

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

EFFECTO DE LA INDUCCION DE REPLICACION  
SOBRE LA FORMACION DE REARREGLOS EN EL  
*pSym DE Rhizobium etli CFN42.*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

**EDGAR VALENCIA MORALES**

TUTOR: DR. DAVID ROMERO CAMARENA



CUERNAVACA, MOR.

ENERO DEL 2000

273604



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 esta 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.

El presente trabajo fue desarrollado en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM como parte de los Estudios del Programa de Genética Molecular de Plásmidos Bacterianos. La dirección corrió a cargo del Dr. David René Romero Camarena.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM me brindaron su apoyo para la realización de mis estudios de Maestría y Doctorado otorgándome becas para mi manutención durante el tiempo en que realicé mis estudios.

De igual forma, el programa PAEP de la UNAM me otorgó apoyo económico para la compra de materiales y reactivos empleados en los experimentos y para la impresión de esta tesis.

**A mis Padres.**

**A mis hermanos y hermanas.**

**A Cristina.**

¿ Por qué la Tierra es mi casa?  
¿ Por qué la noche es oscura?  
¿ Por qué la luna es blanca  
que engorda como adelgaza?  
¿ Por qué una estrella se enlaza  
con otra, como un dibujo?  
Y ¿ por qué el escaramujo es  
de la rosa y el mar?  
Yo vivo de preguntar, saber  
no puede ser lujo.

El agua hirviendo en puchero  
suelta un alma que sube  
a disolverse a la nube  
que luego será aguacero.  
Niño soy tan preguntero,  
tan comilón del acervo,  
que marchito si le pierdo  
una contesta a mi pecho.  
Si saber no es un derecho,  
seguro será un izquierdo.

Yo vine para preguntar  
flor y reflujo.  
Soy de la rosa y de la mar  
como el escaramujo.

Soy aria, endecha, tonada,  
soy Mahoma, soy Lao-Tsé,  
soy Jesucristo y Yahvéh,  
soy la serpiente emplumada,  
soy la pupila asombrada  
que descubre como apunta,  
soy todo lo que se junta  
para vivir y soñar;  
soy el destino del mar,  
soy un niño que pregunta.  
Yo vine para preguntar  
flor y reflujo.  
Soy de la rosa y de la mar  
como el escaramujo.

**El Escaramujo.**  
Silvio Rodríguez.

## **Agradecimientos.**

Son muchas las personas a las que debo agradecer el haber podido realizar esta Tesis, trataré de que no se me escape ninguna.

En primer lugar, a mis padres, Alvaro y Soledad. Gracias por haberme brindado su cariño y apoyo siempre y por haberme inculcado sus principios y valores, pero sobretodo, gracias por darme la libertad de tratar de ponerlos en práctica y de ser yo mismo.

A mis hermanos y hermanas, Edson, Edwin, Elaine y Edna Vianey por compartir conmigo la aventura de crecer y por enseñarme lo que significa ser un buen hijo y un buen hermano. Debo incluir aquí a Xóchitl por integrarse a la familia como una más de nosotros.

A mi tío Joel por cuidarme cuando era un crío y a su familia. Mi tío siempre quiso que yo fuera ingeniero, espero no haberlo decepcionado con mi decisión.

A mis hermanos mayores, Hugo, Michael, Mervin, Carlos y sus respectivas familias por el amor que siempre nos ha unido.

A Cristina, por ponerme a pensar ¿qué hago ahora?, ¿dónde pongo lo hallado?.

A mi amigo desde la secundaria, Gerardo y su familia, incluidos aquí, sus padres, Alejandra, Benja, Beto, Ly y Adri gracias por compartir todos esos momentos conmigo.

A mis amigos del CCH y de la carrera, Ricardo, Vicky, Mariano, Sergio, Tellez (sin acento), Gasca, El chisco, Noemí, Marisol, Juan Luis, Daniel y Paty. A pesar de que los veo muy poco, siempre los recuerdo con enorme cariño.

A Lety Rocha, por ser una de las personas más nobles e inteligentes que conozco, gracias por prestarme tus hombros siempre que lo he necesitado.

A mi amigo Jim Fairchild, su esposa Kay y su hija Pam por mostrarme que los sentimientos buenos y nobles no conocen distancias ni lenguajes.

A mi amigo Miguel, por aguantarme todo este tiempo en el exilio y hacerlo más soportable.

A David, por su amistad, sus enseñanzas, su confianza hacia mí y sobretodo, por su acopio de paciencia para con su torpe aprendiz.

A Rafael Palacios, Carlos Arias, Miguel A. Cevallos, mi comité tutorial por tratar de hacer que mis neuronas funcionaran.

A Carmen Gómez, Alejandra Covarrubias, Rafael Camacho, Rafael Palacios, Miguel A. Cevallos y Patrick Mavingui, por la cuidadosa revisión de esta tesis y sus enriquecedores comentarios.

A la UNAM, que a pesar de los pesares sigue siendo para mi la mejor Universidad.

Al CIFN por darme la oportunidad de desarrollar mis estudios en sus laboratorios.

A Laura, Javier y Paz, que fueron mi mejor par de manos en más de una ocasión.

A mis hermanitos académicos, Adriana y César, por motivarme a trabajar duro para no ser yo el que desentonara en nuestra sagrada familia.

A los demás integrantes del laboratorio Susi B., Maluye, Jaime, Ernesto, Jacobo, Manuel, Susi D., Araceli, Alex y el recién llegado Gustavo. Gracias por ser un grupo tan HUMANO con todas las implicaciones que esta palabra tiene.

A Mary y a Enrique, por mantener limpio el laboratorio a pesar de mi presencia.

A Alma y a Lolita por ayudarme a realizar los 1001 trámites.

A todos los maestros que he tenido durante toda mi vida que se esforzaron por enseñarme algo.

A todas las personas que alguna vez me conocieron y creyeron en mí.

Y por supuesto, gracias a la Bios, que me ha dado tanto... aunque algunas creo que ya me las ha cobrado.



## INDICE.

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	2
<b>Abstract</b>	3
<b>Introducción</b>	5
Las rutas de recombinación	5
El modelo de recombinación por ruptura en doble cadena (DSB) de DNA	6
La replicación activando recombinación	9
Los sistemas "naturales"	9
Los sistemas artificiales	11
La recombinación al rescate de la replicación	12
El genoma de <i>Rhizobium etli</i>	18
<b>Artículo: "Recombination enhancement by replication (RER) in <i>Rhizobium etli</i>"</b>	21
<b>Resultados adicionales</b>	60
Complementación de deleciones para rastreo de la región inestabilizadora	60
La falta de reciprocidad de RER	63
Construcciones para evaluación de etapas tempranas de RER	63
Búsqueda de círculos escindidos de la región simbiótica	64
La búsqueda de RER en otros plásmidos	66
Las cepas que no deletan	66
<b>Discusión y perspectivas</b>	68
El efecto RER: eliminando las explicaciones triviales	68
Las posibles causas de RER	69
La región simbiótica contiene un sitio "hotspot" para recombinación	69
La región simbiótica posee una superestructura que la hace hiper-recombinogénica al activar replicación	70
La región simbiótica presenta una zona de pausa para la horquilla de replicación	71
Acerca de la aparente falta de reciprocidad de RER	72
RER en la "vida normal" de los <i>Rhizobia</i>	72
La utilidad del ensayo RER para otros propósitos	73
<b>Conclusiones</b>	75
<b>Referencias</b>	76

## RESUMEN.

La recombinación y la replicación son dos procesos estrechamente relacionados. Los estudios desarrollados en diferentes organismos han demostrado que la replicación puede generar recombinación homóloga o ilegítima. Por otra parte, los modelos de recombinación propuestos a la fecha involucran rondas de replicación para generar las estructuras que posteriormente darán origen a las moléculas recombinantes. Además, la recombinación proporciona una ruta de escape a la replicación en situaciones donde las horquillas colapsan o el origen de replicación es dañado.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de inducción de rondas adicionales de replicación en la formación de rearrreglos en el plásmido simbiótico (pSym) de *Rhizobium etli*. Para ello, se insertó en diferentes puntos del pSym el origen de replicación del plásmido RK2 (OriV). Este origen de replicación es de amplio rango de huésped, bajo número de copias (4-6), unidireccional, tipo teta. Su actividad depende exclusivamente de la presencia de la proteína TrfA, que en nuestro sistema fue producida a partir de un plásmido portando el gen *trfA*. El plásmido con el gen *trfA* fue introducido mediante conjugación a las cepas con OriV en el pSym.

Los resultados mostraron que la inducción de replicación adicional a partir de OriV en el pSym provoca un incremento de 1000 veces en la frecuencia de formación de rearrreglos en este plásmido. Los rearrreglos observados son deleciones de la región simbiótica (120 Kb) generadas por recombinación entre los operones *nifHDK* (5 Kb). Denominamos a este fenómeno RER (Recombination Enhancement by Replication).

El efecto RER es independiente de la orientación hacia la que avance la horquilla de replicación proveniente de OriV, así como de la posición de OriV en el pSym.

RER es dependiente de la presencia de un gen *recA* activo, en cepas mutantes en *recA* RER no se presenta. Además, el hecho de que las deleciones se generan por recombinación entre secuencias reiteradas grandes parece indicar que RER es un fenómeno de recombinación homóloga. Sin embargo, dado que no se han podido detectar amplificaciones, RER podría ser un evento de recombinación homóloga no recíproco.

RER se restringe a la región simbiótica del pSym; cointegrados en otros plásmidos o en otras zonas del pSym no son inestabilizados por la replicación. Además, translocaciones de la región simbiótica completa a otro plásmido (pa), conservan la propiedad de ser inestabilizados al activar replicación adicional en el pa. En contraste, deleciones de una parte de la región simbiótica, o interrupciones de las zonas homólogas para recombinación (*nifHDK*) inhiben RER.

RER presenta semejanza con el fenómeno de hiper-recombinación observado en la zona de término de replicación del cromosoma de *Escherichia coli*.

## ABSTRACT.

Recombination and replication are two closely related processes. Studies in several organisms have shown that replication can generate homologous or illegitimate recombination. On the other hand, the proposed recombination models up to now involve replication rounds to create the structures which will generate the recombinant molecules. In addition, recombination creates an escape route when the replication forks collapse or when the replication origin is damaged.

The objective of the present work is to evaluate the effect of additional replication rounds induction in the rearrangement formation of the symbiotic plasmid (pSym) of *Rhizobium etli*. To that end, the replication origin (OriV) from plasmid RK2 was inserted at different locations in the pSym. OriV is a wide-host range, low copy number (4-6), unidirectional, theta-type replication origin. Its activity depends exclusively on the presence of the TrfA protein, which in our system was produced from a plasmid carrying the *trfA* gene. The plasmid with the *trfA* gene was introduced by conjugation into the strains carrying OriV on the pSym.

The results showed that induction of additional replication in the pSym provokes a 1000-fold increase in the rearrangement formation frequency of this plasmid. The rearrangements seen are deletions of the symbiotic region (120 Kb) generated through recombination between the *nifHDK* operons (5 Kb). We named this phenomenon RER (Recombination Enhancement by Replication).

RER is independent of the orientation towards the replication fork from OriV advances, as well as from the position of OriV in the pSym.

RER is dependent on the presence of an active *recA* gene, in *recA* mutant strains RER does not occur. In addition, the fact that the deletions are generated through recombination between large homologous sequences seems to indicate that RER is a homologous recombination process. However, since it has not been possible to detect amplifications, RER might be a non-reciprocal homologous recombination event.

RER is restricted to the symbiotic region of the pSym; cointegrates in other plasmids or in other zones of the pSym are not destabilized by replication. Besides, translocations of the whole symbiotic region into other plasmid (pa) keep the ability of being destabilized when additional replication is activated in pa. In contrast, deletions of a part of the symbiotic region or interruptions of the homologous regions for recombination (*nifHDK*) inhibit RER.

RER shows similarity with the hyperrecombination phenomena seen in the replication terminus zone of the *Escherichia coli* chromosome.

En buena lógica, ¿no debería la mente del orador conocer la sustancia del tema sobre el que se dispone a hablar?.

**Platón.**

Fedro.

## INTRODUCCION.

La replicación y recombinación son dos procesos vitales para todos los organismos. Ambos procesos están encargados de mantener la estabilidad de la información genética, pero al mismo tiempo, de propiciar las oportunidades para la variación de la misma y contribuir con ello a la evolución. Se puede afirmar que la sobrevivencia de los organismos depende de que la replicación y la recombinación funcionen de manera concertada. La replicación, tarde o temprano, necesitará de la recombinación para poder segregar los productos que ha generado o en el caso de algunos organismos, como el bacteriófago T4, para originar los nuevos virus (ver más adelante). Por su parte, los procesos de recombinación requieren de la replicación para reparar moléculas de DNA dañadas o en eventos como conjugación. Dada la complejidad de los procesos de recombinación y replicación, tradicionalmente han sido estudiados en forma separada. Sin embargo, en los últimos años, trabajos realizados en diferentes organismos han dejado cada vez más clara la interacción entre ambos (Kogoma 1996; Haber 1999).

### 1) Las rutas de recombinación.

Los estudios realizados por Clark y colaboradores a finales de los 60 e inicios de los 70 en *Escherichia coli* mostraron que este organismo cuenta con más de un sistema de recombinación (ver Smith 1989; Clark y Sandler 1994). A la fecha, se han descrito más de 25 genes involucrados en el proceso de recombinación en esta bacteria (Kowalczykowski *et al.* 1994) a la vez que se han encontrado genes homólogos a varios de ellos en diferentes organismos (West 1992; Camerini-Otero y Hsieh 1995). Además de los genes, se ha descubierto una secuencia de 8 pares de bases (5' - GCTGGTGG - 3') capaz de estimular recombinación en su cercanía cuando es reconocida por el complejo *recBCD*. El sitio se denomina Chi (Crossover Hotspot Instigator,  $\chi$ ). Chi anula la actividad de nucleasa de la subunidad *recD* al tiempo que favorece la actividad helicasa de las subunidades *recBC* (Myers y Stahl 1994).

En un principio, se creía que los diferentes genes sólo participaban en ciertos procesos de recombinación, dependiendo del genotipo de la bacteria. Esto llevó a definir tres rutas de recombinación conocidas como la ruta *recBDC*, *recF* y *recE*, nombradas así por los principales genes de recombinación involucrados en cada una de ellas (Clark y Sandler 1994). Sin embargo, los estudios posteriores han mostrado que los genes pueden participar activamente en más de un proceso de recombinación y que tal vez incluso podrían competir por los sustratos para recombinar (Zaman y Boles 1996; Galitski y Roth 1997). En la Figura 1 se muestra el "estado del arte" acerca de la

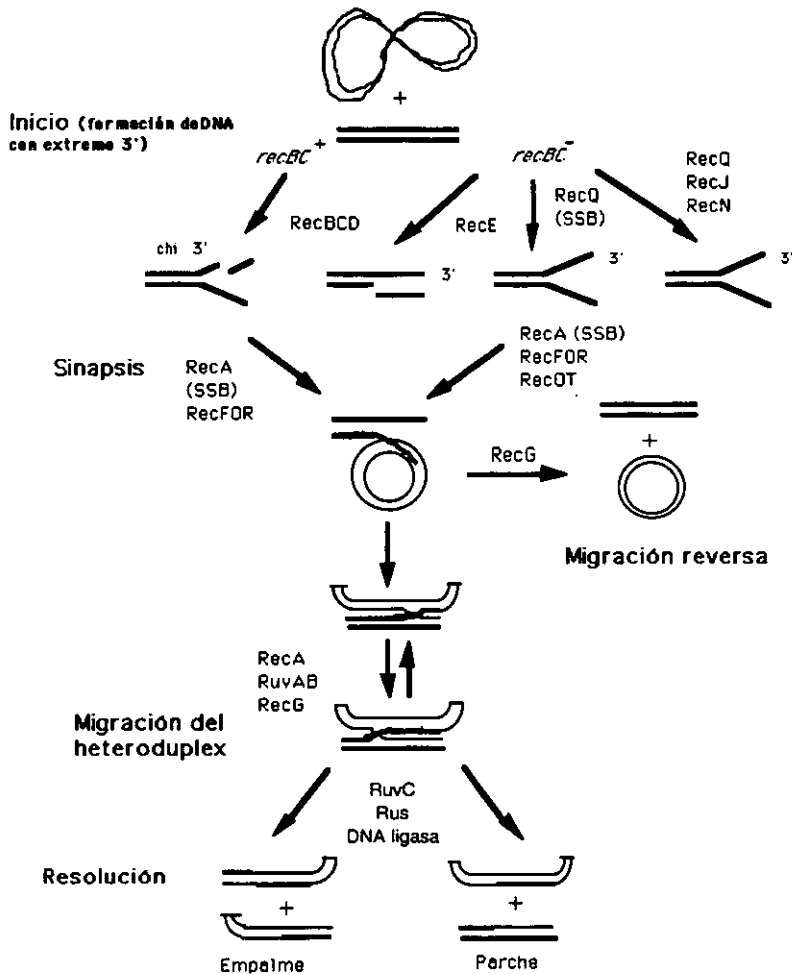
recombinación en *E. coli*.

