^a Valores promedio de 3 ó 4 experimentos. La frecuencia es expresada como el número de kanamicina-resistentes por célula.

b) Análisis molecular de eventos obtenidos sin marcadores de selección positiva.

Dos eventos que generan la inestabilidad simbiótica en las cepas CFN42 y CFN285 se analizaron a nivel molecular. Estos eventos fueron seleccionados por la pérdida de producción de melanina o de los genes nifH.

El mapa de restricción para la enzima BamH1, así como la localización de las secuencias reiteradas y de algunos genes en el plásmido simbiótico de la cepa CFN42 se han reportado recientemente (Fig. 4 y 5) (13). Este plásmido tiene dos operones nifHDK (región nifHa y región nifHb) separados por 120-kb y en orientación directa. Dentro de la región de 120-kb se encuentra un tercer gen nifH (región nifHc), así como varios genes de nodulación y fijación de nitrógeno como nodB, nodC, nodD, nifA, etc. (13,49).

En la cepa CFN42 la inestabilidad simbiótica fue observada por la pérdida de la producción de melanina (Mel). En las clonas Mel, el pSim tiene una deleción de 120-kb. Este evento fue recA dependiente. La determinación del punto de recombinación en el plásmido deletado se realizó por hibridizaciones tipo Southern. Los DNAs totales de las clonas Mel digeridos con BamHI se hibridizaron contra varios cósmidos que cubren todo el pSim y con un probador interno del gen de la nitrogenasa (0.27-kb SalI de nifH). La cepa CFNX103 (representativa de las clonas Mel), sólo presentó un nuevo fragmento de 9.9-kb que hibridiza con el probador nifH (Fig. 6, carril 2), el tamaño de este fragmento corresponde a un fragmento híbrido compuesto por los extremos 5'region nifHa y 3'region nifHb (ver Fig. 8). Los extremos de la deleción en la regiones nifH son observados por la hibridización contra los cósmidos cGD7 y cGD45. Las bandas 1 (nifHa) y 2 del pSim son detectadas con el cósmido cGD7 (Fig. 6, carril 4), mientras que, las bandas 25 (nifHb) y 26

del pSim son detectadas con en el cósmido cGD45 (región nifHb) (Fig. 6, carril 6). Estos cuatro fragmentos son los extremos internos de la región de 120-kb y los cuáles no están presentes en el pSim deletado de la cepa CFNX103. Hibridizaciones contra los cósmidos que cubren todo el pSim, comprobaron que la recombinación entre las regiones nifHa y nifHb causaron la deleción de toda la región de 120-kb (la deleción incluye la región nifHc y varios genes nod y fix).

En la cepa CFN285 la inestabilidad genómica fue de dos tipos: tipo I, curación del pSim y tipo II, deleción en el pSim. La inactivación del gen recA no afectó la curación del pSim (ver artículo). Las cepas CFNX104 (recA⁺) y CFNX106 (recA⁻) que curadas del pSim (tipo I), presentaron un patrón plasmídico idéntico al de la cepa silvestre. Estas clonas no hibridizaron con el rastreador de nifH (Fig. 7, carriles 1 y 4), ni con el pSim (Fig. 7, carriles 5 y 8) lo que indica la pérdida total del pSim. La cepa CFNX105 (recA⁺) representativa del evento de deleción en el pSim (tipo II), tiene un nuevo plásmido de aproximadamente 390-kb. Esta cepa hibridizó con el pSim (Fig. 7, carril 6) y en lugar de tener las tres bandas de hibridización con nifH, sólo se observó una nueva banda de aproximadamente 20-kb (Fig. 7, carril 2). Estos datos indican que la deleción fue generada por una recombinación entre dos regiones nifH, muy similar a la encontrada en la cepa CFN42. Por otro lado, estos datos indican la existencia de un plásmido que tiene la misma movilidad electroforética que el pSim, el cual no había sido descrito.

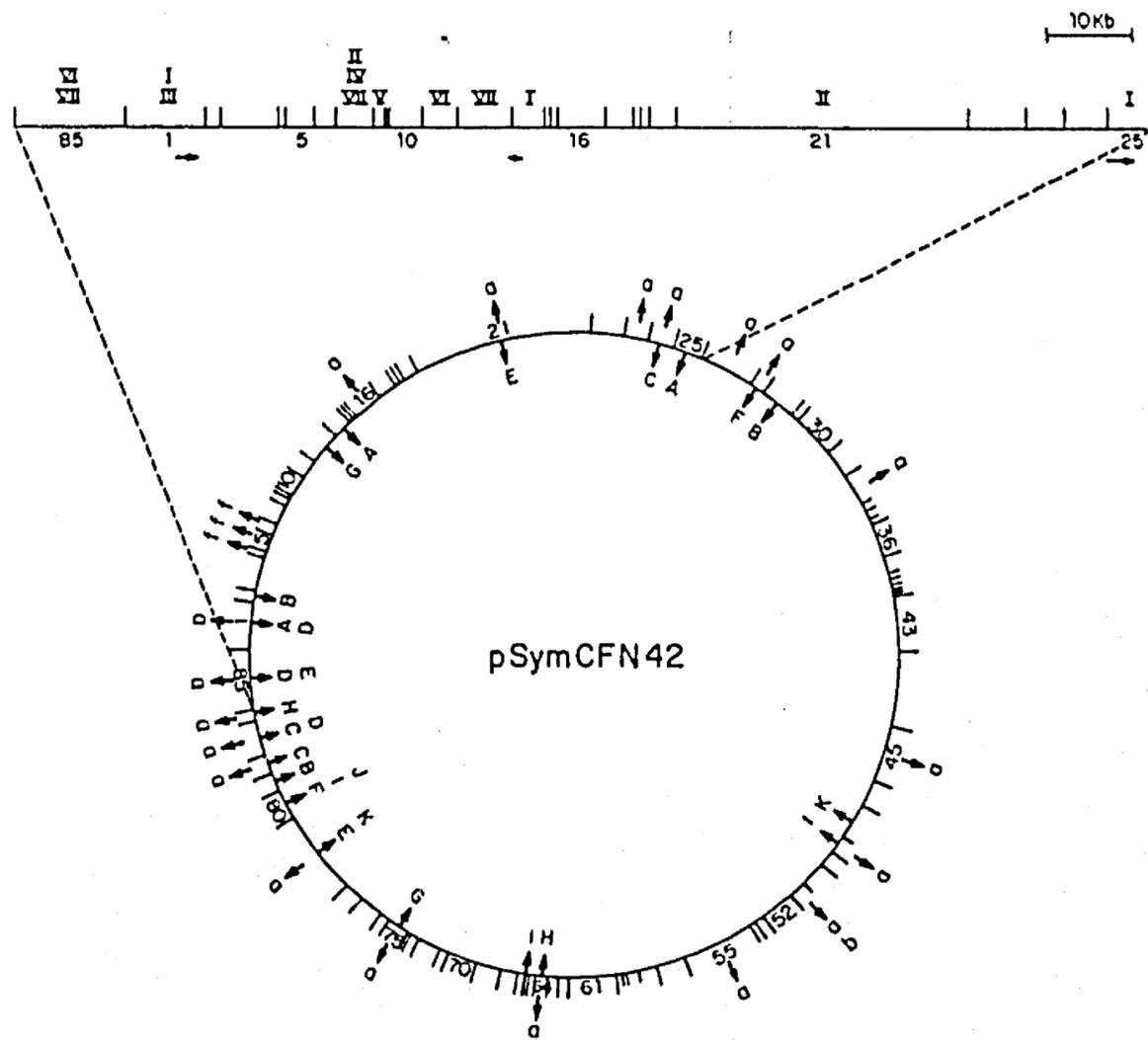


Figura 5. Localización de las diferentes familias reiteradas en el plásmido simbiótico.

Tomado de Girard, M.L. et al. (13).

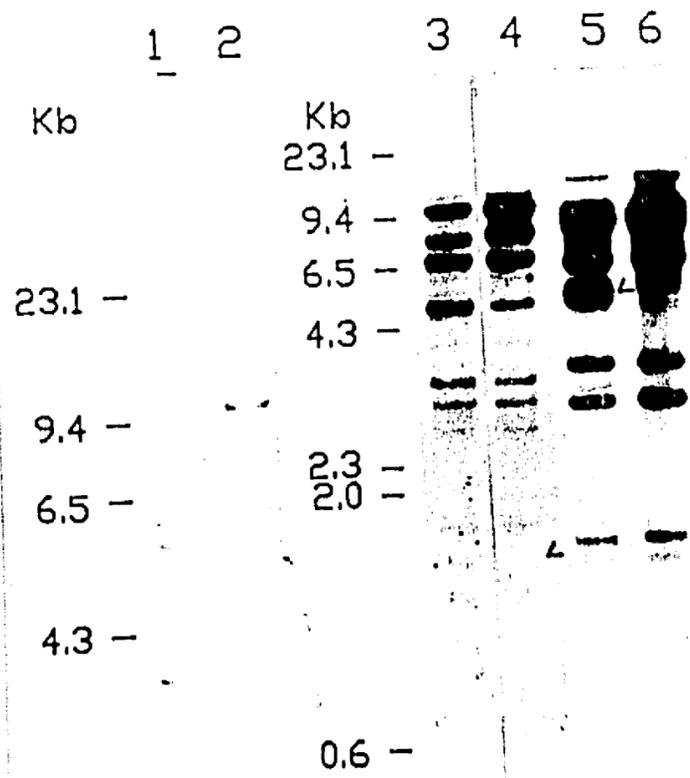


Figura 6.- Caracterización molecular del pSim de la cepa CFNX103. Autorradiografías de las hidridizaciones tipo Southern de los DNAs totales digeridos con BamHI e hibridizados contra los probadores nifH (carriles 1 y 2), cGD7 (carriles 3 y 4) y cGD45 (carriles 5 y 6). Carriles: 1, 2 y 3 , CFN42; 2, 4 y 6, CFNX103. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad (amortiguador de fosfatos, 62 C).

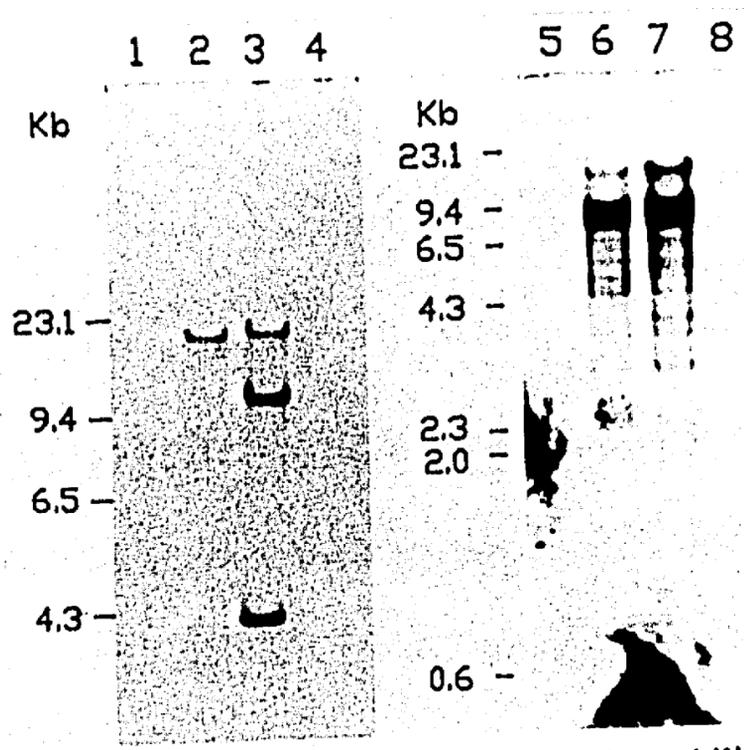


Figura 7. Caracterización molecular de los eventos de inestabilidad genómica de las cepas CFN285 y CFNX102 (recA). Autorradiografías de las hibridizaciones tipo Southern contra los probadores de nifH (carriles 1 a 4) y pSim285 (carriles 5 a 8). Carriles: 1 y 5, CFNX104; 2 y 6, CFNX105; 3 y 7, CFN285; 4 y 8, CFNX106.

c) Amplificación y delección de una región flanqueada por secuencias homólogas en el plásmido simbiótico.

