

03081
11
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.
CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO.

Mecanismos moleculares involucrados en la dinámica de familias
reiteradas de DNA en el genoma de Rhizobium phaseoli.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Investigación Biomédica
Básica presenta
David René Romero Camarena.

Cuernavaca, Mor.

1991.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

A G R A D E C I M I E N T O S .

A Brenda, gracias por todos estos años de alegrías compartidas, apoyo en los momentos difíciles y por su comprensión, necesario todo ello para vivir juntos.

A Alma, gracias por no ser solamente una excelente colaboradora, sino una mejor amiga.

A Osvaldo, Amparo, Beatriz, Susi y Memo, por la intensidad de su amistad.

Al Dr. Rafael Palacios, por la amistad y el apoyo que siempre he recibido de él.

Al Dr. Guillermo Dávila por la libertad, amistad e intensidad con que siempre hemos trabajado.

A Laura Durán y César Rodríguez, porque al tratar de enseñarles, he terminado aprendiendo.

A los integrantes del Departamento de Genética Molecular del CIFN: Rafael, Maggie, Vicky, Rosy, Angeles, Alejandro, Susi, Tomasz, Oscar, Osvaldo, Memo, Laura, César, Jaime, Maluye, Víctor, Lorenzo, Esperanza, Marco Aurelio, Mónica y Lucy, por crear un ambiente estimulante, no sólo intelectual sino personalmente.

A mis alumnos, por atenuar mi soberbia aumentando mis conocimientos.

A mis amigos de la UACPyP del CCH, especialmente a Néstor, Paty, Ada, René, Carlos y Pablo, por su apoyo y amistad.

A los integrantes del jurado de esta tesis: Dr. Fernando Bastarrachea, Dr. Mario Castañeda, Dra. Alejandra Covarrubias, Dr. Guillermo Dávila, Dr. Gabriel Guarneros, Dr. Jaime Mora y Dr. Rafael Palacios. Mi agradecimiento no solamente por su cuidadosa revisión de este trabajo, sino por las enseñanzas que he recibido de ellos durante mi formación.

A todos mis amigos del Departamento de Ecología Molecular del CIFN.

INTRODUCCION.

Todos los seres vivos requieren de nitrógeno para su crecimiento y desarrollo. Aunque el nitrógeno molecular es relativamente abundante, constituyendo aproximadamente el 70% de la atmósfera, la molécula de nitrógeno es casi inerte químicamente. Por lo tanto, muchos seres vivos requieren de una fuente de nitrógeno combinado, ya sea como amonio, nitrato o compuestos orgánicos. Sin embargo, algunos organismos son capaces de convertir esta vasta reserva de nitrógeno gaseoso a formas de nitrógeno combinado, como amonio. Estos organismos son procariotes y conjuntamente, tanto en vida libre como en simbiosis con otros organismos, son responsables del 95% de la conversión de N_2 a formas combinadas de éste. El restante 5% es fijado a través del efecto de descargas eléctricas, luz ultravioleta, procesos industriales, etc.

Dentro de los organismos capaces de realizar fijación biológica de nitrógeno, pueden distinguirse dos grandes grupos. Uno de ellos está compuesto por microorganismos de los géneros Azotobacter, Anabaena, Klebsiella y Clostridium, por citar unos cuantos, los cuales son capaces de fijar nitrógeno para llenar sus

propios requerimientos (diazótrofos). Por otro lado, existe un grupo de organismos que pueden establecer relaciones mutualistas con las raíces de plantas, principalmente leguminosas, y fijar nitrógeno durante esta asociación (fijadores simbióticos de nitrógeno). Dentro de los fijadores simbióticos de nitrógeno pueden citarse especies pertenecientes a los géneros Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium y Sinorhizobium.

En las raíces de plantas leguminosas, representantes de estos géneros bacterianos son capaces de interactuar con la planta y de hecho introducirse en las raíces, induciendo la formación de una estructura, formada por tejidos vegetales, llamada nódulo. Dentro de estos nódulos pueden encontrarse formas bacterianas en un nuevo estadio de diferenciación, llamado bacteroide. Es en este estadio cuando la bacteria es capaz de fijar nitrógeno y donarlo, al menos en parte, para satisfacer las necesidades de la planta. La planta, por su parte, coopera donando una serie de metabolitos necesarios para el funcionamiento del bacteroide.

La formación de nódulos en plantas leguminosas es un proceso altamente específico. Generalmente, la formación de nódulos en una leguminosa dada y la consecuente fijación de nitrógeno, solamente puede darse por interacción con el simbiote específico. Por ejemplo, Phaseolus vulgaris (frijol) es nodulado por Rhizobium phaseoli, el chicharo (Pisum sativum) por Rhizobium leguminosarum, la soya (Glycine max) por Bradyrhizobium japonicum y Sinorhizobium

fredii, etc. Esta distinción no es, sin embargo, absoluta, ya que se han descrito ejemplos de especificidades cruzadas (revisados en Martínez et al., 1990).

El proceso de fijación simbiótica de nitrógeno ha atraído gran interés en los últimos años, debido a múltiples características. Primero, se ha estimado que este proceso simbiótico es una de las principales entradas del ciclo del nitrógeno, lo cual hace su estudio interesante desde el punto de vista ecológico. Esto ha motivado estudios sobre el papel de la fijación simbiótica en la ecología global del ciclo del nitrógeno (Sprent, 1987), así como estudios relacionados con la supervivencia del microsimbionte en diferentes ambientes (Lowendorf, 1980; Alexander, 1980; Bottomley et al., 1990) y de prevalencia y competencia entre diferentes cepas de Rhizobium (Dowling y Broughton, 1986; Triplett, 1990).

Segundo, este proceso ha captado también la atención de investigadores interesados en la especificidad biológica de esta interacción y el intercambio de señales que ella implica. Sin duda alguna, uno de sus principales atractivos radica en el hecho de que este intercambio de señales debe de ser emitido y descodificado por organismos pertenecientes a dos reinos biológicos distintos. Esta es una de las áreas más fértiles de investigación en el campo (Halverson y Stacey, 1986; Kondorosi, 1991; Lerouge et al., 1990; Long, 1989; Martínez et al., 1990; Gray y Rolfe, 1990; Roche et al., 1991).

Tercero, la fijación simbiótica de nitrógeno entraña la realización de no solamente uno, sino dos procesos de diferenciación. Por un lado, la planta debe de llevar a cabo la diferenciación de un grupo de células radiculares, en respuesta a señales bacterianas, para producir un nuevo órgano, el nódulo. Por otro lado, la bacteria debe de diferenciarse a una forma nueva, tanto estructural como funcionalmente: el bacteroide. Sobre de este particular, véase Rolfe y Gresshoff, 1988 y An y Bisseling, 1990.

Cuarto, para el establecimiento de un nódulo funcionalmente activo, es necesaria la realización de importantes cambios metabólicos tanto en la planta como en la bacteria. Esta área ha aportado ejemplos de auténtica cooperación metabólica entre dos organismos. Dentro de los diferentes cambios metabólicos se encuentran: la detención de las vías bacterianas de asimilación de amonio, con el fin de permitir su exportación para satisfacer las necesidades de la planta (Dilworth y Glenn, 1984), la donación de fuentes de carbono por parte de la planta para satisfacer las demandas del bacteroide (Dilworth y Glenn, 1984), la creación de una barrera que permitirá el acceso regulado del oxígeno para evitar la inactivación de la nitrogenasa (Layzell et al., 1990), la síntesis de leghemoglobina, la cual es una proteína cuya función es la de proveer oxígeno de una manera regulada. Este último ejemplo es particularmente interesante, ya que la parte globina es

sintetizada por la planta (Appleby, 1984) mientras que el grupo hemo parece generarse por cooperación metabólica entre ambos simbioses (O'Brien et al., 1987). La misma fijación de nitrógeno es pues un ejemplo de cooperación metabólica, producto de estas complejas adaptaciones (O'Brien y Maier, 1989, Evans et al., 1987).

Esta área ofrece también interés particular para la enzimología, dadas las características de la nitrogenasa. La misma complejidad estructural de esta enzima, la cual requiere de la cooperación de 21 proteínas diferentes para su ensamble y correcto funcionamiento, la necesidad de cofactores de hierro-molibdeno y su complejo mecanismo de reacción, han atraído considerable interés (Orme-Johnson, 1986). Este interés ha aumentado aún más con el hallazgo de formas alternativas de nitrogenasa en organismos diazotróficos (Pau, 1989).

Por último, la fijación simbiótica de nitrógeno presenta también interés desde el punto de vista biotecnológico, ya que representa una forma natural y no contaminante de satisfacer los requerimientos nitrogenados de algunos cultivos para consumo humano (Sprent, 1986). Sin embargo, se ha presentado el problema de que algunas relaciones Rhizobium-leguminosa pueden ser poco efectivas para fijación. Esto ha motivado el aprovechamiento de la investigación básica para emprender modificaciones genéticas de la leguminosa (Phillips y Teuber, 1985) o de la bacteria (Hodgson y Stacey, 1984; Pau 1989; Ronson et al., 1990) para mejorar la

capacidad de fijación de nitrógeno. A largo plazo, se espera que la investigación básica de este proceso pueda conducir a estrategias que permitan a Rhizobium nodular y fijar nitrógeno en otros huéspedes de importancia comercial, como maíz, trigo y arroz, que no son nodulados naturalmente (Cocking et al., 1990). Alternativamente, se ha pensado en estrategias para introducir los genes necesarios para fijación de nitrógeno en estas plantas. Este es sin duda el objetivo más ambicioso y más difícil de realizar.

En las páginas anteriores, he tratado de satisfacer dos objetivos. El primero de ellos ha sido el de mostrar a la investigación en fijación simbiótica de nitrógeno como un problema que ha requerido de la interacción entre diferentes disciplinas biológicas para su comprensión. En segundo lugar, he intentado presentar, de la manera más breve posible, las características que a mi juicio, hacen a la interacción Rhizobium-leguminosa un área particularmente importante de estudio.

Por conveniencia, he omitido mencionar hasta el momento una característica adicional que me parece especialmente atractiva: la estructura y plasticidad del genoma de ambos organismos participantes. En los apartados siguientes, presentaré más ampliamente la información relevante a esta característica desde el punto de vista de Rhizobium. La información correspondiente a las características especiales del genoma vegetal puede

encontrarse en otros trabajos (Walbot y Cullis, 1985).

El genoma de Rhizobium.

En los años pasados se han realizado una gran cantidad de investigaciones tendientes a la identificación y caracterización de genes involucrados en nodulación y fijación de nitrógeno. Al momento de este escrito, se han caracterizado más de cincuenta genes involucrados en estos procesos. Dentro de esta lista, se encuentran genes que participan específicamente en el proceso de nodulación (genes nod) y fijación de nitrógeno (genes nif y fix), pero también genes con funciones diversas que además pueden afectar pasos específicos de la simbiosis o ser activados durante este proceso, como son genes para exopolisacáridos (genes exo), lipopolisacáridos (genes lps), para síntesis de β -glucano (genes ndv) o para síntesis del grupo hemo (genes hem). Información detallada sobre estos genes puede encontrarse en Long, 1989 y Martínez et al., 1990.

Una de las primeras características interesantes del genoma de Rhizobium es que los genes nod, nif y fix, suelen localizarse en plásmidos de gran tamaño, los llamados plásmidos Sim (pSim). Desviaciones a esta regla son B. japonicum y A. caulinodans, donde estos genes se encuentran en el cromosoma bacteriano. Con estas excepciones, estos genes suelen encontrarse en el pSim. Quiero

hacer notar que ni el tamaño ni la composición estructural (excluyendo a los genes nod, nif y fix) son constantes en los pSim de diferentes especies de Rhizobium. El tamaño de los pSim puede variar desde 120 kb hasta aproximadamente 1600 kb. Lo que si es constante es que cuando estos pSim son transferidos a una especie relacionada a Rhizobium pero incapaz de nodular, como Agrobacterium tumefaciens, se transfiere también la capacidad de nodular específicamente a una leguminosa dada (ver por ejemplo Brom et al., 1988) y en un único caso hasta de fijar nitrógeno (Martínez et al. 1987).

Aparte del plásmido simbiótico, las cepas de Rhizobium pueden portar otros plásmidos. Generalmente, el número de plásmidos diferentes en una cepa de Rhizobium puede variar desde uno hasta ocho, todos ellos comúnmente superiores a 120 kb. Por ejemplo, en R. meliloti pueden encontrarse dos megaplásmidos, llamados a y b (a es el pSim). El megaplásmido a tiene un tamaño de 1200 kb mientras que el megaplásmido b un tamaño de 1700 kb, para un total de 2900 kb. R. phaseoli CFN42 posee 6 plásmidos con tamaños de 150 (a y b), 270 (c), 390 (d, pSym), 500 (e) y 600 (f) kb para un total de 2060 kb. Tomando un valor de 5200 kb como un estimado razonable para el tamaño del cromosoma de Rhizobium (el cromosoma de Escherichia coli es de 4000 kb, Kohara et al., 1987), aproximadamente un 35% (R. meliloti) o un 28% (R. phaseoli) de la capacidad codificadora total se encuentra en una fracción extracromosomal.

Esta situación no es una particularidad de las cepas comentadas. En un estudio de una colección de cepas de R. meliloti, se encontró que si bien estas cepas pueden tener otros plásmidos, todas tienen los megaplásmidos a y b (Bromfield et al., 1987; A. Pühler, comunicación personal). De manera similar, al estudiar un grupo de cepas de R. phaseoli aisladas de suelos en Tepoztlán, Mor., se encontró que estas suelen tener 4 a 5 plásmidos, representando aproximadamente el 25% de la capacidad codificadora total (G. Dávila, comunicación personal). Esto contrasta con la situación encontrada en E. coli, donde los plásmidos representan generalmente sólo un 4% de la capacidad codificadora total (calculado a partir de datos discutidos por Hartl y Dykhuizen, 1984). Así, las especies de Rhizobium parecen tener una fracción alta de su genoma en forma de plásmidos.

¿Qué fenotipos pueden conferir estos plásmidos?

Normalmente se considera a los plásmidos como una poza genética accesoria, codificando funciones no esenciales para la vida de la bacteria, sino funciones catabólicas nuevas, factores de resistencia o capacidad de ocupar nichos ecológicos nuevos (Campbell, 1981). En este sentido, la localización de genes para nodulación y fijación de nitrógeno en el pSim es explicable. Más aún, se ha encontrado que el megaplásmido a de R. meliloti puede conferir capacidades de degradación de sustancias en exudados radiculares, como trigonelina (Boivin et al., 1990) o encontradas

solamente en nódulos (rizopinas, Murphy et al., 1988).

Durante mucho tiempo se consideró a los pSim's como estructuras necesarias y suficientes para que pudiera darse la nodulación y la fijación de nitrógeno; el papel del cromosoma en este sentido consistiría en proveer el ambiente genético y fisiológico necesario para la expresión de esta función. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que mutaciones o curaciones de otros plásmidos (no el pSim) pueden alterar también aspectos importantes del proceso simbiótico, como nodulación, infección, competencia para nodulación y aún fijación de nitrógeno (S. Brom, datos no publicados; Charles y Finan, 1991; Hynes et al., 1990). El esquema que parece estar emergiendo es el de que otros genes importantes para este proceso pueden estar en otros replicones distintos al cromosoma y al pSim. Esto tiene implicaciones profundas para los problemas de transferencia horizontal, planteando además la posibilidad de coevolución de diferentes plásmidos.

El hallazgo de que otros plásmidos diferentes al pSim pueden portar información relevante para simbiosis, ha motivado una búsqueda de posibles capacidades en otros plásmidos. Tal vez el ejemplo más interesante es el megaplásmido b de R. meliloti (a es el pSim). En el megaplásmido b se han encontrado regiones que confieren capacidades de utilización de dulcitol, melibiosa, rafinosa, β -hidroxibutirato, acetoacetato, ácido protocatéquico,

quinato y lactosa. Además se han encontrado regiones involucradas en fijación de nitrógeno, transporte de dicarboxilatos y síntesis de exopolisacáridos, lipopolisacáridos y aún de tiamina (Charles y Finan 1991). Esto es llamativo, dado que las últimas cuatro funciones son usualmente consideradas como esenciales. Esto constituye una interesante excepción a la regla de que los plásmidos codifican para funciones accesorias. En R. leguminosarum (Hynes et al., 1990) y en R. phaseoli (S. Brom, datos no publicados) se ha encontrado también que la producción de lipopolisacáridos puede estar codificada por plásmidos.

Una de las características más interesantes del genoma de Rhizobium es la abundancia de secuencias reiteradas que presenta. La estrategia más común para detectar estas secuencias consiste en hibridizar el DNA genómico de una cepa dada contra un detector correspondiente a un gene o región genómica de interés en experimentos tipo Southern. El hallazgo de regiones múltiples con similitud al detector empleado constituye evidencia de reiteración de la región de interés. En muchos de los casos, esta evidencia ha sido fortalecida por experimentos de mutagénesis, complementación y aún secuencia nucleotídica de estos elementos repetidos. Dadas las limitaciones de la hibridización tipo Southern en las condiciones comúnmente empleadas, las secuencias repetidas observadas deben de ser regiones con un tamaño mínimo de 200 a 300 pb y con una similitud con el detector mayor al 75%.

En la tabla 1 presento una compilación de las secuencias reiteradas que han sido identificadas en Rhizobium. Como se ve en esta tabla, virtualmente todas las especies de Rhizobium presentan algún tipo de reiteración reconocida. Dentro de estas secuencias reiteradas se encuentran genes completos en los cuales las repeticiones son funcionales (nodD, rpoN, nifH y aún nifDK, fixN, el locus nod de 1.7 kb y probablemente nodPQ), regiones regulatorias largas y aún el extremo amino de algunos genes (secuencias repetidas relacionadas a nif y RtrRs), secuencias de inserción (ISR1, ISRm1, ISRm2 y RS α) y secuencias con función desconocida (RS β , RS γ , RS δ y RS ϵ). En total, en esta tabla se describen 17 familias diferentes de secuencias reiteradas. A esta lista habría que añadir 6 secuencias reiteradas más, no caracterizadas aún, localizadas en un sector de 290 kb que rodea al agrupamiento fixN de R meliloti (Renalier et al., 1987) y varias secuencias reiteradas localizadas en una región de 110 kb del pSim de S. fredii USDA 193 (Masterson y Atherly, 1986).

Como se ve, la compilación presentada en la tabla 1 tiene un sesgo para secuencias reiteradas funcionales en la simbiosis o localizadas, aunque sea transitoriamente, en sectores genómicos que poseen genes relevantes para la simbiosis. La posible causa de este sesgo es debida a que estas secuencias reiteradas se localizaron en el transcurso de estudios donde se caracterizaron genes o regiones involucradas en esta función. De cualquier manera, estos datos permiten plantear la posibilidad de que

regiones involucradas en el proceso simbiótico sean las que contribuyen mayoritariamente con las reiteraciones encontradas en el genoma de Rhizobium. Sin embargo, este parece no ser el caso.

Resultados recientes indican que la reiteración de DNA es una característica general en el genoma de Rhizobium (Flores et al., 1987). Estos datos se obtuvieron empleando una colección de clonas seleccionadas al azar de bancos genómicos de R. phaseoli, R. meliloti y A. tumefaciens. Cada colección representa aproximadamente el 2% del genoma en cada caso. Cuando estas clonas se emplearon como detectores en hibridizaciones tipo Southern, muchas de las clonas mostraron evidencia de reiteración. Asumiendo que las colecciones de clonas empleadas representan una muestra al azar del genoma, uno podría esperar un promedio de 200 familias reiteradas por genoma. El tamaño de cada familia podría ser pequeño, con un promedio de 3.5 elementos por familia. Al analizar algunas familias se encontró que algunas de ellas están confinadas al cromosoma o a plásmidos específicos, mientras que otras están compartidas entre diferentes plásmidos y/o cromosoma (Flores et al., 1987). Este nivel de reiteración es poco usual en organismos procarióticos; solamente especies pertenecientes a los géneros Halobacterium (Sapienza y Doolittle, 1982) y Streptomyces (Birch et al., 1990) muestran niveles tan altos de secuencias reiteradas.

Independientemente de las razones y mecanismos que han

conducido a esta acumulación de secuencias reiteradas, su presencia debe tener importantes consecuencias para la plasticidad interna del genoma de Rhizobium. En otros procariotes se ha encontrado que la recombinación entre secuencias reiteradas puede conducir a rearrreglos de sectores grandes del genoma (Dyson y Sherrat, 1985; Petes y Hill, 1988). Por lo tanto, es razonable esperar que el genoma de Rhizobium esté sujeto a frecuentes rearrreglos genómicos, como se ha observado en otros procariotes que también poseen un alto nivel de secuencias reiteradas (Charlebois y Doolittle, 1989; Birch et al, 1990). En el siguiente apartado, analizaré los ejemplos que parecen aportar evidencia sobre este punto.

Evidencias de plasticidad genética en Rhizobium.

Desde hace tiempo, han venido apareciendo trabajos que reportan el hallazgo en alta frecuencia de variantes en cepas de Rhizobium consideradas microbiológicamente puras (ver Herridge y Roughley, 1975, para una compilación de la literatura previa). Estas variantes, cuando se presentan, pueden afectar características como tipo colonial (Herridge y Roughley, 1975; Mathis et al., 1986 a, b y c), patrón de utilización de algunos carbohidratos, como manitol (Mathis et al., 1986 a, b y c) o capacidad de establecer una simbiosis efectiva, ya sea a nivel de nodulación o fijación de nitrógeno (Labandera y Vincent, 1975; Mathis et al., 1986 a, b y c; Weaver y Wright, 1987).

El hallazgo de una alta frecuencia de variantes afectadas en sus capacidades simbióticas ha atraído el interés de muchos investigadores, debido a las consecuencias que tendría sobre la existencia de Rhizobium en condiciones naturales. Este fenómeno ha atraído también la atención de la industria de inoculantes, dado que esta variación puede representar un problema económico importante.

¿Qué mecanismos pueden estar generando esta variabilidad en características simbióticas? Poco tiempo después de demostrarse la existencia de los pSim, se encontró que tratamientos como exposición a alta temperatura, los cuales incrementan la frecuencia de obtención de estas variantes, provocan también la curación de plásmidos (Zurkowski, 1982). Otro mecanismo que pudiera estar involucrado en este fenómeno pudiera ser una tasa alta de transposición de secuencias de inserción hacia regiones importantes para el proceso simbiótico. A este respecto, se ha reportado que ISRm1 puede transponer a alta frecuencia (aproximadamente 10^3) y tal vez preferencialmente, a la región nif de R. meliloti 1021 (Ruvkun et al., 1982).

Otro mecanismo que parece estar operando en esta inestabilidad simbiótica es la generación de rearrreglos genómicos a través de recombinación entre secuencias reiteradas. Al analizar un grupo de variantes de B. japonicum USDA 110 las cuales habían perdido la

capacidad de nodular, se encontró que éstas habían sufrido deleciones grandes que afectan una región genómica esencial para nodulación y fijación de nitrógeno (Kaluza et al., 1985; Hahn y Hennecke, 1987). Un análisis detallado de estas deleciones reveló que éstas fueron generadas, en su mayoría, por recombinación entre secuencias reiteradas en orientación directa (secuencias RS α a ϵ , ver tabla 1), las cuales se encuentran agrupadas en la región inestable. Estos eventos de deleción se encuentran a una frecuencia de 10^{-3} (Kaluza et al., 1985; Hahn y Hennecke, 1987).