El proceso de recombinación podría dividirse en 4 etapas principales que son: Inicio o Presinapsis, Sinapsis o Apareamiento, Extensión del heteroduplex y Resolución (Kowalczykowski *et al.* 1994; Camerini-Otero y Hsieh 1995). Durante la presinapsis, lo importante es generar DNA con un extremo 3' libre que pueda ser empleado para recombinar. Este objetivo se logra, dependiendo del sustrato y del genotipo de la bacteria, mediante la participación de nucleasas como *recBCD* en conjunción con la secuencia  $\chi$ , o con la nucleasa *recE*, o bien, con la combinación de una helicasa (*recQ*) y una nucleasa (*recJ*). Posteriormente, durante la sinapsis, RecA (o bien los productos de *recFOR* o *recT*) asimila la punta 3' y la emplea para invadir una zona homóloga en otra molécula. *recA* es el gen cuya actividad afecta el proceso de recombinación en mayor medida, las mutantes en *recA* disminuyen su capacidad de recombinar en al menos 100 veces (Kowalczykowski *et al.* 1994). Además, para que el proceso de invasión sea eficiente, la zona homóloga debe de ser de 300 o más pares de bases idénticas, ya que la recombinación mediada por *recA* se afecta seriamente cuando disminuye el tamaño de la homología (Bi y Liu 1994; Lovett *et al.* 1994).

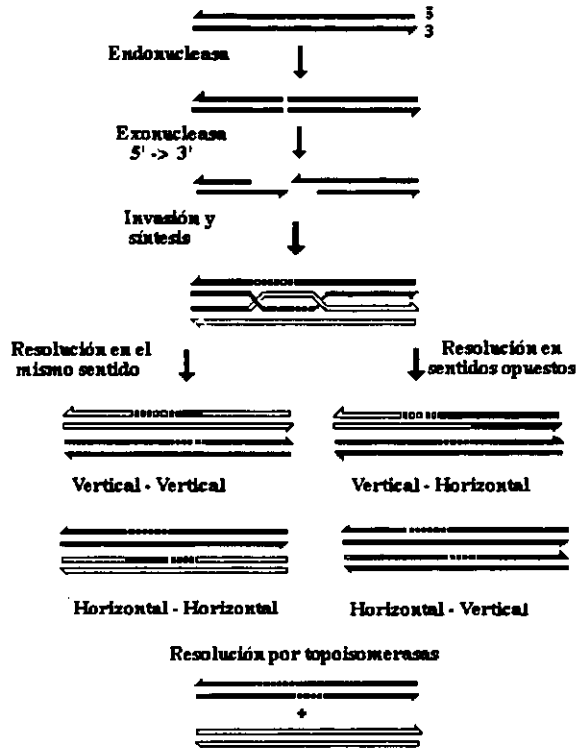
Una vez establecida la sinapsis y creada la estructura de Holliday (Stahl 1994), *ruvAB* (West y Connolly 1992) o *recG* (Lloyd y Buckman 1991) se encargan de extender el heteroduplex formado. Finalmente, la estructura de Holliday es resuelta por *ruvC* (West y Connolly 1992), o *rus* (Sharples *et al.* 1994) o mediante topoisomerasas (Thaler y Stahl 1988) generando las moléculas recombinantes que, dependiendo de la forma en que haya sido cortada la estructura de Holliday, generan "parches" o "empalmes".

## 2) El modelo de recombinación por ruptura en doble cadena (DSB) de DNA.

Los modelos de recombinación de Holliday y de Messelson-Radding (Stahl 1994) explicaban muchos de los fenómenos de recombinación observados en diferentes organismos. Sin embargo, para levadura, los patrones de segregación observados no podían ser explicados completamente por estos modelos (Stahl 1994). Szostak y colaboradores (1983) proponen el modelo de recombinación más ampliamente aceptado a la fecha, el modelo de recombinación por ruptura de doble cadena (DSB, Figura 2). El modelo propone que una ruptura en doble cadena del DNA es capaz de generar, después de ser procesada por una nucleasa, puntas 3'. Estas puntas pueden invadir zonas homólogas y servir para iniciar síntesis de DNA, que al extenderse permitirá la ligación con los extremos 5' dejados por el corte original. Esto genera dos estructuras de Holliday que al ser desplazadas y posteriormente resueltas darán origen a recombinantes.



**Figura 1. Rutas de Recombinación en *E. coli*.** La figura muestra la recombinación entre una molécula superenrollada y una molécula lineal. Dependiendo del fondo genético de la bacteria, los eventos de inicio serán diferentes. A la izquierda, se muestra la degradación de la molécula lineal por *RecBCD* hasta que se encuentra una secuencia  $\chi$ , con lo que *RecBCD* atenua la degradación y se activa como helicasa dejando el extremo 3' libre. Al centro, la nucleasa *RecE* generará el extremo 3'. A la derecha, la helicasa *RecQ* y la nucleasa *RecJ* procesan el duplex. Las tres rutas requerirán posteriormente de *RecA* para continuar el proceso de recombinación (ver texto). Tomado de Camerini-Otero y Hsieh (1995) con modificaciones.



**Figura 2.** El modelo de recombinación por ruptura en doble cadena. Tomado de Stahl (1996) con modificaciones.

Si bien el modelo fue propuesto originalmente para explicar el proceso de meiosis, el hecho que acople las actividades de recombinación y replicación ha permitido que sea adaptado y ligeramente modificado para explicar procesos como conjugación (Smith, 1989), cambio de tipo de apareamiento en levadura (Haber 1998) o para rescatar horquillas de replicación colapsadas (Kuzminov 1995, ver más adelante). La robustez y universalidad del modelo parecen quedar fuera de dudas (Stahl 1996; Kuzminov y Stahl 1999).



### 3) La replicación activando recombinación.

Si bien el modelo de recombinación por ruptura en doble cadena hace evidente la conexión entre recombinación y replicación, como se mencionó con anterioridad, los estudios para comprender más a fondo la interacción entre ambos procesos presentan varias dificultades. Una de ellas son los efectos deletéreos para el organismo generados por la alteración de cualquiera de los dos procesos. La imposibilidad de tener mutantes "simultáneas" en replicación y recombinación en bacterias como *E. coli* se conoce desde hace más de 20 años (Gross *et al.* 1971; Monk y Kinross 1972). A pesar de estas dificultades, se ha podido avanzar en el conocimiento de las interacciones entre replicación y recombinación.

#### 3a) Los sistemas "naturales".

La replicación del bacteriófago T4 depende estrictamente de la actividad de sus proteínas de recombinación (Mosig 1998). T4 usa al menos cuatro rutas diferentes que involucran recombinación para generar nuevas partículas virales, cuenta para ello con más de 32 proteínas que participan en estos procesos (Mosig 1998). Las proteínas de recombinación de T4 al igual que las de *E. coli* pueden participar en más de una ruta. Sin embargo, a diferencia de las proteínas de *E. coli*, al parecer varias de estas proteínas en T4 también están involucradas en procesos de recombinación no homóloga (Mosig 1998).

Los estudios en T4 han sido claves para mostrar que las zonas de replicación son "hotspots" para activar recombinación. Por otra parte, en el fago T4 al igual que en sistemas eucariotes (ver mas adelante), el mover al origen de replicación a otras zonas incrementa la frecuencia de recombinación en este sector del genoma. La capacidad de la replicación para incrementar la frecuencia de recombinación en T4 tal vez se deba a la creación de un DSB provocado por la detención de la horquilla de replicación (Yap y Kreuzer 1991). La idea de que un DSB es el enlace entre replicación y recombinación en T4 ha sido reforzada al demostrarse que un DSB en el genoma de T4 causa replicación extensiva que no se limita sólo a la zona degradada durante el procesamiento del DSB (Yap y Kreuzer 1991; Kreuzer *et al.* 1995 ). Así pues, es claro que para T4 la recombinación y la replicación presentan interacciones estrechas.

En levadura, la activación de las secuencias de replicación autónoma (ARS) presentes en diferentes zonas de los cromosomas incrementa la recombinación principalmente en sus alrededores, pero el efecto puede propagarse por varias kilopares de bases (Kb) alrededor del origen (Rattray y Symington 1993). La supresión de la actividad de la ARS hace que la estimulación de la

recombinación desaparezca. Por otra parte, el introducir la ARS en nuevas regiones del cromosoma que originalmente eran "coldspots" para recombinación las vuelve "hotspots" (Rattray y Symington 1993). La recombinación inducida por replicación en levadura estimula eventos recíprocos y no recíprocos en proporciones variables, dependiendo de la zona del cromosoma donde se encuentre la ARS (Rattray y Symington 1993). La participación de proteínas de recombinación homólogas a las de *E. coli*, al igual que el mecanismo por el cual la replicación incrementa la recombinación comienzan a ser evaluados. Se propone que el estímulo inicial podría ser la creación de un DSB (Malkova *et al.* 1996).

La replicación no sólo activa recombinación durante sus etapas iniciales. Los estudios en *E. coli* han mostrado que la etapa final del proceso de replicación, la terminación, también genera rearrreglos a una alta frecuencia en la zona de término de replicación del cromosoma (Louarn *et al.* 1991; Horiuchi *et al.* 1994; Horiuchi y Fujimura 1995). Si bien la zona de término posee un sector para recombinación sitio específica (el sitio *dif*, Steiner y Kuempel 1998), es claro que toda la zona comprendida entre los sitios de terminación posee alguna característica adicional que la hace hiper-recombinogénica (Corre *et al.* 1997). La propiedad principal de la que parece depender esta capacidad es el poder detener el avance de la horquilla de replicación provocando su colapso y permitiendo la entrada de la maquinaria de recombinación (Horiuchi *et al.* 1994; Horiuchi y Fujimura 1995; Corre *et al.* 1997). Para que la horquilla pueda ser detenida en la zona de término se requiere de dos elementos, una secuencia nucleotídica y una proteína (Tus en *E. coli* o TRP en *Bacillus subtilis*). Las proteínas se unen a su secuencia blanco e impiden el avance de la helicasas involucradas en replicación como DnaB, PriA y el antígeno T de SV40 en una manera orientación dependiente (Sahoo *et al.* 1995; Mohanty *et al.* 1996). Tus o TRP también son capaces de detener el avance de la maquinaria de transcripción de *E. coli*, el bacteriófago T7 y del bacteriófago SP6 (Mohanty *et al.* 1996). En *B. subtilis*, se ha demostrado que hay contacto directo entre RTP y la helicasa DnaB (Manna *et al.* 1996).

Originalmente, se propuso que, una vez detenida la horquilla de replicación, esto crearía un DSB, por lo que el proceso de recombinación en la zona de término del cromosoma dependería de la acción de *recBCD* (Louarn *et al.* 1991; Horiuchi *et al.* 1994). Sin embargo, la escasez de sitios  $\chi$  que pudieran atenuar la actividad de nucleasa de *recBCD* en el término del cromosoma de *E. coli* (Blattner *et al.* 1997) ha hecho proponer dos alternativas, la primera postula que el evento inicial de la recombinación no es un DSB y que la ruta *recBCD* sólo se activa hasta el final del proceso (Corre *et al.* 1997). Por otra parte, la segunda alternativa indica que probablemente otras rutas de recombinación están involucradas. A este respecto, los resultados de Steiner y Kuempel (1998) indican que probablemente la ruta controlada por *recF* también puede participar en la recombinación en la zona de término.

### 3b) Los sistemas artificiales.

*B. subtilis* ha sido el organismo modelo para estudiar el efecto de inducción de replicación sobre la recombinación. En esta bacteria, se han creado secuencias repetidas mediante cointegración de plásmidos con diferentes marcadores genéticos. El origen de replicación puede localizarse entre las secuencias repetidas creadas por los cointegrados o a distancias variables respecto a ellas. Este origen es plasmídico y además temperatura sensible, por lo que la replicación a partir de él se activa a voluntad al hacer crecer a las bacterias a diferentes temperaturas (Noirot *et al.* 1987; Petit *et al.* 1992). Los resultados de estos estudios indican que la replicación es capaz de incrementar la frecuencia de recombinación siempre y cuando el origen de replicación no se encuentre lejano a las secuencias repetidas. De igual forma, el efecto es mayor cuando la horquilla de replicación avanza hacia las secuencias repetidas que cuando se aleja de ellas. La inducción de replicación en un inicio conduce a la formación de amplificaciones (Petit *et al.* 1992), pero si se mantiene activa la replicación, los productos recuperados son deleciones (Noirot *et al.* 1987). Cabe señalar que el origen de replicación empleado es de tipo círculo rodante y que el incremento en la frecuencia de recombinación fue atribuido a la presencia de DNA de cadena sencilla, que es un excelente sustrato para recombinación (ver arriba). En contraste, cuando se empleó un origen de replicación tipo teta ( $\theta$ ), la estimulación de recombinación fue muy modesta, de sólo cuatro veces (Morel-Deville y Ehrlich 1996).

Sólo hasta hace poco se ha tratado de implementar sistemas similares en *E. coli*. Para este organismo, se cuenta con la ventaja de que existen diferentes mutantes para los genes involucrados tanto en replicación como en recombinación, lo que probablemente permitirá avanzar en estos estudios. A la fecha, los resultados indican que diferentes mutantes en proteínas involucradas en replicación generan efectos diferentes en las frecuencias de recombinación, dependiendo de si los sustratos se encuentran en plásmido o en el cromosoma (Saveson y Lovett 1997).

No todos los estudios en *E. coli* han sido fructíferos. El afectar genes involucrados en recombinación y replicación al mismo tiempo es deletéreo para el crecimiento de la bacteria (Gross *et al.* 1971; Monk y Kinross 1972; Cao y Kogoma 1995). El simple hecho de introducir orígenes de replicación adicionales en el cromosoma de *E. coli* provoca que las bacterias presenten fenotipos de crecimiento aberrantes (Yamaguchi y Tomizawa 1980; Louarn *et al.* 1982; Eliasson *et al.* 1996). A pesar de estas dificultades, se han obtenido avances, especialmente al estudiar mutantes en la proteína encargada de ensamblar horquillas de replicación conocida como PriA (Sandler *et al.* 1996; Al-Deib *et al.* 1996). PriA es una proteína que posee actividad helicasa, ATPasa y translocasa, además de ser capaz de unirse a estructuras palindrómicas de DNA para ensamblar horquillas de replicación (Shlomai y Konberg 1980, Zavits y Mariani 1992). Mutaciones en PriA generan deficiencias en

recombinación, evaluada a través de ensayos de transducción. Este fenotipo depende exclusivamente de su capacidad de ensamble del primosoma ya que, si se emplean mutantes en las diferentes actividades bioquímicas de PriA el defecto en recombinación no se observa (Kogoma *et al.* 1996, Sandler *et al.* 1996). Cabe hacer notar que supresores de PriA mapean en otra proteína involucrada en replicación, DnaC (Sandler *et al.* 1996).