En el laboratorio, David Romero construyó un sistema de selección positiva para diferentes tipos de rearrreglos genéticos como son, amplificaciones, delecciones, inserciones y curaciones de plásmidos (33). Este sistema consiste en un "cassette" (GDYN1) que contiene los genes *Spc'*/*Str'* *Km'*/*Gen'* y *sacRB*. El gen *Km'*/*Gen'* tiene la propiedad de responder a dosis génica. El gen *sacRB* codifica para la enzima levansacarasa, la cuál confiere sensibilidad a sacarosa en varias bacterias Gram-negativas. Con este sistema en la fue posible observar amplificaciones y delecciones en el pSim de la cepa CFN42 (33).

Se eligió al plásmido simbiótico (pSim) la cepa CFN42 para el estudio de los eventos de recombinación en las cepas *recA*⁺ y *recA*. La elección se debió a que el mapa de restricción del pSim es conocido y por que en esta cepa se han descrito eventos de inestabilidad genómica. Esta cepa tiene seis plásmidos denominados, p42a (170-kb), p42b (170-kb), p42c (270-kb), p42d o pSim (390-kb), p42e (510-kb) y p42f (630-kb). Para el estudio de la inestabilidad en el pSim de la cepa CFN42, David Romero construyó tres plásmidos en donde el "cassette" (GDYN1) fue insertado por reemplazamiento genético en cada una de las tres reiteraciones *nifH*, los plásmidos obtenidos se denominaron, pSimX4 (insertado en *nifHa*), pSimX5 (insertado en *nifHc*) y pSimX6 (insertado en *nifHb*).

Los plásmidos pSimX4, pSimX5 y pSimX6 se transfirieron a las cepas CFN2001 (*recA*⁺) y CFNX107 (*recA*⁻), derivadas de la cepa CFN42 que no tienen ni el pSim, ni el plásmido p42a. La transferencia del pSim se realizó sin ayuda de sistemas de movilización externos. El patrón plasmídico, así como los DNAs totales digeridos con *Bam*HI se

hibridizaron contra el probador de nifH. Se seleccionaron las clonas que contenían el pSim y el número de reiteraciones esperado y se denominaron: CFNX122 (CFN2001/pSimX4), CFNX123 (CFNX107/pSimX4), CFNX124 (CFN2001/pSimX5), CFNX125 (CFNX107/pSimX5), CFNX126 (CFN2001/pSimX6), y CFNX127 (CFNX107/pSimX6).

Las cepas anteriormente mencionadas fueron plateadas en PY conteniendo diferentes concentraciones de Km (15, 50 y 75 $\mu\text{g/ml}$) o con sacarosa al 12.5%. De la población resistente a sacarosa (12.5%) o a Km (75 $\mu\text{g/ml}$) se tomaron varias colonias y se analizaron a nivel molecular para saber si estas contenían amplificaciones o deleciones. El análisis molecular de las colonias consistió en observar el patrón plasmídico, así como la hibridización de éste y de DNAs totales digeridos con BamHI contra del probador de nifH. El probador del gen nifH (0.27-kb SalI de nifH) revela las reiteraciones nifH con la misma intensidad, ya que tienen la misma secuencia nucleotídica (31). En el caso de tener un plásmido simbiótico con alguna de regiones nifH amplificada, la intensidad de hibridización de las reiteraciones será diferente. Ejemplos de este análisis son mostrados en las Figuras 9, 10 y 11.

En la cepa CFNX122 (recA⁺/pSimX4, nifHa::GDYN1). De las cinco colonias resistentes a Km (75 $\mu\text{g/ml}$) analizadas, sólo una mostró un incremento en el peso molecular del pSim, mientras que en las cinco colonias sacarosa-resistentes analizadas, hay una deleción de aproximadamente 120-kb en el pSim. Esta deleción fue generada por una recombinación entre las regiones nifHa y nifHb. En la cepa CFNX123 (recA/pSimX4, nifHa::GDYN1), las seis colonias resistentes a Km (75 $\mu\text{g/ml}$) analizadas, tienen el pSim sin alguna alteración en el peso molecular, mientras que las cuatro clonas sacarosa-resistentes analizadas, mostraron la pérdida total del pSim.

Las seis clonas analizadas de la cepa CFNX126 (recA⁺/pSimX6, nifHb::GDYN1) resistentes a Km 75 µg/ml, tienen un incremento de tamaño en el pSim (Fig. 9A, carriles 4 a 9). DNAs totales digeridos con BamHI e hibridizados contra el probador de nifH muestran un incremento en la intensidad de dos bandas. La densitometría de las bandas corresponde a una intensidad de 5:1:5 (5 para la banda compuesta por los fragmentos nifHb-GDYM1 y 5'nifHb/3'nifHa-DGYN1; uno para la banda de nifHa; 5 para la banda de nifHc) y sugiere que el pSim tiene cinco veces la región de 120-kb (Fig. 10, carriles 4 y 5). Las clonas sacarosa resistentes de la cepa CFNX126, presentan una delección de 120-kb (Fig. 9A, carriles 1 y 2) que fue generada por una recombinación entre nifHa y nifHb (Fig. 10, carriles 1 y 2). En la cepa CFNX127 (recA/pSimX6, nifHb::GDYN1) las seis colonias resistentes a Km (75 µg/ml) analizadas, no tienen alteración en el tamaño del pSim (Fig. 9B, carriles 5 a 10) y tampoco muestran una intensidad diferente en las regiones nifH (Fig. 10, carriles 10 y 11). Las colonias sacarosa-resistentes de la cepa CFNX127 analizadas, perdieron el pSim (Fig. 9B, carriles 1 a 3 y Fig. 10, carriles 6 a 8).

En la cepa CFNX124 (recA⁺/pSimX5, nifHc::GDYN1), de las seis colonias resistentes a Km (75 µg/ml) analizadas, todas tienen un incremento de peso molecular en el pSim. DNAs totales digeridos con BamHI mostraron cuatro bandas de hibridización con el probador nifH. La densitometría de las bandas revela una intensidad de 5:1:1:4 (cinco para la banda nifHc::GDYN1 : una para la banda nifHa : una para la banda nifHb : cuatro para la banda 5'nifHa/3'nifHb) que corresponde a un pSim con cinco copias de la región de 120-kb (Fig. 11). Las clonas sacarosa-resistentes de la cepa CFNX124 tienen una delección de 120-kb que es el producto de la recombinación entre las regiones de nifHa y nifHb (Fig. 11, carriles 1 y 2). Las colonias resistentes a Km (75 µg/ml) de la cepa CFNX125

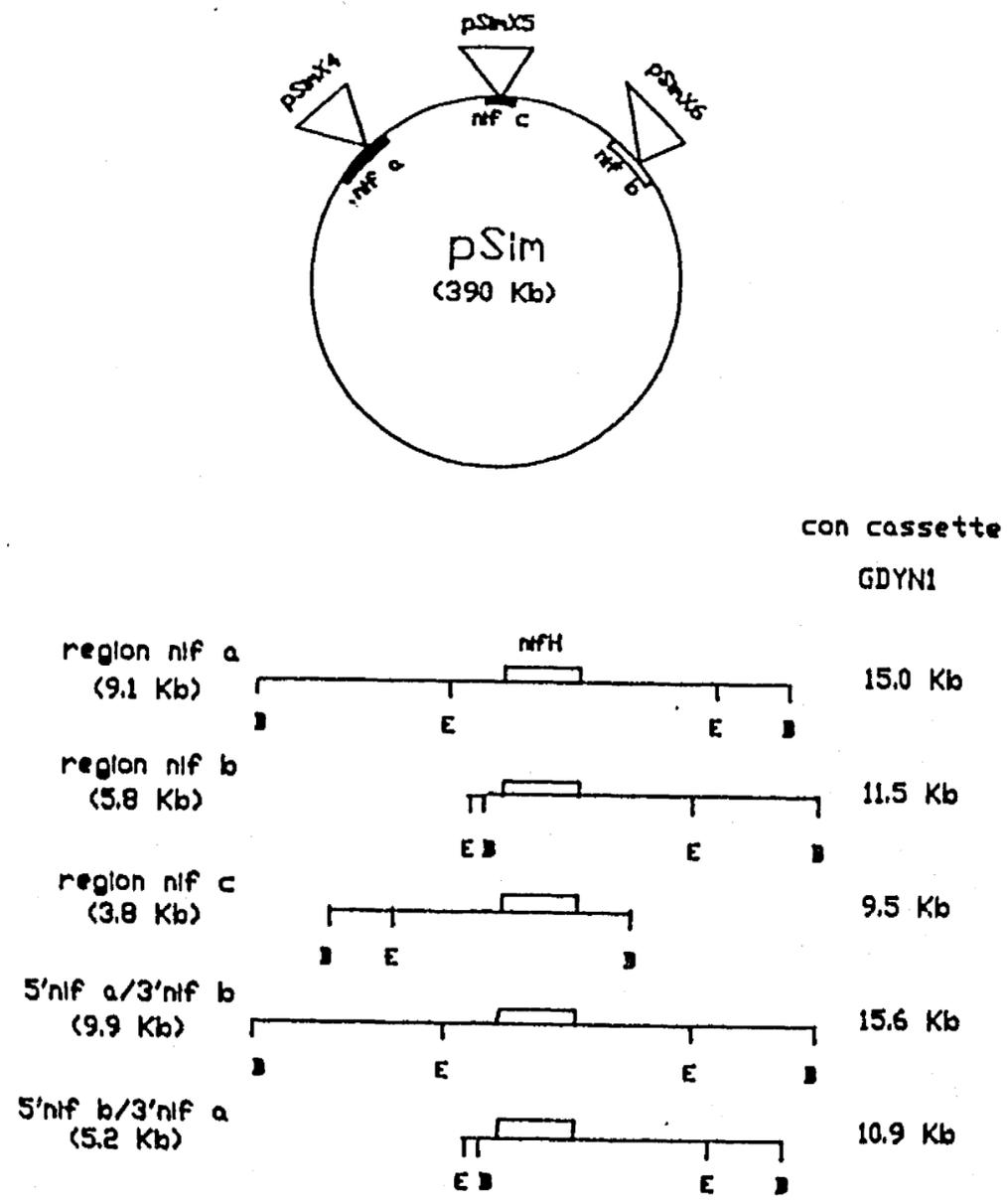


Figura 8.- Diagrama esquemático de las inserciones del GDYN1 en el plásmido simbiótico (parte superior). Mapa de restricción de las regiones *nifHa*, *nifHb*, y *nifHc*, así como los pesos moleculares de los productos de recombinación entre las regiones *nifHa* y *nifHb* (parte inferior). A la derecha se muestran los pesos moleculares de cada región con la inserción del GDYN1.