En otro caso de inestabilidad en características simbióticas, se ha encontrado que algunas cepas de *R. phaseoli* presentan variantes incapaces de nodular a una frecuencia del 1% (Soberón-Chávez et al., 1986). Al analizarse estas variantes se encontró que éstas habían perdido las tres regiones nifH existentes en el plásmido simbiótico de esta cepa; sin embargo, el perfil de plásmidos no sufrió ninguna alteración aparente (Soberón-Chávez et al., 1986). La pérdida de las regiones nif va acompañada de la eliminación de cuando menos 80 kb adicionales, localizadas en el pSim (Soberón-Chávez et al., 1991). Para explicar estos resultados, se propone un modelo de deleción acompañada de una amplificación de la parte restante del pSim. Estos rearrreglos se propone que se generarían por recombinación entre secuencias reiteradas. Sin embargo, la evidencia presentada (Soberón-Chávez et al., 1986, 1989, 1991) es aún insuficiente para sustentar este modelo.

Dado el alto nivel de secuencias reiteradas existente en el genoma de Rhizobium, resulta natural el preguntarse si el fenómeno de inestabilidad por recombinación entre secuencias reiteradas puede presentarse para el genoma en general. Para demostrar esta posibilidad, Flores et al. (1988) emplearon una colección de plásmidos recombinantes que portaban miembros pertenecientes a diferentes familias reiteradas de R. phaseoli; los plásmidos empleados tenían insertos provenientes tanto de los plásmidos como del cromosoma. Estos plásmidos recombinantes se emplearon como detectores en experimentos de hibridización contra el DNA genómico de un conjunto de cepas derivadas a partir de una sola clona. Empleando esta estrategia, se encontró una frecuencia alta de alteraciones en los perfiles de hibridización, con deleciones de algunos miembros de familias reiteradas ocurriendo a una frecuencia de 10^{-2} a 10^{-3} . Estos rearrreglos afectaban a elementos localizados tanto en plásmidos como en el cromosoma (Flores et al., 1988). No se ha determinado el mecanismo involucrado en la generación de estos rearrreglos, pero se sugiere que éstos pudieran generarse a través de recombinación entre secuencias reiteradas. De cualquier manera, estos datos demuestran que rearrreglos genómicos que afectan diferentes sectores, son una característica frecuente en Rhizobium.

Además de la dinámica interna que puede presentar Rhizobium por rearrreglos entre sus componentes, se han observado también algunos ejemplos después de haber introducido otros elementos

genéticos. Este punto ha recibido especial atención, dado que existe una posibilidad real de transferencia de plásmidos simbióticos entre diferentes cepas de Rhizobium en condiciones naturales (Schofield et al., 1987; Pretorius-Güth et al., 1990). Por ejemplo, cuando se introdujo un nuevo pSim en una cepa de R. leguminosarum, se obtuvo un plásmido híbrido resultante de recombinación entre los pSim's entrante y residente (Brewin et al., 1982; Christensen y Schubert, 1983). En otros ejemplos, dos pSim's diferentes pueden coexistir, pero se han observado rearrreglos (Djordjevic et al., 1982) o alteraciones fenotípicas (Sadowsky y Bohlool, 1985) después de aislar las cepas de nódulos.

Como se ve de los datos presentados anteriormente, existen evidencias que permiten sugerir que la presencia de fenómenos frecuentes de plasticidad genómica es una característica de Rhizobium. Sin embargo ha habido poca investigación sobre esta característica de Rhizobium, en particular en relación a los mecanismos involucrados en los fenómenos de plasticidad.

Planteamientos y Objetivos de este trabajo.

El primer ejemplo descrito de reiteración en el genoma de Rhizobium fue el de las tres reiteraciones nifH en Rhizobium phaseoli (Quinto et al., 1982). Este ejemplo atrajo considerable atención, debido a la escasez de genes duplicados en procariotes,

asi como debido a que nifH es el gene estructural para la nitrogenasa reductasa, uno de los componentes del complejo de nitrogenasa.

Un estudio más detallado de estas reiteraciones mostró que las tres se encontraban en un solo plásmido, el pSim (Quinto et al., 1982). La secuencia nucleotídica de estas tres regiones de la cepa CFN42 demostró que las tres portan genes nifH completos, revelando además un hecho muy llamativo: que los tres son idénticos en secuencia. Estudios de hibridización usando como detectores los genes nifD y nifK de Klebsiella pneumoniae mostraron además que ambos genes estaban presentes en las regiones a y b, pero ausentes en la región c (Quinto et al., 1985). Este último dato ha sido puesto en duda por el reciente hallazgo de hibridización positiva en la región c con un detector nifD de R. phaseoli (Valderrama, 1989). Se ha demostrado además que las regiones a y b son operones nifHDK funcionales (Segovia, 1988). Al analizarse el comportamiento de cepas portando mutaciones iguales en cada uno de los tres genes nifH, se encontró que las tres mutantes eran capaces de nodular y fijar nitrógeno en P. vulgaris (evaluado por reducción de acetileno) a los mismos niveles que la cepa silvestre. Estos datos implicaban que al menos dos de las tres reiteraciones eran funcionales, aunque no parecía existir ninguna evidencia de dosis génica (Quinto et al., 1985).

La reiteración de los genes estructurales de la nitrogenasa

parece ser una característica común entre aislados de R. phaseoli. Se ha mostrado que, dentro de una colección de aislados de R. phaseoli con diferentes orígenes geográficos, 48 de ellos poseían reiteración de los genes estructurales de la nitrogenasa (Martínez et al., 1985). Los restantes aislados, además de poseer solamente una copia de estos genes, han mostrado ser muy diferentes de los aislados comunes de R. phaseoli (Martínez et al., 1988). Estos aislados y otros mas que poseen características similares han resultado ser tan diferentes, que se ha propuesto se clasifiquen como una nueva especie, denominada Rhizobium tropici (Martínez et al., 1991).

El conocimiento alcanzado con las reiteraciones nifH de R. phaseoli motivó también el interés de conocer si la reiteración de secuencias de DNA es una característica general en el genoma, encontrándose que este era el caso (Flores et al., 1987). Además, se encontró que algunos elementos de estas familias reiteradas podían estar sujetos a rearrreglos genómicos que ocurrían a alta frecuencia (Flores et al., 1988).

Al momento de comenzar trabajo en colaboración con los grupos de los Dres. Guillermo Dávila y Rafael Palacios, consideré particularmente interesante el dedicarme a estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la dinámica de familias reiteradas de DNA en R. phaseoli, así como sus posibles consecuencias fenotípicas. Resultó natural elegir a la familia reiterada nifH

como un sistema modelo de estudio, dada la amplia información existente sobre ella así como por la importancia de este gene para la fijación de nitrógeno.

Al iniciar este trabajo, tres observaciones hechas en el sistema nifH me parecieron particularmente interesantes.

- 1.- A pesar de que las reiteraciones nifH son activas y de que probablemente, las reiteraciones a y b comparten la misma regulación, no se observa un efecto de dosis génica entre ellas.
- 2.- La secuencia nucleotídica de las regiones nifH reveló una similitud del 100% entre las tres regiones. Para el caso de las regiones a y b, la constancia en sitios para enzimas de restricción sugiere que esta alta similitud podría extenderse también a los genes nifD y nifK.
- 3.- Las tres reiteraciones nifH se encuentran localizadas en un solo plásmido, el pSym. Lógicamente, se infiere que al menos dos de las reiteraciones deben de estar en orientación directa. Esto crearía la posibilidad de generar rearrreglos genómicos por recombinación entre las regiones nifH.

Con respecto al primer punto, existía ya evidencia que sugería la ausencia de un efecto de dosis génica de los genes nifH. De ser cierto, podría implicar que mecanismos que aumentaran el número

de copias de nifH no tendrían ningún efecto positivo sobre la actividad de nitrogenasa. Sin embargo, estos datos fueron obtenidos probando las mutantes bajo condiciones de laboratorio las cuales, dado que son restrictivas para el crecimiento de las plantas, afectan también la actividad de nitrogenasa. Por tanto, me pareció necesario repetir estos experimentos bajo condiciones más favorables. Los datos obtenidos se presentan en el artículo "Effect of naturally occurring nif reiterations on symbiotic effectiveness in Rhizobium phaseoli". Este trabajo fue realizado en colaboración con investigadores del NifTAL Project, University of Hawaii, E.E.U.U.

Con respecto al segundo punto, es llamativa la extrema similitud en secuencia de las tres reiteraciones nifH. Si bien estos datos pudieran explicarse por una generación muy reciente de estas reiteraciones, otra posibilidad es la existencia de mecanismos que estén conservando la identidad entre ellas, como se ha observado en otros organismos (Dover, 1986). Dentro de los mecanismos involucrados se han sugerido conversión génica, entrecruzamientos desiguales, transposición, etc. (Dover, 1986).

Con respecto al tercer punto, implicaría que las reiteraciones nifH podrían no sólo estar sujetas a rearrreglos genómicos, sino también participar en la generación de ellos. Los resultados obtenidos con respecto a este punto se reportan en el artículo "Amplification and deletion of a nod-nif region in the symbiotic

plasmid of Rhizobium phaseoli", así como en los resultados adicionales presentados en esta tesis.

Por último, quisiera aclarar que los resultados presentados aquí son producto de una colaboración entre los grupos del Dr. Guillermo Dávila, del Dr. Rafael Palacios y el mío, para comprender la estructura y dinámica del genoma de Rhizobium. Estos esfuerzos han llevado ya, además, a la determinación del mapa físico del pSim de R. phaseoli CFN42 y a la localización de secuencias reiteradas en él (Girard et al., 1991), el hallazgo de nuevos tipos de rearrreglos que afectan, con alta frecuencia, otros plásmidos de R. phaseoli (Brom et al., 1991) así como la clonación y caracterización del gene reCA de R. phaseoli y su papel en formación de rearrreglos (Martínez-Salazar et al., 1991).

RESULTADOS

Two roads diverged in a wood, and I -
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference.

RobertFrost.

Effect of Naturally Occurring *nif* Reiterations on Symbiotic Effectiveness in *Rhizobium phaseoli*

DAVID ROMERO,^{1*} PAUL W. SINGLETON,² LORENZO SEGOVIA,¹ ENRIQUE MORETT,¹ B. BEN BOHLOOL,²
RAFAEL PALACIOS,¹ AND GUILLERMO DÁVILA¹

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México,¹ and NifTAL Project, University of Hawaii, Paia, Hawaii 96779²

Received 24 August 1987/Accepted 30 November 1987

Most naturally occurring strains of *Rhizobium phaseoli* possess reiteration of the *nif* genes. Three regions contain nitrogenase structural genes in strain CFN42. Two of these regions (a and b) have copies of *nifH*, *nifD*, and *nifK*, whereas the third region (c) contains only *nifH*. Strains containing mutations in either *nif* region a or *nif* region b had significantly diminished symbiotic effectiveness compared with the wild-type strain on the basis of nodule mass, total nitrogenase activity per plant, nitrogenase specific activity, total nitrogen in the shoot, and percentage of nitrogen. A strain containing mutations in both *nif* region a and *nif* region b was totally ineffective. These data indicate that both *nif* region a and *nif* region b are needed for full symbiotic effectiveness in *R. phaseoli*.

Bacteria of the genus *Rhizobium* induce nitrogen-fixing nodules on the roots of their host plants. For fast-growing *Rhizobium* species, it has been shown that the genes required for nodulation (*nod*) and nitrogen fixation (*nif*) are located on large plasmids (12). The nitrogenase enzyme complex is composed of two enzymes, nitrogenase (Mo-Fe protein) and nitrogenase reductase (Fe protein). The Mo-Fe protein is composed of two α subunits and two β subunits encoded by the *nifD* and *nifK* genes, respectively. The Fe protein is composed of two identical subunits encoded by the *nifH* gene.

For *Rhizobium phaseoli*, the symbiont of *Phaseolus vulgaris*, we reported the reiteration of nitrogen fixation gene sequences (13). Three regions homologous to the *nifH* gene were identified in *R. phaseoli* CFN42. These regions are located on a single plasmid (13). Heteroduplex and nucleotide sequencing studies of each region established the presence of complete *nifH* genes in each of the three regions (14). Hybridization studies using as probes *Klebsiella pneumoniae* *nifD* and *nifK* genes indicated that both genes are present in *nif* regions a and b, while only *nifH* is present in *nif* region c (14). Conceivably, *nif* regions a and b are *nifHDK* operons by analogy to the arrangement found in other *Rhizobium* spp. (1). A mutational study indicated that at least two of the reiterated regions (*nif* regions a and b) are functionally expressed (14).

Reiteration of nitrogenase structural genes appears to be a widespread feature among *R. phaseoli* isolates. Martinez et al. (5) reported that, among 50 isolates, 95% contained reiteration of nitrogenase structural genes. Reiteration of nitrogenase structural genes has been found also in *R. fredii* (11), *R. trifolii* (21), and *Rhizobium* sp. strain ORS571 (8, 9).

Given the widespread occurrence of repeated *nif* genes in *R. phaseoli*, a hypothesis explaining the kind of selective pressure that maintains these reiterations must be sought. Maybe reiterated *nif* gene sequences are necessary for optimal expression of nitrogen fixation activity. Assuming that only *nif* regions a and b possess the potential to produce a functional nitrogenase enzyme complex, the hypothesis leads to the following predictions. (i) Strains having single

mutations in any of the regions carrying complete *nifHDK* reiterations (*nif* region a or *nif* region b) must have a diminished symbiotic effectiveness compared with the wild-type strain. (ii) Strains carrying mutations in both *nif* region a and *nif* region b must be totally ineffective. Our results provide evidence which supports this hypothesis.

R. phaseoli CE-3 is a spontaneous streptomycin-resistant derivative of wild-type strain CFN42 (14). Strain CFN2202 is a derivative of CE-3 which carries an insertion of a kanamycin resistance interposon into the *nifH* gene located in region b (14). Strain EM407 is a derivative of CE-3 which carries a kanamycin and spectinomycin resistance interposon into the *nifH* gene located in region a (E. Morett and G. Espin, manuscript in preparation). Strain CFN2210 is a derivative of CE-3 carrying cointegrates of intermediary vectors pLS151 and pLS153. These vectors are derived from plasmid pSUP205 (15). pLS151 carries a spectinomycin resistance interposon in the *nifH* coding frame of *R. phaseoli* CE-3 *nif* region a (19). pLS153 carries a 2-kilobase *HindIII*-*BamHI* fragment from *nif* region a (14) with a kanamycin resistance interposon from plasmid pGV97 (4) in the *nifK* gene. As these plasmids carry only fragments internal to the reiterations, their cointegration in *nif* regions a and b leads to a block of the expression of each *nifK* gene. This strain was shown to be stable, maintaining its phenotypic and genotypic characteristics through nodulation (data not shown).

Seeds of *P. vulgaris* cv. Bush Bountiful were surface sterilized in 2% sodium hypochlorite for 2 min, rinsed, and germinated in sterile vermiculite. Seedlings were planted when the radicles were 2 to 3 cm long. Plants were grown in 1-liter plastic pots (Lab-Tek Products) filled with wet vermiculite as described by Singleton and Tavares (18). Three germinated seedlings were planted in each pot. The bacterial inocula were grown in yeast extract-mannitol broth (20). Immediately after planting, each seedling was inoculated with 10^6 to 10^7 viable cells of the appropriate strain which was suspended in 0.5 ml of sterile water. Viable counts were determined by the drop plate method (20). Four pots were left uninoculated as controls. Plants were grown in a greenhouse in a randomized complete-block design with four replications. The plants were thinned to 2 per pot 10 days after planting. Each pot received a daily application of 100

* Corresponding author.

TABLE 1. Growth, nodulation, and nitrogen fixation traits for *P. vulgaris* inoculated with *R. phaseoli* strains carrying mutations in *nif* reiterations^a

Strain	Active <i>nif</i> reiteration ^b	Nodule dry wt (mg · pot ⁻¹)	Total nitrogenase activity ^c	Nitrogenase sp act ^d	Shoot dry wt (g · pot ⁻¹)	Total N in shoot (mg · pot ⁻¹)	% N
CE-3	a, b, c	290a	16.34a	113.0a	2.1a	66.8a	3.0a
EM407	b, c	184b	3.83b	43.9b	2.0a	36.6b	1.8b
CFN2202	a, c	160b	4.19b	64.5b	1.9a	38.3b	1.9b
CFN2210	c	161b	0.03c	0.6c	1.8a	19.8c	1.1c
Uninoculated control		0c	0.00c	0.0c	1.8a	20.9c	1.1c
+ N control					6.4	219.3	3.4

^a Means within the same column flanked by the same letter are not significantly different ($P = 0.05$) as determined by the Duncan multiple range test.

^b Letters refer to the different *nif* reiterations; nomenclature is as described previously (14).

^c $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{plant}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

^d $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g of nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

ml of N-free nutrient solution (16). Micronutrients were provided from a commercial micronutrient concentrate (Monterey Chemical Co.). Four pots each received a daily application of 100 ml of nutrient solution containing 100 mg of N liter⁻¹ as a measure of yield potential in the system.

At harvest, on day 28 after planting, acetylene-reduction assays were performed by incubating the excised root systems in 5% (vol/vol) acetylene for 45 min. Ethylene production was measured with a Varian Aerograph 940 gas chromatograph. After incubation, the nodules were removed from the roots and oven-dried at 70°C for 72 h for dry weight determinations. Shoots were cut at the surface of the growth medium and oven-dried in the same fashion. The dried shoots were weighed and milled, and samples (0.25 g) were digested with concentrated sulfuric acid after pretreatment with 5 ml of H₂O₂. N content of the digests was determined by the colorimetric method of Mitchell (7). The data (positive N controls not included) were analyzed statistically as described by Gomez and Gomez (2). Correlation coefficients were calculated from entry means.

Growth, nodulation, and nitrogen fixation data for plants inoculated with strain CE-3 or its mutant derivatives are shown in Table 1. Plants nodulated by strains carrying mutations in *nif* region a (EM407) or in *nif* region b (CFN2202) or in both *nif* region a and *nif* region b (CFN2210) showed a lowered level of nodulation as compared with the wild-type strain (CE-3). The dry weight of nodules induced by strains EM407, CFN2202, and CFN2210 was 41% lower than that of nodules induced by the wild-type strain. These values were statistically significant at the 5% level. Differences in nodule dry weight were expected because these strains had lowered nitrogen fixation activity (see below). A direct correlation has been found between nitrogen fixation activity and nodule mass (10, 17).

Total nitrogenase activity values allow a separation of the inoculant strains into three different groups (Table 1). Group 1 contains wild-type strain CE-3, which had the highest value for total nitrogenase activity. Group 2 contains EM407 and CFN2202, which had 25% of the total nitrogenase activity of group 1. Group 3, which contains CFN2210, was totally ineffective for N₂ fixation. Wild-type strain CE-3 ranked highest for nitrogenase specific activity. Strains carrying mutations in *nif* region a (EM407) or *nif* region b (CFN2202) ranked intermediate to CE-3 and CFN2210, with 49% of the nitrogenase specific activity of the latter strains. Strain CFN2210, carrying mutations in both *nif* region a and *nif* region b, was ineffective. A significant linear correlation was observed between nitrogenase specific activity and number of active *nif* reiterations ($r = 0.983$, significant at the

5% level). These results indicate that nitrogen fixation responds to the gene dosage level of the *nifHDK* reiterations.

Results of dry weight and nitrogen analyses are shown in Table 1. No significant differences between treatments were observed for shoot dry weight. However, significant differences between strains were found for both percentage of nitrogen and total nitrogen in the shoot. Wild-type strain CE-3 had the highest value for total nitrogen in the shoot. Strains EM407 and CFN2202 were intermediate, with values falling between those for CE-3 and CFN2210. Strain CFN2210 was ineffective for symbiotic nitrogen fixation and had the lowest value for total nitrogen in the shoot, which was not significantly different from that of the uninoculated control. Values for the positive nitrogen control indicated that the main limitation in our growth system was nitrogen availability from N₂ fixation. Values for percentage of nitrogen were also significantly different between strains. This difference was expected, because values for total nitrogen in the shoot showed that significance and dry weight values were uniform among treatments. This trend still holds (Table 1). Strain CE-3 showed the highest percentage of nitrogen, strains EM407 and CFN2202 ranked intermediate, and strain CFN2210 was indistinguishable from the uninoculated control in percentage of nitrogen.

These data clearly indicate that both *nif* region a and *nif* region b, carrying *nifHDK* reiterations, are needed for optimal nitrogen fixation in *P. vulgaris*, indicating a gene dosage effect for these reiterations.

It was not possible to analyze the effect of mutations in *nif* region c on nitrogen fixation, since the mutants available appear to be extremely unstable (unpublished data). However, *nif* region c alone is unable to confer any nitrogen fixation ability, since mutant CFN2210 is totally ineffective (Table 1). In a previous report (14), we were unable to detect differences in nitrogen fixation ability analogous to those reported here. However, those tests were carried out under conditions restrictive to plant growth (nitrogen-free nutrient agar) and for shorter durations (17 versus 28 days), which made it difficult to detect the differences reported here.

Reiteration of nitrogenase structural genes has been found in other members of the genus *Rhizobium*, such as *R. fredii* (11) and *Rhizobium* sp. strain ORS571 (8, 9). For *R. fredii*, a correlation between the loss of plasmid-borne *nif* gene copies and a reduction in symbiotic effectiveness has been found (6). However, in that study the loss of *nif* reiterations was achieved by plasmid curing, thus making it difficult to ascribe the observed differences in symbiotic effectiveness solely to the loss of *nif* reiterations. For *Rhizobium* sp. strain ORS571, a functional study of the two *nif* reiterations

indicates that both are needed to achieve optimal nitrogen fixation (9). Reiteration of *nodD* genes has been found in *R. meliloti*, and a mutational study indicates that at least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa (3). We conclude that both *nif* region a and *nif* region b, carrying *nifHDK* reiterations, are needed for full symbiotic effectiveness in *R. phaseoli*, indicating a gene dosage effect for these reiterations.

We thank L. Tanouye and T. George for their technical assistance and E. Martinez and S. Brom for critically reading the manuscript. We also thank A. Gutierrez for typing the manuscript.

Partial financial support for this research was provided by the U.S. National Academy of Sciences/National Research Council contracts DAN-0613-C-00-2064-00 (NITFAL project) and BNF-MX-4-84-33 (CIFN) from the U.S. Agency for International Development and by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and the Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada.

LITERATURE CITED

1. Corbin, D., L. Barran, and G. Ditta. 1983. Organization and expression of *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3005-3009.
2. Gomez, K. A., and A. A. Gomez. 1984. Statistical procedures for agricultural research, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
3. Gottfert, M., B. Horvath, E. Kondorosí, P. Putuoky, F. Rodríguez-Quinones, and A. Kondorosí. 1986. At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* 191:411-420.
4. Leemans, J., R. Dehaere, L. Willmitzer, H. De Greve, J. P. Hernalsteens, M. Van Montagu, and J. Schell. 1982. Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.* 1:147-152.
5. Martinez, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-1786.
6. Mathis, J. N., W. M. Barbour, and G. H. Elkan. 1985. Effect of *Sym* plasmid curing on symbiotic effectiveness in *Rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1385-1388.
7. Mitchell, H. L. 1972. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 55:1-3.
8. Norel, F., N. Desnoues, and C. Elmerich. 1985. Characterization of DNA sequences homologous to *Klebsiella pneumoniae nifH*, *D*, *K* and *E* in the tropical *Rhizobium* ORS571. *Mol. Gen. Genet.* 199:352-356.
9. Norel, F., and C. Elmerich. 1987. Nucleotide sequence and functional analysis of the two *nifH* copies of *Rhizobium* ORS571. *J. Gen. Microbiol.* 133:1563-1576.
10. Pacovsky, R. S., H. G. Bayne, and G. J. Bethlenfalvay. 1984. Symbiotic interactions between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Sci.* 24:101-105.
11. Prakash, R. K., and A. G. Atherly. 1984. Reiterations of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast-growing *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 160:785-787.
12. Prakash, R. K., and A. G. Atherly. 1986. Plasmids of *Rhizobium* and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Int. Rev. Cytol.* 104:1-24.
13. Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernandez, T. Ballado, G. Soheron, and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* 299:724-726.
14. 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.
15. Simon, R., V. Prierer, 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.
16. Singleton, P. W. 1983. A split-root growth system for evaluating the effect of salinity on components of the soybean-*Rhizobium japonicum* symbiosis. *Crop Sci.* 23:259-262.
17. Singleton, P. W., and K. R. Stockinger. 1983. Compensation against ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.* 23:69-72.
18. Singleton, P. W., and J. W. Favares. 1986. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1013-1018.
19. Soberón-Chávez, G., R. Nájera, H. Olivera, and L. Segovia. 1986. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.* 167:487-491.
20. Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford.
21. Wang, C. L., J. E. Beringer, and P. R. Hirsch. 1986. Host plant effects on hybrids of *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae* and *trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* 132:2063-2070.