#### 4) La recombinación al rescate de la replicación.

Durante el desarrollo del proceso de replicación, es muy probable que la polimerasa tenga que sortear más de un obstáculo. Las células, especialmente las bacterianas, muy pocas veces pueden realizar durante períodos específicos de su vida replicación y transcripción por separado. Debido a la duración de sus tiempos de doblaje durante la fase de crecimiento logarítmica, ambos procesos deben de ocurrir en forma simultánea, e incluso, para organismos como *E. coli*, es necesario que haya múltiples rondas de replicación activas al mismo tiempo. Aún en las células eucariotas donde el ciclo celular presenta diferentes estadios y con ello se disminuyen los riesgos para completar las rondas de replicación, seguramente habrán lesiones en el DNA que pueden ser ocasionadas por diferentes causas y que generan colapsos en la horquilla de replicación. ¿Qué ocurre cuando las horquillas de replicación se colapsan? El detener el avance de la horquilla de replicación o dejar sin reparar las lesiones en DNA, conducirán a la muerte celular. Es aquí donde la recombinación adquiere gran importancia. Bierne y Michel (1994), al igual que Kuzminov (1995); han propuesto que el rescate de horquillas de replicación detenidas se lleva a cabo gracias a la participación de las enzimas de recombinación. En el modelo propuesto por Kuzminov (Figura 3), el colapso de una horquilla de replicación generará una ruptura en doble cadena, que será el sitio de entrada de la nucleasa RecBCD. Esta degradará al DNA hasta encontrarse con  $\chi$  en la orientación adecuada. El arribo de RecBCD a la secuencia  $\chi$  la convierte en helicasa, con lo que se genera la punta 3' que será tomada por *recA* para empezar recombinación con el cromosoma no dañado. La invasión de la punta 3' permitirá el cargado de una nueva horquilla de replicación que completará la síntesis del cromosoma, permitiendo la supervivencia de la bacteria. La distribución y orientación de los sitios  $\chi$  en el cromosoma de *E. coli* hacen plausible que esto ocurra *in vivo*. Una modificación de este modelo predice que rupturas en doble cadena en el DNA podrían conducir a la replicación del cromosoma completo y no solo limitar la síntesis a la zona dañada. De igual forma, durante los procesos de conjugación, transformación o transducción, las puntas 3' de la cadena de DNA ajena a la bacteria podrían activar replicación al invadir zonas homólogas y generar moléculas cromosomales completas que, al momento de segregarse, originan la

progenie recombinante (Smith 1989).

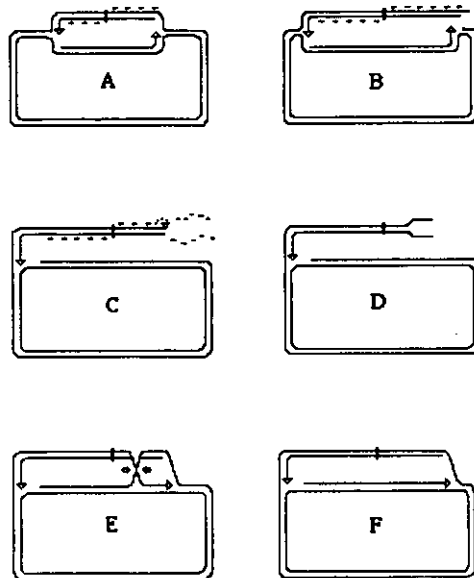
La recombinación no sólo proporciona una ruta de escape para una horquilla de replicación atrapada. En condiciones donde el origen de replicación natural del cromosoma de *E. coli* se inactiva, existen al menos dos mecanismos alternativos de síntesis de DNA que permiten la sobrevivencia de la bacteria. Los dos mecanismos son conocidos como la replicación inducible estable del DNA (iSDR) y la replicación constitutiva estable del DNA (cSDR) (Kogoma 1997).

La activación de iSDR es parte de la respuesta SOS; mutantes en *lexA* no presentan iSDR (Kogoma *et al.* 1979). La actividad iSDR es independiente de la presencia de la proteína DnaA así como de la integridad del origen de replicación del cromosoma (Magee *et al.* 1992). Bajo circunstancias de inducción de iSDR, las zonas preferidas para inicio de síntesis de DNA se localizan o bien alrededor de la zona del origen (*oriM*), o bien en la zona de término de replicación (*oriK*) (Asai *et al.* 1994). Sin embargo, otras zonas pueden ser empleadas como orígenes de replicación (Magee *et al.* 1992).

La iSDR es completamente dependiente de los genes *recA*, *recBC(D)*. El gen *recA* en un inicio se requiere para activar la respuesta SOS, pero una vez inducida, si *recA* no es capaz de realizar intercambio de cadenas de DNA la respuesta iSDR desaparece (Asai *et al.* 1993). Las mutaciones en *recBC(D)* presentan el mismo efecto en iSDR que para conjugación: mutaciones en *recBC* inhiben la iSDR, mientras que mutaciones en *recD* la favorecen (Magee y Kogoma 1990; Asai *et al.* 1993). Entre los genes de recombinación que afectan el establecimiento de iSDR se encuentran también *recJ*, mutaciones en este gen estimulan el proceso (Asai *et al.* 1993). Se ha observado también que mutantes en *ruvABC* y *recG* presentan un efecto dual: al inicio estimulan iSDR (ver más adelante), pero dado que las estructuras de Holliday formadas no pueden ser procesadas, inhiben las posteriores etapas de elongación (Asai *et al.* 1993; Asai y Kogoma 1994).

Por otra parte, si bien iSDR no requiere de DnaA, sí requiere de las proteínas DnaB, DnaC, DnaG así como de PriA (Kogoma y Lark 1975; Lark *et al.* 1981; Masai y Arai 1988; Masai *et al.* 1994). Todas estas proteínas participan en la formación del complejo encargado de la replicación de DNA en condiciones de iSDR. Mutaciones en cualquiera de ellos eliminan el efecto iSDR.

El modelo propuesto para la activación de iSDR se presenta en la Figura 4 (Kogoma 1997). Básicamente, lo que se propone es que, una ruptura en doble cadena que se puede generar por diferentes rutas (UV, nucleasas, etc.) provoca la formación de una punta 3' invasiva que se apareará con una región homóloga creando una estructura de Holliday y permitiendo el ensamblado de una nueva horquilla de replicación.



**Figura 3. Colapso y rescate de la horquilla de replicación.** A) La replicación bidireccional del cromosoma inicia. La horquilla que avanza a la derecha encontrará una ruptura en cadena sencilla que hará que colapse. B) Después del colapso, se crea un DSB que es un punto de entrada para RecBCD que comienza a degradar el cromosoma hasta encontrar un sitio  $\chi$  en orientación correcta. C) Al encontrar el sitio  $\chi$ , RecBCD cambia su actividad a helicasa. D) Se genera una punta 3' invasiva que con ayuda de RecA encontrará una zona homóloga. E) Se forma una de estructura Holliday. F) La estructura de Holliday permite ensamblar una nueva horquilla de replicación. Barra negra, *oriC*; flechas negras sobre y bajo las líneas, sitios  $\chi$ ; cabeza de flecha blanca, cadena líder de replicación. Tomado de Kuzminov (1995) con modificaciones.

El efecto dual de las mutaciones en *ruvABC* o *recG* se explica suponiendo que al inicio, las estructuras Holliday son mucho más estables, con lo que la horquilla de replicación se genera sin problemas, pero que al no haber procesamiento posterior de estas estructuras, impedirán el avance de la horquilla de replicación. En este modelo de iSDR, los orígenes alternativos, *oriM* y *oriK* podrían representar sitios donde las rupturas en doble cadena son frecuentes. A este respecto, al menos para la zona de término de replicación se cree que rupturas en doble cadena son generadas frecuentemente (Horiuchi *et al.* 1994; Corre *et al.* 1997). Por otra parte, el modelo propuesto por Kogoma se asemeja

el propuesto por Kuzminov (1995) para rescate de horquillas de replicación (compare con Figura 3).

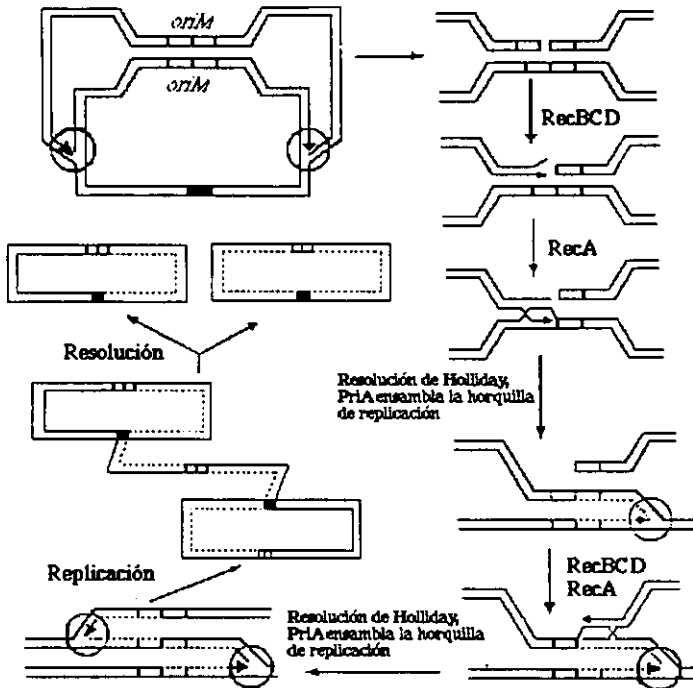
Si bien iSDR puede rescatar al cromosoma bacteriano cuando el origen de replicación es inactivado, o bajo condiciones donde se presenta daño en el DNA, también favorece la aparición de mutaciones en el genoma, ya que el proceso de replicación iniciado por esta ruta es propenso a errores (Kogoma 1997).

La otra alternativa de inicio de replicación, llamada cSDR depende de una mutación en la RNasaHI. La función de esta RNasa es remover moléculas de RNA apareadas sobre DNA, garantizando de esta forma que no serán empleados como iniciadores para la síntesis de DNA (Ogawa *et al.* 1984). Al inactivar la RNasa, los híbridos DNA-RNA son estables y el RNA puede emplearse para síntesis de DNA (deMassy *et al.* 1984; Ogawa *et al.* 1984).

Al igual que para iSDR, cSDR es independiente de la integridad del *oriC* así como de la proteína DnaA. De hecho, el gen *mhA* fue aislado en la búsqueda de mutantes supresoras para *dnaA* (Lindahl y Lindahl 1984). Los orígenes empleados por cSDR se localizan cercanos a la zona de término de replicación del cromosoma (deMassy *et al.* 1984). Cualquiera de los posibles orígenes puede ser empleado y la elección parece ser completamente aleatoria (von Meyenburg *et al.* 1987). Además, la activación de estos orígenes es independiente del ciclo celular, lo que hace a cSDR una replicación deficiente (von Meyenburg *et al.* 1987).

La cSDR es completamente dependiente de *recA* excepto en dos mutantes. Una de ellas es la mutante *rin*, cuyo producto desafortunadamente no ha sido identificado. Sin embargo, se sabe que no restablece los niveles de recombinación de las mutantes *recA*, por lo que se cree que no codifica para una proteína de recombinación (Torrey y Kogoma 1982). La otra mutación que elimina la dependencia de *recA* para cSDR es la mutación *lexA* (Def), que provoca activación constitutiva del regulón *lexA* (Torrey *et al.* 1984; Cao y Kogoma 1993). Casi ningún otro gene de recombinación probado i. e. *recBCD*, *recJ*, *ruvA* o *ruvC* presenta efectos sobre cSDR (Hong y Kogoma 1993; Kogoma *et al.* 1994). El único gen que afecta cSDR en forma negativa parece ser *recG* y esto se debe a su capacidad de disociar loops R y D (McGlynn *et al.* 1997; Hong *et al.* 1995; Vincent *et al.* 1996).

En lo que respecta a las proteínas para el ensamblado de la horquilla de replicación, cSDR tiene exactamente los mismos requerimientos de iSDR (Masai *et al.* 1994), pero en adición, requiere de la DNA polimerasa I, al menos en las etapas iniciales de síntesis de DNA (Kogoma y Maldonado 1997).



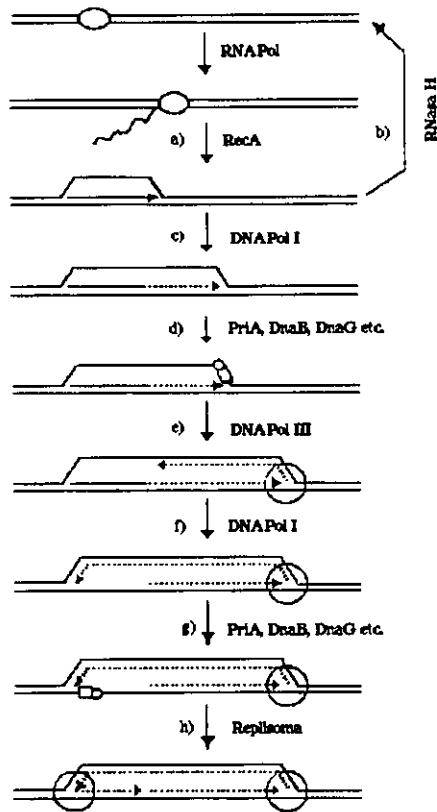
**Figura 4. Modelo de la iSDR.** Un DSB en *oriM* del cromosoma permitirá que, después del procesamiento de las puntas por RecBCD, RecA use el extremo 3' para invadir al homólogo. La invasión permitirá inicio de síntesis de DNA con ayuda de PriA y otras proteínas de replicación. Si la segunda punta del DSB original es procesada, podrá invadir también, con lo que se crea un concatámero que al resolverse generará dos cromosomas. Tomado de Kogoma (1997) con modificaciones.

Un modelo para cSDR se presenta en la Figura 5 (Kogoma 1997). Una molécula de DNA que esta siendo transcrita genera RNA que es asimilado por el duplex de DNA con ayuda de *recA*. Si la RNasa se encuentra presente, este duplex RNA-DNA será removido, pero si se inactiva la RNasa, el duplex es estable y permite a PolII iniciar síntesis. Esto genera un D-loop, que ahora permite el que se ensamble una horquilla de replicación "clásica". Mientras tanto, el RNA es removido por la propia PolII con lo que se carga una segunda horquilla de replicación y se tiene síntesis bidireccional.

Las actividades iSDR y cSDR se han estudiado en *E. coli*, sin embargo, la universalidad de



*recA* y de las proteínas encargadas de procesamiento de DNA para generar sustratos útiles en recombinación, hacen suponer que los mecanismos iSDR y cSDR se pueden presentar en todos los organismos.



**Figura 5. Modelo de cSDR.** a) La RNA polimerasa transcribe un gen. El RNA invade un duplex con ayuda de RecA. b) En células silvestres, la RNasaH elimina el híbrido DNA-RNA. Sin embargo, en mutantes *rnhA*, el híbrido es estable y es empleado por Pol I para iniciar síntesis de DNA. d) La estructura creada permite que PriA reclute las proteínas de replicación (círculo y rectángulo pequeños). e) Se carga Pol III con lo que ya se tiene una horquilla de replicación. f) Mientras tanto, Pol I degrada al RNA que le sirvió de primer. g) PriA ensambla otra horquilla de replicación. h) Las dos horquillas creadas pueden replicar todo el cromosoma. Las puntas de flecha en el esquema indican extremos 3'. Tomado de Kogoma (1997) con modificaciones.

## 5) El Genoma de *Rhizobium etli*.

*Rhizobium etli* (Segovia *et al.* 1993) no sólo es interesante por su capacidad de realizar simbiosis con el frijol (*Phaseolus vulgaris*) y fijar nitrógeno. Esta bacteria es interesante también por la estructura y dinámica de su genoma.