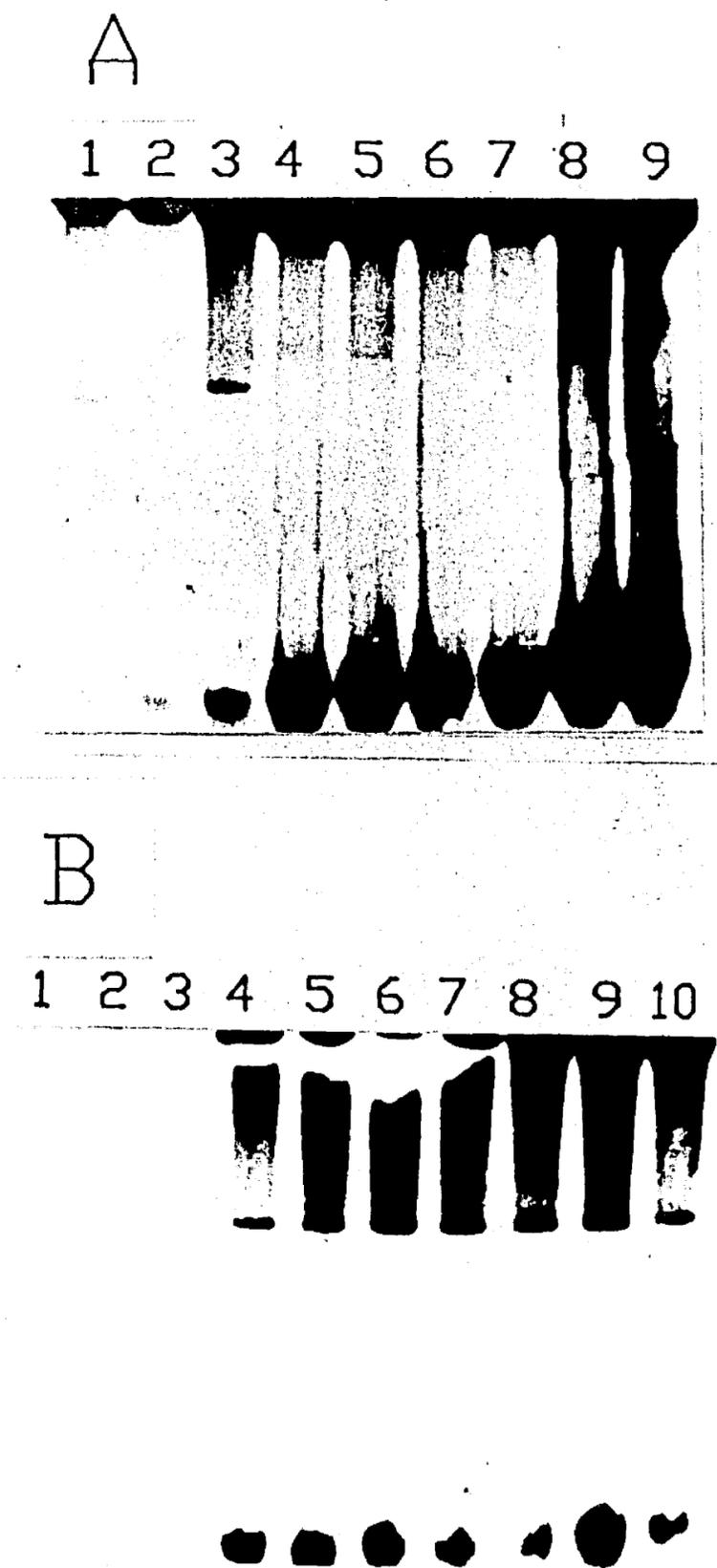


Figura 9.- Autorradiografía del patrón plasmídico de las clonas conteniendo el pSimX6 hibridizado con el probador de *nifH*. (A) clonas en fondo genético *recA*⁺. Carriles: 1,CFNX126 del1; 2, CFNX126 del2; 3, CFNX126; 4, CFNX126 Km1; 5, CFNX126 Km2; 6, CFNX126 Km3; 7, CFNX126 Km4; 8, CFNX126 Km5; 9, CFNX126 Km6. (B) clonas en fondo genético *recA*⁻. Carriles: 1, CFNX127 cur1; 2, CFNX127 cur2; 3, CFNX127 cur3; 4, CFNX127; 5, CFNX127 Km1; 6, CFNX127 Km2; 7, CFNX127 Km3; 8, CFNX127 Km4; 9, CFNX127 Km5; 10, CFNX127 Km6. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad (amortiguador de fosfatos, 65°C).

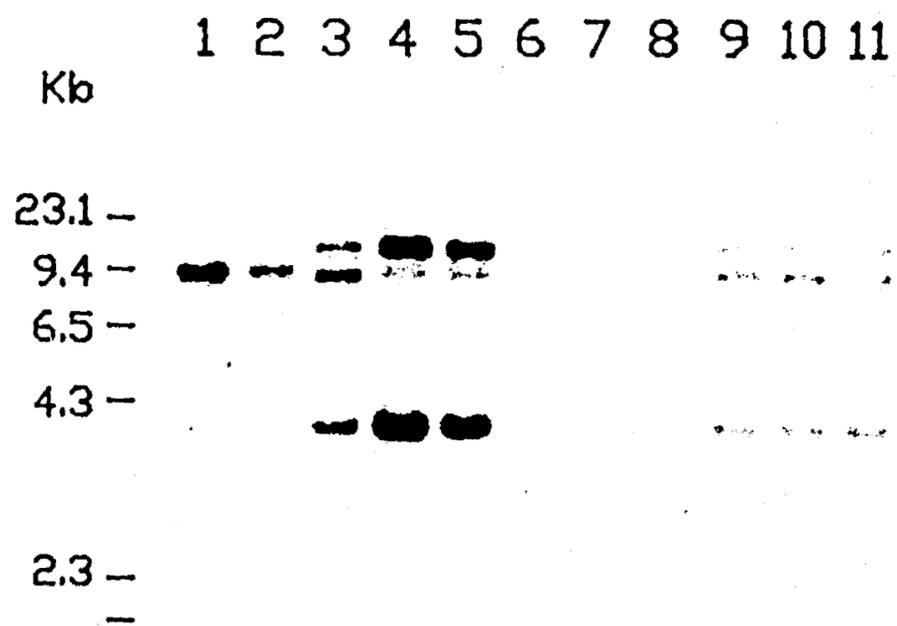


Figura 10.- Autorradiografía de la hibridización de los DNAs totales digeridos con BamHI de clonas conteniendo el pSimX6 e hibridizados con el probador de nifH (0.27kb-SalI de nifH). Carriles 1, CFNX126 del1; 2, CFNX126 del2; 3, CFNX126; 4, CFNX126 Km1; 5, CFNX126 Km2; 6, CFNX127 cur1; 7, CFNX127 cur2; 8, CFNX127 cur3; 9, CFNX127; 10, CFNX127 Km1; 11, CFNX127 Km2. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad (amortiguador de fosfatos, a 65°C).

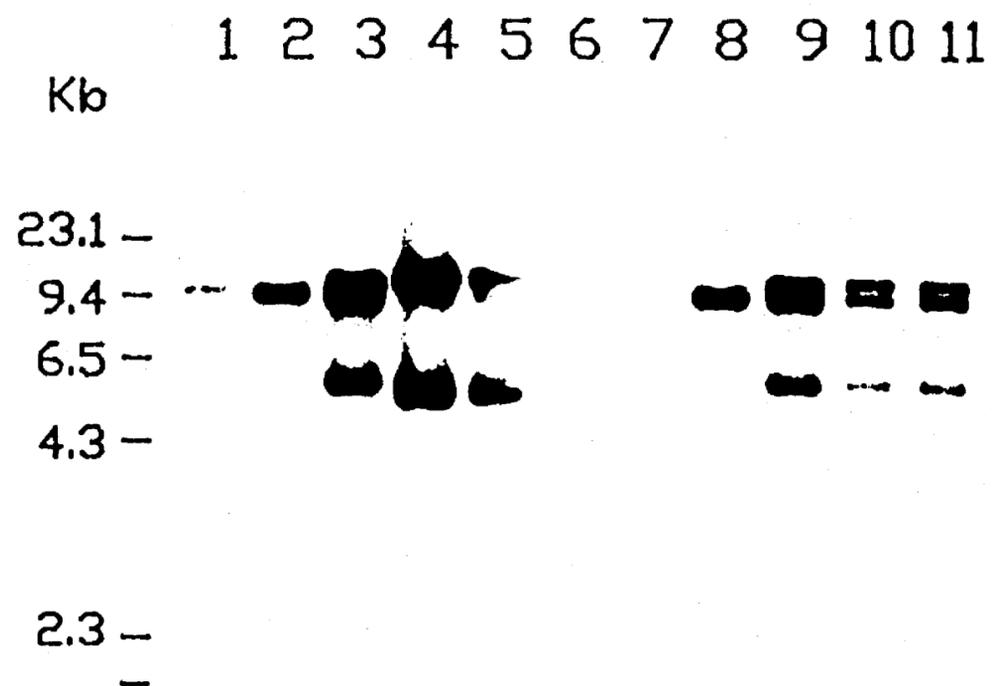


Figura 11.- Autorradiografía de la hibridización de los DNAs totales de clones conteniendo el pSimX5 digeridos con *Bam*HI e hibridizados con el probador de *nifH* (0.27kb-*Sal*I de *nifH*). Carriles: 1, CFNX124 del1; 2, CFNX124 del2; 3, CFNX124; 4, CFNX124 Km1; 5, CFNX124 Km2; 6, CFNX125 cur1; 7, CFNX125 cur2; 8, CFNX125 del1; 9, CFNX125; 10, CFNX125 Km1; 11, CFNX125 Km2. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad (amortiguador de fosfatos a 65°C).

Tabla 4. Frecuencia de Amplificaciones, deleciones y pérdida total del plásmido simbiótico de la cepa CFN42.

evento (selección)		cepa		
		CFNX4 (<u>nifHa</u> ::GDYM1)	CFNX5 (<u>nifHc</u> ::GDYM1)	CFNX6 (<u>nifHb</u> ::GDYM1)
Amplif. (Km75)	w.t	1.1×10^{-4}	7.6×10^{-4}	3.7×10^{-4}
	<u>recA</u>	$>7.4 \times 10^{-6}$	$>3.3 \times 10^{-6}$	$>3.4 \times 10^{-6}$
Delec. (Sac 12.5%)	w.t	4.0×10^{-4}	6.0×10^{-4}	3.1×10^{-4}
	<u>recA</u>	$>3.8 \times 10^{-5}$	1.0×10^{-5}	$>1.4 \times 10^{-5}$
Curación (Sac 12.5%)	<u>recA</u>	3.8×10^{-5}	2.0×10^{-5}	1.4×10^{-5}

(recA/pSimX5) analizadas, no muestran un aumento en el tamaño del pSim y la intensidad de las bandas de hibridización con el probador nifH son muy similares (Fig. 11, carriles 10 y 11). De las colonias sacarosa-resistentes de la cepa CFNX125 (recA/pSimX5) analizadas, sólo una de ellas mostró un deleción en el pSim. La deleción ocurrió por la recombinación entre las regiones nifHa y nifHb (Fig. 11, carril 8), todas las demás colonias mostraron la pérdida total del pSim (Fig. 11, carriles 6 y 7).

Con las frecuencias de formación de las colonias en los diferentes medios y la fracción que estas presentaron un evento molecular, podemos deducir la frecuencia aproximada con la que ocurren los eventos de amplificación, deleción y curación (Tabla 4). La amplificación y deleción de la región de 120-kb ocurrió por la recombinación entre las regiones nifHa y nifHb, éstos eventos aparecen con una frecuencia de 10^{-4} en las células silvestes. La amplificación de la región en la mutante recA::Spc^r no fue observada. La

delección de la región de 120-kb en la mutante *recA::Spc^r*, sólo fue observada en el plásmido pSimX5 (*nifHc::GDYN1*), ésta aparece con una frecuencia de 1.0×10^{-5} (60 veces menor a la de la cepa *recA⁺*) (Tabla 4). La curación del pSim sólo fue observada en la cepa *recA::Spc^r* a una frecuencia de 2×10^{-5} .

d) Formación de cointegrados entre plásmidos grandes durante la conjugación.