Amplification and Deletion of a *nod-nif* Region in the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium phaseoli*

DAVID ROMERO, SUSANA BROM, JAIME MARTÍNEZ-SALAZAR, MARÍA DE LOURDES GIRARD, RAFAEL PALACIOS, AND GUILLERMO DÁVILA*

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

Received 31 October 1990/Accepted 8 February 1991

One remarkable characteristic of the genomes of some *Rhizobium* species is the frequent occurrence of rearrangements. In some instances these rearrangements alter the symbiotic properties of the strains. However, no detailed molecular mechanisms have been proposed for the generation of these rearrangements. To understand the mechanisms involved in the formation of rearrangements in the genome of *Rhizobium phaseoli*, we have designed a system which allows the positive selection for amplification and deletion events. We have applied this system to investigate the stability of the symbiotic plasmid of *R. phaseoli*. High-frequency amplification events were detected which increase the copy number of a 120-kb region carrying nodulation and nitrogen fixation genes two to eight times. Deletion events that affect the same region were also found, albeit at a lower frequency. Both kinds of rearrangements are generated by recombination between reiterated nitrogenase (*nifHDK*) operons flanking the 120-kb region.

Rhizobium spp. are gram-negative soil bacteria studied primarily for their ability to establish nitrogen-fixing symbioses with leguminous plants. Intensive genetic analysis during the past decade has led to the identification of genes essential for the nodulation (*nod* genes) and nitrogen fixation (*nif* and *fix* genes) processes. In all the fast-growing *Rhizobium* species, these genes are carried on large plasmids, the so-called *Sym* plasmids or *pSym* (20, 24).

One interesting characteristic of the *Rhizobium* genome is the presence of a large number of reiterated DNA sequences. For *Rhizobium phaseoli*, the symbiont of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), we have estimated the presence of about 700 reiterated elements, belonging to 200 different families (9). This high degree of reiteration is not restricted to *R. phaseoli*; other members of the *Rhizobiaceae* family, including the closely related bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, possess a large amount of reiterated DNA (9, 24). For other organisms, it has been shown that recombination between pairs of repeated elements may lead to different kinds of genomic rearrangements, including additions, amplifications, deletions, and inversions (2, 31).

Frequent genomic rearrangements (in the range of 10^{-2} to 10^{-3}) have been commonly observed in different *Rhizobium* species, including *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium trifolii*, and *R. phaseoli*. These rearrangements, which are frequently deletions, may affect the symbiotic properties of the strain, either for nodulation or for nitrogen fixation (4, 7, 10, 14, 18, 39, 44). Unfortunately, the mechanisms involved in the generation of genetic instability in these species have been poorly analyzed.

In order to understand the mechanisms involved in the genetic instability of *R. phaseoli*, we have developed an experimental approach for the general selection of genomic rearrangements. This system allows the positive selection of different kinds of rearrangements, including amplifications, deletions, insertions, and loss of plasmids. We have used this system to study the stability of *pSym* of *R. phaseoli*. We

have detected high-frequency amplification and deletion events which affect a 120-kb region carrying nodulation and nitrogen fixation genes. These rearrangements are generated by recombination between reiterated nitrogenase (*nifHDK*) operons flanking this region.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and media. *Escherichia coli* HB101 (5) was the host employed for all the recombinant DNA procedures; *E. coli* S17-1 (38) was used as the host for conjugative transfer of intermediate vectors to *R. phaseoli*. *R. phaseoli* CFN42 (33) was the parental strain. Linear maps of the plasmids used in this work are shown in Fig. 1. *E. coli* strains were grown at 37°C in LB medium (25), and *R. phaseoli* strains were grown at 30°C in PY medium (27). Media containing sucrose at a 5 or 12.5% (wt/vol) final concentration (see below) were prepared by adding appropriate volumes of a filter-sterilized, concentrated sucrose solution to autoclaved PY or LB medium. When needed, antibiotics were added at the following concentrations: kanamycin, 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (*E. coli*) or 15 to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (*R. phaseoli*, see below); nalidixic acid, 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (*R. phaseoli*); spectinomycin, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (*E. coli* or *R. phaseoli*); and tetracycline, 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (*R. phaseoli*) or 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (*E. coli*).

Recombinant DNA procedures. Recombinant plasmids were purified by an alkaline lysis method (21). Restriction endonucleases and T4 DNA ligase were purchased from Amersham Corp., and the reaction conditions were as specified by the manufacturer. Transformations of *E. coli* strains with recombinant plasmids were done by a calcium chloride procedure (21).

Plasmid construction and site-directed mutagenesis. A 4.2-kb *Pst*I fragment of *pGS100* (6a), carrying the kanamycin/gentamicin and spectinomycin/streptomycin resistance determinants of *pSa*, was ligated into the unique *Pst*I site of *pUCD800* (11), and *E. coli* HB101 was transformed with the ligation mixture. Km^r Sp^r sucrose-sensitive colonies were screened for plasmids with the desired restriction pattern, and one of these was named *pGUS3*. From this plasmid, the

* Corresponding author.

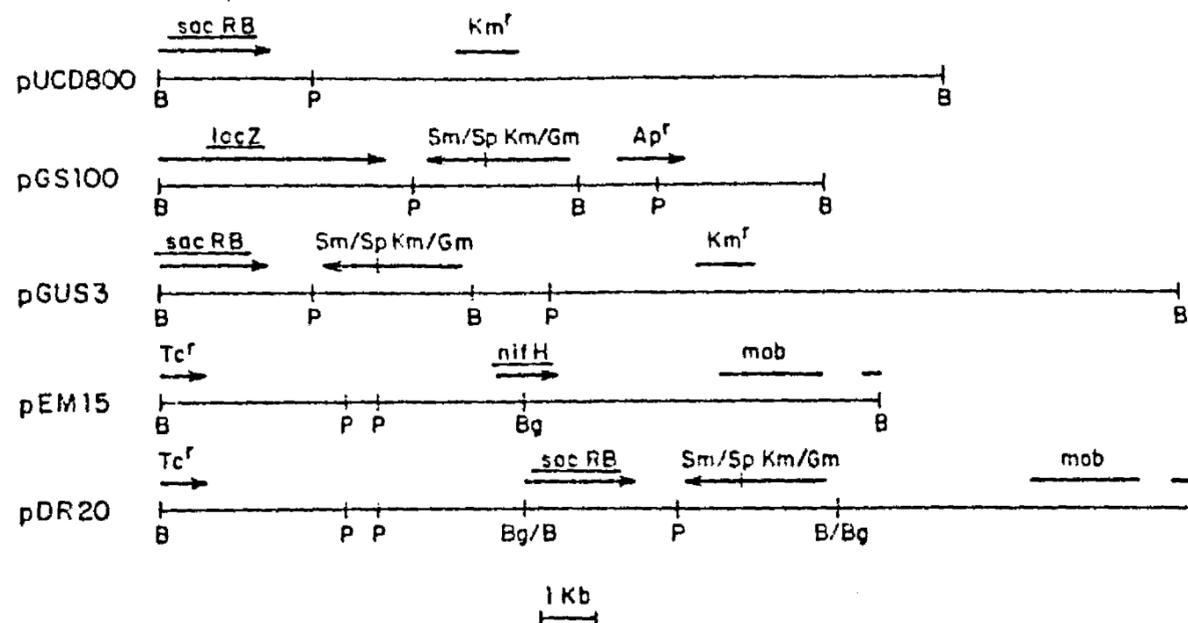


FIG. 1. Physical maps of the plasmids utilized in this work. Details of plasmid construction are given in Materials and Methods. *mob*, Origin of transfer from RP4; *lacZ*, structural gene for β -galactosidase from *E. coli*; *nifH*, structural gene for nitrogenase reductase from *R. phaseoli* (*nif* region a); *sacRB*, structural loci for levansucrase from *B. subtilis*; Ap, Gm, Km, Sm, Sp, and Tc, ampicillin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, spectinomycin, and tetracycline resistance determinants, respectively. Abbreviations: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*III; P, *Pst*I. Arrows indicate direction of transcription.

newly constructed cassette (GDYN1) was excised as a 5.7-kb *Bam*HI fragment and ligated in the unique *Bgl*III site of pEM15 (26); *E. coli* HB101 was transformed with this DNA preparation, and clones with a Tc^r Sp^r sucrose-sensitive phenotype were selected. Such isolates were surveyed for plasmids with the desired construction, yielding the intermediate plasmid pDR20. Since the pEM15 parental plasmid is a pSUP205 (38) derivative carrying one of the three *nif* regions of *R. phaseoli* (*nif* region a), insertion of the GDYN1 cassette leads to an interruption of the *nifH* coding sequence (codon 147). *R. phaseoli* CFNX5 was constructed by replacing the *nif* region c sequences on the pSym of *R. phaseoli* CFN42 with the insertion located in pDR20 by an *in vivo* gene replacement procedure (38). This strategy takes advantage of the extended homology between *nif* region a and *nif* region c, which spans over 1.3 kb. To this end, pDR20 was transformed into strain S17-1, and the transformant was mated on PY plates with *R. phaseoli* CFN42. Transconjugants were selected on PY plates containing 20 μ g of nalidixic acid ml⁻¹ and 15 μ g of kanamycin ml⁻¹. Double recombinants were identified by their sensitivity to tetracycline.

Isolation of *R. phaseoli* derivatives carrying amplifications of a genomic sector. In order to isolate derivatives carrying amplifications, strain CFNX5 was grown overnight in liquid PY medium containing 15 μ g of kanamycin ml⁻¹ and diluted in a solution containing 10 mM MgSO₄ and 0.01% Tween 40 (vol/vol), and appropriate dilutions were plated onto PY plates containing 50 (selection for duplications) or 100 (selection for higher-order amplifications) μ g of kanamycin ml⁻¹. Colonies carrying either duplications or amplifications usually appeared after 3 to 4 days at 30°C. However, this procedure appears to be nonlethal for unamplified strains; at longer incubation times (6 to 9 days, depending on the kanamycin concentration), smaller colonies began to appear. These small colonies, upon further testing, did not show any evidence of amplification. Therefore, all the scoring and colony isolation were done only for colonies growing in a 3- to 4-day period at 30°C. Frequencies are given as the number of colonies resistant to the indicated kanamycin concentration per total CFU.

Isolation of *R. phaseoli* strains carrying deletions. To isolate strains carrying deletions, the indicated *R. phaseoli* strains were grown overnight in liquid PY medium without antibiotics, diluted, and plated onto PY plates containing sucrose at 12.5% (wt/vol). Scoring was done for rapidly growing colonies after 3 to 4 days at 30°C.

Filter blot hybridization, plasmid profiles, and quantitation of copy number. Genomic DNA was digested with *Bam*HI, subjected to electrophoresis in 1% agarose gels, blotted onto nitrocellulose (Hybond C; Amersham Corp.), and hybridized as described previously (10). Plasmid profiles were obtained by the *in-gel* lysis method of Eckhardt (8), blotted onto nitrocellulose, and hybridized similarly. The internal *nifH* fragment used as a probe was a 0.27-kb *Sal*I fragment from the *R. phaseoli nifH* gene (from codon 29 to codon 120) located in *nif* region a (34). The extent of the *R. phaseoli nifD*- and *nifK*-specific probes is shown in Fig. 4. For the quantitation of copy number, blots were autoradiographed and hybridization signals were integrated by scanning the autoradiographs with a GS300 scanning densitometer by using the GS350 data system (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Calif.), taking care to be within the linear range of the film.

Assay for nodulation and nitrogen fixation. Sterile *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa seedlings were grown in nitrogen-free plant nutrient agar and scored for nodulation and acetylene reduction 17 days after inoculation with a specific strain, as described previously (34).

RESULTS

Experimental approach to study genomic rearrangements. A system was constructed for positive selection of different types of genomic rearrangements. The relevant features of the GDYN1 element (acronym for Genome Dynamics) are shown in Fig. 2a. This cassette contains a segment of plasmid pSa which carries kanamycin/gentamicin and spectinomycin/streptomycin resistance markers. We have found that upon introduction into *R. phaseoli*, these genes confer a high level of resistance to spectinomycin (100 μ g ml⁻¹) but a lower level of resistance to kanamycin (15 μ g ml⁻¹). Higher

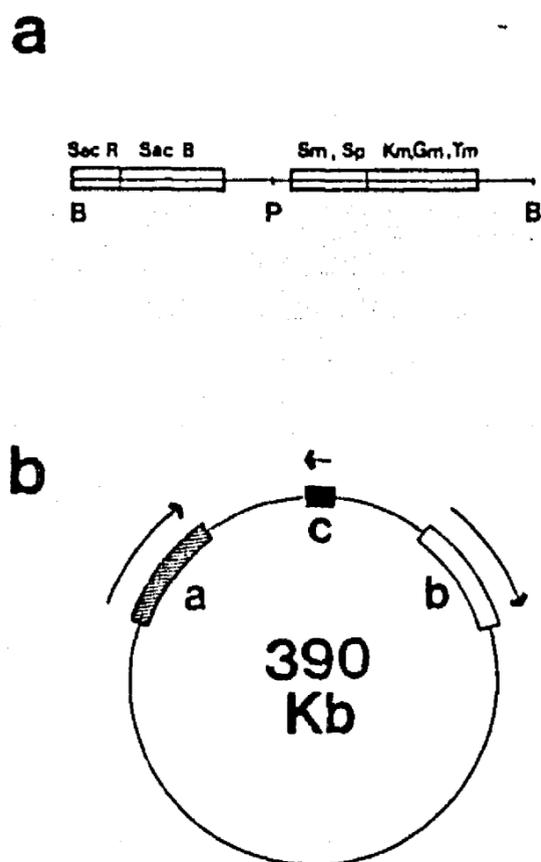


FIG. 2. (a) Relevant features of the 5.7-kb GDYN1 cassette. The approximate localization of the kanamycin/gentamicin and spectinomycin/streptomycin resistance determinants as well as the *sacR-sacB* sequences is indicated by boxes. The kanamycin/gentamicin determinant also confers resistance to tobramycin (Tm). Restriction sites: B, *Bam*HI; P, *Pst*I. (b) Schematic structure of pSym of *R. phaseoli* CFN42. Localization and relative extension of *nif* regions a, b, and c (34) are indicated by boxes. Boxes are at a scale eight times larger than the rest of the circle. Arrows indicate transcription direction in each region.

levels of kanamycin resistance can be achieved by increased gene dosage (see below), providing us with a simple way to identify and quantitate amplified variants. The GDYN1 cassette also carries the *sacR-sacB* genes of *Bacillus subtilis*. The *sacR* gene is a regulatory locus; the *sacB* gene codes for the enzyme levansucrase (41), which confers sucrose sensitivity in several gram-negative bacteria (11). Selection for sucrose-resistant derivatives can be used to isolate different kinds of rearrangements, including deletions (17), insertions (11), and loss of plasmids (17).

We have used the GDYN1 cassette to explore the stability of pSym of *R. phaseoli* CFN42. The complete physical map of this 390-kb plasmid as well as the localization of some nodulation and nitrogen fixation gene sequences has been determined recently in our laboratory (11a). This plasmid contains two *nifHDK* operons (*nif* region a and *nif* region b) (33, 34) in direct orientation, separated by 120 kb (Fig. 2b). A third *nifH* gene (*nif* region c) (33, 34) as well as sequences hybridizing with *nodB*-, *nodC*-, *nodD*-, and *nifA*-specific gene probes is located within this region. The orientation of *nif* region c is inverse to that of the other two *nif* regions (11a). We incorporated the GDYN1 cassette into the *nif* region c coding sequence, by using site-directed mutagenesis and a gene replacement procedure (see Materials and Methods).

The resulting *R. phaseoli* strain (CFNX5) has normal-sized pSym (Fig. 3a, lanes 1 and 2). Southern blots of this strain probed with an internal sequence of the *R. phaseoli*

nifH gene give a band pattern consistent with that for an insertion in *nif* region c (Fig. 3b, lane 1). Since this probe is hybridizing with a sequence that is identical in the three *nifH* reiterations (34), the three bands are equally intense. Strain CFNX5 is resistant up to 15 μg of kanamycin ml^{-1} and is sensitive to sucrose (12.5%).

High-frequency tandem duplications in pSym formed by recombination between reiterated *nifHDK* operons. When strain CFNX5 was grown in liquid culture and then plated on kanamycin (50 μg ml^{-1}), resistant colonies were obtained at a frequency of 4×10^{-3} . Five of six resistant colonies (represented by strain CFNX26, Fig. 3) differ from the CFNX5 parental strain in several aspects, namely: (i) there is no normal-sized pSym, (ii) Southern blots of the plasmid profile probed with either an internal *nifH* fragment (Fig. 3a, lane 4) or the whole pSym plasmid (data not shown) reveal a plasmid of higher molecular size (around 500 kb), (iii) Southern blots of *Bam*HI-restricted total DNA probed with an internal *nifH* fragment show an additional 5.2-kb band (Fig. 3b, lane 2), and (iv) *nifH*-positive bands were not of equal intensity; the band carrying the cassette (*nif* region c) has a double relative intensity. The other kanamycin-resistant strain (CFNX28) is similar to the ones described before, except that pSym is of higher molecular size (around 600 kb) (Fig. 3a, lane 6) and the band stoichiometry (Fig. 3b, lane 3) is different.

Our interpretation of these results is that strains CFNX26 and CFNX28 have undergone a tandem duplication and triplication, respectively, of the 120-kb sector bounded by *nif* regions a and b (see Fig. 6). These rearrangements are generated by recombination between *nif* region a and *nif* region b, thus giving rise to a new *nif* reiteration (5.2-kb band) carrying the 5' end of *nif* region b and the 3' end of *nif* region a. This interpretation predicts that the new *nif* reiteration must be a complete *nifHDK* operon (Fig. 4). Hybridization of genomic DNAs of strains carrying duplications or triplications against *R. phaseoli* *nifD*- and *nifK*-specific probes indicates that this is indeed the case (Fig. 5). Other authors had observed this new *nifHDK* reiteration (26); however, they failed to recognize the existence of amplifications in their strains.

Further support for this interpretation was obtained by hybridization of genomic DNAs of these strains against a set of cosmids covering the whole pSym plasmid. Hybridization with cosmids encompassing the 120-kb sector as probes gives a higher overall densitometric intensity than with cosmids covering the remainder of pSym (data not shown).

Isolation of derivatives carrying higher-order amplifications in pSym. Higher-order amplifications were obtained by plating strain CFNX5 on 100 μg of kanamycin ml^{-1} ; resistant derivatives were detected at a frequency of 2×10^{-5} . Analysis of five derivatives indicated that they contain five to eight copies of the 120-kb region. One example (strain CFNX39) is shown in Fig. 3. Southern blots of total DNA of strain CFNX39 probed with an internal *nifH* fragment show the same four-band pattern observed in strains carrying duplications; however, band stoichiometry is severely altered, with the 5.2-kb band and the *nif* region c band being 7 and 8 times more intense, respectively, than the *nif* region a and *nif* region b bands (Fig. 3b, lane 4). This is the precise stoichiometry that we expected for a strain carrying eight copies of the 120-kb region. A symbiotic plasmid has been detected in highly amplified strains (Fig. 3a, lanes 7 and 8). This plasmid has undergone a massive enlargement in size, from the original 390 kb to nearly 1,200 kb. The low hybridization signal observed may be due to extensive

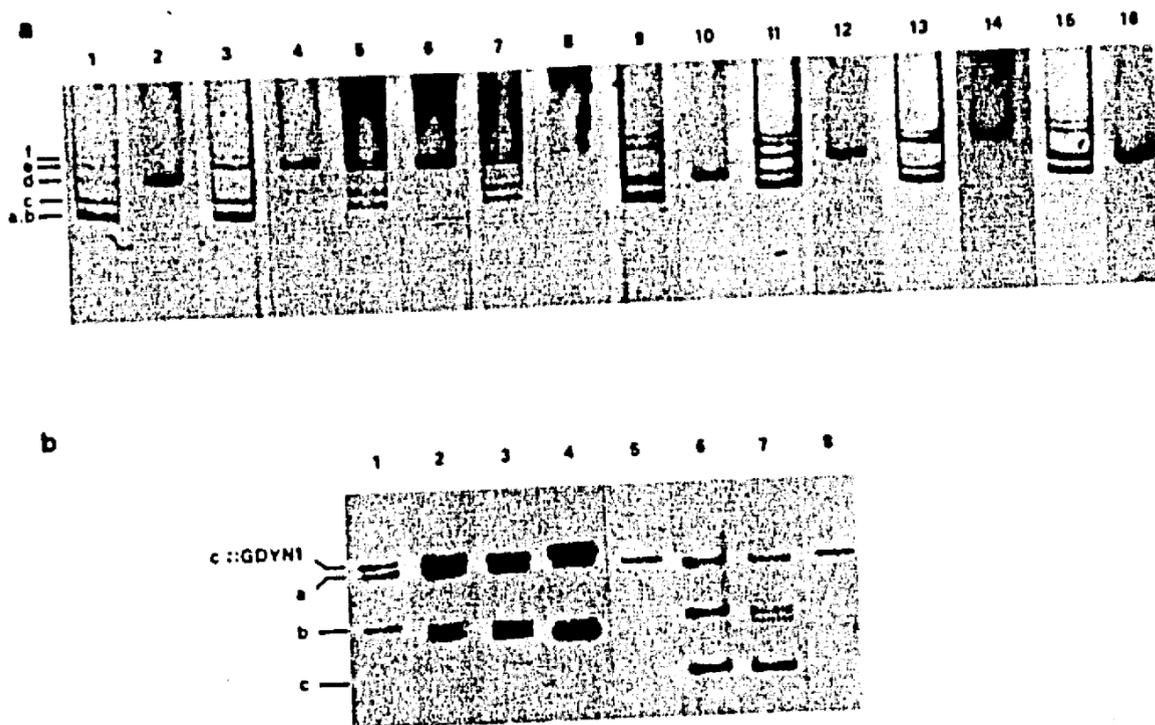


FIG. 3. (a) Plasmid profiles and localization of pSym in *R. phaseoli* derivatives. Odd-numbered lanes are plasmid profiles, stained with ethidium bromide. Even-numbered lanes are Southern blots of each plasmid profile probed with an internal *nifH* fragment. Letters on the left side of the panel mark the position of the corresponding plasmid; plasmid d is pSym. Approximate sizes are 150 (a,b), 270 (c), 390 (d), 510 (e), and 630 (f) kb. Strains CFNX5 (lanes 1 and 2) and CFNX42 (lanes 11 and 12) were the starting strains. Derivatives carrying amplifications of a sector of pSym are in lanes 3 and 4 (CFNX26), 5 and 6 (CFNX28), 7 and 8 (CFNX39), and 13 and 14 (CFNX76). Derivatives carrying deletions in pSym are in lanes 9 and 10 (CFNX55) and 15 and 16 (CFNX77). (b) Southern analyses of derivatives carrying amplifications or deletions. Genomic DNA of each strain was digested with *Bam*HI and hybridized to an internal *nifH* fragment. Relative densitometric intensities are given below with the lane number from the uppermost to the lowermost band in each lane. Letters on the left side of the panel indicate the position of each *nif* region. Strains CFNX5 (lane 1, 1:1:1) and CFNX42 (lane 6, 1:1:1) were the starting strains. Derivatives carrying amplifications are CFNX26 (lane 2, 2:1:1:1), CFNX28 (lane 3, 3:1:1:2), CFNX39 (lane 4, 8:1:1:7), and CFNX76 (lane 7, 1:1:1:2). Derivatives carrying deletions are CFNX55 (lane 5) and CFNX77 (lane 8).

breakage of such a large plasmid during the electrophoretic procedure.