El genoma de *R. etli* está dividido en cromosoma y plásmidos (Brom *et al.* 1992). Al igual que en otros *Rhizobia*, la cantidad de material genético presente en los plásmidos puede alcanzar hasta el 50% (Long 1989; Martínez-Romero *et al.* 1990; García de los Santos *et al.* 1996). *R. etli* presenta seis plásmidos nombrados pa-pf cuyos tamaños aproximados son pa, 160 Kb; pb, 150 Kb; pc, 270 Kb; pd, 390 Kb; pe, 500 Kb y pf, 600 Kb. Otra propiedad importante del genoma de *R. etli* compartida con otros *Rhizobia* es la presencia de una gran cantidad de elementos reiterados. Las reiteraciones comprenden secuencias de inserción, genes estructurales para diferentes enzimas, fragmentos de genes y regiones regulatorias (Freiberg *et al.* 1997; Rodríguez 1998). Para el caso particular de *R. etli*, Flores *et al.* (1987) han calculado la presencia de 700 elementos reiterados que pertenecen a 200 familias diferentes. Dado que la estimación se realizó por hibridación, es probable que haya más elementos reiterados en esta bacteria.

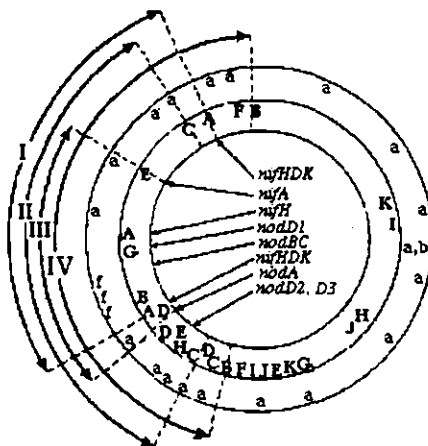
La presencia de elementos reiterados unidos a un sistema de recombinación activo permite la formación de rearrreglos en el genoma (Romero y Palacios 1997; Romero *et al.* 1997). En *R. etli*, la formación de rearrreglos ha sido estudiada con más detalle en su plásmido d. El plásmido d, también denominado plásmido simbiótico (pSym), posee la mayoría de los genes necesarios para establecer la relación con la planta de frijol (Girard *et al.* 1991).

Estudios previos realizados en el pSym muestran que se presentan amplificaciones y deleciones a frecuencias que varían entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , respectivamente (Romero *et al.* 1991). Los rearrreglos observados involucran principalmente una zona de 120 Kb que está bordeada por los operones de la nitrogenasa (Romero *et al.* 1991).

Otras zonas del pSym también pueden presentar rearrreglos, pero esto ocurre a menor frecuencia (Romero *et al.* 1995; Romero *et al.* 1997). Un esquema de las regiones del pSym que participan en recombinación se muestra en la Figura 6. Además de las amplificaciones y deleciones, se ha determinado que en los operones de la nitrogenasa ocurren procesos de recombinación semejantes a conversión génica (Rodríguez y Romero 1998).

A la fecha es claro que la recombinación homóloga está involucrada en la formación de rearrreglos en el pSym, ya que cepas mutantes en el gen *recA* no presentan los rearrreglos (Romero *et al.* 1995; Rodríguez y Romero 1998). Sin embargo, no se conoce qué otros procesos pueden influir la formación de rearrreglos en el pSym. El identificar otros procesos que participen en la formación de

rearrreglos en el pSym contribuirá a entender la dinámica del genoma de esta bacteria y al mismo tiempo proporcionará elementos y herramientas que permitan una mejor manipulación del genoma en vista a probables aplicaciones prácticas.



**Figura 6. Estructura y dinámica del pSym.** En la figura  $0.93^\circ = 1\text{Kb}$ . El pSym está representado por los tres círculos concéntricos. En el más interno se muestra la posición de algunos de los genes necesarios para simbiosis. El círculo intermedio indica la posición de los elementos de las familias reiteradas. Finalmente, el círculo externo indica las zonas con homología en otros plásmidos (pa, pb o pf). Los arcos numerados I-IV indican las zonas del plásmido susceptibles a rearrreglos. Tomado de Romero *et al.* 1997, con modificaciones.

De esta forma, el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la inducción de replicación sobre la formación de rearrreglos en el pSym de *R. etli*. Los resultados obtenidos se incluyeron en el artículo "Recombination Enhancement by Replication (RER) in *Rhizobium etli*" que se presenta a continuación. Además, se incluye una sección de resultados adicionales, en donde se muestran experimentos desarrollados con la finalidad de tratar de entender mejor las interacciones entre recombinación y replicación observadas durante el presente trabajo.

Si ves algo de lejos, sin comprender de qué se trata, te contentarás con definirlo como un cuerpo extenso. Cuando estés un poco más cerca, lo definirás como un animal, aunque todavía no sepas si se trata de un caballo o un asno. Si te sigues acercando, podrás decir que es un caballo, aunque aún no sepas si se trata de Brunello o Favello. Por último, sólo cuando estés a la distancia adecuada verás que es Brunello (o bien, ese caballo y no otro, cualquiera que sea el nombre que quieras darle). Este será el conocimiento pleno, la intuición de lo singular. Así, hace una hora, yo estaba dispuesto a pensar en todos los caballos, pero no por la vastedad de mi intelecto, sino por la estrechez de mi intuición. Y el hambre de mi intelecto sólo pudo saciarse cuando vi al caballo individual que los monjes llevaban por el freno. Sólo entonces supe que mi razonamiento previo me había llevado cerca de la verdad. De modo que las ideas, que antes había utilizado para imaginar un caballo que aún no había visto, eran puros signos, como eran signos de la idea del caballo las huellas sobre la nieve: cuando no poseemos las cosas usamos signos y signos de signos.

**Umberto Eco.**  
El Nombre de la Rosa.

Mellon Institute, Box 1  
4400 Fifth Avenue  
Pittsburgh, PA 15213-2683

Telephone: (412) 268-1812  
Fax: (412) 268-1813  
E-mail: genetics-usa@andrew.cmu.edu



December 10, 1999

David Romero  
Genética Molecular de Plásmidos Bacterianos  
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno-UNAM  
Apartado Postal 565-A  
62100 Cuernavaca  
Morelos,  
México

FAX: 73 175581

RE: GENETICS MS #8782

Dear Dr. Romero:

I am pleased to inform you that the paper by E. Valencia-Morales and D. Romero entitled "Recombination enhancement by replication (RER) in *Rhizobium eii*" has been accepted for publication in GENETICS.

You should receive page proofs in about eight to ten weeks. If you plan to be absent from the above address during that period, please make arrangements for one of your colleagues to check the proofs and order reprints on your behalf.

Thank you for your contribution to GENETICS.

Sincerely,

Elizabeth W. Jones  
Editor-in-Chief

11/22:154/3

**REVISED MANUSCRIPT**

**TITLE: RECOMBINATION ENHANCEMENT BY REPLICATION (RER) IN *Rhizobium etli*.**

**AUTHORS: Edgar Valencia-Morales and David Romero \*.**

**Programa de Genética Molecular de Plásmidos Bacterianos, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México.**

RUNNING TITLE: Replication increases recombination.

KEY WORDS: *Rhizobium* ; Recombination; DNA Replication; Genomic rearrangements.

\*Corresponding author:

Dr. David Romero

Programa de Genética Molecular de  
Plásmidos Bacterianos, Centro de Investigación  
sobre Fijación de Nitrógeno-UNAM.

Apartado Postal 565-A

62210 Cuernavaca, Morelos.

México.

Telephone number: (73) 175867

Fax number: (73) 175581

E-mail: dromero@cifn.unam.mx

## ABSTRACT

Studies in several organisms show that recombination and replication interact closely. Recombinational repair usually requires associated replication at some stage; moreover, additional replication can induce recombination through either homologous or illegitimate events. In prokaryotes, stimulation of recombination by replication is more dramatic when rolling circle replication is employed. In contrast, theta-type replication induces only a modest increase in recombination frequency.

In this work, we show that induction of theta-type replication from a supernumerary origin in the symbiotic plasmid (pSym) of *Rhizobium etli* leads to a 1000-fold increase in deletion formation on this plasmid. These deletions span 120 Kb (the symbiotic region) and have as endpoints the reiterated nitrogenase operons. We have named this phenomenon RER, after *Recombination Enhancement by Replication*. RER is not affected by the position of the replication origin in the pSym, the direction of advance of the replication fork or the distance from the origin to the recombining repeats. On the other hand, RER is dependent on an active *recA* allele, indicating that it is due to homologous recombination. RER displays a strong regionality, restricted to the symbiotic region. The similarities and differences of RER with the recombination process observed at the terminus of replication of the *Escherichia coli* chromosome are discussed.



## INTRODUCTION

Traditionally, DNA replication and recombination are studied separately. However, work with bacteriophages (KREUZER *et al.* 1995; KUZMINOV and STAHL 1999), bacteria (LOUARN *et al.* 1982; NOIROT *et al.* 1987; LOUARN *et al.* 1991; PETIT *et al.* 1992; HORIUCHI and FUJIMURA 1995; CORRE *et al.* 1997; KOGOMA 1997; SAVESON and LOVETT, 1997) and eukaryotic cells (RATTRAY and SYMINGTON 1993; MALKOVA *et al.* 1996) shows that recombination may be induced during the replication process. Rearrangement formation by replication arises either through *recA*-dependent (PETIT *et al.* 1992; SAVESON and LOVETT 1997) or *recA*-independent mechanisms (KREUZER *et al.* 1995; LOVETT and FESCHENKO 1996; BIERNE *et al.* 1997; SAVESON and LOVETT 1997). Recombination triggered by replication can be either reciprocal (NOIROT *et al.* 1987) or non-reciprocal (NOIROT *et al.* 1987; MALKOVA *et al.* 1996).

Currently accepted models for recombination involve DNA replication (STAHL 1994; STAHL 1996). DNA replication primed by recombination intermediates is particularly relevant when chromosome integrity is affected, or when the chromosomal origin is damaged and/or inactivated. Under these circumstances, replication induced by recombination restores genome integrity, allowing bacterial survival (ASAI *et al.* 1994; BIERNE and MICHEL 1994; KUZMINOV 1995; KOGOMA 1997).

Rolling circle-type replication usually provokes a strong stimulation in recombination (NOIROT *et al.* 1987; PETIT *et al.* 1992). This is reasonable, since the strand generated and displaced during replication may become a good substrate for recombination proteins such as RecA, RecFOR complex, RecOT complex and SsbB (KOWALCZYKOWSKI *et al.* 1994), or their counterparts in other systems, such as UvsX and UvsY in phage T4 (KREUZER *et al.* 1995). In contrast, a report suggests that theta-type replication has only a minor effect on recombination, when tested on a bacterial system (MOREL-DEVILLE and EHRlich 1996). This proposal is in conflict with results obtained in eukaryotic systems, where apparent theta-type replication strongly induces recombination (RATTRAY and SYMINGTON 1993; MALKOVA *et al.* 1996).

A particular drawback for most of the studies in bacterial systems is the use of artificial repeats created on the chromosome, in which a supernumerary replication origin has also been placed. Moreover, in many cases in which a new replication origin is placed into the chromosome, coexisting with a functional, vegetative origin, bacterial cells display altered nucleoid partition, aberrant cell morphology and a decrease in viability (YAMAGUCHI and TOMIZAWA 1980; LOUARN *et al.* 1982; NOIROT *et al.* 1987; ELIASSON *et al.* 1996). Therefore, a system in which the connections between replication and recombination can be studied under less restrictive conditions would contribute to unraveling the links between these processes.

We have been using the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium etli* as a model for the study of genome dynamics. One of the unusual features of *Rhizobium* is the presence of abundant DNA reiteration, comprising about 18% of the genome (reviewed by ROMERO *et al.* 1997). Reiterated elements in *Rhizobium* spp. reside either in the chromosome or in plasmids (FLORES *et al.* 1987; GIRARD *et al.* 1991; FREIBERG *et al.* 1997), and include IS elements, housekeeping genes and genes for nodulation and nitrogen fixation. Genomic rearrangements are facilitated by the presence of these repeated sequences (reviewed by ROMERO and PALACIOS 1997; ROMERO *et al.* 1997).

The genome of *R. etli* comprises the chromosome and six plasmids (pa to pf), ranging in size from 150 to 600 Kb (BROM *et al.* 1992; GARCÍA-DE LOS SANTOS *et al.* 1996). Plasmid d is the symbiotic plasmid (pSym, 390 Kb) since it carries almost all the genes needed for symbiosis with beans. The pSym can be either eliminated (BROM *et al.* 1992) or the copy number of several regions in this plasmid increased (ROMERO *et al.* 1991; ROMERO *et al.* 1995) without detrimental effects for free-living growth. The pSym shows amplification and deletion events at high frequency ( $10^{-4}$  per viable cell), affecting a 120 Kb region termed the symbiotic region; these events are mediated by homologous recombination between flanking reiterated operons (*nifHDK* regions a and b) encoding the nitrogenase enzyme complex (ROMERO *et al.* 1991). A third, incomplete copy of these repeats is located inside the symbiotic region (*nifH* region c), in an inverted orientation *vis a vis* regions a and b. Recombination between the direct repeats is facilitated by their size (5 Kb) and high homology. The nitrogenase reiterations participate in gene conversion-like events which preserve their identity (RODRÍGUEZ and ROMERO 1998). Other reiterations participate in the generation of rearrangements, but at lower frequencies (about  $10^{-6}$ , ROMERO *et al.* 1995).

Studies aimed to identify processes that may trigger rearrangement formation in the pSym are yet absent. The main goal of this work was to evaluate the role of inducing additional replication on rearrangement formation in the pSym of *R. etli*. Our data show that additional theta-type replication in the pSym induces a dramatic increase in the formation of rearrangements, leading to loss of the symbiotic region through homologous recombination. Other zones of the genome are not destabilized by the additional replication process in this plasmid.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids and media:** The bacterial strains employed are listed in Table 1. *E. coli* strains were grown at 37° in Luria-Bertani medium (MILLER 1972). *R. etli* and *Agrobacterium tumefaciens* strains were grown at 30° in PY medium (NOEL *et al.* 1984). When indicated, sucrose was added to PY plates at 12.5% (w/vol). Antibiotics were added at the following concentrations (in

$\mu\text{g ml}^{-1}$ ): a) *E. coli*, Carbenicillin (Cb) 100, Chloramphenicol (Cm) 15, Kanamycin (Km) 30, Spectinomycin (Sp) 100, Streptomycin (Sm) 100, Tetracycline (Tc) 10; b) *R. etli*, Cm 20, Gentamycin (Gm) 80, Km 15, Nalidixic acid (Nal) 20, Neomycin (Nm) 75, Rifampicin (Rif) 100, Tc 2.

**Filter blot hybridization and determination of plasmid profiles:** Total DNA was digested with *Bam*HI, electrophoresed in 1% agarose gels, blotted onto nitrocellulose (Hybond N+, Amersham Corp.) and hybridized under stringent conditions using Rapid-Hyb buffer (Amersham Corp.) as specified by the manufacturer. Plasmid profiles were obtained by an in-gel lysis method (ECKHARDT 1978), blotted onto nitrocellulose and hybridized similarly. Most probes were linearized by digestion with restriction enzymes and labelled with  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP by a random priming procedure (FEINBERG and VOGELSTEIN 1983) using the Rediprime DNA labelling system (Amersham Corp.). PCR products used as probes were not digested.

**Plasmid construction:** The plasmids used in this work are shown in Table 2. All DNA manipulations were carried out under standard protocols (SAMBROOK *et al.* 1989). Restriction enzymes, T4 polynucleotide ligase and bacterial alkaline phosphatase were purchased from Amersham Corp. and used as suggested by the provider.