La transferencia del pSim de la cepa CFN42 de *R. phaseoli* a una alta frecuencia (10^{-3}) se ha logrado, por la introducción de la región de movilización contenida en un transposón y la complementación *in trans* de los genes de la transferencia. En el laboratorio S. Brom utilizando estos sistemas, observó que el plásmido p42a de la CFN42 podría incrementar la transferencia del pSim. En los experimentos siguientes se describe la transferencia del pSim en ausencia de sistemas de conjugación externos al *Rhizobium*. Además, se evaluó la participación del plásmido p42a en la transferencia. Por otro lado, durante la transferencia del pSim, varios rearrreglos moleculares fueron observados. La participación del gen *recA* en estos rearrreglos fue analizada.

Los plásmidos usados para los experimentos de conjugación fueron construidos en la cepa CFN42 por David Romero. En estos plásmidos el "cassette" GDYN1 fue insertado por reemplazamiento genético en cada una de las regiones *nifH* del pSim (pSimX4, pSimX5 y pSimX6) (ver Fig. 8). Las tres diferentes construcciones presentaron un comportamiento idéntico en los experimentos de transferencia del pSim por conjugación, en base a esto presentaré sólo los datos con el plásmido pSimX5, como representativo de ellos.

El plásmido pSimX5 de la cepa CFNX5 (CFN42/pSimX5) fue transferido a las cepas CFN2001 (derivada de la CFN42, sin el pSim ni el p42a) y CFNX107 (derivada de la CFN2001, *recA::Spc'*). Las exconjugantes fueron seleccionadas en PY Rif(50µg/ml) Km (15 µg/ml), y contraseleccionadas para *Spc'* y sacarosa-sensibles. La frecuencia de transferencia fue de 1×10^{-6} exconjugantes por célula donadora.

El análisis del patrón plasmídico de las exconjugantes, reveló 3 patrones diferentes (Fig. 12): Patrón I, tiene los cuatro plásmidos de la CFN2001 (p42b, p42c, p42e y p42f) y el pSimX5 (p42d); patrón II, tiene los cuatro plásmidos de la CFN2001, el pSimX5 y otro plásmido que migra a nivel del p42b; patrón III, tiene los cuatro plásmidos de la CFN2001 y un plásmido que migra a nivel del p42f. La hibridización tipo Southern de los patrones plasmídicos contra los probadores *nifH*, p42a, p42b, p42c, y pSim, mostraron que; en el patrón I, sólo se transfirió el pSim (Fig. 12, carril 4); en el patrón II, el plásmido que migra a nivel del p42b corresponde al p42a (Fig. 12, carril 2); en el patrón III, el plásmido que migra a nivel del p42f, hibridizó con los probadores *nifH*, p42a y p42d (Fig. 12, carriles 1,3,7,8,9 y Fig. 13). Estas hibridizaciones indican que el plásmido que migra a nivel del p42f es un cointegrado entre los plásmidos pSim y p42a (el tamaño del cointegrado es de aproximadamente 560-kb).

En la Tabla 5 se muestran los porcentajes obtenidos de cada uno de los patrones. El alto porcentaje de co-transferencia de los plásmidos pSimX5 y p42a, así como el alto porcentaje de cointegrados entre el pSimX5 y el p42a, sugieren fuertemente que el p42a tiene una importante participación en la transferencia.

Tabla 5. Frecuencia de transferencia de los diferentes patrones plasmídicos ^a.

Tipo de transferencia	Patrón I (pSimX5)	Patrón II (pSimX5 + pA)	Patrón III (pSimX5::pA)
<u>recA</u> ⁺ a <u>recA</u> ⁺	10.7% (3/28)	46.4% (13/28)	42.8% (12/28)
<u>recA</u> ⁺ a <u>recA</u>	5.5% (2/36)	53.7% (19/36)	41.6% (15/36)
<u>recA</u> a <u>recA</u>	3.7% (1/27)	37.0% (10/27)	61.5% (16/27)

^a promedio de 3 o 4 experimentos.

Se analizó el efecto del p42a en la transferencia del pSim, así como la participación del gene recA en la formación de los cointegrados durante la transferencia. Las cepas CFNX109 (recA/pSimX5) y CFNX112 (recA/pSimX5 p42a), fueron utilizadas como donadoras de la transferencia, mientras que la cepa CFNX108 (recA Ery^r) fue utilizada como receptora. La frecuencia de transferencia del pSimX5 en presencia del p42a fue de 5×10^{-7} exconjugantes por donadora, mientras que en ausencia del p42a no la observamos ($> 1 \times 10^{-9}$ por donadora). Los porcentajes de los diferentes patrones plasmídicos en ausencia de RecA, no son afectados (Tabla 5).

Se analizaron a nivel molecular siete cepas que contenían un cointegrado pSimX5::p42a. Las cepas seleccionadas fueron las siguientes. En la cepa CFNX114, el cointegrado fue obtenido de una cruce en donde ambas células fueron recA⁺. En las cepas CFNX115, CFNX116 y CFNX120, los cointegrados fueron obtenidos de una cruce donde la donadora fue recA⁺ y la receptora fue recA. Los cointegrados de las cepas CFNX117, CFNX118 y CFNX119, fueron obtenidos de una cruce donde ambas células fueron recA. Los plásmidos fueron denominados como pSim y el número de la cepa, por ejemplo, cepa

CFNX115 tiene el cointegrado pSimX115.

En la Fig. 16 se muestra el patrón plasmídico de las cepas, así como su hibridización contra el pSim y el p42a. En las cepas CFNX114, CFNX115, CFNX116, CFNX117, CFNX118 y CFNX119, el pSim y el p42a hibridizaron con un plásmido que migra a nivel del p42f (tamaño aproximado de 560-kb). En la cepa CFNX120, el pSim y p42a hibridizaron con un plásmido que migra entre el pSim y el p42c (tamaño aproximado de 290-kb).

Hibridizaciones tipo Southern usando el probador nifH, mostraron que las cepas CFNX114, CFNX115, CFNX116, CFNX117 y CFNX118 tienen el mismo patrón de reiteraciones nifH que la cepa parental (CFNX5). El pSimX119, tiene tres reiteraciones nifH, pero la reiteración nifHa no está presente, en cambio, apareció una nueva banda de 6.6-kb que hibridizó con nifH (Fig. 14, carril 7). El pSimX120, tiene sólo dos reiteraciones nifH, una ellas (9.5-kb) corresponde al fragmento nifHc::GDYN1, mientras que la otra (5.2-kb) corresponde un fragmento híbrido formado por los extremos 5'nifHb/3'nifHa (Fig. 14, carril 8).

En un intento por determinar el punto de recombinación en la formación de los cointegrados, los DNAs totales de las cepas digeridos con BamHI fueron hibridizados contra los 11 cósmidos que cubren todo el pSim de la CFN42 y las 19 bandas del pSim que tienen reiteraciones con el p42a (ver Fig. 4 y 5). El análisis de las autorradiografías de las hibridizaciones contra los diferentes probadores (Fig. 14 a 19), revelaron cuatro tipos de cointegrados diferentes.

Patrón A, encontrado en los pSimX114, pSimX115. Estos plásmidos comparados con el pSimX5 y p42a, no mostraron cambios en los patrones de restricción. Posiblemente porque

el punto de recombinación ocurrió entre fragmentos de un mismo peso molecular.

Patrón B, representado por los plásmidos pSimX116 y pSimX117, pSimX118. Estos plásmidos comparados contra el pSimX5 y p42a mostraron varios cambios. a) la banda 16 (6.0-kb) del pSim y otra banda de 13-kb con la cuál hibridiza y que se localiza en el p42a, incrementaron de tamaño (6.6 y 13-kb) (Fig. 15 y 18), b) la banda 83 (7.5-kb) del pSim revela una banda reiterada de 13-kb que desaparece y parece generar una nueva banda de 6.6-kb (Fig. 19, carriles 3, 6 y 8). Estos eventos nos sugieren, que estos cointegrados fueron generados por más de un evento de recombinación.

Patrón C, encontrado en el pSimX119. En este cointegrado ocurrieron los cambios siguientes: a) la banda 1 (9.1-kb) que contiene la región nifHa desaparece y aparecen dos nuevas bandas de 5.4-kb y 6.6-kb (Fig. 17, carril 7), siendo la de 6.6-kb homóloga a nifH (Fig. 14, carril 7), b) la banda 79 (17-kb) del pSim desaparece y aparece una banda de 15-kb (Fig. 16, carril 7)). En este plásmido el cointegrado parece haberse generado por dos eventos de recombinación, uno de ellos involucró el cambio en la región de nifHa.

Patrón D, encontrado en el pSimX120. Este cointegrado mostró los siguientes cambios: a) en la banda 16 (6.0-kb) del pSim y en la banda de 13-kb del p42a los cambios fueron idénticos a los observados en los cointegrados del patrón B (pSimX116, pSimX117 y pSimX118), b) la pérdida de la región de los cósmidos cGD103, cGD170, cGD51, cGD179, y cGD47 (región de 270-kb que no incluye los genes nod y fix), c) la desaparición de las regiones nifHa y nifHb, estos fragmentos generaron un fragmento de 5.2-kb (5'nifHb/3'nifHa). Este cointegrado esta formado por el p42a y la región de 120-kb del pSim que contiene los genes de nodulación y fijación de nitrógeno.

Se analizó el patrón plasmídico de 25 colonias de las cepas CFNX114 (recA⁺/pSimX114), CFNX116 (recA/pSimX116) y CFNX118 (recA Ery^r/pSim118). En ninguna de las colonias se observó un cambio en el patrón plasmídico (datos no mostrados), sugiriendo que los cointegrados son relativamente estables. Por otro lado, sólo el plásmido pSimX120 fue incapaz de formar nodulos en Phaseolus vulgaris, este dato sugiere que en la región de 270-kb hay algún gen de nodulación.

Con los datos anteriores indican que el pSim se tranfiere a una muy baja frecuencia y requiere del p42a para la transferencia. Es posible que el pSim no contenga los genes de la transferencia y que estos son complementados por el p42a. La formación de cointegrados entre el pSim y p42a ocurre muy frecuentemente en la transferencia del pSim y que ésta es indepediente del gen recA. El análisis de los cointegrados mostró cuatro diferentes tipos de cointegrados, los cuales fueron generados por uno o más eventos de recombinación. En algunos casos se observó la clara participación de secuencias reiteradas, por ejemplo, la delección de la región de 270-kb del pSim en el pSimX120 es mediada por las regiones nifHa y nifHb o en el rearrreglo observado en el pSimX119, en donde la región de nifHa fue alterada. Algunos rearrreglos observados en los cointegrados fueron obtenidos durante la transferencia en ausencia de la proteína RecA, esto sugiere que éstos eventos son independientes de RecA. Por otro lado, es difícil decir si hay uno o más sitios para la generación de los cointegrados. Sin embargo, en algunos plásmidos es claro observar más de un evento de recombinación, los cuáles puede ser dados por secuencias repetidas o bien por eventos de recombinación que no requieren de homología.