Recombination between reiterated *nifHDK* operons also leads to high-frequency deletions in pSym. Deletion frequency in pSym was evaluated by plating strain CFNX5 on medium with a high sucrose concentration (12.5%); resistant colonies

arose at a frequency of 4×10^{-4} . All eight derivatives analyzed carry the same kind of deletion, represented by strain CFNX55 (Fig. 3). These strains harbor a pSym plasmid of reduced molecular size (around 270 kb; Fig. 3a, lanes 9 and 10). That this rearrangement involved recombination between *nif* region a and *nif* region b was determined by hybridizing restricted DNAs of these strains with an internal *nifH* sequence. In these strains, instead of the three *nifH* reiterations observed in strain CFNX5, only one band of altered size is observed (Fig. 3b, lane 5). Its size (9.9 kb) is consistent with a recombination between *nif* region a and *nif* region b, thus generating a hybrid band that carries the 5'

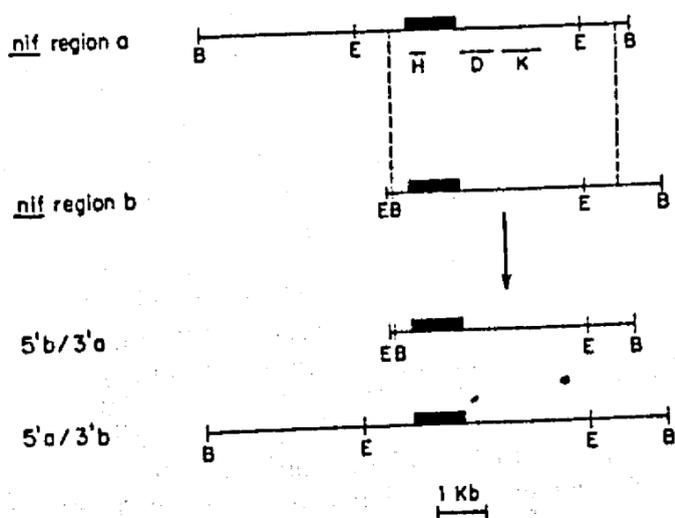


FIG. 4. Physical maps of *nif* region a and *nif* region b and the expected products for reciprocal recombination. All the maps are drawn in a 5' to 3' direction in regard to the *nifH* gene. The location of the *nifH* gene is indicated by the black box. A reciprocal crossover anywhere between the broken lines should yield two recombinant products (5'b/3'a and 5'a/3'b). The origin and extent of the *R. phaseoli* *nifH*-, *nifD*-, and *nifK*-specific probes are indicated by bars. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI.

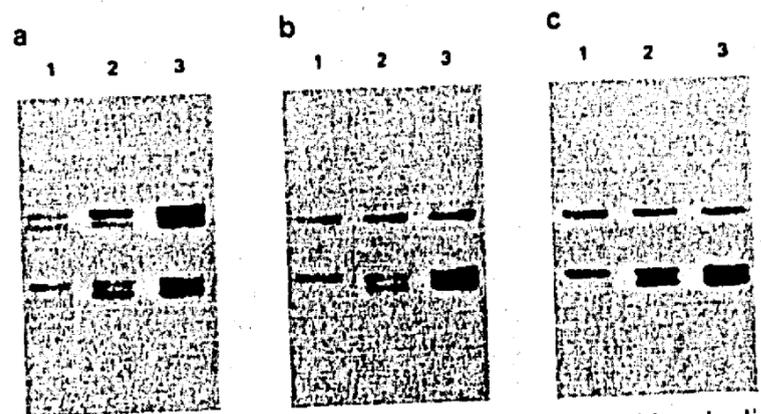


FIG. 5. Hybridization analysis of strains carrying either duplications or triplications. Genomic DNAs of strains CFNX5 (lanes 1), CFNX26 (lanes 2), and CFNX28 (lanes 3) were digested with *Bam*HI, blotted, and hybridized against *nifH* (a)-, *nifD* (b)-, and *nifK* (c)-specific probes.

end of *nif* region a and the 3' end of *nif* region b (Fig. 4). Hybridization analysis of double-restricted DNAs confirmed this interpretation (data not shown). This kind of recombination must delete the whole 120-kb region; hybridization with a set of cosmid clones covering *pSym* confirmed this expectation (data not shown).

This sucrose selection scheme was also used to determine the deletion frequency in strains CFNX26 and CFNX28. For both strains, deleted derivatives were obtained at a frequency of 8×10^{-5} .

Instability of derivatives carrying tandem duplications in *pSym*. It has been reported that tandemly amplified derivatives are unstable structures that return to the original state at high frequency (2, 31, 37, 43). This characteristic was explored by plating strains bearing duplications or triplications on media with a lower sucrose concentration (5%). In this condition, we have found that amplified strains are sensitive, while the parental strain CFNX5 is resistant. For strains CFNX26 and CFNX28, derivatives resistant to 5% sucrose were isolated at a frequency of 9×10^{-3} . Forty derivatives analyzed for each starting strain were phenotypically indistinguishable from the CFNX5 strain (i.e., they were sensitive to $50 \mu\text{g}$ of kanamycin ml^{-1} or 12.5% sucrose but resistant to lower concentrations of both substances). Therefore, these results indicate that strains carrying duplications or triplications of the 120-kb region are unstable, reverting at a high frequency.

Duplications and deletions are also found in an unmarked strain. To determine whether these rearrangements do occur in the absence of any selective system, we screened several single-colony isolates of the CFN42 wild-type strain (Fig. 3) for modifications in the size of *pSym*. Among 320 isolates, one carried a tandem duplication (strain CFNX76; Fig. 3a, lanes 13 and 14, and Fig. 3b, lane 7) and another carried a deletion (strain CFNX77; Fig. 3a, lanes 15 and 16, and Fig. 3b, lane 8) corresponding to the rearrangements described above. Thus, these results indicate that amplification and deletion events occur in otherwise unmodified strains.

Symbiotic phenotypes of strains carrying deletions or duplications in the *pSym*. Symbiotic properties of strains CFNX76 and CFNX77 were analyzed on *P. vulgaris* L. As expected, strain CFNX77, which carries a deletion of the 120-kb region, was unable to nodulate *P. vulgaris*. A derivative carrying a tandem duplication of this region (strain CFNX76) was able to nodulate and to reduce acetylene at rates comparable to those of the wild-type strain. However, since these tests were carried out under laboratory conditions, they may have failed to detect subtle, albeit important, differences in symbiotic properties. More work is needed to ascribe a definitive symbiotic phenotype for amplified strains.

DISCUSSION

In this communication, we have described the construction and use of a genetic element (the GDYN1 cassette) which allows the easy isolation of different kinds of genomic rearrangements. The GDYN1 cassette has several advantages over other previously published experimental approaches. This element allows the positive selection of deletions, amplifications, and deamplifications, by variation of selective conditions. Therefore, one genetic construction is sufficient to determine the frequency of all these events for a given genomic region. Selective conditions can be manipulated to obtain defined copy number increases. Since the use of the GDYN1 cassette does not make any assumption

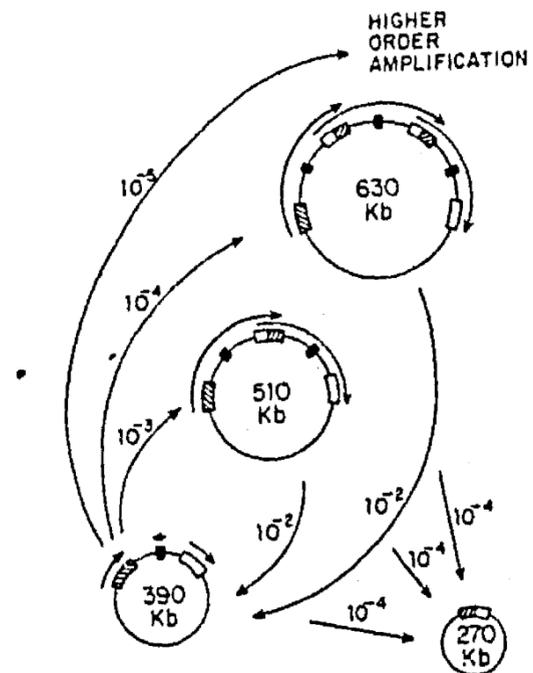


FIG. 6. Schematic representation of the observed rearrangements in the symbiotic plasmid of *R. phaseoli* CFN42. Large arrows around the circles indicate the extension of the amplified unit. Other symbols are as defined in the legend to Fig. 2b. Numbers above the arrows are frequencies of the respective rearrangement, rounded to the nearest potency.

on the nature of the region being screened, this element is useful to determine the dynamics of different sectors of the genome. Moreover, since the genes contained in the GDYN1 cassette are active in several bacterial species, this element may be useful for the selection of rearrangements in other gram-negative bacteria.

Figure 6 summarizes the observed rearrangements for *pSym* of *R. phaseoli* CFN42, obtained by using the GDYN1 cassette. These rearrangements alter not only the presence but the relative copy number of a genomic region containing genes relevant for the symbiotic process. One interesting characteristic of these rearrangements is the diversity of plasmid sizes that may be generated, ranging from 270 to nearly 1,200 kb. Such variability gives rise to plasmid structures equivalent in size up to one quarter of the bacterial chromosome.

All the rearrangements described in this paper occur at a frequency far above that observed for spontaneous mutation, and all were generated by recombination between reiterated *nifHDK* operons. This endpoint preference is remarkable, because there are several different pairs of reiterated elements flanking the region where the GDYN1 cassette was inserted that should be potentially useful for the generation of rearrangements (11a). We believe that this endpoint preference is due to the extended homology between the reiterated *nifHDK* operons, which spans over 5 kb (34). Of these, at least 1.3 kb is identical in nucleotide sequence; that the remaining 3.7 kb is highly homologous was estimated by heteroduplex experiments under stringent conditions, as well as by conservation in restriction sites (34). Assuming a linear relationship between extent of homology and recombination rate, other pairs of reiterated elements should be regions with shorter and/or imperfect homology between them, thus making these regions less available for recombination. According to this hypothesis, under conditions in which pairing between the *nifHDK* operons is restricted, use of other pairs of reiterated ele-

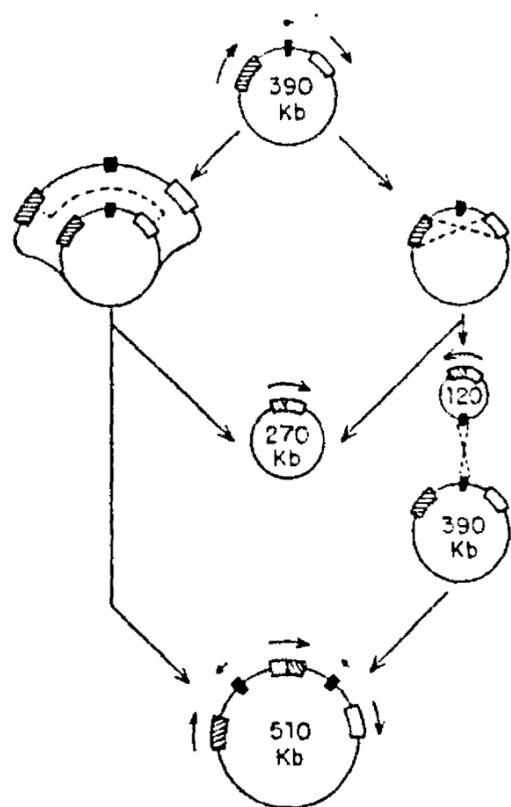


FIG. 7. Models for the generation of plasmid molecules with a deletion or with a duplication of the 120-kb region. In the right part of the figure, an intramolecular recombination event between *nif* regions a and b gives rise to a deleted plasmid molecule (270 kb) and to a smaller 120-kb circle. Homologous recombination between the 120-kb circle and a normal plasmid molecule gives rise to a duplication of the 120-kb region. This recombination event may occur anywhere within the 120-kb region; an example is shown. For the left part of the figure, an unequal crossover event between *nif* sequences in a partially replicated plasmid gives rise to two plasmid molecules after full replication and resolution, one with a deletion and the other with a duplication.

ments as rearrangement endpoints must be readily observed. Experiments are under way to test this hypothesis.

We have shown previously that both *nifHDK* operons are needed for an optimal symbiotic effectiveness in *R. phaseoli* (36). The finding that they can recombine to give rise to amplifications and deletions suggests that whatever their origin and other present-day functions, they participate in the generation of genome rearrangements. In this regard, it has been shown that recombination between long, reiterated sequences in direct orientation leads to either amplifications or deletions, both in plasmid (6, 29, 30, 37, 43) or chromosomal (1, 2, 12, 15, 19, 31) systems.

An important aspect to be analyzed is the mechanism involved in the formation of these rearrangements. At the time of this writing, we are considering two alternative models, namely, unequal crossing-over between reiterated *nifHDK* operons or circle excision and reinsertion models (Fig. 7). We believe that triplications and higher-order amplifications are formed after the intermediate generation of a duplication by either of the models presented here. Similar models have also been suggested to explain amplification of R-factor drug resistance plasmids (6, 29, 30, 37, 43) and chromosomal regions (1, 2, 12, 15, 19, 31).

Reiteration of nitrogenase structural genes and other genomic regions is a common feature not only in *R. phaseoli* strains (9, 22, 23, 33, 34) but also in other *Rhizobium* species (3, 9, 13, 14, 16, 18, 28, 32, 35, 42). Therefore, we believe that rearrangements similar to these may occur in other

Rhizobium strains. In fact, recombination between reiterated sequences is involved in deletion of a symbiotic region in *B. japonicum* (14, 18).

Tandem amplifications in prokaryotes are commonly viewed as a rapid and reversible adaptation of a cell population to certain environmental factors that require overexpression of some genes (2, 12, 37, 40). In nature, *Rhizobium* spp. encounter a variety of different microenvironments, both inside and outside the legume host. Whether or under which conditions the rearrangements described above may be useful adaptations remains to be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Jaime Mora and Brenda Valderrama for giving us the *nifH*-, *nifD*-, and *nifK*-specific probes, to Guido de Vos for plasmid pGS100, to Alejandro García de los Santos and Osvaldo López for technical assistance, and to Alma Córdova for typing the manuscript.

Partial financial support for this research was provided by grant no. 936-5542.01-523-8.600 from the U.S. Agency for International Development. J.M.S. received a studentship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México).

REFERENCES

- Anderson, P., and J. R. Roth. 1981. Spontaneous tandem genetic duplications in *Salmonella typhimurium* arise by unequal recombination between rRNA (*rnn*) cistrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3113-3118.
- Anderson, R. P., and J. R. Roth. 1977. Tandem genetic duplications in phage and bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:473-504.
- Badenoch-Jones, J., T. A. Holton, C. M. Morrison, K. F. Scott, and J. Shine. 1989. Structural and functional analysis of nitrogenase genes from the broad-host-range *Rhizobium* strain ANU240. *Gene* 77:141-153.
- Berry, J. O., and A. G. Atherly. 1984. Induced plasmid-genome rearrangements in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 157:218-224.
- Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.
- Chandler, M., B. Allet, E. Gallay, E. B. de la Tour, and L. Caro. 1977. Involvement of IS1 in the dissociation of the r-determinant and RTF components of plasmid R 100.1 *Mol. Gen. Genet.* 153:289-295.
- De Vos, G. Unpublished data.
- Djordjevic, M. A., W. Zurkowski, and B. G. Rolfe. 1982. Plasmids and stability of symbiotic properties of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* 151:560-568.
- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584-588.
- 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.
- 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.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, 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.
- 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.
- Goldberg, I., and J. J. Mekalanos. 1986. Effect of a *recA* mutation on cholera toxin gene amplification and deletion events. *J. Bacteriol.* 165:723-731.
- Gyorgypal, Z., N. Iyer, and A. Kondorosí. 1988. Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid specificity are involved

- in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 212:85-92.
14. Hahn, M., and H. Hennecke. 1987. Mapping of a *Bradyrhizobium japonicum* DNA region carrying genes for symbiosis and an asymmetric accumulation of reiterated sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2247-2252.
 15. Hill, C. W., R. H. Grafstrom, B. W. Harnish, and B. S. Hillman. 1977. Tandem duplications resulting from recombination between ribosomal RNA genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 116:407-428.
 16. Honma, M. A., and F. M. Ausubel. 1987. *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8558-8562.
 17. Hynes, M. F., J. Quandt, M. P. O'Connell, and A. Pühler. 1989. Direct selection for the curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *Gene* 78:111-120.
 18. Kaluza, K., M. Hahn, and H. Hennecke. 1985. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the *nif* region of the *Rhizobium japonicum* genome. *J. Bacteriol.* 162:535-542.
 19. Lin, R.-J., M. Capage, and C. W. Hill. 1984. A repetitive DNA sequence, *rhs*, responsible for duplications within the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Mol. Biol.* 177:1-18.
 20. Long, S. R. 1989. *Rhizobium* genetics. *Annu. Rev. Genet.* 23:483-506.
 21. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 22. Martínez, E., M. Flores, S. Brom, D. Romero, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. *Plant Soil* 108:179-184.
 23. Martínez, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-1786.
 24. Martínez, E., D. Romero, and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:59-93.
 25. Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 26. Morett, E., S. Moreno, and G. Espin. 1988. Transcription analysis of the three *nifH* genes of *Rhizobium phaseoli* with gene fusions. *Mol. Gen. Genet.* 213:499-504.
 27. 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.
 28. Norel, F., and C. Elmerich. 1987. Nucleotide sequence and functional analysis of the two *nifH* copies of *Rhizobium* ORS571. *J. Gen. Microbiol.* 133:1563-1576.
 29. Peterson, B. C., and R. H. Rownd. 1983. Homologous sequences other than insertion elements can serve as recombination sites in plasmid drug resistance gene amplification. *J. Bacteriol.* 156:177-185.
 30. Peterson, B. C., and R. H. Rownd. 1985. Recombination sites in plasmid drug resistance gene amplification. *J. Bacteriol.* 164:1359-1361.
 31. Petes, T. D., and C. W. Hill. 1988. Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu. Rev. Genet.* 22:147-168.
 32. Prakash, R. K., and A. G. Atherly. 1984. Reiterations of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast-growing *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 160:785-787.
 33. Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Ballado, G. Soberón, and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* 299:724-726.
 34. 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.
 35. Renaller, M.-H., J. Batut, J. Ghai, B. Terzaghi, M. Gherardi, M. David, A.-M. Garnerone, J. Vasse, G. Truchet, T. Huguet, and P. Boistard. 1987. A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of *Rhizobium meliloti* 2011 carries a functional *fix* gene repeat and a *nod* locus. *J. Bacteriol.* 169:2231-2238.
 36. Romero, D., P. W. Singleton, L. Segovia, E. Morett, B. B. Bohlool, R. Palacios, and G. Dávila. 1988. Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:848-850.
 37. Rownd, R. H. 1982. R plasmid drug resistance gene amplification in bacteria, p. 273-279. In R. T. Schimke (ed.), *Gene amplification*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 38. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791.
 39. Soberón-Chávez, G., R. Nájera, H. Olivera, and L. Segovia. 1986. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.* 167:487-491.
 40. Sontl, R. V., and J. R. Roth. 1989. Role of gene duplications in the adaptation of *Salmonella typhimurium* to growth on limiting carbon sources. *Genetics* 123:19-28.
 41. Steinmetz, M., D. Le Coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Tréboul, and P. Guy. 1985. The DNA sequence of the gene for the *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* 200:220-228.
 42. Watson, J. M., and P. R. Schofield. 1985. Species-specific, symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in *Rhizobium trifolii*. *Mol. Gen. Genet.* 199:279-289.
 43. Yagi, Y., and D. B. Clewell. 1977. Identification and characterization of a small sequence located at two sites on the amplifiable tetracycline resistance plasmid pAM α 1 in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 129:400-406.
 44. Zurkowski, W. 1982. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* 150:999-1007.

RESULTADOS ADICIONALES.

A) USO DE OTRAS SECUENCIAS REITERADAS COMO SITIOS DE RECOMBINACION PARA LA GENERACION DE AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES.

Los datos presentados en el artículo "Amplification and deletion of a nod-nif region in the symbiotic plasmid of Rhizobium phaseoli", demuestran la generación de amplificaciones y deleciones con una alta frecuencia que afectan una región de 120 kb que cubre varios genes nod y nif. En ambos casos, estos rearrreglos se forman por recombinación entre las reiteraciones nifHDK (regiones a y b).

Si se analiza el mapa físico del plásmido simbiótico de la cepa CFN42 (fig. 1) puede apreciarse la existencia de un gran número de reiteraciones; varias de ellas flanquean la región para la cual se han observado amplificaciones y deleciones. ¿Pueden usarse estas otras reiteraciones para la generación de rearrreglos?.

Para que estas reiteraciones puedan ser usadas para generar

rearrreglos deben cumplir al menos dos condiciones. La primera es que estas se encuentren en orientación directa, mientras que la segunda es que ambas reiteraciones sean suficientemente similares en secuencia nucleotídica como para poder ser reconocidas eficientemente por el sistema de recombinación que esté generando estos rearrreglos. Una violación de cualquiera de estas dos condiciones puede conducir al resultado observado, esto es, un uso preferencial de las regiones nifHDK para la generación de rearrreglos.

Sin embargo, creemos que esta preferencia puede deberse a la similitud entre las reiteraciones nifHDK, la cual cubre al menos 5 kb. Si asumimos la existencia de una relación lineal entre extensión de homología y tasa de recombinación, como se ha observado en otros sistemas bacterianos (Shen y Huang, 1986), esta preferencia se explicaría suponiendo que otros pares de elementos reiterados podrían ser regiones con zonas de similitud más pequeñas o imperfectas, siendo así menos accesibles para recombinación. Esta hipótesis predice que si se restringen las posibilidades de apareamiento entre los operones nifHDK, debe de observarse el uso de otros elementos reiterados para la formación de rearrreglos.