To construct pEYM1, a 4.28 Kb *Hind*III fragment from pTn5 -*luxB* (C. KONCZ, unpublished), containing both the replication and transfer origins (*oriV* and *oriT*, respectively) from plasmid RK2 (THOMAS and SMITH 1987; PANSEGRAU *et al.* 1994) was cloned into pIC20R (MARSH *et al.* 1984) in the desired orientation. Plasmid pEYM1 was digested with *Bgl*II and the 3.9 Kb fragment containing *oriV-oriT* was then ligated into the unique *Bam*HI site of the Tn5-containing plasmid pSUP5011 (SIMON 1984), replacing the *mob* sequence. The resulting plasmid (pEYM4) harbors a new Tn5 derivative designated as Tn5 -GDYN2 (acronym for Genome DYNAMics, Figure 1).

Plasmid pEYM2 contains the *oriV-oriT* fragment from pEYM1 ligated to the 1.3 Kb *Bam*HI fragment from pSV16 (DURLAND *et al.* 1990), containing the *Km<sup>r</sup>* gene from Tn903. Since the only active replication origin in pEYM2 is *oriV* from RK2, this plasmid must be maintained in a strain producing TrfA *in trans*, such as *E. coli* S17-1.

Activation of replication from *oriV*-containing elements was achieved using plasmid pEYM5. pEYM5 is a derivative from pMMB206 (MORALES *et al.* 1991) in which a 1.2 Kb *Eco*RI-*Pst*I fragment from pFF1-34wt (DURLAND *et al.* 1990), containing a promoterless *trfA* gene, was cloned under the control of the *PTaclacUV5* promoter.

Plasmids pEYM9 and pEYM10 are integrative plasmids for *R. etli* derived from plasmid pSUP202 (SIMON *et al.* 1983), containing either an internal 4.5 Kb *Eco*RI fragment from the *Bam*HI band 47 or an internal 2.5 Kb *Eco*RI fragment from the *Bam*HI band 81 of the pSym map, respectively (GIRARD

*et al.* 1991). Both plasmids confer a Tcr phenotype when integrated into pSym.

For the construction of additional integrative elements, the 3.9 Kb *Bg*III fragment from pEYM1 (*oriV-oriT*) was ligated to a 2 Kb *Bam*HI  $\Omega$ Km cassette from pBSL128 (ALEXEYEV *et al.* 1995), generating plasmid pEYM11. Since this plasmid replicates using *oriV*-RK2, it was maintained in *E. coli* strain S17-1. Digestion of pEYM11 with *Hind*III and ligation into the unique *Hind*III site of the *nifH* c-containing vector, pCQ23 (QUINTO *et al.* 1982), generates integrative plasmids pEYM12 and pEYM13. These plasmids differ in the orientation towards the *oriV* replication fork advances.

**Construction and characterization of *R. etli* strains carrying Tn5-GDYN2 on the symbiotic plasmid:** For introduction of Tn5-GDYN2, a biparental mating was done, using *E. coli* S17-1/pEYM4 as donor and *R. etli* CFNX5 (ROMERO *et al.* 1991) as recipient, selecting for Nal<sup>r</sup> Nmr transconjugants. To identify transconjugants with the transposon inserted in the pSym, we took advantage of the GDYN1 cassette, conferring Km/Gm, Sp/Sm resistance (ROMERO *et al.* 1991), present in the pSym of CFNX5. Triparental matings were made with *A. tumefaciens* GMI9023 as a recipient and individual *R. etli* colonies as donors; *E. coli* HB101/pRK2013 was used as a conjugation helper. *A. tumefaciens* transconjugants which had received a pSym with GDYN2 inserted in it were identified by their Nmr<sup>r</sup> Spr phenotype. Once we obtained transconjugants with the desired phenotype, we recovered the *R. etli* donors which had originated them. To verify that the Tn5-GDYN2 was inserted in the pSym of these *R. etli* derivatives (CFNX600, CFNX601 and CFNX602), their plasmid profiles were hybridized against the 3.9 Kb *Bg*III fragment containing *oriV-oriT* from pEYM1 or with an internal *nifH* probe (a 455 bp PCR product, covering from nucleotides 423 to 878, RODRIGUEZ and ROMERO 1998). To locate the position of the Tn5-GDYN2 in the pSym, total DNA was digested with *Bam*HI and analyzed by Southern blot hybridization using as probes the pSym cosmid collection (GIRARD *et al.* 1991).

**Construction of *recA:: $\Omega$ Sp* derivatives carrying Tn5-GDYN2 in the pSym:** To generate *recA:: $\Omega$ Sp* derivatives from the different insertions, the pSyms from strains CFNX600, CFNX601 and CFNX602 were transferred by conjugation into strains CFN2001 or its isogenic *recA:: $\Omega$ Sp* derivative, CFNX107 (see Table 1), using HB101/pRK2013 as a conjugation helper. Selection for Rif<sup>r</sup> Nmr<sup>r</sup> transconjugants gave rise to strains CFNX603 to CFNX608. As a verification, plasmid profiles of selected transconjugants were hybridized against *oriV* and *nifH* specific probes (see above).

**Construction and characterization of *R. etli* strains harboring *oriV* in alternative orientations on the pSym:** To create *R. etli* strains with the *oriV* replication fork on the pSym advancing either clockwise or counterclockwise, plasmids pEYM12 and pEYM13 were introduced by conjugation into strain CE3, selecting for Nal<sup>r</sup> Nmr<sup>r</sup> transconjugants; this generates strains CFNX609

and CFNX610. Cointegrates between the pSym and either pEYM12 or pEYM13 resulted from single-exchange events, among the homologous region in all these plasmids (*nifHc*). The presence of the cointegrated plasmid was confirmed by Southern blot hybridization of plasmid profiles of selected transconjugants, using pBR322 as a probe. Formation of cointegrates in the *nifHc* region was verified by Southern blot hybridization of *Bam*HI-digested total DNA, probed against an internal *nifH* fragment.

**Construction and characterization of *R. etli* strains harboring the Tn5-GDYN2 in plasmid pGM1:** We introduced Tn5-GDYN2 into a strain containing pGM1, CFNX250 (Table 1) through a biparental mating using *E. coli* S17-1 as donor, selecting for a *Nal<sup>r</sup>Nm<sup>r</sup>* phenotype. We identified those transconjugants in which pGM1 received Tn5-GDYN2 through biparental matings against *A. tumefaciens* using individual *R. etli* colonies as donors and selecting for a *Nm<sup>r</sup> Spr* phenotype. The original *R. etli* colonies which gave rise to these transconjugants were identified. Hybridization of plasmid profiles of selected transconjugants against the *oriV-oriT* probe confirmed the presence of Tn5-GDYN2 in pGM1. Location of Tn5-GDYN2 on pGM1 was established through *Bam*HI-digested total DNA hybridization against the cosmids covering the symbiotic region. For derivatives not showing an altered band pattern, we assumed that the GDYN2 was located in the part corresponding to plasmid a. Strains CFNX614, CFNX616 and CFNX620 were characterized in this way.

**Construction and characterization of *R. etli* derivatives harboring integrated plasmids at different genomic locations:** To generate strains carrying an additional deletable zone into a separate endogenous plasmid, we employed plasmid pLPS42b (Table 2). This plasmid harbors a 7.5 Kb fragment encompassing the *lpsβ* region from plasmid b (GARCÍA-DE LOS SANTOS and BROM 1997) cloned into an integrative plasmid. We introduced pLPS42b into strains CFNX600, CFNX601 and CFNX602 through biparental mating, using *E. coli* S17-1 as a donor. *Nal<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>* transconjugants arise through a single crossover between pLPS42b and its homologous target. Strains CFNX611 to CFNX613 were obtained in this way.

To obtain strains with integrated plasmids in the pSym, we introduced by conjugation either plasmid pEYM9 or pEYM10 into strains CFNX600 and CFNX602 using *E. coli* S17-1 as donor, selecting for *Nal<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup>* transconjugants. Integration of pEYM9 creates a cointegrate in band 47 of the pSym, whose borders are 4.5 Kb long repeats (strains CFNX622 and CFNX624). Integration of pEYM10 generates a cointegrate in band 81 of the pSym, whose borders are 2.5 Kb long repeats (strain CFNX623 and CFNX625). Presence of the cointegrated plasmids in all the derivative strains was confirmed by Southern hybridization of plasmid profiles using pBR322 as a probe.

To search for the zone which destabilizes the symbiotic region under active replication from *oriV*,

pEYM12 was introduced by biparental matings with *E. coli* S17-1, into either strains CFNX55 or CFNX88 (harboring different deletions of the pSym, see Table 1), selecting for transconjugants in media containing Nal and Nm; these crosses generated strains CFNX627 and CFNX630.

**Evaluation of deletion frequencies:** The GDYN1 element (Figure 1, part A and ROMERO *et al.* 1991) contains a dose-dependent Km/Sp determinant (positive selection for amplifications) as well as the *sacB* gene of *Bacillus subtilis*, which confers sucrose-dependent lethality to gram-negative bacteria. Plating of cells carrying the GDYN1 element on media containing sucrose has been useful for the positive selection of deletions affecting the symbiotic zone (ROMERO *et al.* 1991; ROMERO *et al.* 1995). For evaluation of deletion frequencies, at least six single-colony isolates were obtained from each cross done to introduce pEYM5 into the different strains carrying *oriV*. Since transconjugants were obtained as single-colony isolates, each transconjugant colony represents an independent activation event. These colonies were diluted in MgSO<sub>4</sub> (10mM)-Tween 40 (0.01%) and plated onto medium with Nal and Cm (for viable cell count) and onto medium containing sucrose to select for deleted derivatives. Deletion frequency is the number of bacteria growing in sucrose-containing medium divided by the number of bacteria growing in NalCm plates. For low copy number plasmids, such as the pSym (one to two copies per cell, RAMÍREZ-ROMERO *et al.* 1997), evaluating the recombinant formation frequency by this technique is a satisfactory way to determine the real frequency of the event (CHÉDIN *et al.* 1997), since a low number of plasmids per cell reduces not only the probability of having preformed recombinant plasmids, but also competition between parental and recombinant plasmids.

## RESULTS

**Experimental design:** To evaluate the role of additional rounds of replication in the formation of rearrangements on the pSym, we devised a strategy that is based on the use of (i) an element that allows a positive selection for the formation of deletions (GDYN1, see MATERIALS AND METHODS and Figure 1, part A), (ii) a Tn5- derivative that contains a conditional origin of replication (Tn5-GDYN2) and, (iii) a plasmid (pEYM5) that permits the activation of the newly-introduced origin of replication (Figure 1).

The Tn5-GDYN2 transposon (Figure 1, part B) contains both the replication origin as well as the conjugal transfer origin (*oriV-oriT*) from plasmid RK2 (PANSEGRAU *et al.* 1994). The replication origin of RK2 allows low-copy number replication (five to six copies per cell) in a theta-type, unidirectional mode (MEYER and HELINSKI 1977) in many hosts, including *Rhizobium* (THOMAS and SMITH 1987). The main determinant for replication from this origin is the RK2-encoded TrfA protein

(THOMAS and SMITH 1987). Several broad-host range vectors have been constructed using only the *oriV*-RK2 and the *trfA* gene (THOMAS and SMITH 1987; BLATNY *et al.* 1997). Thus, activation of the *oriV* carried by Tn5-GDYN2 can be controlled by the presence or absence of TrfA. Presence of TrfA was achieved by introduction of pEYM5, which carry a promoterless *trfA* gene under the control of the *PTa<sub>clac</sub>UV5* promoter (Figure 1, part D).

To ascertain the functionality of this replication system, plasmid pEYM2, harboring *oriV*-RK2 as the only replication origin, was introduced by conjugation into *R. etli* *recA*<sup>+</sup> or *recA*:: $\Omega$ Sp derivatives carrying pEYM5. Transconjugants carrying pEYM2 were readily obtained ( $1 \times 10^{-3}$  per recipient cell); the presence of both plasmids as separate molecules in these transconjugants was verified by examination of their plasmid profiles (data not shown). In contrast, no transconjugants were observed in similar experiments using recipient strains lacking pEYM5. Transconjugants were seen in pEYM5-harboring recipients despite the absence of the inducer IPTG, suggesting that synthesis of TrfA in absence of the inducer is high enough to activate replication, as observed previously (DURLAND and HELINSKI, 1990).

**Induction of replication from *oriV* induces a dramatic increase in rearrangement formation in the pSym:** Strains CFNX600, CFNX601 and CFNX602 carry the Tn5-GDYN2 transposon at different locations in the pSym (Figure 1, part C); pEYM5 was introduced by conjugation into these strains. The resulting transconjugants (at least 30 from each cross) were analyzed for plasmid profile (see MATERIALS AND METHODS).

Upon introduction of pEYM5 into strain CFNX5 (lacking a supernumerary origin), no alteration in plasmid size or abundance was detected. In contrast, upon introduction of this plasmid into strains containing a supernumerary origin on the pSym either inside (CFNX600) or outside (CFNX602) the symbiotic region, 62 out of 70 transconjugant colonies (CFNX600) or 62 out of 66 colonies (CFNX602) analyzed showed an altered plasmid pattern (Figure 2, part A). The main differences are the absence of a normally-sized pSym and an increase in the intensity of the band corresponding to plasmid c. These differences are consistent with a large, 120 Kb deletion in the pSym, generating a deleted plasmid that comigrates with plasmid c (ROMERO *et al.* 1991). Southern blotting of the plasmid profile, hybridized against an internal *nifH* probe, confirmed the presence of a deleted pSym (comigrating with plasmid c) in our strains (Figure 2, part B). The size of the deleted plasmids (270 Kb), suggests that these were generated by recombination between *nifHDK* region a and *nifHDK* region b (ROMERO *et al.* 1991), removing the symbiotic region. Confirming this expectation, Southern blots of *Bam*HI-restricted total DNA, probed with an internal *nifH* fragment, revealed that deleted strains lack the three *nifH* reiterations observed in the parental strain, having only a single band of altered size (Figure 2, part C). Its size (9.9 Kb) is consistent with a recombination between *nifHDK*

region a and *nifHDK* region b, thus generating a hybrid band that carries the 5' end of *nifHDK* region a and the 3' end of *nifHDK* region b (ROMERO *et al.* 1991).

These data were further extended by analyzing over 400 colonies for plasmid profile, coming from at least 20 independent experiments employing strains CFNX600, CFNX601 and CFNX602. In every case, upon activation of supernumerary replication of the pSym, most of the resulting colonies (127 out of 162, strain CFNX600; 89 out of 116, strain CFNX601; 100 out of 144, strain CFNX602) showed a pattern consistent with a deletion of the symbiotic zone in the pSym. A diagrammatic representation of the results is shown in Figure 3. In these experiments, no selection was applied for strains that had undergone a deletion in the pSym; selection was only made for presence of the replication-activating plasmid. Similar proportions of derivatives lacking the symbiotic region were observed in strains harboring the supernumerary origin inside the symbiotic region (strains CFNX600 or CFNX601) or outside of it (CFNX602). The high frequency of derivatives carrying deletions of the symbiotic region cannot be attributed to selection against the supernumerary origin, because in derivatives of strain CFNX602 the additional origin is preserved on the deleted pSym (Figure 3). These data are best explained suggesting that supernumerary replication stimulates deletion formation. We dubbed this phenomenon RER, after Recombination Enhancement by Replication.

To quantitate the deletion frequency, we collected individual transconjugants from the crosses, scoring the frequency of sucrose-resistant cells in each colony (see MATERIALS AND METHODS). As shown in Table 3, introduction of pEYM5 into a strain lacking the Tn5-GDYN2 element does not alter the frequency of deletions. In contrast, after introduction of pEYM5 into strains harboring a supernumerary replication origin, there is a thousand-fold increase in deletion frequency (Table 3).