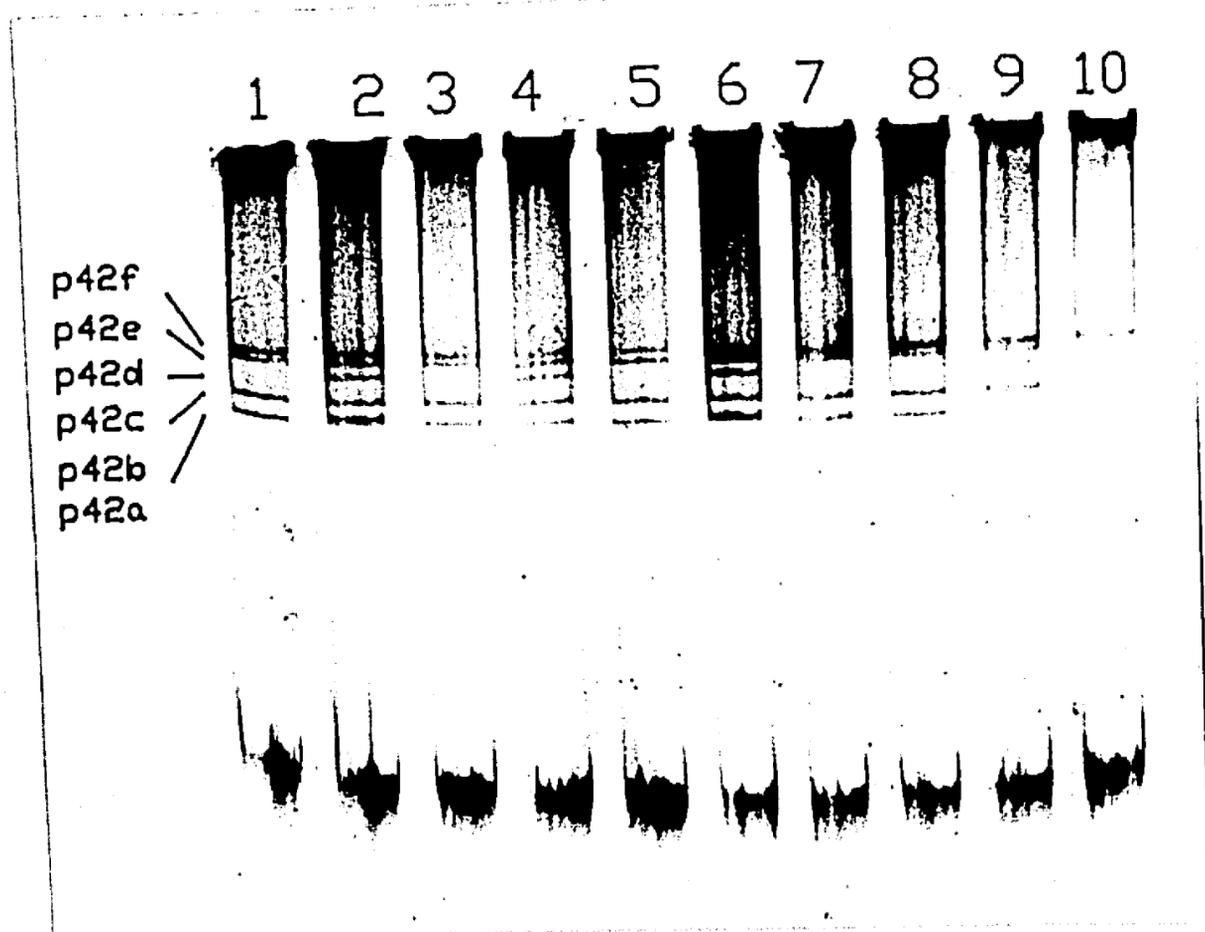


Figura 12.- Visualización del patrón plasmídico con Bromuro de etidio de algunas clonas exconjugantes de *R. phaseoli*. Carriles: 1 a 4 y 7 a 10, exconjugantes de una cruce CFNX5 y CFNX107; 5, CFNX107; 6, CFNX5.

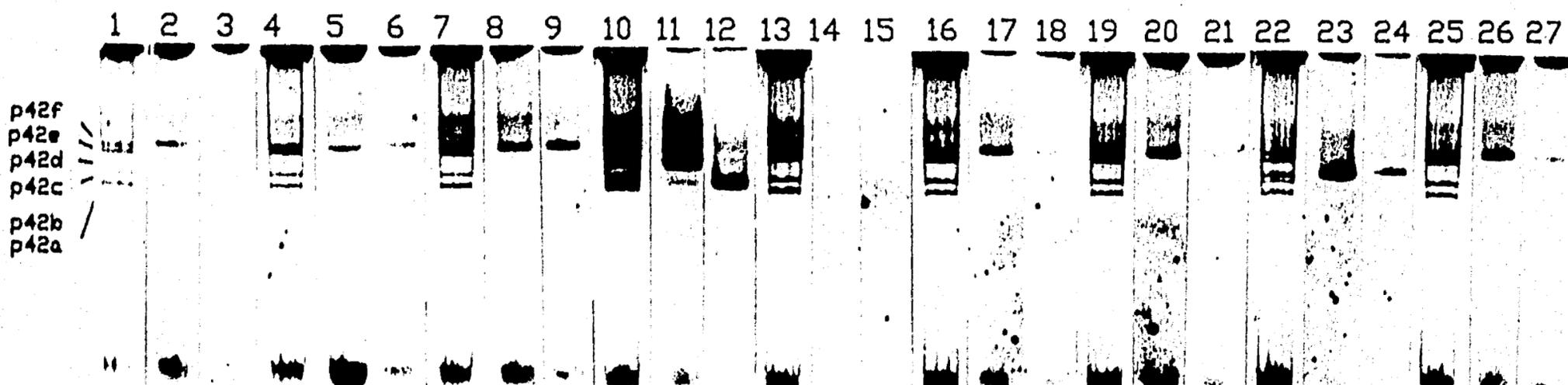


Figura 13.- Análisis del patrón plasmídico e hibridización con los probadores pSim42 y p42a de las cepas CFNX114 (1 a 3); CFNX115 (4 a 6); CFNX116 (7 a 9); CFNX5 (10 a 12); CFNX107 (13 a 15); CFNX117 (16 a 18); CFNX119 (19 a 21); CFNX120 (22 a 14); CFNX118 (25 a 27). Patrón de plásmidos teñidos con bromuro de etidio (1,4,7,10,13,16,19,22,25). Autorradiografía de la hibridización con el pSim42 (2,5,8,11,14,17,20,23,26) y con el p42a (3,6,9,12,15,18,21,24,27). Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad (amortiguador de fosfatos, 65°C).

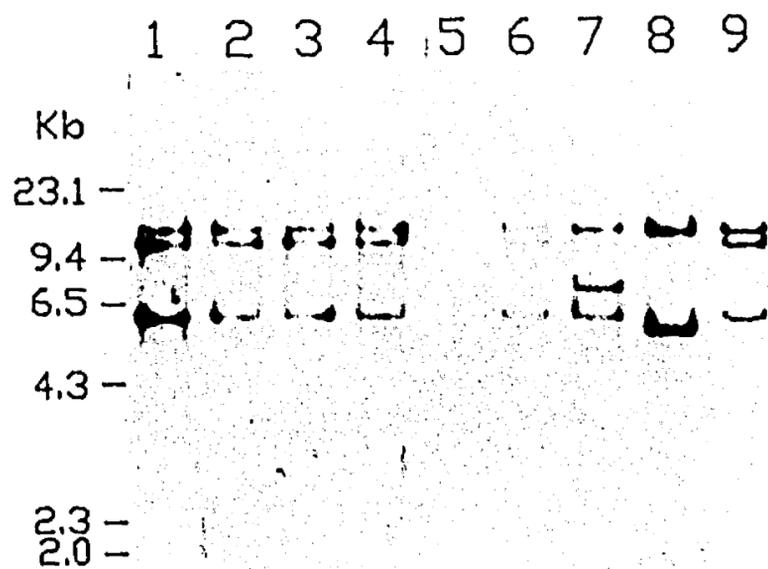


Figura 14.- Autorradiografía de la hibridización tipo Southern de los DNAs totales digeridos con BamHI e hibridizados con el probador de nifH (0.27kb-SalI de nifH). Carriles: 1, CFNX114; 2, CFNX115; 3, CFNX116; 4, CFNX5; 5, CFNX107; 6, CFNX117; 7, CFNX119; 8, CFNX120; 9, CFNX118. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad (amortiguador de fosfatos, 65°C).

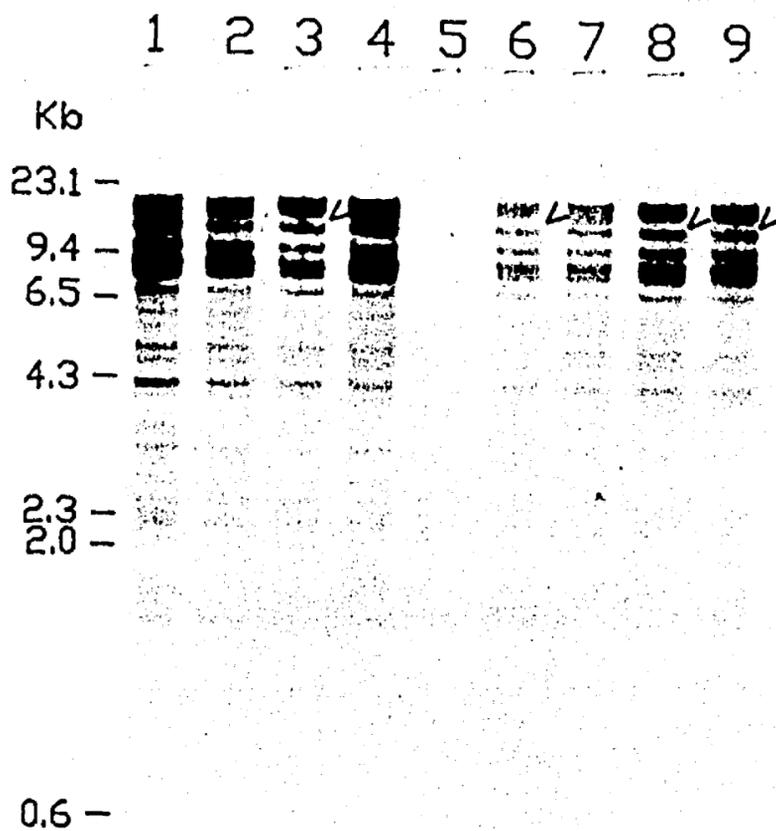


Figura 15.- Autorradiografía de la hibridización tipo Southern de los DNAs totales digeridos con BamHI e hibridizados con el probador p42a. Carriles: 1, CFNX114; 2, CFNX115; 3, CFNX116; 4, CFNX5; 5, CFNX107; 6, CFNX117; 7, CFNX119; 8, CFNX120; 9, CFNX118. La flecha señala la desaparición de una banda. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad (amortiguador de fosfatos, 65°C).