La manera más sencilla de probar esta hipótesis consiste en insertar el cassette GDYN1 en las reiteraciones nifHDK, ya sea en la región a o en la región b. Como se ve en la fig. 2, ahora no cualquier entrecruzamiento entre las 5 kb de las reiteraciones

nifHDK conducirá a amplificación o delección de las secuencias del cassette GDYN1; para que un entrecruzamiento conduzca a una amplificación o delección reconocible, debe ocurrir dentro de la región delimitada por las líneas interrumpidas. Entrecruzamientos dentro de las 5 kb de la regiones nif pero fuera de la región marcada con las líneas puede conducir a la amplificación o delección de la región de 120 kb; sin embargo, éstos tipos no son detectables en este enfoque, dado que no producen una variación en el número de copias del cassette GDYN1. Como se ve, con este enfoque la región "accesible" para recombinación ha quedado reducida a 3.8 kb para el caso de una inserción en la región b, mientras que para una inserción en la región a, la región accesible es de solamente 1 kb.

Para obtener las cepas con la inserción del cassette GDYN, en la región a o b, se cruzó la cepa S17-1/pDR20 con R. phaseoli CFN42, de manera similar a como se describió en el artículo "Amplification and deletion.....". Las dobles recombinantes obtenidas se analizaron por hibridización tipo Southern contra un detector específico para nifH. De esta manera se obtuvieron las cepas CFNX4 (nifHa::GDYN1) y CFNX6 (nifHb::GDYN1).

Estas cepas se crecieron en medio no selectivo y se platearon en medio selectivo para delecciones (PY con sacarosa 12.5%) o para duplicaciones (PY con kanamicina $50\mu\text{g ml}^{-1}$). En la tabla 2 se presentan los resultados de este experimento. Como se ve en esta tabla, la inserción de GDYN1 en la región b (cepa CFNX6) presenta

una frecuencia de obtención de deleciones o duplicaciones, similar a la observada en una cepa con inserción de GDYN1 en la región c (cepa CFNX5). Por otro lado, la inserción de GDYN en la región a (cepa CFNX4) lleva a una fuerte reducción en la frecuencia de obtención de deleciones o duplicaciones (aproximadamente 20 veces) en comparación a la observada en la cepa CFNX5. Esta reducción es claramente mayor a la esperada (5 veces) por lo que probablemente otros factores, aparte de la reducción en el tamaño de la región "accesible", están operando para producir una disminución en la frecuencia de rearrreglos.

Para determinar si los rearrreglos obtenidos a partir de las cepas CFNX4 y CFNX6 son causados aún por recombinación entre las reiteraciones nifHDK, se analizaron las derivadas obtenidas para perfil de plásmidos y patrones de hibridización contra un detector nifH así como para hibridización contra cósmidos que cubren el pSym. En la fig. 3 se muestran algunos tipos representativos, hibridizados contra un detector nifH. Todas las duplicaciones aisladas a partir de la cepa CFNX6 (6 cepas analizadas), corresponden al que llamaré tipo I, el cual es generado por recombinación entre las regiones nifHDK a y b. Para este caso, se esperan 4 bandas con hibridización contra nifH: una de región b::GDYN1 (11.3 kb), una 5'b/3'a::GDYN1 (10.9 kb), una de región a (9 kb) y otra de región c (aprox. 4 kb). Todas estas bandas serían de intensidad sencilla, salvo la banda de región c, que tendría una intensidad doble. Dada la proximidad en tamaño de las

bandas de región b::GDYN1 y de 5'b/3'a::GDYN1 y la pobre resolución del gel característica de esta zona, ambas bandas migrarían aparentemente como una sola, dando lugar a que el patrón diera solamente 3 bandas, con intensidades densitométricas relativas 2:1:2 (fig. 3, carril 8, cepa CFNX32). Estas cepas se analizaron también para perfil de plásmidos y patrón de hibridización contra cósmidos que cubren el pSim (datos no mostrados). Los resultados obtenidos indican que las duplicaciones obtenidas a partir de la cepa CFNX6 se generan por recombinación entre las regiones nifHDK, provocando duplicaciones en tandem del sector de 120 kb.

Para comprobar si a partir de la cepa CFNX6 pueden obtenerse amplificaciones de orden superior, la cepa CFNX6 se plateó en PY con kanamicina 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se obtuvieron derivadas resistentes a una frecuencia de 10^{-5} . La caracterización de cinco derivadas mostró que estas se generan también por recombinación entre las reiteraciones nifHDK, provocando repeticiones en tandem (de 5 a 8 veces) del sector de 120 kb (datos no mostrados).

Por último, se analizó un grupo de 8 deleciones obtenidas a partir de la cepa CFNX6. Como se ve en la fig. 3, carril 10, las ocho deleciones presentan una sola banda de hibridización con nifH, con una migración característica de una banda híbrida 5'a/3'b. Esto indica que las deleciones a partir de la cepa CFNX6 se generan también por recombinación nif-nif (tipo I). Los datos de patrón de plásmidos y perfil de hibridización contra cósmidos que cubren

el pSim corroboran esta interpretación (datos no mostrados).

En contraste a la uniformidad en tipo de rearreglo observada cuando el cassette se encontraba en la región c (CFNX5) o en la región b (CFNX6), al analizar las derivadas obtenidas a partir de una inserción en la región a (CFNX4) se observaron nuevos tipos de rearreglos.

Al analizarse 8 derivadas de la cepa CFNX4 portando supuestas deleciones para perfil de plásmidos y para hibridización contra nifH y una colección de cósmidos del pSim como detectores (fig. 4), se pudieron definir cuatro tipos de eventos.

El primer tipo (tipo I, fig. 3, carril 5, cepa CFNX87) se genera por recombinación entre las reiteraciones nifHDK a y b (bandas 1 y 25 del pSim, respectivamente). Este tipo de recombinación provoca que estas derivadas contengan ahora solamente una banda de hibridización contra un detector nifH, con una migración característica para una banda híbrida 5'a/3'b (fig. 3). Esta recombinación provoca una deleción continua que cubre de la banda 2 a la 24 (fig. 4). Las bandas que permanecen al hibridizarse estas cepas con cósmidos que cubren esta región corresponden a reiteraciones con otros sectores del pSim o con el resto del genoma. El plásmido resultante tiene un tamaño de 270 kb. Cinco cepas derivadas de CFNX4 corresponden a este tipo de deleción.

El segundo tipo (tipo II, cepa CFNX63), al analizarse por hibridización contra un detector nifH, muestra una sola banda de hibridización con una migración característica para la región nifHb. Por tanto, este nuevo tipo no fue generado por recombinación tipo nif-nif, sino que debió de haber empleado otras secuencias. Al analizarse esta derivada con una colección de cósmidos del pSim (fig. 4) se observa que esta porta una deleción que afecta de la banda 83 a la 24, para un total de 135 kb. Esta deleción traslapa casi en su totalidad con la afectada en las deleciones tipo I (fig. 5). En las bandas extremas de este tipo de deleción (bandas 83 y 24) se ha detectado la presencia de elementos reiterados pertenecientes a la familia c (Girard, et al., 1991). Por tanto, esta deleción probablemente se genera por recombinación entre el elemento C2 y el C3, generando una banda híbrida nueva, observable en la hibridización con cGD7 (fig. 4). El plásmido resultante es de un tamaño cercano a 270 kb. Solamente una deleción derivada de CFNX4 corresponde a este tipo.

El tercer tipo (tipo III, fig. 3, carril 6, cepa CFNX88) es similar al tipo II en el sentido de que solamente tiene una sola banda de hibridización con un detector nifH, siendo esta característica de nifHb. Sin embargo, este nuevo tipo porta una deleción que va de la banda 85 a la 21, a diferencia de los casos anteriores. Las bandas extremas de este tipo de deleción comparten elementos reiterados pertenecientes a la familia E

(Girard et al., 1991), por lo que esta delección probablemente se origina a consecuencia de una recombinación entre los elementos E2 y E3, produciendo una banda híbrida observable en la hibridización con cGD15 (fig. 4). El plásmido resultante es de aproximadamente 300 kb. Solamente una delección derivada de CFNX4 corresponde a este tipo (fig. 5).

El último tipo observado en este conjunto de cepas corresponde a una curación del pSim. No se observó ninguna hibridización ni con el detector nifH ni con un conjunto de cósmidos que cubren tanto la región de 120 kb como 90 kb adicionales en tres diferentes sectores del pSim. Solamente una cepa CFNX89 corresponde a este tipo, lo cual permite estimar la frecuencia de curación espontánea del pSim en aproximadamente 10^{-6} .

Ha resultado muy difícil aislar duplicaciones a partir de la cepa CFNX4. De hecho, de 6 derivadas aisladas, solamente 2 de ellas presentan amplificaciones reconocibles. Se desconoce la razón de esto. De estas dos cepas, una de ellas (CFNX24) presenta un perfil de hibridización con un detector nifH compatible con una duplicación tipo I (fig. 3, carril 2). En esta cepa se observaron 4 bandas de hibridización contra un detector nifH. Una corresponde a la región a::GDYN1 (14.7 kb), una a 5'b/3'a::GDYN1 (10.9 kb), una a la región b (5.6 kb) y otra a la región c (aproximadamente 4 kb). Todas estas bandas son de intensidad sencilla, salvo la banda correspondiente a la región c, la cual es

de intensidad doble. El análisis de perfil de plásmidos y patrón de hibridización contra cósmidos que cubren el pSim confirman que esta cepa es una duplicación tipo I (datos no mostrados).

La otra amplificación aislada a partir de la cepa CFNX4 (cepa CFNX18) presenta un perfil de hibridización con un detector nifH diferente al de las duplicaciones tipo I. Como se ve en la fig. 3, carril 3, en esta cepa se observaron tres bandas de hibridización contra un detector nifH; una corresponde a la región a::GDYN1 (14.7 kb), una a la región b (5.6 kb) y la tercera a la región c (aproximadamente 4 kb). Al realizarse un análisis por densitometría se encontró que estas bandas se presentan en una estequiometría 3:1:3, respectivamente. De estos datos podemos concluir que el rearrreglo en la cepa CFNX18 es:

- a) Una triplicación (no una duplicación) que afecta, al menos parcialmente, el sector de 120 kb, dado que la banda correspondiente a la región c aumenta en abundancia relativa y,
- b) Este evento no se originó por recombinación entre los operones nifHDK, dado que no aparece la banda híbrida característica de las amplificaciones tipo I.

El análisis del patrón de hibridización de esta cepa contra un conjunto de cósmidos que cubren el sector de 120 kb permite

aclarar el origen de esta triplicación (fig. 6). Esta triplicación provoca un aumento en la intensidad relativa de un sector que cubre de las bandas 84 a la 23 del pSim; esto es diferente a lo observado para las duplicaciones tipo I, donde se observa un aumento en la intensidad de las bandas 2 a la 24. Aún más, en el patrón de hibridización de la cepa CFNX18 contra cGD7 se observa una banda adicional de hibridización, la cual no aparece en las amplificaciones tipo I (fig. 6).

Estos datos son compatibles con una triplicación generada por recombinación entre elementos reiterados en las bandas 83 y 24, esto es, los elementos C2 y C3. Por tanto, esta sería una triplicación tipo II, correspondiendo al evento recíproco al de las deleciones tipo II. Para corroborar esto, se hibridizó el DNA genómico de la cepa CFNX18 contra la banda 83 como detector. De ser cierta esta interpretación, debería observarse una banda adicional de hibridización, con la misma migración que la observada para la banda adicional revelada con cGD7. Los datos obtenidos confirman esta predicción (fig. 7).

En la tabla 3 se presenta la clasificación de los diferentes tipos de rearrreglos aislados y caracterizados en este trabajo.

De estos datos puede concluirse que:

a) Ocurren rearrreglos a alta frecuencia en el plásmido

simbiótico de Rhizobium phaseoli CFN42. Estos rearrreglos son amplificaciones y deleciones de un sector de este plásmido.

- b) Estos rearrreglos se generan principalmente por recombinación entre las reiteraciones nifHDK localizadas en orientación directa en este plásmido.
- c) En condiciones en las cuales se "limita" el uso de las reiteraciones nifHDK como sitios de recombinación, pueden usarse como tales al menos otros dos pares de reiteraciones en este plásmido. La recombinación entre estas reiteraciones ocurre, sin embargo, a menor frecuencia que para el caso de las reiteraciones nifHDK.
- d) La frecuencia de curación espontánea del plásmido simbiótico de R. phaseoli CFN42 se estima en 10^{-6} .

B) FENOTIPOS CARACTERISTICOS DE CEPAS PORTANDO AMPLIFICACIONES O DELECIONES EN EL PLASMIDO SIMBIOTICO DE R. phaseoli CFN42.

En este momento me encuentro analizando si las amplificaciones o deleciones reportadas en este trabajo confieren algún o algunos fenotipos característicos. Hasta el momento, no he encontrado

diferencias en motilidad en ausencia de atractantes o en producción de exopolisacáridos en ninguna de las cepas analizadas. Además, no parece ser que las deleciones, sean estas tipos I, II ó III confieran alguna auxotrofia, ya que cepas portando estas deleciones pueden crecer en medio mínimo con succinato de sodio como fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno. Tampoco he detectado diferencias con respecto al uso de fuentes de carbono en cepas portando ya sea amplificaciones o deleciones. Dentro de las fuentes probadas estuvieron succinato, glucosa, lactosa, maltosa, fructosa, glicerol, lactato y manitol.

Sin embargo, se han detectado diferencias significativas con dos fenotipos, los cuales son producción de melanina y capacidad de nodulación.

Con respecto a producción de melanina, se sabe desde hace tiempo que Rhizobium phaseoli es capaz de producir este pigmento (Beynon et al., 1980). La producción de melanina no es, sin embargo, una capacidad exclusiva de R. phaseoli, ya que puede presentarse en otras especies de Rhizobium (Cubo et al., 1988). Con respecto a la localización de los genes necesarios para la síntesis de melanina se sabe que estos se encuentran localizados en el plásmido simbiótico, tanto en la cepa CFN42 como en otras cepas de R. phaseoli (Borthakur et al., 1987; Cubo et al., 1988). De hecho, Martínez-Salazar et al. (1991) han demostrado que una cepa derivada de R. phaseoli CFN42, portando una deleción en su

plásmido simbiótico, es incapaz de producir melanina. Esta deleción corresponde al tipo I descrito en este trabajo.

Con estos antecedentes, decidimos explorar las capacidades de producción de melanina de cepas portando diferentes tipos de rearreglos. Corroborando datos de la literatura, encontramos que la cepa CFNX89, la cual es una derivada curada de pSim, es incapaz de producir melanina. Por otro lado, hemos encontrado que la cepa CFNX55, la cual porta una deleción tipo I, es todavía capaz de producir melanina, aunque en cantidades apenas detectables. Sin embargo, una cepa portando una deleción tipo III (CFNX88) produce melanina en cantidades normales. Esto plantea la existencia de dos loci necesarios para la síntesis de melanina, uno de ellos localizado entre las bandas 21 y 25 y el otro localizado entre las bandas 25 a 83 (ver discusión).

Al analizar la producción de melanina en cepas llevando amplificaciones tipo I (CFNX26, CFNX28, CFNX39 y CFNX76) o una triplicación tipo II (CFNX18) se encontró que estas son capaces de producir más melanina que la cepa silvestre. Esto implica que la amplificación del locus localizado entre las bandas 21 a 25 conlleva un efecto de dosis génica, expresado éste como un aumento en la producción de melanina (ver discusión).

El segundo fenotipo observado en cepas portando deleciones o amplificaciones en el pSim se refiere a la capacidad de nodulación.

Como se describió en el artículo "Amplification and deletion ...", una cepa que porta una deleción tipo I es incapaz de nodular a Phaseolus vulgaris. De manera similar, cepas que portan deleciones tipo II ó tipo III son también incapaces de nodular a P. vulgaris. Estos datos pueden explicarse por la pérdida de genes esenciales para nodulación, como nodBC en las deleciones tipo I y nodA y nodBC en las deleciones tipos II y III (ver discusión).

Al analizar la cinética de nodulación de cepas portando diferentes tipos de amplificaciones, se encontró que cepas portando duplicaciones (CFNX26, CFNX76) o triplicaciones (CFNX28) tipo I pueden nodular P. vulgaris con una cinética indistinguible a la de las cepas progenitoras (fig. 8). Sin embargo, la cepa que porta una triplicación tipo II (CFNX18) está inhibida fuertemente en su capacidad de nodulación, produciendo menos nódulos y a tiempos más largos que la cepa progenitora (fig. 8). Este efecto no se debe a un aumento en la cantidad total de DNA en el pSim o a un aumento en el número de copias del cassette GDYN1, ya que la cepa CFNX28, la cual porta una triplicación tipo I nodula con una cinética normal (fig. 8). Por otro lado, la cepa CFNX39, la cual porta una amplificación (8 veces) tipo I se encuentra inhibida también en cinética de nodulación, aunque menos severamente que la triplicación tipo II (fig. 8). Los fenotipos observados podrían explicarse por sobreproducción de genes específicos para nodulación (ver discusión).

Con el fin de comprobar si los nódulos observados fueron formados por la cepa usada como inoculante y no por revertantes que (en el caso de amplificaciones) hayan regresado a la estructura normal del pSim, se aislaron bacterias de nódulos inducidos por cada cepa y se caracterizaron por el perfil de plásmidos para presencia de un pSim normal o amplificado. No se observó ningún crecimiento bacteriano proveniente de la superficie de los nódulos, por lo que las cepas aisladas provienen del interior de ellos. Los datos obtenidos se encuentran en la tabla 4. Como se ve en esta tabla, las cepas que están ocupando los nódulos corresponden al tipo usado como inoculante, cuando se emplearon la cepa CFNX5 o duplicaciones y triplicaciones tipo I (CFNX26 y CFNX28, respectivamente) derivadas de ella. La única excepción es la de una cepa aislada de nódulos inducidos por CFNX5, la cual parece llevar una amplificación. En este momento me encuentro caracterizando a que tipo pertenece.

En contraste a la uniformidad descrita en el párrafo anterior, cuando *P. vulgaris* en inoculado con cepas que tienen una desventaja en nodulación, pueden observarse tipos correspondientes a un regreso a la estructura normal del pSim. Para el caso de la cepa CFNX39, la cual está inhibida de manera intermedia en nodulación, 2/12 de las cepas llevan un pSim normal, mientras que cuando la inhibición es más pronunciada, como en el caso de la cepa CFNX18, 8/16 cepas llevan un pSim normal (tabla 4).

Como conclusión a este apartado, hemos encontrado diferencias en cepas portando amplificaciones o deleciones con respecto a producción de melanina y cinética de nodulación. La caracterización fenotípica de estas cepas debe considerarse aún como incompleta, ya que deben analizarse todavía otras posibilidades (ver discusión).

DISCUSSION

We shall not cease from exploration
And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time.

T. S. Eliot.

a) Significado funcional de la reiteración de los genes nifHDK en R. phaseoli.

Los datos presentados en el artículo "Effect of naturally occurring nif reiterations on symbiotic effectiveness in Rhizobium phaseoli", muestran claramente que tanto la región a como la región b (portando ambas reiteraciones nifHDK) son necesarias para una fijación de nitrógeno óptima en P. vulgaris. Esto indica la presencia de un efecto de dosis génica para estas reiteraciones. Además, los datos presentados indican que la región c por sí sola es incapaz de conferir la capacidad de fijar nitrógeno.

En un reporte previo (Quinto et al., 1985), no se encontraron diferencias en efectividad simbiótica similares a las encontradas aquí. Creemos que esto fue debido a que las pruebas reportadas anteriormente se llevaron a cabo bajo condiciones restrictivas para el crecimiento vegetal y, además, se realizaron a tiempos más cortos (17 vs. 28 días). Ambos factores hicieron difícil el detectar las diferencias reportadas aquí. Por otro lado, el presente estudio fue mejorado por la inclusión de mejores estimadores de la capacidad de fijación de nitrógeno, como la medición del contenido de nitrógeno total en la planta.

La presencia de reiteraciones nifH funcionales no es un hecho restringido a R. phaseoli. Como se ve en la tabla 1, al menos otros dos organismos poseen reiteraciones nifH funcionales (A.

caulinodans y R. sp. NGR234) y se sospecha que un tercero (S. fredii) posee también esta característica. Estos ejemplos ilustran el hecho de que la reiteración nifH no es una característica restringida al microsimbionte del frijol; esta se presenta también en microsimbiontes de la soya (S. fredii), de Sesbania rostrata (A. caulinodans), o aún en una cepa con amplio rango huésped (R. sp. NGR234). Tampoco es esta una característica obligatoria para los simbioses de estas plantas. Por ejemplo, el frijol puede ser nodulado y fijar nitrógeno en simbiosis con dos especies distintas, R. phaseoli y R. tropici sp.nov. (Martínez et al., 1985, 1991); la primera de estas especies posee reiteraciones nifH, mientras que la segunda no. Un ejemplo similar es la soya, la cual puede interactuar como un simbiote que posee (S. fredii) o carece (B. japonicum) de reiteraciones nifH.

De cualquier manera, la reiteración de nifH parece ser una variación que permitió incrementar el nivel de fijación de nitrógeno en una cepa o especie dada. Desde luego, la reiteración nifH es sólo una de las posibles alternativas para incrementar la actividad de nitrogenasa; otra alternativa pudiera haber sido una mutación que elevara el nivel de expresión y/o estabilidad del producto de una sola copia. Sin embargo, la reiteración de genes a partir de copias existentes, abre la posibilidad de generar proteínas variantes o aún nuevas (Ohno et al., 1986). Para el caso que nos ocupa, resultaría interesante que alguna de estas reiteraciones nifH pudiera volverse la "materia prima" para la

evolución de una nitrogenasa alternativa (veáse Valderrama, 1989; para una discusión de esta posibilidad). De hecho, las reiteraciones nodD observadas en diferentes organismos (tabla 1) pudieran ser un ejemplo de duplicación seguido de divergencia, dado que difieren en sus funciones regulatorias. De un análisis de los datos de la tabla 1, se observan 6 genes que presentan reiteraciones funcionales. Este número de reiteraciones funcionales excede ya del observado en E. coli (Riley y Krawiec, 1987), a pesar de que, para el caso de Rhizobium, se ha analizado solamente una parte proporcionalmente pequeña de su genoma. De ser esto representativo del resto del genoma, nos encontraríamos ante un genoma bacteriano "sencillo" donde la duplicación de genes funcionales ha sido extremadamente frecuente.

b) Plasticidad en el genoma de Rhizobium: mecanismos y perspectivas.

Como se ve en el artículo "Amplification and deletion of a nod-nif region in the symbiotic plasmid of Rhizobium phaseoli" y en la sección de resultados adicionales de esta tesis, he demostrado la existencia de rearrreglos que afectan a alta frecuencia (10^{-3} a 10^{-4}) la estructura del plásmido simbiótico de R. phaseoli CFN42. Estos rearrreglos son principalmente amplificaciones y deleciones que afectan un sector de 120 kb en este plásmido. Los rearrreglos observados se generan

principalmente por recombinación entre las reiteraciones nifHDK localizadas en orientación directa en este pSim. A menor frecuencia, pueden usarse también como sitios de recombinación, otros dos pares de reiteraciones en este plásmido.

Estos datos confirman las ideas presentadas anteriormente, de que las secuencias reiteradas podían participar en la generación de plasticidad genómica en Rhizobium. Asimismo, se presentan dos modelos que podrían explicar la generación de rearrreglos, uno basado en entrecruzamiento desigual y el otro basado en excisión de una molécula circular por recombinación entre secuencias repetidas y su posterior reinserción.