The observed increase in deletion frequency was similar regardless of the location of the Tn5-GDYN2 element on the pSym, ruling out positional effects of the new replication origin with respect to the deleted zone. Similar deletion frequencies were found when the additional origin was located at 3.2 Kb (strain CFNX601), 32 Kb (strain CFNX600) or at 79 Kb (strain CFNX602) from the nearest recombining repeat (Table 3). Thus, these results indicate that the magnitude of RER is independent of the distance of the supernumerary origin to the recombining repeats. In fact, strains with insertions in bands 43 or 84 (65 Kb or 54 Kb away from the nearest recombining repeat, respectively, GIRARD *et al.* 1991), which are located outside the symbiotic region, also showed a high frequency of deletion (data not shown). In these strains, as well as in CFNX602, the additional origin is still preserved on the deleted pSym.

RER cannot be attributed to incompatibility between the replication origins of the different plasmids. As shown in Table 3, introduction of pEYM5 into CFNX5 (lacking the supernumerary origin) did not increase deletion frequency. Similarly, introduction of a plasmid lacking *trfA* (pMMB206) into strains



CFNX600, CFNX601 or CFNX602, or a RK2 derivative (pRK7813, which uses *oriV*-RK2 and *TrfA* to replicate) into CFNX5, did not increase deletion frequency (Table 3).

**RER is independent of the direction of advance of the supernumerary replication fork:** To test whether the enhanced frequency of deletion formation was dependent on the direction of travel of the replication fork, we employed plasmids pEYM12 and pEYM13, which harbor alternative orientations of the unidirectional *oriV*-RK2 origin. These plasmids also contain *nifH* region c, as a target for homologous recombination. Cointegration of these plasmids on the pSym generates strains where the *oriV*-RK2 element is flanked by direct repeats of *nifH* region c. Depending on the integrative plasmid used, advance of the supernumerary replication fork can occur either counterclockwise (CFNX609) or clockwise (CFNX610) relative to *nifHDK* region a (Figure 4). Supernumerary replication was primed by the introduction of pEYM5.

Since these strains lack the GDYN1 element, RER was evaluated by examining pSym size by an in-gel lysis electrophoretic procedure (Eckhardt-type gels, see MATERIALS AND METHODS) and scoring for retention of the *oriV*-RK2 origin by hybridization against a specific probe. About fifty transconjugants from each construction, from three independent experiments were evaluated. For the construction with *oriV* in the clockwise direction, approximately 50% of the transconjugant colonies analyzed had lost the symbiotic zone, while the remaining 50% had lost only the cointegrated plasmid carrying *oriV*-RK2 (Figure 4). Similar results were obtained for the construction in the counterclockwise orientation (Figure 4). Thus, RER is independent on the direction of movement of the additional replication fork.

**RER is dependent on a functional *recA* allele:** To evaluate the participation of *recA* in RER, the symbiotic plasmids from strains CFNX600, CFNX601 and CFNX602 were mobilized into strains CFN2001 or its isogenic *recA:: $\Omega$ Sp* derivative, CFNX107, as described in MATERIALS AND METHODS. As shown in Table 4, in the *recA:: $\Omega$ Sp* derivatives deletion formation under active replication is completely abolished (compare CFNX603 and CFNX605 vs CFNX606 and CFNX608, respectively). Similar results were obtained with CFNX604 vs CFNX607 (data not shown). The strict dependence on an active *recA* product suggests that RER operates through homologous recombination.

**RER is not a generalized (i. e. SOS-like) response:** A plausible explanation for RER might be that replication intermediates participate in mounting a SOS-like response, which in turn activates recombination of the whole genome. To test this idea, we cointegrated pLPS42b (Table 2) into the pb plasmid of strains CFNX600, CFNX601 and CFNX602, activating replication afterwards by introducing pEYM5 (see MATERIALS AND METHODS and Figure 5, top part). If additional replication provokes an SOS-like response (and hence genome-wide recombination), the cointegrated

plasmid should become as unstable as the symbiotic region. Retention of the cointegrated plasmid in these experiments was evaluated by the frequency of Tcr derivatives, while deletion frequency of the symbiotic region was scored by the relative frequency of sucrose-resistant derivatives. As shown in Table 5, although the pSym of strain CFNX611 loses the symbiotic zone at a high frequency upon replication activation, the cointegrate in pb remained stable. Stability of the cointegrated plasmid was further ascertained by testing 100 derivatives from strain CFNX611 for loss of the Tcr marker: no Tcs isolates were found. Similar results were obtained for strains CFNX612 and CFNX613 (no Tcs isolates among 100 derivatives from each strain). Thus, RER does not induce a generalized recombinogenic effect in *R. etli*, but one restricted to the pSym.

**RER is restricted to the symbiotic zone of the pSym:** In some cases where replication activates recombination, hyperrecombination occurs in a preferred region (HORIUCHI and FUJIMURA 1995; CORRE *et al.* 1997). Moreover, the susceptibility to high recombination is preserved even if the specific region is translocated to a new chromosomal position (CORRE *et al.* 1997). Our data suggest that RER displays some regionality, since high recombination upon supernumerary replication is seen only for the symbiotic region. However, this apparent regionality might be attributed to the paucity of appropriately oriented repeats outside the symbiotic region.

To evaluate if RER displays regionality towards the symbiotic region, integrative plasmids pEYM9 or pEYM10 (harboring a Tcr marker) were used to generate properly oriented repeats at two different locations in the pSym outside the symbiotic region (strains CFNX622 to CFNX625, see MATERIALS AND METHODS and Table 1). These strains also carry the Tn5-GDYN2 element either inside the symbiotic region (strains CFNX622 and CFNX623, Figure 5, bottom part) or outside of it (CFNX624 and CFNX625, not shown), and the GDYN1 element in the middle of the symbiotic region. Upon replication activation, the symbiotic region was lost at a high frequency while the cointegrated plasmid in each strain remained stable (Table 5). The cointegrated plasmid appears to be rather stable in these constructions, since no Tcs isolates were detected upon direct testing of 264 derivatives (CFNX622) or 293 derivatives (CFNX623). Similar results were also obtained with strains CFNX624 and CFNX625, thus ruling out any effect of Tn5-GDYN2 position (data not shown). These results clearly indicate that RER displays regionality, i. e. it is restricted to the symbiotic region.

A further indication of regionality was obtained using plasmid pGM1 (Table 2), a 320 Kb self-transferable plasmid in which the whole symbiotic region of the pSym (bands 82 to 27 of the pSym map, see top part of Figure 6) was translocated into plasmid a of *R. etli*. This plasmid was modified by the introduction of Tn5-GDYN2 at different locations, thus generating strains CFNX614, CFNX616 and CFNX620 (Figure 6). Since these strains lack the GDYN1 element, scoring for

deletion was done by analyzing pSym size on Eckhardt-type gels. Upon introduction of pEYM5 into strains CFNX614 and CFNX616, pGM1 loses the symbiotic region at high frequency through recombination at the *nifHDK* operons, irrespective of the location of the Tn5 -GDYN2 element (Figure 6). Interestingly, no deletions were found for strain CFNX620 upon replication activation (Figure 6). In this strain, Tn5 -GDYN2 (9.6 Kb) is located in *nifHDK* region a, close to a Km/Gm, Sp/Sm cassette (7.2 Kb). Thus, absence of deletions may be attributed to reduced pairing between the recombining repeats, due to these large, heterologous insertions. These results indicate that (i) RER is restricted to the symbiotic region and (ii) all the determinants needed for the observed regionality, besides the additional replication origin, are contained within the symbiotic region.

**Deletions that affect the symbiotic region suppress RER:** To determine if the whole symbiotic region is needed for the regionality characteristic of RER, we took advantage of two deletions of the pSym that affect the symbiotic region (ROMERO *et al.*, 1995). Strains carrying these deletions were modified by incorporating *oriV*-RK2 into the deleted pSym, via a cointegrative plasmid (pEYM12) (Figure 6). Since the deletions analyzed remove one of the repeats (*nifHDK*) that flank the symbiotic region, RER was evaluated by checking the stability of pEYM12 upon activation of the supernumerary origin. Deletions that remove the whole symbiotic region (bands 1-25, Figure 6, strain CFNX630) or a part of it (bands 85-21, Figure 6, strain CFNX627) do not show enhanced instability of pEYM12 upon supernumerary replication (compare with strain CFNX609, Figure 6). This suggests that a determinant necessary for regionality is located between bands 1 to 21.

## DISCUSSION

In this work we show that theta-type replication from a supernumerary origin provoke a one thousand-fold increase in the formation of deletions in the pSym of *R. etli*. This effect displays a strong regionality, invariably removing the whole symbiotic region through homologous recombination. This phenomenon, called RER, was unaffected by the position or relative orientation of the introduced origin *vis a vis* the symbiotic region. RER may also occur in the pSym of other rhizobial species, since induction of replication in the pSym of *R. tropici* generates deletions at levels comparable to those seen in *R. etli* (P. MAVINGUI and R. PALACIOS, personal communication); in this case, the recombining repeats (insertion sequences) are 60 Kb apart (MAVINGUI *et al.* 1998).

A plausible explanation for RER could be that additional replication increases the copy number of a hypothetical locus within the symbiotic region, with adverse effects for pSym maintenance; this might lead to a strong selection for strains with deletions of the symbiotic region. We believe that such

hypothesis is unlikely because: (i) copy number of the symbiotic region can be increased (up to 12 copies) by tandem amplification without adverse effects on pSym maintenance or cell survival (ROMERO *et al.* 1991; FLORES *et al.* 1993), (ii) in a *recA::*  $\Omega$ Sp strain, stable coexistence of the additional origin and the symbiotic region is seen (see Table 4), without curing of the pSym or loss of viability (data not shown) and (iii) stable maintenance of both the symbiotic region and the additional origin is seen, even in a wild-type background, whenever pairing of the recombining repeats is hindered (strain CFNX620, Figure 6). Therefore, we favour the hypothesis that RER is acting by stimulation of regional recombination, caused by additional replication.

One enigmatic aspect of RER that remains to be clarified is related to its magnitude. Under normal replication conditions (1 to 2 copies per cell, RAMÍREZ *et al.* 1997), recombination on the pSym occurs at moderate frequency ( $10^{-4}$  per viable cell); as shown in this work, overreplication starting from an additional origin (6-8 copies per cell, THOMAS and SMITH 1987), provokes a huge increasing in homologous recombination, at frequencies approaching 60% per viable cell. Although the reasons for this increase are still unknown, the occurrence of RER suggests that control of copy number of plasmids belonging to the *repABC* family (RAMÍREZ *et al.* 1997), such as the pSym, must be finely tuned, in order to avoid enhanced instability. In this sense, RER is akin to other situations found in mammalian cells, where overreplication may provoke recombinational instability in specific genomic regions (SCHIMKE *et al.* 1986).

It is interesting that RER leads to the preferential recovery of only one of the possible recombination products. Invariably, the huge increase in deletion frequency characteristic of RER is not accompanied by a similar increase in the frequency of amplifications (ROMERO *et al.* 1991; ROMERO *et al.* 1995), products to be expected to increase in frequency if RER is acting through a reciprocal recombination process (data not shown). Similarly, high levels of excised circles (FLORES *et al.* 1993) were not observed, even though some of them, originating from strains with insertions of Tn5 -GDYN2 in the symbiotic region, would carry an active origin. This finding could be explained assuming that both products (deletions and amplifications) are generated during the initial stages of RER; however, further rounds of recombination among the amplified products would tend to diminish their abundance, concomitantly increasing the frequency of deletions. Alternatively, it could be argued that recombination induced by RER is not reciprocal. In this regard, recombination through non-reciprocal models, such as the half-crossing over model (MAHAN and ROTH 1989; KOBAYASHI 1992) does not generate an amplification with every deletion. Work in progress will try to settle the issue of reciprocity by analyzing the products obtained at early stages after activation of replication.

Previous evaluations of the effect of additional theta-type replication, using artificial constructs on the chromosome of *B. subtilis*, showed only a modest effect (two- to four fold) on recombination. RER

is more comparable to the effects caused by inducing additional rolling circle-type replication in the chromosome of *B. subtilis* (NOIROT *et al.* 1987; PETIT *et al.* 1992). In both cases, however, recombination was diminished by factors that do not affect RER, such as increasing the distance from the additional replication origin (either theta- or rolling-circle- type) to the recombining repeats or by modifying the relative orientation of the origin (NOIROT *et al.* 1987; PETIT *et al.* 1992; MOREL-DEVILLE and EHRLICH 1996). Additionally, none of these examples show the regionality characteristic of RER. These differences could be due to the nature of the system i. e. chromosome *vs* plasmid, the type and size of repeats or both.

The characteristics observed with RER are reminiscent of the hyperrecombination observed along the replication terminus zone of the *E. coli* chromosome (LOUARN *et al.* 1991; HORIUCHI and FUJIMURA 1995; CORRE *et al.* 1997). Similarities between RER and hyperrecombination in the terminus zone include the following: (i) both depend on a theta-type replication process (unidirectional for RER, bidirectional for the terminus zone), (ii) both exhibit a similar increase in *recA*-dependent recombination frequency, (iii) both display clear regionality, extending for at least 280 Kb in the *E. coli* chromosome (HORIUCHI and FUJIMURA 1995) and 120 Kb for RER and, (iv) regionality is maintained after translocating the corresponding region to a new genomic environment (CORRE *et al.* 1997). It has been proposed that structural features of the termination region favour the formation of catenation links, which are later on resolved by RecBCD-mediated recombination; this is the so-called terminal strand invasion model (CORRE *et al.* 1997).

Although the terminal strand invasion model may explain RER, an alternative possibility would be the existence of a site within the symbiotic region that is prone to replication-mediated generation of persistent single- or double-strand breaks. Both lesions would impede the advance of a replication fork; correction of these lesions is frequently achieved by recombination (LOUARN *et al.* 1991; HORIUCHI and FUJIMURA 1995; KUZMINOV 1995; CORRE *et al.* 1997). Under this view, additional replication instigates recombination by provoking a persistent cut on a site (within the symbiotic region) other than the additional *oriV*. The high frequency of recombination associated with RER can be easily explained, since double strand breaks would allow the loading of recombination enzymes, such as RecBCD, thus making the molecule highly susceptible to homologous recombination. Both regionality and the preferential recovery of deletions affecting the symbiotic region are expected under this model, because one of the products of reciprocal excisive recombination (a circle containing the symbiotic region) would be frequently cut. Resolution between these alternatives must wait to the identification and characterization of the site that conditions RER.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to CSABA KONCZ, DONALD HELINSKI and VICTOR MORALES for providing strains and plasmids, to SUSANA BROM, JAIME MARTÍNEZ-SALAZAR, PATRICK MAVINGUI and RAFAEL PALACIOS for critical reviewing of the manuscript, and to LAURA CERVANTES, JAVIER RIVERA and MARÍA DE LA PAZ SALAS for skillful technical assistance. Partial financial support was provided by grants No. 4321-N9406 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México), No. IN203897 from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica and No. 030331 from the Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (both from Universidad Nacional Autónoma de México). E. V.-M. receive scholarships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) and Dirección General de Estudios de Posgrado (Universidad Nacional Autónoma de México).