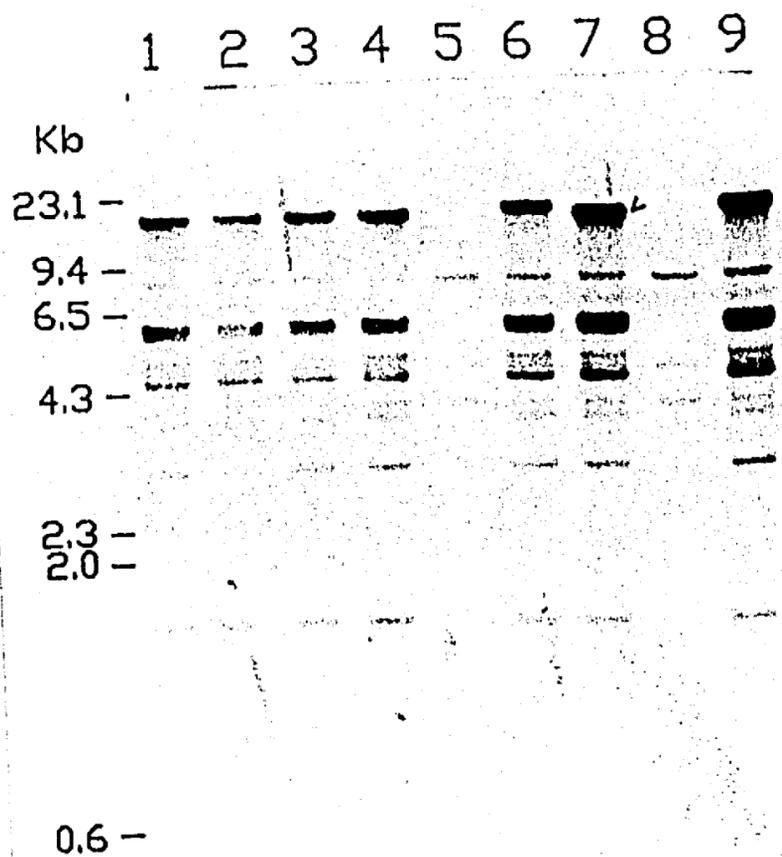


Figura 16.- Autorradiografía de la hibridización tipo Southern de los DNAs totales digeridos con BamHI e hibridizados con el probador cGD47. Carriles: 1, CFNX114; 2, CFNX115; 3, CFNX116; 4, CFNX5; 5, CFNX107; 6, CFNX117; 7, CFNX119; 8, CFNX120; 9, CFNX118. La flecha señala el cambio de una banda. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad (amortiguador de fosfatos, 65°C).

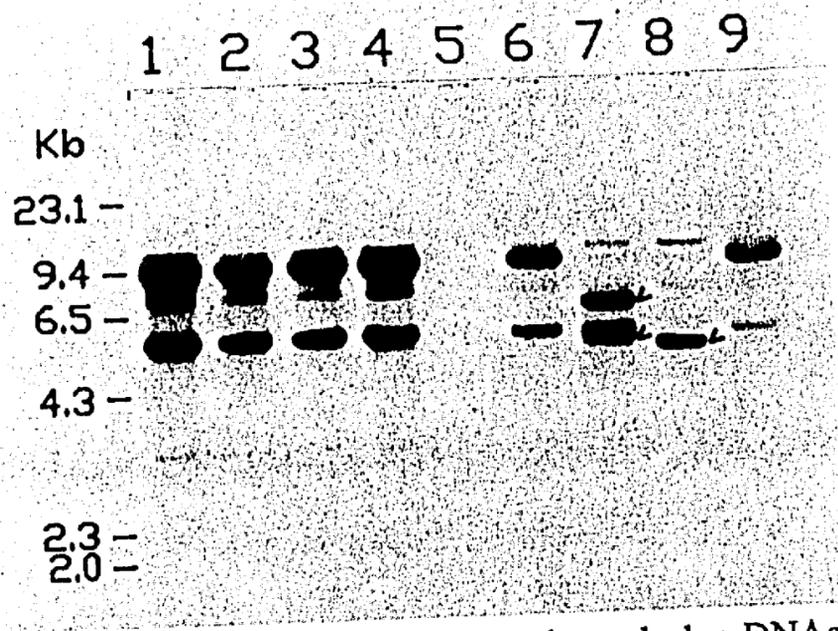


Figura 17.- Autorradiografía de la hibridización tipo Southern de los DNAs totales digeridos con BamHI e hibridizados con el probador banda 1 del pSim42. Carriles: 1, CFNX114; 2, CFNX115; 3, CFNX116; 4, CFNX5; 5, CFNX107; 6, CFNX117; 7, CFNX119; 8, CFNX120; 9, CFNX118. Las flechas señalan la aparición o desaparición de bandas. Las bandas de mayor señal corresponden a las regiones nifHa y nifHb, y la banda superior de baja señal corresponde a la región nifHc::GDYN1. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad.

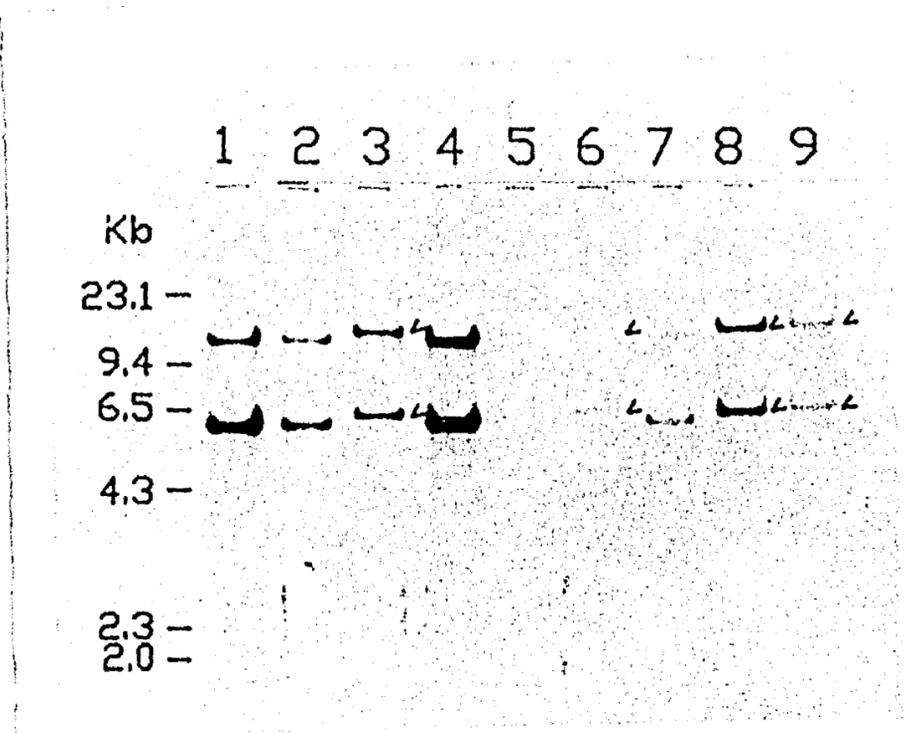


Figura 18.- Autorradiografía de la hibridización tipo Southern de los DNAs totales digeridos con BamHI e hibridizados con el probador banda 16 del pSim42. Carriles: 1, CFNX114; 2, CFNX115; 3, CFNX116; 4, CFNX5; 5, CFNX107; 6, CFNX117; 7, CFNX119; 8, CFNX120; 9, CFNX118. La flechas señalan los cambios en las bandas. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad.

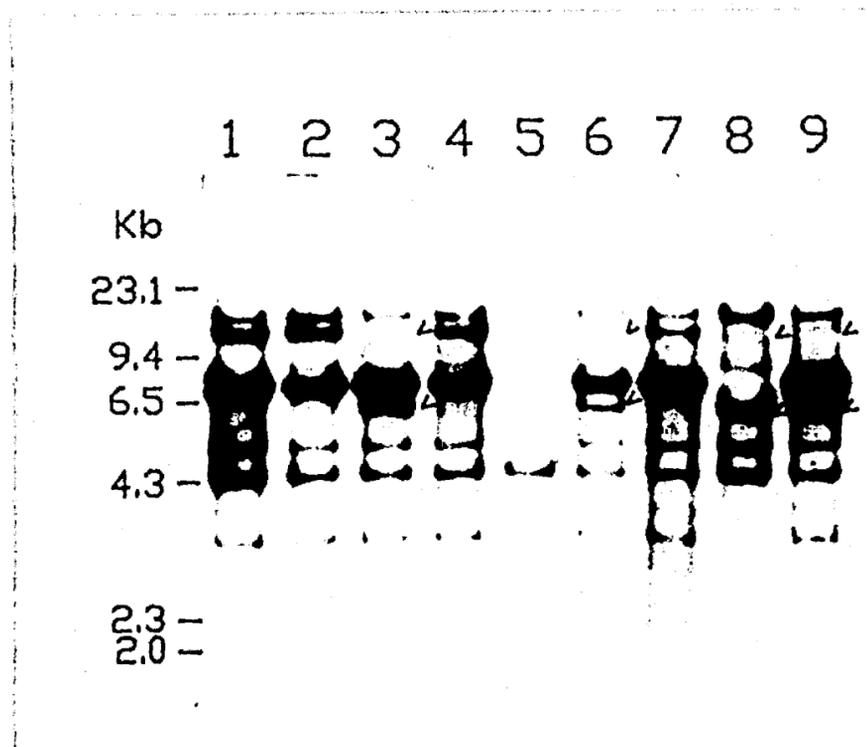


Figura 19.- Autorradiografía de la hibridización tipo Southern de los DNAs totales digeridos con BamHI e hibridizados con el probador banda 83 del pSim42. Carriles: 1, CFNX114; 2, CFNX115; 3, CFNX116; 4, CFNX5; 5, CFNX107; 6, CFNX117; 7, CFNX119; 8, CFNX120; 9, CFNX118. Las flechas muestran los cambios observados. Las condiciones de hibridización fueron de alta severidad.

DISCUSION

En la presente tesis se describen algunos estudios de la inestabilidad del genoma de *R. phaseoli* y su dependencia por el gen *recA*. Como primera etapa, se clonó y caracterizó el gen *recA*, así como la construcción varias cepas con la mutación *recA::Spc^r*. En la segunda etapa, se analizó la participación del gen *recA* en la recombinación de plásmidos pequeños y grandes. Los eventos de recombinación de plásmidos grandes fueron enfocados al plásmido simbiótico.

El gen *recA* fue clonado por complementación del fenotipo Fec del bacteriófago lambda. El gen clonado en la cepa de *E. coli* HB101 fue capaz de restaurar la resistencia a agentes que dañan el DNA (luz UV, nitrofurantoina y metil-metanosulfonato), y de complementar la recombinación conjugacional y transduccional. Se obtuvo el mapa de restricción y la localización del gen *recA* en la región clonada, esto permitió seleccionar el sitio de restricción para inactivar el gen.

El plásmido pMS26 se construyó para facilitar la homogenización del gen *recA*. Este plásmido tiene interrumpido el gen *recA* con un fragmento que confiere la resistencia a Spc y dentro del vehículo, el "cassette" GDYN1 que contiene los genes *sacRB* que permiten la selección positiva de su pérdida. El plásmido pMS26 fue muy útil para obtener cepas de *R. phaseoli* con la mutación *recA::Spc^r*. Las cepas elegidas (CFN42, CFN285, CFN2370 y CFN299) para la mutágenesis dirigida son cercanas filogenéticamente, pero presentaron un polimorfismo en la región del gen *recA*. En el caso, de las cepas CFN42 y CFN299, la homología fue menor que entre las otras cepas. La baja homología causó una disminución en la frecuencia de inserción y excisión del pMS26. La inserción del pMS26 en diferentes fragmentos, así como la excisión incompleta del pMS26 puede deberse a la baja homología

entre las dos regiones recA. Sin embargo, con este método fue posible obtener mutantes recA en la cepa CFN299.

En la recombinante sencilla CFN299::pMS26C1, se observó una alta frecuencia de pérdida del vehículo (sacarosa-resistentes). La inestabilidad puede ser debida a un rearrreglo dentro del pMS26 que acercó dos secuencias repetidas o a la formación de una proteína RecA híbrida con mayor capacidad en recombinación. Sin embargo, la frecuencia de recombinación medida con el plásmido pBX404-7 de las cepas CFN299 y CFN299::pMS26C1, fueron idénticas, lo cual descarta la opción de la proteína híbrida hiperrecombinante. Las cepas recA::Spc^r derivadas de la cepa CFN299::pMS26C1 fueron generadas por una excisión parcial del vehículo, la permanencia de algunas regiones del pMS26 no afectaron el fenotipo RecA⁺.