Recientemente, se han obtenido datos en mi grupo que sugieren que un mecanismo que puede operar en Rhizobium es uno de excisión de moléculas circulares y reinserción (Durán, 1991). Para este fin, hemos empleado un sistema simplificado para detectar amplificación. Este sistema emplea un plásmido incapaz de replicarse en Rhizobium el cual porta además una secuencia homóloga al genoma de este organismo (en este caso, la reiteración nifHa). Este plásmido puede integrarse en el genoma por un sólo evento de recombinación tipo Campbell, generando en este caso una estructura nifHa-vector-nifHa. Si se aplica una selección que demanda una mayor expresión de un gene localizado en el vector (tal como un aumento en el nivel de resistencia a cloramfenicol) pueden obtenerse amplificaciones por recombinación desigual entre las dos

regiones que flanquean al vector. Sistemas similares a éste han sido empleados anteriormente en otros organismos (Guttererson y Koshland, 1983; Young, 1984).

Al aplicarse este sistema en Rhizobium, se logró detectar amplificaciones en tandem de la región nifHa y el vector (Durán, 1991). Dependiendo de la concentración de cloramfenicol utilizada, pudo amplificarse hasta 12 veces esta región. Lo más interesante con respecto a esta discusión es que en cepas portando este tipo de amplificación, se observaron una serie de elementos circulares que corresponden a monómeros y multímeros de una estructura nifHa-vector. Estos elementos se presentaron solamente al ejercer selecciones para amplificación, desapareciendo en su ausencia. La abundancia de estos elementos, además, se incrementa en relación directa al grado de amplificación (Durán, 1991). Estas observaciones y otras adicionales, son consistentes con que el mecanismo de amplificación que está operando es uno de excisión de moléculas circulares y reinserción (Durán, 1991).

Además del mecanismo empleado, otra pregunta interesante consiste en la naturaleza del sistema de recombinación que cataliza estos rearrreglos. En E. coli se ha observado que cuando las secuencias empleadas como sitios de recombinación para la generación de rearrreglos son secuencias largas, el sistema es dependiente de recA (Hill y Petes, 1988), mientras que si las secuencias son menores a 20 pb se emplea un sistema independiente

de reCA (Albertini et al, 1982; Shyamala et al., 1990). Para probar que sistema de recombinación estaba operando, Jaime Martinez Salazar, (1991); probó la frecuencia de amplificaciones y deleciones en fondos genéticos silvestres o deficientes en reCA. Se encontró que la frecuencia tanto de amplificaciones como de deleciones en un fondo genético deficiente en reCA se abatía al menos 100 veces, probándose así el papel de reCA en la formación de rearrreglos en R. phaseoli (Martínez-Salazar, J., 1991).

En este momento, planeo extender los estudios de formación de amplificaciones y deleciones para analizar otras regiones del pSim. Se ha analizado solamente un intervalo que cubre un tercio de la estructura de este plásmido. La inserción del cassette GDYN1 en otros sitios del plásmido simbiótico nos permitirá generar un "mapa de plasticidad", el cual se complementará con la localización de otros genes de importancia. Esto nos permitirá entender la plasticidad del pSim como un replicón modelo del genoma de Rhizobium. Por otro lado, la existencia de amplificaciones no se restringe al pSim. En otros estudios, se ha encontrado evidencia de que otras regiones del genoma pueden portar eventos de amplificación que se generan a alta frecuencia (Brom et al., 1991; M. Flores y R. Palacios; datos no publicados).

Además, nos encontramos analizando la posibilidad de que rearrreglos de los tipos amplificación o deleción puedan ocurrir en el pSim de otras cepas de R. phaseoli. Este estudio es

particularmente importante, ya que la evidencia de genética de poblaciones sugiere que esta especie pudiera estar formada por tanto como cinco linajes cromosomales muy diferentes (Piñero et al., 1988). Dada la imposibilidad técnica de analizar un número muy amplio de cepas, en este momento estamos analizando representantes únicos de cada linaje, con un énfasis en aquellos miembros que posean un interés agronómico (César Rodríguez S., tesis de Maestría en Ciencias, en proceso).

Es necesario, sin embargo, el explorar otros tipos de eventos que sabemos ocurren a alta frecuencia en este genoma. Entre estos se encuentran curaciones de plásmidos específicos (Brom et al., 1991), cointegraciones entre plásmidos (Brom et al., 1991; Martínez-Salazar, 1991) así como al menos un ejemplo de translocación (Martínez-Salazar, 1991). Por otro lado, la estructura misma del pSim sugiere la posibilidad de inversiones. Nuestro plan a largo plazo consiste en entender el papel de estos rearrreglos en la estructura y dinámica del genoma de Rhizobium. Sin embargo, tal vez el mayor reto en este momento consiste en identificar las posibles alteraciones fenotípicas conferidas por estos rearrreglos.

c) Consecuencias fenotípicas de los rearrreglos observados.

Al momento de comenzar este trabajo, deseábamos comprender

los factores involucrados en la dinámica de familias reiteradas en el genoma de Rhizobium phaseoli. Al mismo tiempo, nuestra intención era comprender los mecanismos de inestabilidad de la nodulación y fijación de nitrógeno. Como se ve de la información analizada en la introducción, se han emprendido muchos estudios tendientes a aclarar las causas de este problema. Sin embargo, por lo común, se piensa que los rearrreglos genómicos, cuando se presentan, conducen inevitablemente a alteraciones dañinas para los fenotipos simbióticos de la cepa.

Considero que esta es una visión parcial. Si bien los rearrreglos genómicos pueden conducir a la pérdida de características deseables, también pueden llevar a una mejora en estas características. El caso de las amplificaciones en tandem es particularmente claro en este sentido, ya que se han encontrado numerosos ejemplos de estos rearrreglos permitiendo adaptación rápida a condiciones ambientales que demandan la alta expresión de un producto génico (Anderson y Roth, 1977; Hill y Petes, 1988; Sonti y Roth, 1989). Por otro lado, la frecuente reversibilidad presentada por este tipo de rearrreglos (Anderson y Roth, 1977; Koch, 1979) es particularmente atractiva, ya que permite la generación de adaptaciones útiles sin comprometer irreversiblemente la estructura del genoma. Por tanto, consideré importante el incluir en nuestra estrategia, la posibilidad de selección para este tipo de rearrreglos.

Al analizar las capacidades de nodulación en cepas portando deleciones, encontré que todas ellas producen un fenotipo Nod⁺, independientemente del tipo de deleción. Esto no es sorprendente, ya que las deleciones tipo I carecen de varios genes esenciales para nodulación, como son los genes nodB, nodC y una de las copias de nodD, mientras que las deleciones tipos II y III carecen de los genes nodA, nodB, nodC y todas las copias de nodD. El gene nodD es un factor regulatorio positivo, el cual, en respuesta a compuestos flavonoides exudados por las plantas, puede activar la síntesis de un grupo de genes requeridos para nodulación (Kondorosi et al., 1991), como son los genes nodABC. Recientemente se demostró que los genes nodABC, así como otros genes nod, están involucrados en la síntesis y modificación de un compuesto mitogénico específico para la planta huésped, el cual es esencial para iniciar la organogénesis del nódulo (Lerouge, 1990; Roche, 1991). En todas las especies de Rhizobium analizadas, los genes nodABC forman un operón o al menos tienen una localización contigua. Sin embargo, en R. phaseoli el gene nodA está separado de los genes nodBC por 20 kb (fig. 1), formando dos unidades transcripcionales separadas (Girard et al., 1991; Vázquez et al., 1991).

Al analizar la cinética de nodulación de cepas portando diferentes tipos de amplificaciones, se encontró que aquellas que portan duplicaciones o triplicaciones tipo I poseen una cinética de nodulación indistinguible de las cepas progenitoras. En

contraste, una cepa portando una triplicación tipo II se encuentra severamente inhibida en su capacidad de nodulación. La cepa que porta una amplificación (8 veces) tipo I se encuentra inhibida también en su cinética de nodulación, aunque menos severamente que aquella que porta una triplicación tipo II.

Debe recordarse que los eventos tipo I y los tipo II afectan una región común, la cual incluye a los genes nodBC y al menos una copia de nodD. Los eventos tipo II, además, afectan una zona que incluye el gene nodA y la copia restante de nodD. Hace algunos años, se reportó que los genes nodABC, clonados en un plásmido multicopia, pueden inhibir la nodulación del chícharo por una cepa normal de R. leguminosarum (Knight et al., 1986). Conociendo el papel de los genes nodABC en la producción de un factor mitogénico específico, es tentador suponer que la inhibición de nodulación en una cepa portando una triplicación tipo II es debida a la sobreproducción de este factor. Alternativamente, lo que podría estarse produciendo es un factor con una estructura alterada, debido esto probablemente a un desbalance en la dosis de los genes encargados de la producción de este factor. En este momento nos encontramos analizando, en colaboración con el grupo de la Dra. Esperanza Martínez, el tipo y cantidad de factor producido por estas cepas.

Otro fenotipo que presentan cepas portando amplificaciones o deleciones es variación en la capacidad de producir melanina. De

hecho, cepas portando amplificaciones tipo I ó II pueden producir más melanina que la cepa silvestre. Por otro lado, cepas portando deleciones, pueden producir cantidades normales o fuertemente reducidas, dependiendo del tipo de deleción. En otras cepas de R. phaseoli se ha realizado un análisis genético de la producción de melanina (Borthakur et al., 1987). Este análisis reveló la existencia de dos loci (mel I y mel II) necesarios para la biosíntesis de melanina. Mutaciones en cualquiera de los dos loci abolen la síntesis de melanina, pero las mutaciones en mel II presentan un segundo fenotipo: eliminan la capacidad de fijar nitrógeno (Borthakur et al., 1987). Estos autores sugieren que el locus mel II es en realidad nifA, el cual codifica para un regulador positivo de los genes nif y fix (Borthakur et al., 1987). Los datos del mapeo del plásmido simbiótico indican la existencia de un probable gene nifA en la banda 21 de este plásmido; este pudiera corresponder a uno de los loci mel propuestos en este trabajo (mel II). El otro locus, localizado entre las bandas 25 a 83, podría corresponder a un análogo de mel I.

La caracterización fenotípica presentada aquí debe considerarse aún como preliminar. Para comprender la relevancia biológica de estos rearrreglos, deben de analizarse todavía otros muchos fenotipos relevantes, como nodulación en presencia de amonio, nodulación de otras leguminosas, capacidad de fijar nitrógeno, capacidad de utilizar exudados radiculares como fuentes de carbono o nitrógeno, competitividad, quimiotaxis específica,

etcétera.

Otro punto que debe estudiarse aún es la frecuencia de estos rearrreglos en respuesta a diferentes condiciones ambientales. La frecuencia de rearrreglos descrita aquí debe de considerarse como la situación basal bajo condiciones de laboratorio. ¿Pueden existir condiciones naturales que varíen la frecuencia de rearrreglos? Tal vez el cambio ambiental más radical que experimenta Rhizobium es la transición de saprófito a simbiote. ¿Las condiciones fisiológicas existentes en el nódulo pueden afectar la tasa de formación de rearrreglos? De afectarse estas tasas de manera diferencial, nos encontraríamos ante una situación de alternancia en tasas de variación genética, lo cual podría tener profundas consecuencias evolutivas (Hall, 1990).

Resta todavía mucho por hacer. Sin embargo, es mi convicción el que del análisis de este tipo de preguntas se obtendrá una comprensión más completa de la estructura, dinámica y evolución del genoma.

REFERENCIAS.

- Albertini, A.M., M. Hofer, M.P. Calos y J.H. Miller (1982).
On the formation of spontaneous deletions: the importance of
short sequence homologies in the generation of large deletions.
Cell, 29: 319-328.
- Alexander, M. (1980).-Ecological constraints on nitrogen
fixation in agricultural ecosystems, p. 163-183. En:
Advances in Microbial Ecology. M. Alexander, ed. Plenum
Publishing Corp. New York.
- Anderson, R.P. y J.R. Roth (1977).-Tandem genetic
duplications in phage and bacteria. Annu. Rev. Microbiol.
31: 473-504.
- Appelbaum, E.R., D.V. Thompson, K. Idler y N. Chartrain.
(1988).-Rhizobium japonicum USDA191 has two nodD genes
that differ in structure and function. J. Bacteriol.,
170: 12-20.
- Appleby, C.A. (1984).-Leghemoglobin and Rhizobium respiration.
Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 443-478.
- Badenoch-Jones, J., T.A. Holton, C.M. Morrison, K.F. Scott y

- J. Shine (1989).-Structural and functional analysis of nitrogenase genes from the broad-host-range Rhizobium strain ANU240. *Gene*, 77: 141-153.
- Barbour, W.M., J.N. Mathis y G.H. Elkan (1985).-Evidence for plasmid- and chromosome-borne multiple nif genes in Rhizobium fredii. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 41-44.
- Better, M., B. Lewis, D. Corbin, G. Ditta y D.R. Helinski. (1983).-Structural relationships among Rhizobium meliloti symbiotic promoters. *Cell*, 35: 479- .
- Beynon, J.L., J.E. Beringer y A.W.B. Johnston (1980).-Plasmids and host-range in Rhizobium leguminosarum and Rhizobium phaseoli. *J. Gen. Microbiol.*, 120: 421-429.
- Birch, A., A. Häusler y R. Hütter (1990).-Genome rearrangement and genetic instability in Streptomyces spp. *J. Bacteriol.*, 172: 4138-4142.
- Boivin, C., S. Camut, C.A. Malpica, G. Truchet y C. Rosenberg (1990).-Rhizobium meliloti genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell*, 2: 1157-1170.
- Borthakur, D., J.W. Lamb y A.W.B. Johnston (1987).-

Identification of two classes of Rhizobium phaseoli genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. *Mol. Gen. Genet.*, 207: 155-160.

-Bottomley, P.J., K. Leung, S.R. Strain, K. Yak, N. Dashti y P. Claycomb (1990).-The ecology of indigenous populations of Rhizobium leguminosarum bvs. trifolii and viceae. pp. 371-378. En: P. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (eds.). Nitrogen Fixation: achievements and objectives. Chapman and Hall, New York.

-Brewin, N.J., E.A. Wood, A.W.B. Johnston, N.J. Dobb y G. Hombrecher (1982).-Recombinant nodulation plasmids in Rhizobium leguminosarum. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 1817-1827.

-Brom, S., E. Martínez, G. Dávila y R. Palacios (1988).-Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of Rhizobium spp. strains that nodulate Phaseolus vulgaris. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1280-1283.

-Brom, S., A. García de los Santos, M.L. Girard, G. Dávila, R. Palacios y D. Romero (1991).-High frequency rearrangements in Rhizobium leguminosarum bv phaseoli plasmids. *J. Bacteriol.*, 173:

- Bromfield, E.S.P., N.P. Thurman, S.T. Whitwill y L.R. Barran (1987).-Plasmids and symbiotic effectiveness of representative phage types from two indigenous populations of Rhizobium meliloti. J. Gen. Microbiol. 133: 3457-3466.
- Campbell, A. (1981).-Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 35: 55-83.
- Charlebois, R.L. y W.F. Doolittle (1989).-Transposable elements and genome structure in Halobacteria. En: Mobile DNA, D.E. Berg y M.M. Howe (eds). E.E.U.U. American Society for Microbiology. pp. 297-308.
- Charles, T.C. y T.M. Finan (1991).-Analysis of a 1600-Kilobase Rhizobium meliloti megaplasmid using defined deletions generated in vivo. Genetics, 127: 5-20.
- Christensen, A.H. y Schubert, K.R. (1983).-Identification of a Rhizobium trifolii plasmid coding for nitrogen fixation and nodulation genes and its interaction with pJB5JI, a Rhizobium leguminosarum plasmid. J. Bacteriol., 156: 592- .
- Cocking, E.C., M.K. Al-Mallah, E. Benson y M.R. Davey (1990).-Nodulation of non-legumes by rhizobia. pp. 813-823. En: P. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (eds.). Nitrogen Fixation: achievements and objectives. Chapman and Hall, New

York.

- Cubo, M.T., A.M. Buendía-Clavería, J.E. Beringer y J.E. Ruiz-Sáinz (1988).-Melanin production by Rhizobium strains. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1812-1817.

- David, M., O. Domergue, P. Pogonec y D. Kahn (1987).- Transcription patterns of Rhizobium meliloti symbiotic plasmid pSim: identification of nifA-independent fix genes. J. Bacteriol., 169: 2239-2244.

- Davis, E.O. y A.W.B. Johnston (1990 a).-Analysis of three nodD genes in Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli; nodD1 is preceded by nolE a gene whose product is secreted from the cytoplasm. Mol. Microbiol., 4: 921-932.

- Davis, E.O. y A.E.B. Johnston (1990 b).-Regulatory functions of the three nodD genes of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. Mol. Microbiol. 4: 933-941.

- Dilworth, M. y A. Glenn (1984).-How does a legume nodule work?. Trends Biochem. Sci. 9: 519-523.

- Djordjevic, M.A., W. Zurkowski y B.G. Rolfe (1982).-Plasmids and stability of symbiotic properties of Rhizobium trifolii. J. Bacteriol., 151: 560-568.

- Dover, G.A. (1986).-Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. Trends in Genet. 2: 159-165.

- Dowling, D.N. y W.J. Broughton (1986).-Competition for nodulation of legumes. Annu. Rev. Microbial., 40: 131- .

- Durán Stransky, L.M. (1991).-Amplificación de una región del plásmido simbiótico de Rhizobium phaseoli CFN42 por medio de plásmidos integracionales. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.

- Dusha, I., S. Kovalenko, Z. Banfalvi y A. Kondorosi (1987).- Rhizobium meliloti insertion element ISRm2 and its use for identification of the fixX gene. J. Bacteriol., 169: 1403-1409.

- Dyson, P. y D. Sherratt (1985).-Molecular mechanisms of duplication, deletion and transposition of DNA. En: The Evolution of Genome Size, T. Cavalier-Smith, ed. John Wiley and Sons, London. pp. 353- .

- Evans, H.J., A. Harker, H. Papen, S.A. Russell, F.J. Hanus y M. Zuber (1987).-Physiology, Biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. Annu. Rev. Microbiol., 41: 335- .

- Flores, M., V. González, S. Brom., E. Martínez, D. Piñero, D. Romero, G. Dávila y R. Palacios (1987).-Reiterated DNA sequences in Rhizobium and Agrobacterium spp. J. Bacteriol., 169: 5782-5788.
- Flores, M., V. González, M.A. Pardo, A. Leija, E. Martínez, D. Romero, D. Piñero, G. Dávila y R. Palacios (1988).-Genomic instability in Rhizobium phaseoli. J. Bacteriol., 170: 1191-1196.
- Girard, M.L., M. Flores, S. Brom, D. Romero, R. Palacios y G. Dávila (1991).-Structural complexity of the symbiotic plasmid of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. J. Bacteriol., 173, en prensa.
- Gray, J.X. y B.G. Rolfe (1990).-Exopolysaccharide production in Rhizobium and its role in invasion. Mol. Microbiol., 4: 1425-1431.
- Gutterson, N.I. y D.E. Koshland Jr. (1983).-Replacement and amplification of bacterial genes with sequences altered in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4894-4898.
- Gyorgypal, Z., N. Iyer y A. Kondorosi (1988).-Three regulatory nodD alleles of diverged flavonoid specificity are involved in

- host-dependent nodulation by Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet., 212: 85-92.
- Hahn, M. y H. Hennecke (1987).-Mapping of a Bradyrhizobium japonicum DNA region carrying genes for symbiosis and an asymmetric accumulation of reiterated sequences. Appl. Environ. Microbiol., 53: 2247-2252.
- Hall, B. (1990).-Spontaneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral. Genetics, 126: 5-16.
- Halverson, L.J. y G. Stacey (1986).-Signal exchange in plant-microbe interactions. Microbiol. Rev. 50: 193- .
- Hartl, D.L. y D.E. Dykhuizen (1984).-The population genetics of Escherichia coli. Annu. Rev. Genet. 18: 31-68.
- Hennecke, H., L. Meyer, M. Göttfert y H.-M. Fischer (1988).-Genetics of the Bradyrhizobium japonicum-soybean symbiosis: recent developments on genes for nodulation, bacteroid respiration, and regulation of nitrogen fixation. En: Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, pp. 118-123 R. Palacios y D.P.S. Verma (eds.). APS Press, E.E.U.U.
- Herridge, D.F. y R.J. Roughley (1975).-Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of Rhizobium.

- J. Appl. Bacteriol., 38: 19-27.
- Hodgson, A.L.M. y G. Stacey (1986).-Potential for Rhizobium improvement. Crit. Rev. Biotechnol., 4: 1- .
- Honma, M.A. y F.M. Ausubel (1987).-Rhizobium meliloti has three functional copies of the nodD symbiotic regulatory gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8558-8562.
- Hoying, J.B., S.M. Behm y N. Lang-Unnasch (1990).-Cloning and characterization of Rhizobium meliloti loci required for symbiotic root nodule invasion. Mol. Plant-Microbe Interact. 3: 18-27.
- Hynes, M.F. y N.F. McGregor (1990).-Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by Rhizobium leguminosarum. Mol. Microbiol., 4: 567-574.
- Kaluza, K., M. Hahn y H. Hennecke (1985).-Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the nif region of the Rhizobium japonicum genome. J. Bacteriol., 162: 535-542.
- Knight, C.D., L. Rossen, J.G. Robertson, B. Wells y J.A. Downie (1986).-Nodulation inhibition by Rhizobium leguminosarum multicopy nodABC genes and analysis of early stages of plant

- infection. J. Bacteriol., 166: 552-558.
- Koch, A.L. (1979).-Selection and recombination in populations containing tandem multiplet genes. J. Mol. Evol. 14: 273-285.
- Kohara, Y., K. Akiyama y K. Isono. (1987).-The physical map of the whole E. coli chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. Cell, 50: 495-508.
- Kondorosi, A. (1991).-Overview on genetics of nodule induction by Rhizobium meliloti. pp. 111-118. En: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Vol. 1. H. Hennecke y D.P.S. Verma (eds.). Kluwer Academic Publishers, Holanda.
- Kullik, I., S. Fritsche, H. Knobel, J. Sanjuan, H. Hennecke y H.M. Fischer (1991).-Bradyrhizobium japonicum has two differentially regulated, functional homologs of the σ^{54} gene (rpoN). J. Bacteriol., 173: 1125-1138.
- Labandera, C.A. y J.M. Vincent (1975).-Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of Rhizobium trifolii. J. Appl. Bacteriol., 39: 209-211.
- Layzell, D.B., S. Hunt, A.H.M. Moloney, S.M. Fernando y L. Diaz del Castillo (1990).-Physiological, metabolic and developmental

implications of O₂ regulation in legume nodules. pp. 21-32. En: P. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (eds.). Nitrogen Fixation: achievements and objectives. Chapman and Hall, New York.

-Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J.C. Promé y J. Dénarié (1990).-Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligo-saccharide signal. Nature, 344: 781-784.

-Long, S.R. (1989).-Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. Cell, 56: 203-214.

-Lowendorf, H.S. (1980).-Factors affecting survival of Rhizobium in soils, p. 87-123. En: M. Alexander (ed.). Advances in Microbial Ecology. Plenum Publishing Corp. New York.

-Martínez, E., M.A. Pardo, R. Palacios y M.A. Cevallos (1985).-Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. J. Gen. Microbiol., 131: 1779-1786.

-Martínez, E., R. Palacios y F. Sánchez (1987).-Nitrogen fixing nodules induced by Agrobacterium tumefaciens harboring Rhizobium phaseoli plasmids. J. bacteriol., 169: 2828-2834.