## LITERATURE CITED

- ALEXEYEV, M. F., I. N. SHOKOLENKO and T. P. CROUGHAN, 1995 Improved antibiotic resistance cassettes and  $\Omega$  elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63-67.
- ASAI, T., D. B. BATES and T. KOGOMA, 1994 DNA replication triggered by double-stranded breaks in *E. coli*: dependence on homologous recombination functions. *Cell* **78**: 1051-1061.
- BIERNE, H., and B. MICHEL, 1994. When replication forks stop. *Mol. Microbiol.* **13**: 17-23.
- BIERNE, H., S. D. EHRLICH and B. MICHEL, 1997 Deletions at stalled replication forks occur by two different pathways. *EMBO J.* **16**: 3332-3340.
- BLATNY, J. M., T. BRAUTASET, H. C. WINTHER-LARSEN, P. KARUNAKARAN and S. VALLA, 1997 Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria. *Plasmid* **38**: 35-51.
- 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.
- BROM, S., A. GARCÍA-DE LOS SANTOS, T. STEPKOWSKI, M. FLORES, G. DÁVILA *et al.*, 1992 Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* **174**: 5183-5189.
- CHÉDIN, F., R. DERYVYN, S. D. EHRLICH and P. NOIROT, 1997 Apparent and real recombination frequencies in multicopy plasmids: the need for a novel approach in frequency determination. *J. Bacteriol.* **179**: 754-761.
- CORRE, J., F. CORNET, J. PATTE and J. M. LOUARN, 1997 Unraveling a region-specific hyper-recombination phenomenon: genetic control and modalities of terminal recombination in *Escherichia coli*. *Genetics* **147**: 979-989.
- DURLAND, R. H., and D. R. HELINSKI, 1990 Replication of the broad-host-range plasmid RK2: direct measurement of intracellular concentrations of the essential TrfA replication proteins and their effect on plasmid copy number. *J. Bacteriol.* **172**: 3849-3858.
- DURLAND, R. H., A. TOUKDARIAN, F. FANG and D. HELINSKI, 1990 Mutations in the *trfA* replication gene of the broad-host-range plasmid RK2 result in elevated plasmid copy numbers. *J. Bacteriol.* **172**: 3859-3867.
- ECKHARDT, T., 1978 A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
- ELIASSON, A., K. NORDSTRÖM and R. BERNANDER 1996 *Escherichia coli* strains in which chromosome replication is controlled by a P1 or F replicon integrated into *oriC*. *Mol. Microbiol.* **20**: 1013-1023.

- FEINBERG, A. P., and B. VOGELSTEIN, 1983 A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- FIGURSKI, D. H., and D. R. HELINSKI, 1979 Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1648-1652.
- FLORES, M., V. GONZÁLEZ, S. BROM, E. MARTÍNEZ, D. PIÑERO *et al.*, 1987 Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* **169**: 5782-5788.
- FLORES, M., S. BROM, T. STEPKOWSKI, M. L. GIRARD, G. DÁVILA *et al.*, 1993 Gene amplification in *Rhizobium*: Identification and *in vivo* cloning of discrete amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**: 4932-4936.
- FREIBERG, C., R. FELLAY, A. BAIROCH, W. BROUGHTON, A. ROSENTHAL *et al.*, 1997 Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394-401.
- GARCÍA-DE LOS SANTOS, A., S. BROM and D. ROMERO 1996 *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. & Biotechnol.*, **12**: 119-125.
- GARCÍA-DE LOS SANTOS, A., and S. BROM, 1997 Characterization of two plasmid-borne *lpsB* loci of *Rhizobium etli* required for lipopolisaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 891-902.
- GIRARD, M. L., M. FLORES, S. BROM, D. ROMERO, R. PALACIOS *et al.*, 1991 Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *J. Bacteriol.* **173**: 2411-2419.
- HANAHAH, D., 1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:407-428.
- HORIUCHI, T., and Y. FUJIMURA, 1995 Recombinational rescue of the stalled DNA replication fork: a model based on analysis of an *Escherichia coli* strain with a chromosome region difficult to replicate. *J. Bacteriol.* **177**: 783-791.
- JONES, J. D. G., and N. GUTTERSON, 1987 An efficient mobilizable cosmid vector, pRK7813, and its use in a rapid method for marker exchange in *Pseudomonas fluorescens* HV37a. *Gene* **61**: 299-306.
- KOBAYASHI, I., 1992 Mechanisms for gene conversion and homologous recombination: the double-strand break repair model and the successive half crossing-over model. *Adv. Biophys.* **28**: 81-133
- KOGOMA, T. 1997 Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 212-238
- KOWALCZYKOWSKI, S. C., D. A. DIXON, A. K. EGGLESTON, S. D. LAUDER and W. R. REHRAUER, 1994 Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**: 401-465.
- KREUZER, K. N., M. SAUNDERS, L. J. WEISLO and H. W. E. KREUZER, 1995 Recombination-dependent DNA replication stimulated by double-strand breaks in bacteriophage T4. *J. Bacteriol.* **177**: 6844-6853.



- KUZMINOV, A., 1995 Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**: 373-384.
- KUZMINOV, A., and F. W. STAHL, 1999 Double-strand end repair via the RecBCD pathway in *Escherichia coli* primes DNA replication. *Genes & Dev.* **13**: 345-356.
- LOUARN, J., J. PATTE and J-M. LOUARN, 1982 Suppression of *Escherichia coli dnaA46* mutations by integration of plasmid R100.1 derivatives: constraints imposed by the replication terminus. *J. Bacteriol.* **151**: 657-667.
- LOUARN, J. M., J. LOUARN, V. FRANÇOIS and J. PATTE, 1991 Analysis and possible role of hyperrecombination in the termination region of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **173**: 5097-5104.
- LOVETT S. T., and V. V. FESCHENKO, 1996 Stabilization of diverged tandem repeats by mismatch repair: evidence for deletion formation via a misaligned replication intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 7120-7124.
- MAHAN, M. J., and J. R. ROTH, 1989 Role of *recBC* function in formation of chromosomal rearrangements: a two-step model for recombination. *Genetics* **121**: 433-443.
- MALKOVA, A., E. L. IVANOV and J. E. HABER, 1996 Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7130-7136.
- MARSH, J. L., M. ERFLE and E. J. WYKES, 1984 The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**: 481-485.
- MARTÍNEZ-SALAZAR, J., D. ROMERO, M. L. GIRARD and G. DÁVILA, 1991 Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. *J. Bacteriol.* **173**: 3035-3040.
- MAVINGUI, P., T. LAEREMANS, M. FLORES, D. ROMERO, E. MARTÍNEZ-ROMERO and R. PALACIOS, 1998 Genes essential for Nod factor production and nodulation are located on a symbiotic amplicon (AMPRtr CFN299pc60) in *Rhizobium tropici*. *J. Bacteriol.* **180**: 2866-2874.
- MEYER, R. J., and D. R. HELINSKI 1977 Unidirectional replication of the P-group plasmid RK2. *Biochim. Biophys. Acta.* **478**: 109-113.
- MILLER, J. H., 1972 *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- MORALES, V. M., A. BACKMAN and M. BAGDASARIAN, 1991 A series of wide-host-range low copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene.* **97**: 39-47.
- MOREL-DEVILLE, F., and S. D. EHRLICH, 1996 Theta-type DNA replication stimulates homologous recombination in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol. Microbiol.* **19**: 587-598.

- 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.
- NOIROT, P., M.-A. PETIT and S. D. EHRLICH, 1987 Plasmid replication stimulates recombination in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **196**: 39-48.
- PANSEGRAU, W., E. LANKA, P. T. BARTH, D. H. FIGURSKI, D. G. GUINEY *et al.*, 1994 Complete nucleotide sequence of the Birmingham IncP $\alpha$  plasmids: compilation and comparative analysis. *J. Mol. Biol.* **239**: 623-663.
- PETIT, M.-A., J. M. MESAS, P. NOIROT, F. MOREL-DEVILLE and S. D. EHRLICH, 1992 Induction of DNA amplification in the *Bacillus subtilis* chromosome. *EMBO J.* **11**: 1317-1326.
- QUINTO, C., H. DE LA VEGA, M. FLORES, L. FERNÁNDEZ, T. BALLADO *et al.*, 1982 Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* **299**: 724-726.
- RAMÍREZ-ROMERO M. A. , P. BUSTOS, L. GIRARD, O. RODRÍGUEZ , M. A. CEVALLOS *et al.*, 1997 Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology* **143**: 2825-31.
- RATTRAY, A. J., and L. S. SYMINGTON, 1993 Stimulation of meiotic recombination in yeast by an *ARS* element. *Genetics* **134**: 175-188.
- RODRÍGUEZ, C., and D. ROMERO, 1998 Multiple recombination events maintain sequence identity among members of the nitrogenase multigene family in *Rhizobium etli*. *Genetics*. **149**: 785-794.
- ROMERO, D., and R. PALACIOS, 1997 Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 91-111.
- ROMERO, D., S. BROM, J. MARTÍNEZ-SALAZAR, M. L. GIRARD, R. PALACIOS *et al.*, 1991 Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* **173**: 2435-2441.
- ROMERO, D., J. MARTÍNEZ-SALAZAR, L. GIRARD, S. BROM, G. DÁVILA *et al.*, 1995 Discrete amplifiable regions (amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J. Bacteriol.* **177**: 973-980.
- ROMERO, D., G. DÁVILA and R. PALACIOS, 1997 The dynamic genome of *Rhizobium*, pp. 153-161 in *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis* edited by F. J. DE BRUIJN, J. R. LUPSKI and G. WEINSTOCK, Chapman & Hall, New York.
- ROSENBERG, C., and T. HUGHET, 1984 The pATC58 plasmid of *Agrobacterium umefaciens* is not essential for tumor induction. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 533-536.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, 1989 *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- SAVESON, C. J., and S. T. LOVETT, 1997 Enhanced deletion formation by aberrant replication in

*Escherichia coli*. Genetics **146**: 457-470.

SCHIMKE, R. T., S. W. SHERWOOD, A. B. HILL and R. N. JOHNSTON, 1986 Overreplication and recombination of DNA in higher eukaryotes: potential consequences and biological implications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**: 2157-2161

SIMON, R., 1984 High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5 -Mob transposon. Mol. Gen. Genet. **196**: 413-420.

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. Biotechnology **1**: 784-791.

STAHL, F. W., 1994 The Holliday junction on its thirtieth anniversary. Genetics **138**: 241-246.

STAHL, F., 1996 Meiotic recombination in yeast: coronation of the double-strand-break repair model. Cell **87**: 965-968.

THOMAS, C. M., and C. A. SMITH, 1987 Incompatibility group P plasmids: genetics, evolution, and use in genetic manipulation. Ann. Rev. Microbiol. **41**: 77-101.

YAMAGUCHI, K., and J. TOMIZAWA, 1980 Establishment of *Escherichia coli* cells with an integrated high copy number plasmid. Mol. Gen. Genet. **178**: 525-533.

## FIGURE LEGENDS

FIGURE 1.- Experimental design. (A) Schematic representation of the GDYN1 element. Arrows show the transcriptional direction of the *sacB* gene and the antibiotic resistance determinants. (B) Organization of Tn5-GDYN2. The IS50 elements are shown as white ovals; the central part shows the position of the *Km<sup>r</sup>* and *oriV-oriT* determinants. (C) Schematic structure of the pSym of *R. etli* CFNX5, showing the location of different insertions of Tn5-GDYN2; these are indicated as a circle (strain CFNX600), inverted triangle (strain CFNX601) or small square (strain CFNX602), labelled as *oriV-RK2*. These strains carry the *nifH* region *c::GDYN1* insertion, useful for determination of deletion frequencies. (D) Plasmid pEYM5, used to achieve replication from the supernumerary origin; the *trfA* gene is under the control of *PTa<sub>clacUV5</sub>* (arrow).

FIGURE 2.- Molecular characterization of recombinant products obtained after supernumerary replication. In each panel, lane 1 is strain CFNX601, while lanes 2-7 show CFNX601 sucrose-resistant derivatives obtained upon introduction of pEYM5. (A) Plasmid profile, stained with ethidium bromide. Location of each plasmid is marked on the left side of the panel. Approximate sizes are: plasmid a (160 Kb), b (150Kb), c (270 Kb), Sym (390 Kb), e (500 Kb) and f (600 Kb). (B) Southern blot hybridization of the plasmid profile, probed with an internal *nifH* fragment. Position of the pSym (390 Kb) and its deleted derivative (270 Kb) is indicated at the left. (C) Southern analysis of total DNA of deleted derivatives. Total DNA of each strain was digested with *Bam*HI, electrophoresed on 1% agarose gels and probed with an internal *nifH* fragment. Position of each *nif* region is shown at the left; region a, 9.0 Kb, region b, 5.6 kb, region *c::GDYN1*, 10.3 Kb. On the right, the position of the join point for the deletions is marked (5'a-3'b, 9.9 Kb). Band sizes are according to ROMERO *et al.* 1991.

FIGURE 3.- RER is not affected by the position of the supernumerary origin. (Upper part), activation of a supernumerary origin (stick and ball symbol, labelled as *oriV-RK2*) located inside the symbiotic region by introduction of pEYM5 leads to enhanced deletion by recombination between *nif* regions a and b; the joint point on the resulting plasmid is indicated. (Lower part), activation of a supernumerary origin located outside the symbiotic region also leads to hyperrecombination between *nif* regions a and b.

FIGURE 4.- RER is not affected by the orientation of advance of the supernumerary replication fork. (Top part) Linear map of the pSym of *R. etli*, showing the *Bam*HI sites (small vertical lines); some bands are numbered for reference. The symbiotic region spans from band 1 to 25. In both diagrams (strains CFNX609 and CFNX610), rectangles labelled a, b and c indicate the *nif* regions. Cointegrates are shown as black squares joined by lines over each map; arrow, orientation of *oriV-*

RK2. RER effect upon introduction of pEYM5 in these strains is shown at the right, evaluated by analysis of plasmid profiles. Note that in these strains, the symbiotic region or just the supernumerary *oriV*-RK2 can be deleted independently.

FIGURE 5.- Schematic representation of the strains analyzed in Table 5. Most symbols are as in Figures 1 and 3, except by cointegrate plasmids, that are depicted as white squares (marked as Tcr) joined by lines over each map. Note that in strain CFNX611 the cointegrate is located on plasmid b, whereas in strains CFNX622 and CFNX623 is located on different positions on the pSym.

FIGURE 6.- Effect of translocations or deletions of the symbiotic region on RER. (Top part) Linear map of the pSym of *R. etli*, showing the *Bam*HI sites (small vertical lines). Rectangles (labelled a, b and c) indicate the *nif* regions; note that strain CFNX630 harbors a single, hybrid *nif* region (5'a-3'b). For strains with translocations (CFNX614, CFNX616 and CFNX620) the diagrams show plasmid pGM1 (solid line, symbiotic region; cross-hatched sector, plasmid a) carrying Tn5 GDYN2 (stick and triangle symbol, labelled as *oriV*-RK2) and *nifHDK*:: Km/Gm, Sp/Sm (stick and circle symbol). Additional constructions either on a wild-type pSym (strain CFNX609) or on pSyms harboring different deletions (strains CFNX630 and CFNX627) are also shown (dotted lines, deleted zones). Cointegrates are shown as black squares joined by lines over each map; arrow, orientation of *oriV*-RK2. RER effect upon introduction of pEYM5 in these strains is shown at the right, evaluated by analysis of plasmid profiles; NA, not applicable.