Cabe mencionar que el sistema de selección positiva utilizado facilitó la construcción de las mutantes recA. En sistemas en donde no hay una selección positiva para la pérdida del vector y con regiones 100% homólogas, la frecuencia de dobles recombinantes es del 1% con respecto a las recombinantes sencillas. Sin embargo, en sistemas en donde la región de homología es menor del 100%, la frecuencia de obtención de recombinantes sencillas disminuye notablemente, la cual reduce la frecuencia de obtención de doble recombinantes.

Las cepas de R. phaseoli recA::Spc^r construidas, fueron muy sensibles a los agentes mutagénicos nitrofurantoina y MMS. En las mutantes recA la frecuencia de recombinación (medida como la restauración del gen Km del plásmido pBX404-7) disminuyó 100 veces con respecto a la cepa parental. Con este sistema, las mutantes recA de E. coli y Agrobacterium tumefaciens mostraron una disminución de 1000 veces en la frecuencia de recombinación (52). Esta diferencia podría deberse a una actividad residual del gen

recA::Spc' o bien a la presencia de otros genes de recombinación. Por ejemplo, la información genética del plásmido pC1-1 confiere resistencia a mutágenos y posiblemente participe en algún proceso de recombinación.

Utilizando el sistema del plásmido pBX404-7, se reporta para las cepas RR1 (recA⁺) de *E. coli* y Ach (recA⁺) de *A. tumefaciens* una frecuencia de recombinación de 5.2×10^{-3} y 1.3×10^{-4} , respectivamente (52). En nuestro caso, las cepas CFN42 CFN285 y CFN2370 tienen una frecuencia de recombinación de 2×10^{-4} , mientras que la cepa CFN299 tiene una frecuencia de 4×10^{-5} . Estos datos sugieren fuertemente que las cepas de *R. phaseoli* tienen una maquinaria de recombinación de plásmidos pequeños menos eficiente que la de *E. coli*, pero similar a la de *A. tumefaciens*.

El plásmido pC1-1 confiere a la cepa HB101(recA13) la resistencia a los mutágenos MMS y NFT, pero es incapaz de complementar las funciones de recombinación. Es posible que este plásmido contenga un gen similar a los genes muc del plásmido pKM101 (derivado del R46), los cuáles tienen la capacidad de incrementar la resistencia a luz UV y agentes mutagénicos (11,19). Estos genes pueden complementar genéticamente a las mutantes umuDC (genes involucrados en la reparación del DNA) (11,19). También se ha descrito, que el plásmido CAM-OCT de *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de incrementar la resistencia a luz UV y agentes mutagénicos, sin complementar las funciones de recombinación (22). El plásmido pC1-1 contiene un fragmento de 1.5-kb EcoRI, que en condiciones de baja severidad hibridiza con el probador del gen recA (0.56-kb PstI/SalI del pCR3). Esta hibridización puede deberse a que los dos genes compartan dominio similares, por ejemplo, el dominio de ATPasa o de unión al DNA.

En un primer ensayo de cuantificación de la inestabilidad genómica de *R. phaseoli*, se eligieron las cepas CFN42 y CFN285, así como sus derivadas *recA::Spc^r*. La inestabilidad de la cepa CFN42 fue determinada por la pérdida de la producción de melanina (Mel). Las clonas Mel^r aparecen con una frecuencia acumulativa de 1.7×10^{-2} , estas clonas fueron generadas por la recombinación entre las regiones *nifHa* y *nifHb* que causaron la deleción de 120-kb en el pSim. Este evento de recombinación es dependiente del gen *recA*. Algunos eventos de recombinación entre estas dos regiones se han observado recientemente en el laboratorio (33).

En la cepa CFN285 y su derivada *recA*, la inestabilidad se determinó por hibridización en colonia, usando como rastreador el gen de la nitrogenasa (*nifH*). La pérdida de los genes *nifH* ocurre con una frecuencia acumulativa de 5×10^{-3} . Dos tipos de eventos fueron encontrados; una fue la curación del pSim y la otra una deleción de 100-kb en el pSim. La deleción fue generada por la recombinación de dos regiones *nifH*, similar a las observadas en la CFN42. En la cepa CFNX102 (*recA::Spc^r*) el evento de deleción no fue observado, pero sí la curación del pSim. En este caso podemos concluir que la curación del pSim es *recA*-independiente.

Para una fácil obtención de eventos de recombinación mediados por las regiones *nifH* (amplificación y deleciones), David Romero construyó tres pSims que tienen insertado el "cassette" GDYN1 en cada una de las reiteraciones *nifH*. El "cassette" GDYN1 tiene la propiedad de poder seleccionar positivamente deleciones por medio de los genes *sacRB* y amplificaciones por dosis génica del gen Km. Con los plásmidos obtenidos él logró obtener las frecuencias de los eventos de amplificación y deleción generados por la recombinación de las regiones *nifHa* y *nifHb* (33).

Para evaluar la participación del gen recA en los procesos de amplificación y deleción, los plásmidos con la inserción GDYN1 en la región nifH (pSimX4, pSimX5, y pSimX6) fueron transferidos a las cepas CFN2001 y CFNX107 (recA⁻). Las clonas de las cepas CFNX122, CFNX124 y CFNX126 (recA⁺) resistentes a Km 75 µg/ml fueron analizadas y mostraron un pSim de mayor peso molecular. El aumento de peso molecular en los pSimX5 y pSimX6 fue debido a una amplificación en tandem de la región de 120-kb y fue generada por la recombinación entre las regiones nifHa y nifHb. Los plásmidos analizados tienen 5 copias de la región de 120-kb. Comparando las frecuencias de amplificación reportados (33), con las obtenidas aquí, observamos que la amplificación de la región de 120-kb a 5 copias es 10 veces menor a la encontrada para la duplicación o triplicación de la región de 120-kb y es 10 veces mayor que a la encontrada para un pSim con 8 copias de la región (33). El incremento en la concentración de Km en el medio selectivo permite seleccionar clonas con un número diferente de copias de la región, por ejemplo, en Km 50 µg/ml es posible seleccionar duplicaciones o triplicaciones (33), en Km 75 µg/ml se pueden seleccionar un pSim con 5 copias de la región de 120-kb, y en Km100 µg/ml se puede seleccionar un pSim con 8 copias de la región (33).

Los eventos de amplificación mediados por las regiones nifH no fueron observados en la mutante recA::Spc^r. Esto indica que los eventos de recombinación son dependientes del gen recA. Sin embargo, las células son capaces de crecer en altas concentraciones de Km (75 µg/ml) posiblemente por efecto de alguna mutación, ya que las frecuencias de aparición de clonas resistentes a Km 75 µg/ml es de aproximadamente 10⁻⁶.

En otras especies bacterianas se han descrito amplificaciones en tandem (30,37,44,45,47). Por ejemplo, en E. coli una región de aproximadamente 40-kb que

contiene al gene glyT se amplifica en tandem a una frecuencia de 10^{-3} (30), o bajo ciertas condiciones de crecimiento en E. coli, una región de 8 a 37 kb que contiene el gen lac es amplificada de 40 a 200 veces a una frecuencia de 10^{-6} (47). En el plásmido R100 se ha observado, que la amplificación en tandem de la región r-det (23-Kb) es mediada por las secuencias repetidas IS₁ y ocurren a una frecuencia de 10^{-3} (30,45). La mayoría de estos eventos son dependientes de los sistemas de recombinación homóloga e inactivación del gen recA reduce los eventos de amplificación (30,45).

Las frecuencias de deleciones generadas por la recombinación entre las regiones nifHa y nifHb de los diferentes plásmidos en células recA⁺ fueron de 10^{-4} , similar a las previamente reportadas (33). Las deleciones en la cepa recA::Spc^r, solo se observaron en el plásmido pSimX5 y ocurren con una frecuencia aproximada de 1×10^{-5} , esta frecuencia es 10 veces menor que la encontrada en la cepa parental (recA⁺). Por otro lado, la pérdida del marcador sacRB en la mutante recA::Spc^r, se debe a la pérdida total del plásmido simbiótico, la cuál ocurre a una frecuencia de 10^{-5} .

En este trabajo, se describen algunos eventos de inestabilidad genómica en las cepas CFN42 y CFN285. Los eventos observados fueron amplificaciones y deleciones mediados por las secuencias nifH, y la curación del pSim. Los eventos de deleción y curación causaron la pérdida de las propiedades simbióticas de las cepas. Se ha reportado que en algunas cepas R. phaseoli tienen reiteradas la regios nifH, ¿En estas cepas pueden ocurrir la recombinación entre las regiones nifH y generar plásmidos simbióticos deletados o amplificados? ¿En cuántas cepas de R. phaseoli la inestabilidad simbiótica observada está dada por la curación del pSim?. En nuestro caso, observamos dos eventos de inestabilidad genómica que provocan la pérdida de ls capacidades simbiótica. ¿ Que otros eventos

genéticos y que no observamos son los que participan en la inestabilidad simbiótica? ¿ Hay en R. phaseoli algún sistema de recombinación similar al encontrado para el cambio de antígenos flagelares en Salmonella ó el encendido y apagado de los genes para la producción de alginato en P. aeruginosa? ¿ Hay en R. phaseoli algún sistema más específico en la generación de variabilidad genética?. Finalmente, podemos suponer que la alta inestabilidad simbiótica de R. phaseoli, podría estar dada por la participación de varios eventos, como en el caso de la cepa CFN285, en donde ocurre la pérdida parcial (delección) o total (curación) del pSim.

La transferencia del pSim entre cepas recA⁺ ocurre a una frecuencia de 10^{-6} , mientras que entre cepas recA::Spc^r la frecuencia fue de 10^{-7} . Aunque, la transferencia del pSim se realizó en ausencia del gen recA, es posible que éste tenga una participación durante el proceso. La transferencia del pSim sólo se realizó presencia del plásmido p42a, posiblemente porque contiene los genes necesarios para la conjugación, los cuáles complementan in trans la transferencia del pSim.

Durante la transferencia de pSim se observó que un 40% de las exconjugantes presentaron un cointegrado compuesto por el pSim y el p42a. La generación de estos cointegrados no fue afectada por la ausencia de la proteína RecA. También, se ha reportado que el pSim de la cepa CFN42 puede cointegrarse con el plásmido p42b, este evento ocurre con una frecuencia acumulativa de 10^{-2} (5).

El evento de recombinación entre el pSim y p42a durante la transferencia del pSim y que es recA-independiente, es muy similar al reportado por Broome-Smith (6). Este autor describe un evento de recombinación sitio específico y recA-independiente entre los plásmidos ColE1 o ColK y el pLG500. El plásmido pLG500 al ser complementado para la

movilización se cointegra con el plásmido ColE1 o ColK. La cointegración se efectúa en las 47 pb del sitio de relajación del pLG500 y en la región del origen de transferencia del ColE1 (6).

Es posible que el evento de cointegración entre los plásmidos pSim y p42a sea similar al anteriormente descrito. Sin embargo, nosotros desconocemos el posible origen de transferencia en ambos plásmidos. En un intento por establecer el posible sitio de recombinación entre los dos plásmidos, se realizaron experimentos tipo Southern usando como probador el p42a, los 11 cósmidos que cubren todo el pSim, y los 19 fragmentos del pSim que tienen reiteraciones en el p42a.