- Martínez, E., M. Flores, S. Brom, D. Romero, G. Dávila y R. Palacios (1988).-Rhizobium phaseoli: a molecular genetics view. *Plant Soil*, 108: 179-184.
- Martínez, R., D. Romero y R. Palacios (1990).-The Rhizobium genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9: 59-93.
- Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. Martins Mercante, A.A. Franco, P. Graham y M.A. Pardo (1991).- Two novel Rhizobium species nodulating phaseolus vulgaris L. beans and Leucaena sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, en prensa.
- Martínez-Salazar, J.M. (1991).-Clonación y caracterización del gene recA de Rhizobium phaseoli. Tesis de Doctorado en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM.
- Martínez-Salazar, J.M., D. Romero, M.L. Girard y G. Dávila (1991).-Molecular cloning and characterization of recA gene of Rhizobium phaseoli and construction of recA mutants. *J. Bacteriol.*, 173: en prensa.
- Masterson, R.V. y A.G. Atherly (1986).-The presence of repeated DNA sequences and partial restriction map of the pSym of Rhizobium fredii USDA 193. *Plasmid*, 16: 37-44.
- Mathis, J.N., W. Mark Barbour, T.B. Miller, D.W. Israel y

- G.H. Elkan (1986 a).-Characterization of a mannitol-utilizing, nitrogen-fixing Bradyrhizobium japonicum USDA 110 derivative. Appl. Environ. Microbiol., 52: 81-85.
- Mathis, J.N., D.W. Israel, W. Mark Barbour, B.D.W. Jarvis y G.H. Elkan (1986 b).-Analysis of the symbiotic performance of Bradyrhizobium japonicum USDA110 and its derivative I-110 and discovery of a new mannitol-utilizing, nitrogen-fixing USDA 110 derivative. Appl. Environ. Microbiol., 52: 75-80.
- Mathis, J.N., L.D. Kuykendall y G.H. Elkan (1986 c).-Restriction endonuclease and nif homology patterns of Bradyrhizobium japonicum USDA110 derivatives with and without nitrogen fixation competence. Appl. Environ. Microbiol., 51: 477-480.
- Murphy, P.J., N. Heycke, S.P. Trenz, P. Ratet, F.J. de Bruijn y J. Schell (1988).-Synthesis of an opine-like compound, a rhizopin, in alfalfa nodules is symbiotically regulated. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 9133-9137.
- Nap, J.P. y T. Bisseling (1990).-Developmental biology of a Plant-prokaryote symbiosis: The legume root nodule. Science, 250: 948-954.
- Norel, F. y C. Elmerich (1987).-Nucleotide sequence and functional analysis of the two nifH copies of Rhizobium ORS571.

- J. Gen. Microbiol., 133: 1563-1576.
- O'Brian, M.R., P.M. Kirshbom y R.J. Maier (1987).-Bacterial heme synthesis is required for expression of the leghemoglobin holoprotein but not the apoprotein in soybean root nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8390-8393.
- O'Brian, M. y R.J. Maier (1989).-Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in Rhizobium legume symbiosis. Biochim. Biophys. Acta, 974: 229-246.
- Ohno, S., N. Mori y T. Matsunaga (1986).-Conditio sine qua non for de novo emergence of new genes and the concept of primordial building blocks. pp. 157-174. En: Genetics, development and evolution. 17th Stadler Genetics Symposium. J.P. Gustafson, G.L. Stebbins y F.J. Ayala (eds.) Plenum Press, New York.
- Orme-Johnson, W.H. (1985).-Molecular basis of biological nitrogen fixation. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 14: 419-459.
- Paau, A.S. (1989).-Improvement of Rhizobium inoculants. Appl. Environ. Microbiol., 55: 862-865.
- Pau, R.N. (1989).-Nitrogenases without molybdenum. Trends Biochem. Sci., 14: 183-186.

- Petes, T.D. y C.W. Hill (1988).-Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu. Rev. Genet.*, 22: 147-168.

- Phillips, D.A., L.R. Teuber (1985).-Genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation in legumes. En: H.J. Evans, P.J. Bottomley, W.E. Newton (eds.). *Nitrogen Fixation Research Progress*. Martinus Nijhoff Publ., E.E.U.U.

- Prakash, R.K. y A.G. Atherly (1984).-Reiterations of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast-growing Rhizobium japonicum. *J. Bacteriol.*, 160: 785-787.

- Pretorius-Güth, I.M., A. Pühler y R. Simon (1990).-Conjugal transfer of megaplasmid 2 between Rhizobium meliloti strains in alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2354-2359.

- Priefer, U.B., H.J. Burkardt, W. Klipp y A. Pühler (1981).-ISR1: an insertion element isolated from the soil bacterium Rhizobium lupini. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45: 87-91.

- Priefer, U.B., J. Kalinowski, B. Rüger, W. Heumann y A. Pühler. (1989).-ISR1, a transposable DNA sequence resident in Rhizobium class IV strains, shows structural characteristics of classical insertion elements. *Plasmid*, 21: 120-128.

- Piñero, D., E. Martínez y R.K. Selander (1988).-Genetic diversity and relationships among isolates of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2825-2832.
- Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Ballado, G. Soberón y R. Palacios (1982).-Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli.
- Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leemans, M.A. Cevallos, M.A. Pardo, R. Azpiroz, M.L. Girard, E. Calva y R. Palacios. (1985).-Nitrogenase reductase: a functional multigene family in Rhizobium phaseoli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 1170-1174.
- Renalier, M.-H., J. Batut, J. Ghai, B. Terzaghi, M. Gherardi, M. David, A.-M. Garnerone, J. Vasse, G. Truchet, T. Huguet y P. Boistard (1987).-A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of Rhizobium meliloti 2011 carries a functional fix gene repeat and a nod locus. J. Bacteriol., 169: 2231-2238.
- Riley, M. y S. Krawiec (1987).-Genome organization, p. 967-981. En: F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger (eds.). Escherichia coli and Salmonella typhimurium: celular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Roche, P., P. Lerouge, J.C. Promé, C. Faucher, J. Vasse, F. Maillet, S. Camut, F. de Billy, J. Dénarié y G. Truchet. (1991). NodRm₁, a sulphated lipo-oligosaccharide signal of Rhizobium meliloti elicits hair deformation, cortical cell division and nodule organogenesis on alfalfa roots. p. 119-126. En: H. Hennecke y D.P.S. Verma (eds.). *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. Holanda.
- Rodríguez-Quiñones, F., M. Fernández-Burriel, Z. Banfalvi, M. Megias y A. Kondorosi (1989).-Identification of a conserved, reiterated DNA region that influences the efficiency of nodulation in strain RS1051 of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2: 75-83.
- Rolfe, B.G. y P.M. Gresshoff (1988).-Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39: 297-319.
- Ronson, C.W., A. Bosworth, M. Genova, S. Gudbrandsen, T. Hankinson, R. Kwiatkowski, H. Ratcliffe, C. Robie, P. Sweeney, W. Szeto, M. Williams y P. Zablotowicz (1990).-Field release of genetically-engineered Rhizobium meliloti and Bradyrhizobium japonicum strains. pp. 397-403. En: P. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (eds.). *Nitrogen fixation: achievements*

and objectives. Chapman and Hall, New York.

- Ruvkun, G.B., S.R. Long, H.M. Meade, R.C. Vanden Bos y F.M. Ausubel (1982).- ISRM1: a Rhizobium meliloti insertion sequence that transposes preferentially into nitrogen fixation genes. J. Mol. Appl. Genet., 1: 405-418.

- Sadowsky, M.J. y B.B. Bohlool (1985).-Differential expresion of the pea symbiotic plasmid pJB5JI in genetically dissimilar backgrounds. Symbiosis, 1: 125- .

- Sapienza, C. y W.F. Doolittle (1982).-Unusual physical organization oh the Halobacterium genome. Nature, 295: 384-389.

- Schofield, P.R., A.H. Gibson, W.F. Dudman y J. Watson (1987).- Evidence for genetic exchange and recombination of Rhizobium symbiotic plasmids in a soil population. Appl. Environ. Microbiol., 53: 2942-2947.

- Schwedock, J. y S.R. Long (1990).- ATP sulphurylase activity of the nodP and nodQ gene products of Rhizobium meliloti. Nature, 348: 644-647.

- Scott, D.B., C.B. Court, C.W. Ronson, K.F. Scott, J.M. Watson, P.R. Schofield y J. Shine (1984).-Organization of nodulation and nitrogen fixation genes on a Rhizobium trifolii symbiotic

- plasmid. Arch. Microbiol., 139: 151-157.
- Segovia, L. (1988).-Construcción de mutaciones en las regiones nif de Rhizobium phaseoli. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM.
- Shen, P. y H.V. Huang (1986).-Homologous recombination in Escherichia coli: dependence on substrate length and homology. Genetics, 112: 441-457.
- Shyamala, V., E. Schneider y G. Ferro-Luzzi Ames (1990).-Tandem chromosomal duplications: role of REP sequences in recombination event at the join-point. EMBO J., 9: 939-946.
- Soberón-Chávez, G., R. Nájera, H. Olivera y L. Segovia (1986).- Genetic rearrangements of a Rhizobium phaseoli symbiotic plasmid. J. Bacteriol., 167: 487-491.
- Soberón-Chávez, G. y R. Nájera (1989).-Symbiotic plasmid rearrangement in a hyper-recombinant mutant of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. J. Gen. Microbiol., 135: 47-54.
- Soberón-Chávez, G., R. Nájera, E. Calva y M. Fernández (1991).- Partial deletion of the Rhizobium phaseoli CFN23 symbiotic plasmid implies a concomitant amplification of plasmid DNA sequences. Mol. Microbiol., 5: 89-95.

- Sonti, R.V. and J.R. Roth (1989).-Role of gene duplications in the adaptation of Salmonella typhimurium to growth on limiting carbon sources. *Genetics*, 123: 19-28.

- Sprent, J.I. (1986).-Benefits of Rhizobium to agriculture. *Trends in Biotechnol.*, 3: 124-129.

- Sprent, J.I. (1987).-The Ecology of the Nitrogen Cycle. Cambridge University Press, England. pp. 151.

- Triplett, E.W. (1990).-The molecular genetics of nodulation competitiveness in Rhizobium and Bradyrhizobium. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3: 199-206.

- Valderrama Blanco, M.B. (1989).-Búsqueda y caracterización genética de sistemas alternativos para la nitrogenasa en Rhizobiaceas. Tesis de Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM.

- Vázquez, M., A. Dávalos, A. de las Peñas, F. Sánchez y C. Quinto (1991).-Novel organization of the common nodulation genes in Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli strains. *J. Bacteriol.* 173: .

- Walbot, V., C.A. Cullis (1985).-Rapid genomic change in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 36: 367-396.
- Watson, J.M. y R.P. Schofield (1985).-Species-specific, symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in Rhizobium trifolii. *Mol. Gen. Genet.*, 199: 279-289.
- Weaver, R.W. y S.F. Wright (1987).-Variability in effectiveness of Rhizobia during culture and in nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2972-2974.
- Wheatcroft, R. y R.J. Watson (1988).-Distribution of insertion sequence ISRm1 in Rhizobium meliloti and other gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 113-121.
- Young, M. (1984).-Gene amplification in Bacillus subtilis. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 1613-1621.
- Zurkowski, W. (1982).-Molecular mechanism for loss of nodulation properties of Rhizobium trifolii.

TABLA 1.-Secuencias reiteradas identificadas en Rhizobium.

Gene o secuencia	Organismo	Número de copias	Comentarios
<u>nodD</u>	<u>R. meliloti</u>	3	Gene regulatorio específico de genes involucrados en nodulación. En <u>R. meliloti</u> las tres copias son funcionales. (Honma et al., 1987; Gyorgypal et al., 1987).
	<u>S. fredii</u>	2	<u>nodD1</u> es necesario para activar genes de nodulación. <u>nodD2</u> parece regular síntesis de exopolisacáridos. (Appelbaum et al., 1988).
	<u>B. japonicum</u>	2	(Hennecke et al., 1988; Appelbaum et al., 1988).
	<u>R. trifolii</u> RS1051	2	No todas las cepas de <u>R. trifolii</u> tienen reiterado este gene; se sugiere que ambas copias son funcionales. (Rodríguez-Quñones et al., 1989).
	<u>R. phaseoli</u>	3	Las tres copias son activas pero difieren en patrones de regulación y en capacidad para activar otros genes <u>nod</u> (Davis y Johnston, 1990 a,b).
<u>nodPO</u>	<u>R. meliloti</u>	2	Una de las copias (megaplásmido a) codifica para una ATP sulfurilasa que podría modificar un factor de nodulación; se desconoce si la segunda copia (en megaplásmido b) es activa.

<u>rpoN</u>	<u>B. japonicum</u>	2	(Schwedock y Long, 1990). Codifica para un factor σ alternativo para RNA polimerasa (σ_{54}). Ambas copias activas pero con diferente regulación. (Kullik et al., 1991).
<u>nifH</u>	<u>R. phaseoli</u>	3	Todas las copias son idénticas y activas funcionalmente. Regiones a y b llevan además copias de <u>nifD</u> y <u>nifK</u> . <u>nifH</u> es el gene estructural para nitrogenasa reductasa (Quinto et al., 1985; este trabajo).
	<u>R. sp. NGR234</u>	2	Ambas copias son idénticas y llevan además genes <u>nifD</u> y <u>nifK</u> . Ambas copias parecen ser funcionales (Badenoch-Jones et al., 1989).
	<u>A. caulinodans</u>	2	Copias altamente similares. Una lleva genes <u>nifD</u> y <u>nifK</u> , la otra no. Ambas copias son funcionales. (Norel y Elmerich, 1987).
	<u>S. fredii</u>	2-3	Varias señales de hibridización. Se desconoce si éstas representan genes activos. Se sugiere la existencia de copias en pSym y/o cromosoma en algunas cepas (Prakash y Atherly, 1984; Barbour, 1985).
<u>fixN cluster</u>	<u>R. meliloti</u>	2	Agrupamiento de genes necesarios para fijación de nitrógeno. Copias en el pSym, separadas por 260 kb. Ambas copias son funcionales (Renalier et al, 1987; David et al., 1987).
"1.7kb" <u>nod</u>	<u>R. trifolii</u> RS1051	2	Al menos dos copias en pSym; ambas son funcionales y necesarias para nodulación (Rodríguez-Quiñones et al, 1989).
	<u>R. meliloti</u>	2	Locus aparentemente duplicado. Mutaciones en una de las copias afectan la capacidad de invadir raíces de

Secuencias repetidas relacionadas a <u>nif</u> .	<u>R.meliloti</u>	6	alfalfa (Hoying et al., 1990). Secuencias reiteradas cortas (aprox. 300 pb); dos de ellas llevan promotores de genes <u>nif</u> (Better et al, 1983). El locus <u>mos</u> , que codifica para genes requeridos para síntesis de una opina, porta una reiteración de la región regulatoria y el amino terminal de <u>nifH</u> . (Murphy et al., 1988).
RtRS	<u>R.trifolii</u>	4	Caso similar al anterior; análisis de tres copias revela la existencia de reiteración de la región promotora de <u>nifHDK</u> y, en ocasiones, del amino terminal de <u>nifH</u> (Scott et al., 1984; Watson y Schofield, 1985).
ISR 1	<u>R.lupini</u>	2 a 6	Secuencia de inserción (1260 pb) identificada por frecuente transposición a RP4. Porta una secuencia abierta de lectura larga y tres más pequeñas. Número variable entre cepas (Priefer et al, 1981, 1989).
ISRm1	<u>R.meliloti</u>	1 a 11	Secuencia de inserción descubierta por su integración preferencial en genes involucrados en fijación de nitrógeno en la cepa 1021 (Ruvkun et al., 1980). Existente en muchas cepas, con un número variable de copias (Wheatcroft y Watson, 1988).
ISRm2	<u>R.meliloti</u>	2	Secuencia de inserción (2700 pb) descubierta al insertarse en genes de nodulación de la cepa 41. Encontrada frecuentemente en cepas de <u>R.meliloti</u> . (Dusha et al., 1987).
RS α	<u>B.japonicum</u>	12	Secuencia de 1126 pb con características similares a secuencias de inserción. Localización preferencial

			alrededor de los genes <u>nifH</u> y <u>nifDK</u> . Involucrada en formación de deleciones. (Kaluza et al., 1985; Hahn y Hennecke, 1987).
RSβ	<u>B. japonicum</u>	6	Localización preferencial en regiones <u>nif</u> ; involucrada en formación de deleciones (Kaluza et al., 1985; Hahn y Hennecke, 1987).
RSY	<u>B. japonicum</u>	12	Localización preferencial alrededor de las regiones <u>nif</u> ; probablemente involucrada en formación de deleciones. (Hahn y Hennecke, 1987).
RSδ	<u>B. japonicum</u>	10	Localización preferencial alrededor de las regiones <u>nif</u> ; probablemente involucrada en formación de deleciones. (Hahn y Hennecke, 1987).
RSe	<u>B. japonicum</u>	4	Localización preferencial alrededor de las regiones <u>nif</u> ; probablemente involucrada en formación de deleciones. (Hahn y Hennecke, 1987).

TABLA 2.-Frecuencia de rearrreglos en el pSim de varias cepas de R. phaseoli.

CEPA	INSERCIÓN DE GDYN1 EN:	FRECUENCIA DE: DUPLICACIONES	DELECCIONES
CFNX4	<u>nif</u> , región a	$\leq 2 \times 10^{-4}$	2×10^{-5}
CFNX5	<u>nif</u> , región c	5×10^{-3}	4×10^{-4}
CFNX6	<u>nif</u> , región b	3×10^{-3}	2×10^{-4}

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 3.-Resumen de los diferentes tipos de rearreglos aislados y caracterizados en este trabajo.

CEPA PROGENITORA	INSERCIÓN DE GDYN1 EN:	NUMERO DE REARREGLOS OBSERVADO*			
		TIPO I	TIPO II	TIPO III	CURACION pSim
CFNX4	<u>nif</u> , región a	6 (5D, 1A)	2 (1D, 1A)	1 (1D)	1
CFNX5	<u>nif</u> , región c	19 (8D, 11A)	-	-	-
CFNX6	<u>nif</u> , región b	19 (8D, 11A)	-	-	-

* A, amplificaciones; D, deleciones.

TABLA 4.-Estabilidad de cepas portando amplificaciones después de nodular a Phaseolus vulgaris L.

CEPA EMPLEADA PARA NODULACION	TIPO DE REARREGLO	NUMERO DE AISLADOS DE NODULO CONTENIENDO: pSim NORMAL	pSim AMPLIFICADO
CFNX5	-	15	1
CFNX26	Duplicación, tipo I	0	16
CFNX28	Triplicación, tipo I	0	9
CFNX39	8 veces, tipo I	2	10
CFNX18	Triplicación tipo II	8	8

Fig. 1.-Mapa físico del plásmido simbiótico de R. phaseoli CFN42 (Girard et al., 1991). El mapa está subdividido en los fragmentos BamHI que lo componen. Las flechas internas representan las familias reiteradas dentro del pSim. Cada familia se identifica con letras mayúsculas (A a K); la familia A corresponde a nifH. Las flechas externas indican bandas con reiteraciones comunes al plásmido indicado (a a f). En la zona extendida se muestra la localización probable de algunos genes relevantes para la simbiosis, así como la extensión de los cósmidos empleados en este trabajo.

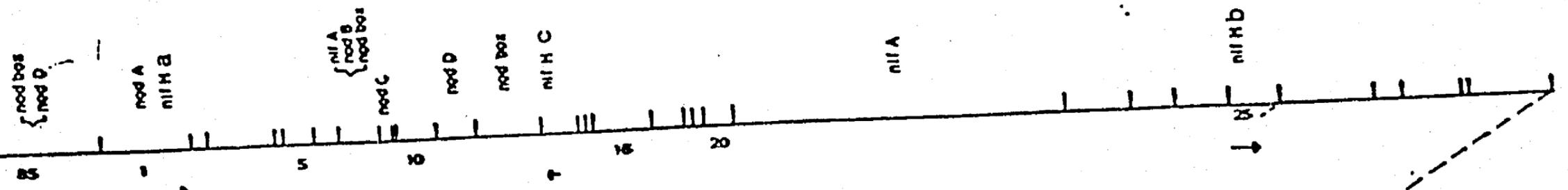
D7

cGD101

cGD28

cGD15

cGD45



10 kb

pSym CFN 42
 390 Kb
 (1 kb = 0.93°)

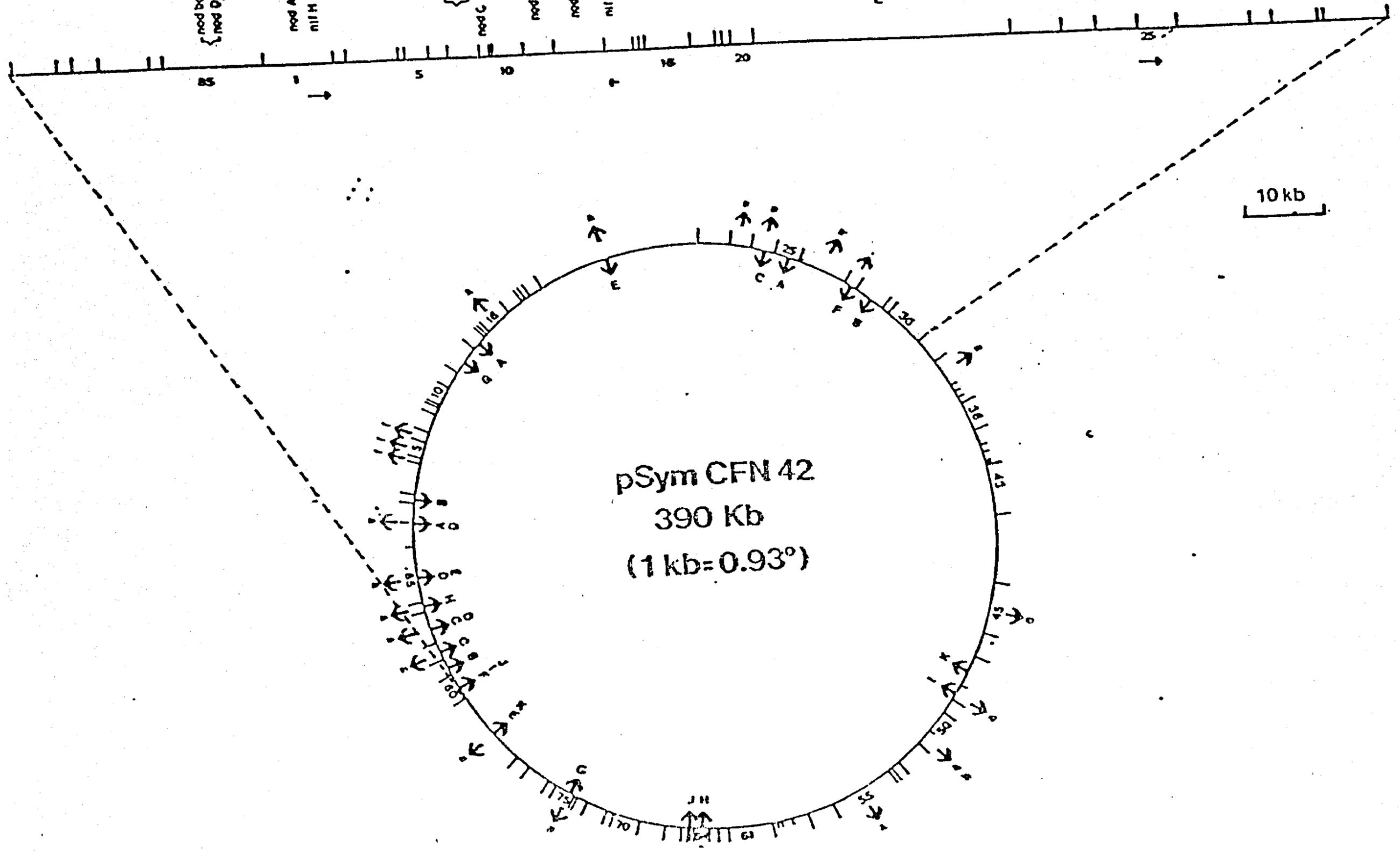
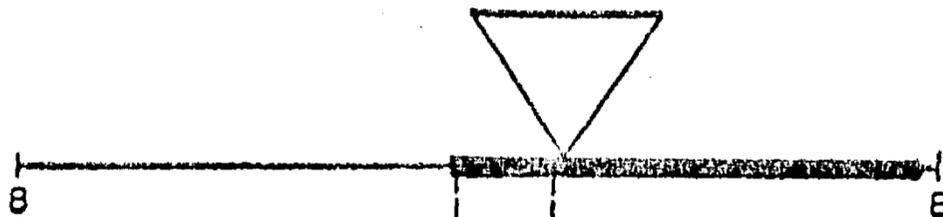
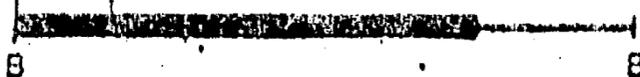


Fig. 2.-Mapa físico de las regiones nif, a y b, indicando la localización del cassette GDYN1 en la cepa CFNX4 (parte superior de la figura) o en la cepa CFNX6 (parte inferior). Cualquier entrecruzamiento en las regiones delimitadas por líneas interrumpidas conducirá a deleciones o amplificaciones detectables.

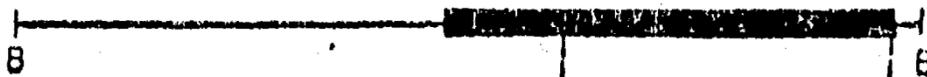
NIF REGION A



NIF REGION B



NIF REGION A

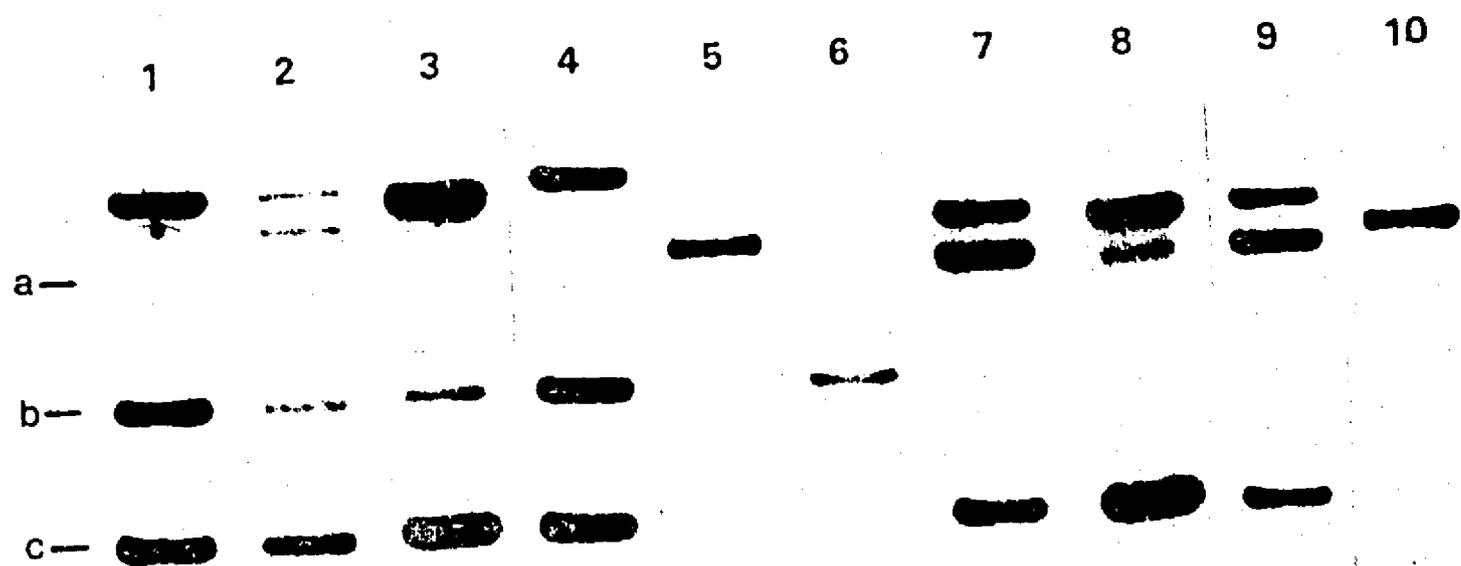


NIF REGION B



1 kb

Fig. 3.-Análisis por hibridización tipo Southern de cepas portando amplificaciones o deleciones. El DNA genómico de cada cepa se dirigió con BamHI y se hibridizó contra un fragmento interno del gene nifH como detector. Las letras en el lado izquierdo indican la localización de cada región nif. Las cepas en los carriles 2, 3, 5 y 6 fueron obtenidas a partir de la cepa CFNX4; aquellas en los carriles 8 y 10, a partir de la cepa CFNX5. Carriles: 1, CFNX4 (nifHa::GDYN1); 2, CFNX24 (duplicación tipo I); 3, CFNX18 (triplicación tipo II); 4, CFNX4; 5, CFNX87 (delección tipo I); 6, CFNX88 (delección tipo III); 7, CFNX6 (nifHb::GDYN1); 8, CFNX32 (duplicación tipo I); 9, CFNX6; 10, CFNX81 (delección tipo I). La cepa CFNX63 (no mostrada) muestra un patrón idéntico al presentado en el carril 6.



—
~

Fig. 4.-Mapeo físico de las deleciones obtenidas en este trabajo. El DNA genómico de cada cepa se digirió con BamHI y se hibridizó contra el cósmido indicado (ver fig. 1). Los números en el lado izquierdo de cada panel indican la banda correspondiente (ver fig. 1); R indica una reiteración, ya sea interna o externa al pSim. Las flechas marcan bandas que no aparecen en el perfil de la cepa silvestre. En los carriles P, se muestra la cepa progenitora (CFNX4), carriles I, CFNX87 (delección tipo I); carriles II, CFNX63 (delección tipo II); carriles III, CFNX88 (delección tipo III).

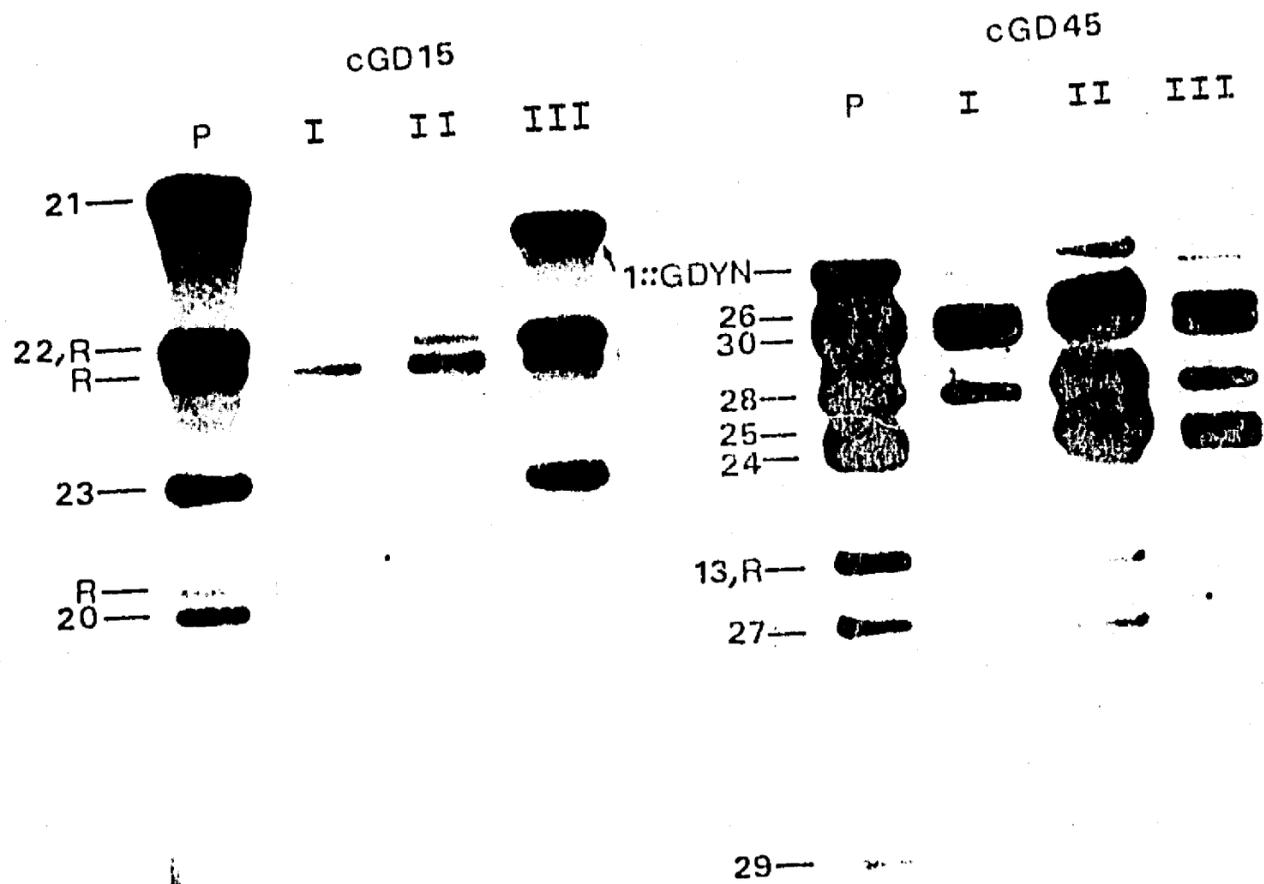
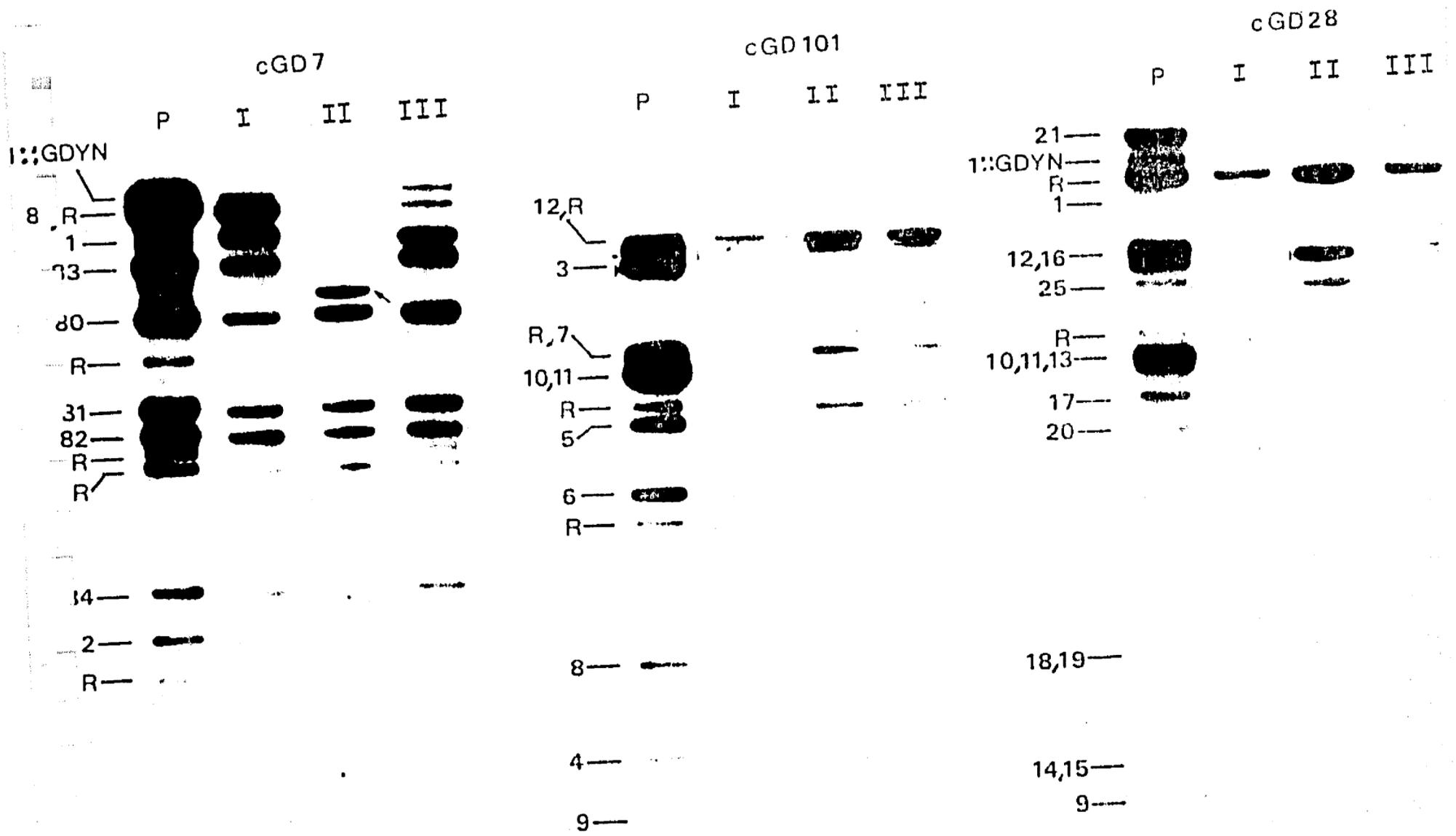
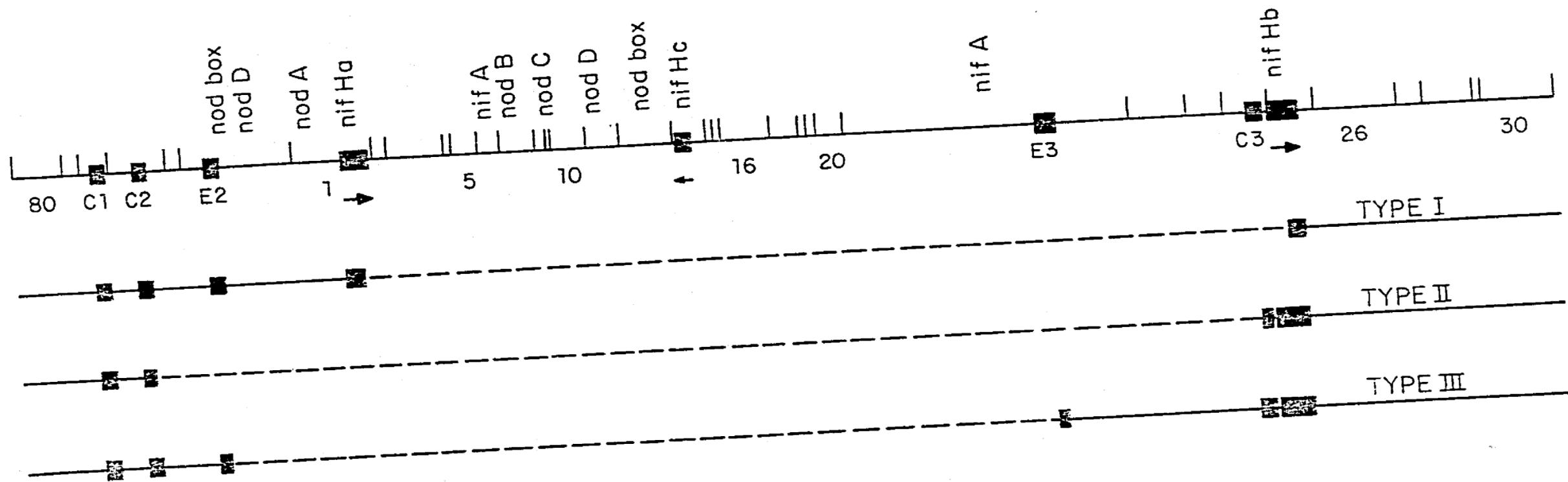


Fig. 5.-Mapa físico de la región afectada por los diferentes tipos de deleciones aisladas en este trabajo. Las secuencias reiteradas de interés se representan con bloques negros. La extensión de cada tipo de deleción se ilustra con líneas interrumpidas.



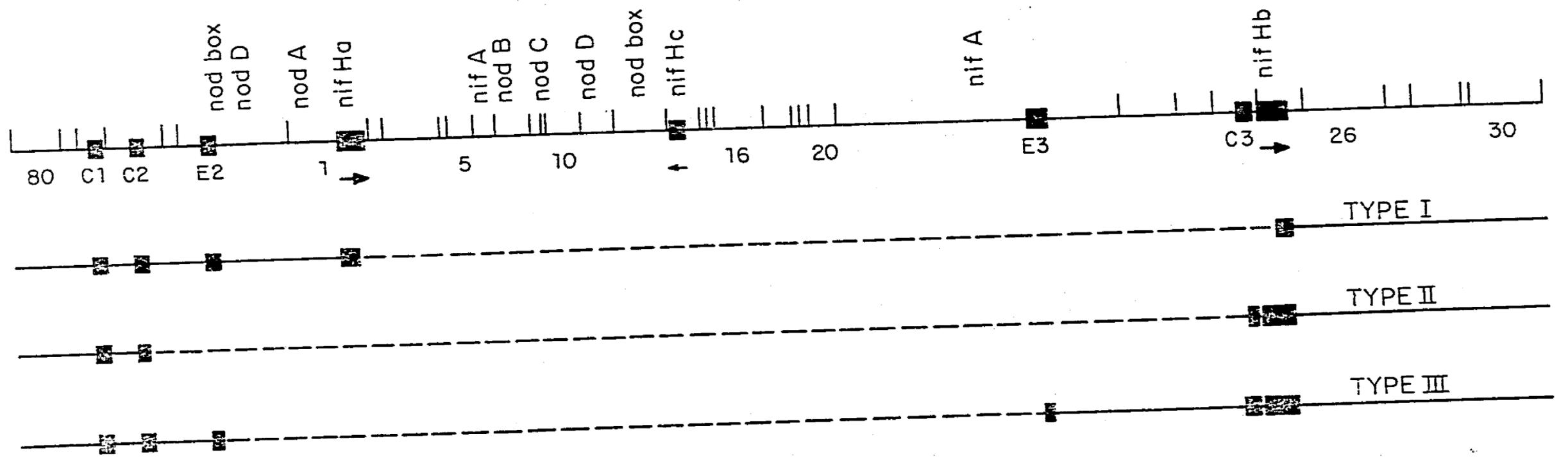


Fig. 6.-Análisis por hibridización tipo Southern de una cepa portando una triplicación tipo II. El DNA genómico de las cepas CFNX4 (carriles 1) y CFNX18 (carriles 2) se digirió con BamHI y se hibridizó contra el cósmido correspondiente como detector. Los números en el lado izquierdo de cada panel indican la banda correspondiente (ver fig. 1); R indica una reiteración, ya sea interna o externa al pSim. La flecha (cGD7, carril 2) indica una banda nueva, característica de la cepa CFNX18.

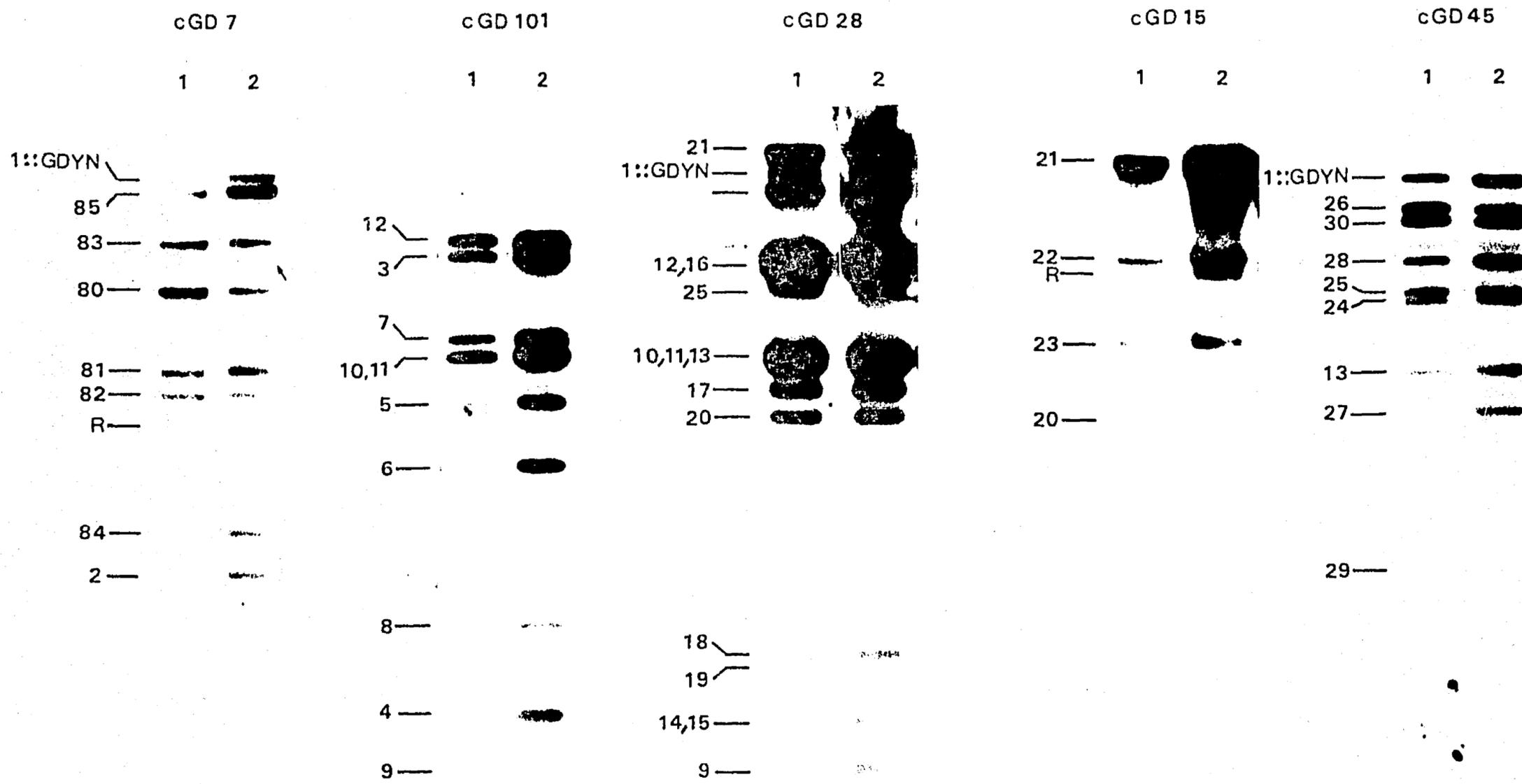


Fig. 7.-Fragmentos genómicos homólogos al segmento 83 del pSim. El DNA genómico de las cepas CFNX4 (carril 1) y CFNX18 (carril 2, triplicación tipo II) se digirió con BamHI y se hibridizó con un detector correspondiente al segmento 83 del pSim. La flecha indica una banda característica de la cepa portando este rearreglo.

1

2

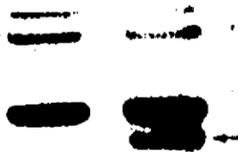


Fig. 8.-Cinética de nodulación de cepas portando diferentes tipos de amplificaciones. •, CFNX42; O, CFNX76 (duplicación tipo I); ■, CFNX5; , CFNX26 (duplicación tipo I); +, CFNX28 (triplicación tipo I); x, CFNX39 (8 veces, tipo I); ▲, CFNX4; Δ, CFNX18 (triplicación tipo II). $DSM_{0.05}$, diferencia significativa mínima (5%), para los datos de 14 días.