El análisis de las hibridaciones tipo Southern mostraron cuatro cointegrados diferentes, pero en ninguno de ellos tenemos bien delimitado el sitio de cointegración entre los dos plásmidos. El patrón A (pSimX114 y pSimX115), no mostró alteración alguna en las hibridaciones realizadas y suponemos que el sitio de recombinación se pudo efectuar entre dos fragmentos del mismo peso molecular, por lo cual es difícil determinar el punto de recombinación. En el patrón B (pSimX116, pSimX117 y pSim118), los cambios observados sugieren que por lo menos ocurrieron dos eventos de recombinación. En el patrón C (pSimX119), los cambios observados sugieren que por lo menos ocurrieron dos eventos, uno de ellos en la región de nifHa. En el caso del patrón D (pSim120), este plásmido parece haberse generado por más de dos eventos, uno de ellos ocurrió por la recombinación entre las regiones nifHa y nifHb, la cuál causó la deleción de la región de 270-kb en el pSim. Es importante mencionar que muchos de los rearrreglos en los cointegrados fueron generados en ausencia de la proteína RecA. Una posible explicación de este fenómeno es que la transferencia de los plásmidos por conjugación se realiza como

ssDNA lineal, el cuál puede ser sustrato de otros genes recombinación o que las proteínas de la conjugación generen éstos rearrreglos.

Finalmente podemos decir que en este trabajo se describen varios eventos de inestabilidad genómica. En el caso, de las amplificaciones y las deleciones, éstas fueron mediados por las regiones homólogas (regiones nifH) y dependientes del gen recA. En el caso, de la curación del plásmido simbiótico, la inactivación del gen recA no estabilizó la pérdida del plásmido.

Por otro lado, en la transferencia del plásmido simbiótico observamos algunos eventos de recombinación que ocurrieron en ausencia del gen recA: Estos eventos fueron la cointegración del pSim con el p42a, y otros eventos como deleciones. ¿ En estos eventos que otros genes de recombinación son los que están participando?. ¿ Hay en R. phaseoli una vía de recombinación similar a la vía RecE de E. coli?. ¿ Por que las cepas de R. phaseoli pueden mantener plásmidos con alto número de reiteraciones?.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Amundsen, S., A. Neiman, S. Thibodeaux, and G. Smith. 1990. Genetic dissection of the biochemical activities of RecBCD enzyme. *Genetics* 126:25-40.
- 2.- Berry, O.B., and A.G. Atherly. 1984. Induced plasmid-genome rearrangements in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 157:218-224.
- 3.- Beynon, J.L., J.E. Beringer, and A.W.B. Johnston. 1980. Plasmid and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J. Gen. Microbiol.* 120:421-429.
- 4.- Brewin, N.J., E.A. Wood, A.W.B. Johnston, N.J. Dibb, and G. Hombrecher. 1982. Recombinant nodulation plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 128:1817-1827
- 5.- Brom, S., A. García de los Santos, M.L. Girard, G. Dávila, R. palacios, and D. Romero. 1991. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 173:***-***
- 6.- Broome-Smith, J. 1980. RecA independent, site-specific recombination between ColE1 or ColK and a miniplasmid they complement for mobilization and relaxation: implications for the mechanism of DNA transfer during mobilization. *Plasmid* 4:53-63.
- 7.- Cheng, K., and G. Smith. 1987. Cutting of Chi-like sequences by the RecBCD enzyme of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 194:747-750.
- 8.- Claverys, J-P., and A.S. Lacks. 1986. Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiol. Rev.* 50:133-165.
- 9.- DeLuca, C.L., S.T. Lovett, and R.D. Kolodner. 1983. Genetic and physical analysis of plasmid recombination in *recB recC sbcB* and *recB recC sbcA* *Escherichia coli* K-12 mutants. *Genetics* 122:269-278.
- 10.- Djordjevic, A.M., W. Zurkowski, and B. Rolfe. 1982. Plasmids and stability of symbiotic properties of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* 151:560-568.
- 11.- Elledge, J.S. and G. Walker. 1983. The *muc* genes of pKM101 are induced by DNA damage. *J. Bacteriol.* 155:1306-1315.
- 12.- Flores, M., V. González, M.A. Pardo, A. Leija, E. Martínez, D. Romero, D. Piñero, G.Dávila, and R. Palacios. 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 170:1191-1196.
- 13.- Girard, M.L., M. Flores, S.Brom, D. Romero, R. Palacios, and G. Dávila. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *J. Bacteriol.* 173:2411-2419.

- 14.- Golub, E., A. Bailone, and R. Devoret. 1988. A gene encoding an SOS inhibitor is present in different conjugative plasmids. *J. Bacteriol.* 170:4392-4394.
- 15.- Glass, E.R. 1982. Gene function: *E. coli* and its heritable elements. University of California Press. USA.
- 16.- Ippen-Ihler, A.K., and E. Minkley Jr. 1986. The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 20:593-624.
- 17.- Laban, A., Z. Silberstein, and A. Cohen. 1984. The effect of nonhomologous DNA sequences on interplasmidic recombination. *Genetics.* 108:39-52
- 18.- Lamb, W.J., G. Hombrecher, and A.W.B. Johnston. 1982. Plasmid-determined nodulation and nitrogen fixation abilities in *R. phaseoli*. *Mol. Gen. Genet.* 186:449-452.
- 19.- Langer, J.P., W. Shanabruch, and G. Walker. 1981. Functional organization of plasmid pKM101. *J. Bacteriol.* 145:1310-1316.
- 20.- Long, R.S. 1989. *Rhizobium* Genetics. *Annu. Rev. Genet.* 23:483-506.
- 21.- Martínez, E., D. Romero, and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:59-93
- 22.- McBeeth, D. 1990. The CAM-OCT plasmid enhances UV responses of *Pseudomonas aeruginosa* *recA* mutants. *J. Bacteriol.* 172:1340-1344.
- 23.- McEvoy, L.J., H. Murata, and Chatterjee. 1990. Molecular cloning and characterization of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* peptin lyase gene that responds to DNA-damaging agents. *J. Bacteriol.* 172:3284-3289.
- 24.- McKittrick, N. and G. Smith. 1989. Activation of Chi recombinational hotspots by RecBCD-like enzymes from enteric bacteria. *J. Mol. Biol.* 210: 485-495.
- 25.- Miller, V.R. and A. T. Kokjohn. 1990. General Microbiology of *recA*: Environmental and evolutionary significance. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:365-394.
- 26.- Morrison, A.N., C.Y. Hau, M.J. Trinick, J. Shine, and B.G. Rolfe. 1983. Heat curing of a Sym plasmid in a fast-growing *Rhizobium* sp that is able to nodulate legumes and the nonlegume *Parasponia* sp. *J. Bacteriol* 153:527-531.
- 27.- Murphy, C.R., G.Gasparich, D. Bryant, and R. Porter. 1990. Nucleotide sequence and further characterization of the *Synechococcus* sp strain PCC7002 *recA* gene: complementation of a cyanobacterial *recA* mutation by the *Escherichia coli* *recA* gene. *J. Bacteriol.* 172:967-976.

- 28.- O'Connell, M.P., M.F. Hynes, and A. Püehler. 1987. Incompatibility between a Rhizobium Sym plasmid and a Ri plasmid of Agrobacterium. Plasmid 18:156-163
- 29.- Peterson, K., N. Ossanna, A. Thliveris, D. Ennis, and W. Mount. 1988. Derepression of specific genes promotes DNA repair and mutagenesis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 170:1-4.
- 30.- Petes, D.T., and W.C. Hill. 1988. Recombination between repeated genes in microorganisms. Annu. Rev. Genet. 22:147-168.
- 31.- Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leemans, M.A. Ceballos, M.A. Pardo, R. Azpiroz, M.L. Girard, E. Calva and R. Palacios. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in Rhizobium phaseoli. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:1170-1174.
- 32.- Rolfe, G.B., and P. Gresshoff. 1988. Genetic analysis of legume nodulation initiation. Annu. Rev. Plant Physiol. 39:297-319.
- 33.- Romero, D., S. Brom, J. Martínez-Salazar, M.L. Girard, R. Palacios, and G. Dávila. 1991. Amplification and deletion of a nod-nif region in the symbiotic plasmid of Rhizobium phaseoli. J. Bacteriol. 173:2435-2441.
- 34.- Ramesar, S.R., V. Abratt, D. Woods, and D.E. Rawlings. 1989. Nucleotide sequence and expression of a cloned Thiobacillus ferrooxidans recA gene in Escherichia coli. Gene 78:1-8.
- 35.- Sadowski, P. 1986. Site-specific recombinases: Changing partners and doing the twist. J. Bacteriol. 165:341-347.
- 36.- Sancar, A., and B. G. Sancar. 1988. DNA repair enzymes. Annu. Rev. Biochem. 57: 29-67.
- 37.- Segal, M.A., and J. Roth. 1989. Recombination between homologies in direct and inverse orientation in the chromosome of Salmonella: intervals which are nonpermissive for inversion formation. Genetics 122:737-747.
- 38.- Schultz, D. and G. Smith. 1986. conservation of Chi cutting activity in terrestrial and marine enteric bacteria. J. Mol. Biol. 189:585-595.
- 39.- Smith, R.G. 1988. Homologous recombination in procaryotes. Microbiol. Rev. 52:1-28.
- 40.- Smith, R.G. 1989. Homologous recombination in E. coli: multiple pathways for multiple reasons. Cell 58:807-809.
- 41.- Soberón-Chavez, G., R. Najera, E. Calva, and M. Fernandez. 1991. Partial deletion of the Rhizobium phaseoli CFN23 symbiotic plasmid implies a concomitant amplification of DNA sequences. Mol. Microbiol. 5:89-95.

- 42.- Soberón-Chávez, G., R. Najera, G. Espin, and S. Moreno. 1991. Formation of Rhizobium phaseoli symbiotic plasmids by genetic recombination. *Mol. Microbiol.* 5:in press
- 43.- Soberón-Chavez, G., R. Nájera, H. Olvera, L. Segovia. 1986. Genetic rearrangements of a Rhizobium phaseoli symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.* 167:487-491.
- 44.- Sonti, V.R. and J. Roth. 1989. Role of gene duplication in the adaptation of Salmonella typhimurium to growth on limiting carbon sources. *Genetics.* 123:19-28.
- 45.- Stark, R.G., and M. G. Wahl. 1984. Gene amplification. *Annu. Rev. Biochem.* 53:447-491.
- 46.- Taylor, A., and G. Smith. 1990. Action of RecBCD enzyme on cruciform DNA. *J. Mol. Biol.* 211:117-134.
- 47.- Tisty, D.T., A.M. Albertini, and J.H. Miller. 1984. Gene amplification in the lac region of E. coli. *Cell* 37:217-224.
- 48.- Van Houten, B. 1990. Nucleotide excision repair in Escherichia coli. *Microbiol. Rev.* 54:18-51.
- 49.- Vázquez, M., A. Dávalos, A. de las Peñas, F. Sánchez, and C. Quinto. 1991. Novel organization of the common nodulation genes in Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli strains. *J. Bacteriol.* 173:1250-1258.
- 50.- Willetts, N., and B. Wilkins. 1984. Processing of plasmid DNA during Bacterial Conjugation. *Microbiol. Rev.* 48:24-41.
- 51.- Womble, D.D., and R.H. Rownd. 1988. Genetic and physical map of plasmid NR1: comparison with other IncFII antibiotic resistance plasmids. *Microbiol. Rev.* 52:433-451.
- 52.- Xu, B., C. Paszty and P.F. Lurquin. 1988. A plasmid-based method to quantitate homologous recombination frequencies in Gram-negative bacteria. *Biotechniques* 6:752-760.
- 53.- Zurkowski, W. 1982. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of Rhizobium trifolij. *J. Bacteriol.* 150:999-1007.