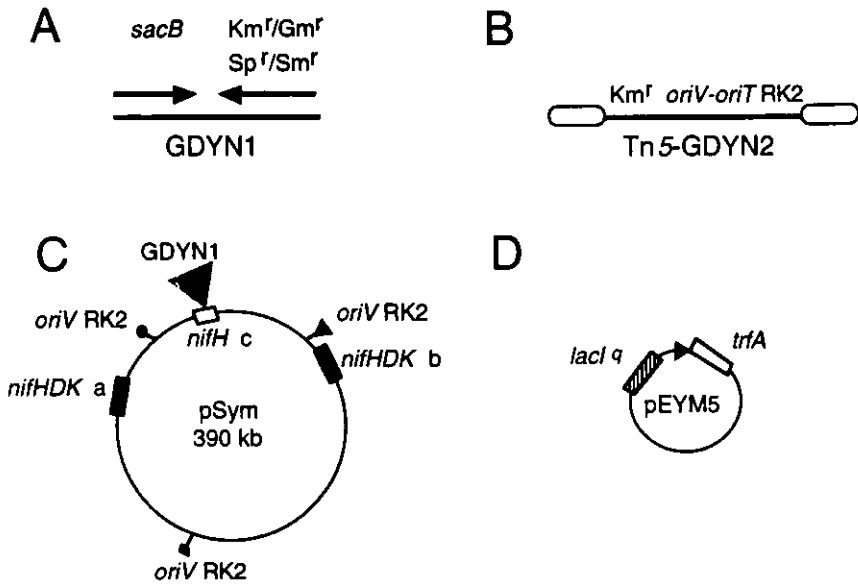


Figure 1. Valencia-Morales&Romero

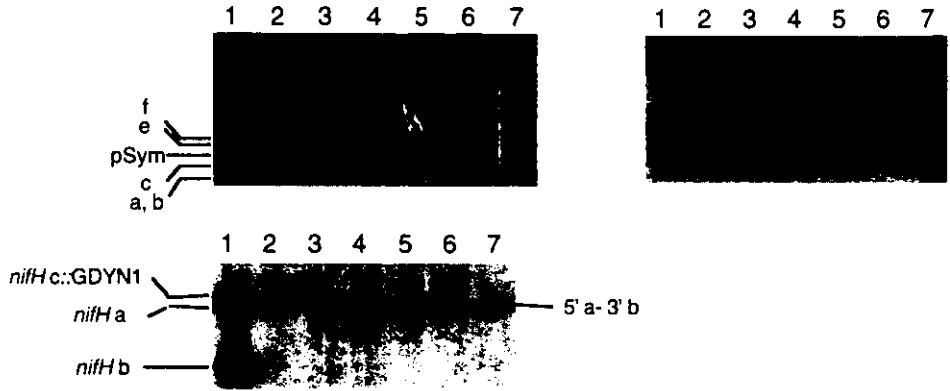


Figure 2. Valencia-Morales&Romero

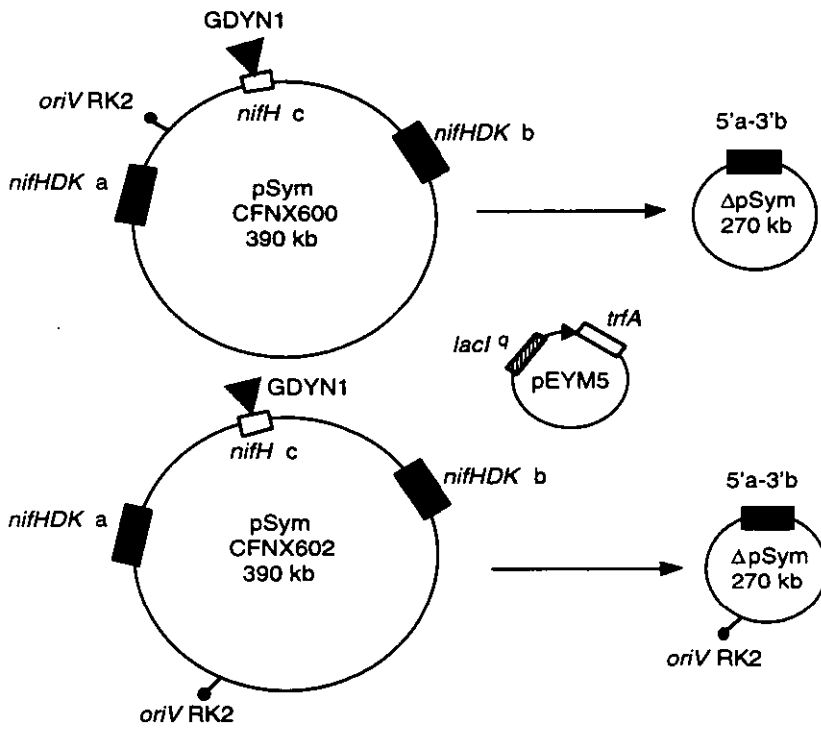
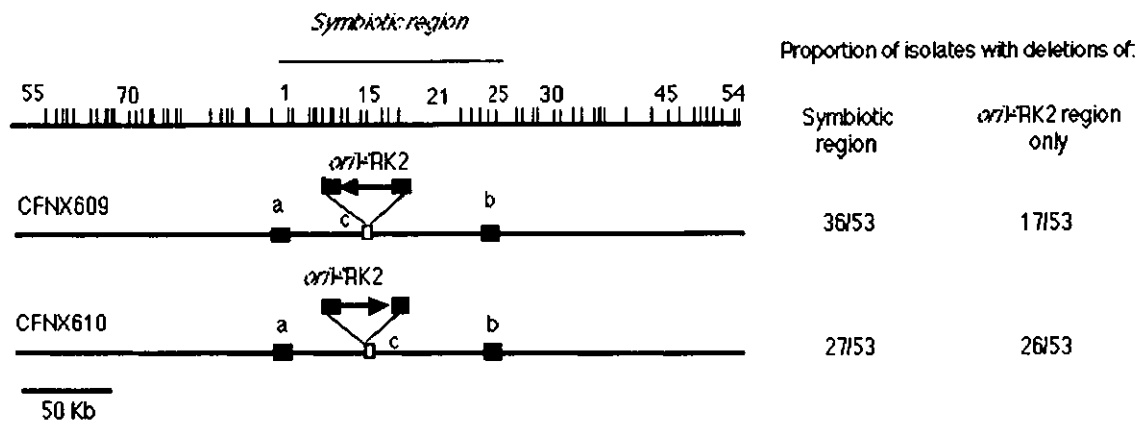


Figure 3. Valencia-Morales&Romero



Figure 4. Valencia-Morales&Romero



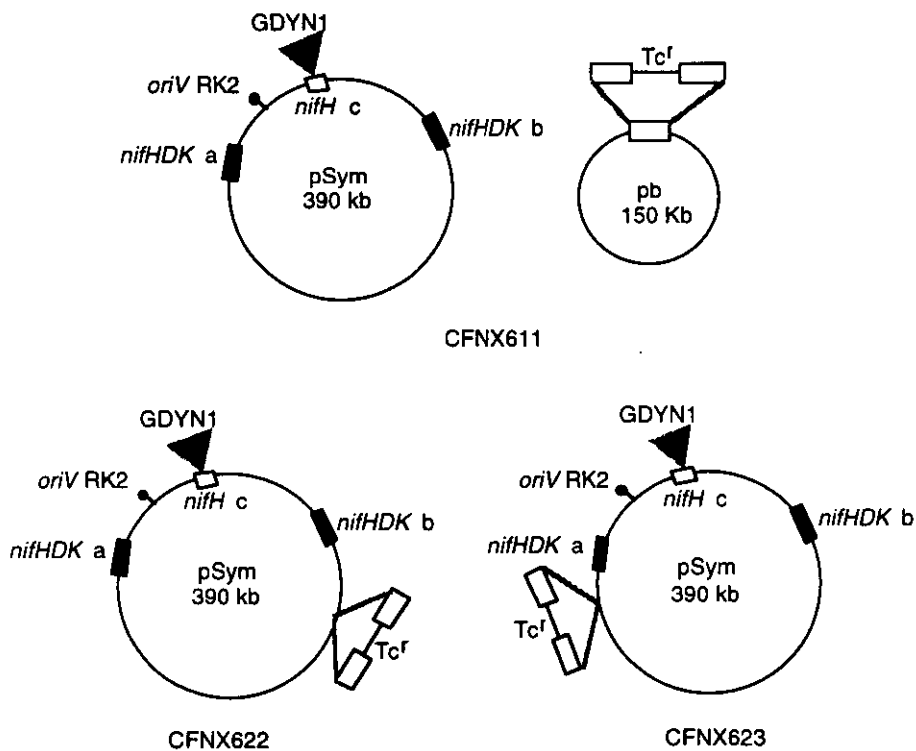
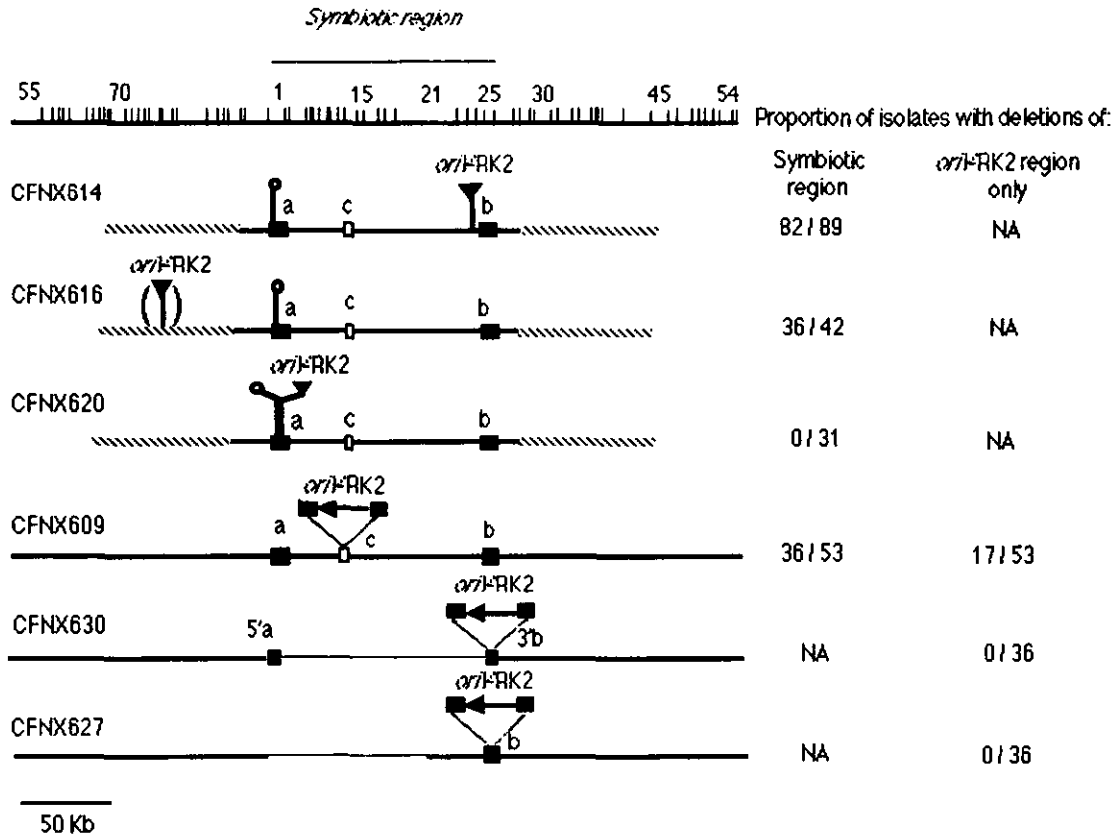


Figure 5. Valencia-Morales&Romero

Figure 6. Valencia-Morales&Romero



**TABLE 1**  
**Bacterial strains used in this study**

Strains	Relevant properties	Source or reference
<i>Rhizobium etli</i>		
CFN42T	Type strain for the species.	QUINTO <i>et al.</i> 1982
CE2	CFN42 Rif <sup>r</sup>	NOEL <i>et al.</i> 1984
CE3	CFN42 Smr	NOEL <i>et al.</i> 1984
CFNX5	CE3/pSym <i>nifHc</i> ::GDYN1	ROMERO <i>et al.</i> 1991
CFNX55	CE3/pDEL270	ROMERO <i>et al.</i> 1991
CFNX88	CE3/pDEL300	ROMERO <i>et al.</i> 1995
CFN2001	CE2 derivative, pa <sup>-</sup> pSym <sup>-</sup>	BROM <i>et al.</i> 1992
CFNX107	CFN2001 derivative, <i>recA</i> :: $\Omega$ Sp	MARTÍNEZ-SALAZAR <i>et al.</i> 1991
CFNX250	CE3 derivative harboring pGM1 instead of the normal pSym	DAVID ROMERO, unpublished
CFNX600	CFNX5/pSym band 12::GDYN2	This work
CFNX601	CFNX5/pSym band 24::GDYN2	This work
CFNX602	CFNX5/pSym band 69::GDYN2	This work
CFNX603	CFN2001/ pSym from CFNX600	This work
CFNX604	CFN2001/pSym from CFNX601	This work
CFNX605	CFN2001/pSym from CFNX602	This work
CFNX606	CFNX107/pSym from CFNX600	This work
CFNX607	CFNX107/pSym from CFNX601	This work
CFNX608	CFNX107 / pSym from CFNX602	This work
CFNX609	CE3 <i>nifH c</i> ::pEYM12, <i>oriV</i> counterclockwise	This work
CFNX610	CE3 <i>nifHc</i> ::pEYM13, <i>oriV</i> clockwise	This work

CFNX611	CFNX600 /pb::pLPS42b	This work
CFNX612	CFNX601 /pb::pLPS42b	This work
CFNX613	CFNX602 /pb::pLPS42b	This work
CFNX614	CFNX250/pGM1 band 24::GDYN2	This work
CFNX616	CFNX250/pGM1, pa region::GDYN2	This work
CFNX620	CFNX250/pGM1 <i>nifHDK</i> a::GDYN2	This work
CFNX622	CFNX600/pSym::pEYM9	This work
CFNX623	CFNX600/pSym::pEYM10	This work
CFNX624	CFNX602/pSym::pEYM9	This work
CFNX625	CFNX602/pSym::pEYM10	This work
CFNX627	CFNX88 /pDEL300, <i>nifHb</i> ::pEYM12	This work
CFNX630	CFNX55/pDEL270::pEYM12	This work

*Escherichia coli*

S17-1	F- <i>pro-82 thi-1 endA1 hsdR17 supE44 recA13</i> , chromosomally integrated RP-4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)	SIMON 1984
HB101	F- <i>leuB6 proA2 recA13 thi-1 ara-14 lacY1 galK2</i> <i>xyl-5 mtl-1 rpsL20 λ<sup>-</sup>supE44 hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i>	BOYER and ROULLAND- DUSOIX 1969
DH5α	F- φ80 <i>dlacZ ΔM15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA- argF) U169</i>	HANAHAN 1983

*Agrobacterium tumefaciens*

GMI9023	<i>A. tumefaciens</i> C58, lacking pTi and the cryptic plasmid	ROSENBERG and HUGHET 1984
---------	---	------------------------------

---

**TABLE 2**  
**Plasmids used in this study**

Plasmid	Relevant properties	Source or reference
pTn5 <i>luxB</i>	Plasmid harboring <i>oriV-oriT</i> from RK2, Tn5 <i>luxB</i> . Cbr, Kmr	CSABA KONCZ unpublished
pSUP5011	pBR325 derivative, Tn5- <i>mob</i> . Cbr, Cmr, Kmr.	SIMON 1984
pSUP202	pBR325 derivative, <i>oriT</i> from RK2. Cbr, Cmr Tcr.	SIMON <i>et al.</i> 1983
pLPS42b	pSUP202 derivative, <i>lpsβ</i> region from plasmid b of <i>R. etli</i> . Cbr, Tcr.	A. GARCÍA-DE LOS SANTOS unpublished
pRK2013	ColE1 derivative containing transfer region of RK2. Kmr.	FIGURSKI and HELINSKI 1979
pCQ23	pBR328 derivative containing the <i>nifHc</i> region from <i>R. etli</i> CFN42. Cbr, Tcr.	QUINTO <i>et al.</i> 1982
pIC20R	pUC8 derivative, extended polylinker, <i>lacZα</i> , Cbr	MARSH <i>et al.</i> 1984
pRK7813	Broad-host range cosmid vector, <i>oriV-oriT</i> from RK2, <i>lacZ α</i> , Tcr.	JONES and GUTTERSON 1987
pFF134-wt	<i>oriV</i> from RK2, <i>trfA</i> gene under the control of <i>pneo</i> . Cbr, Cmr.	FANG <i>et al.</i> 1990
pBSL128	Modified pBluescriptII KS+ plasmid, with direct multiple cloning sites flanking the <i>nptII</i> gene. Cbr, Kmr.	ALEXEYEV <i>et al.</i> 1995
pSV16	<i>oriV</i> from RK2, Cbr, Kmr.	DURLAND <i>et al.</i> 1990
pGM1	A pSym derivative containing 170 Kb (the symbiotic region, bands 82-27), cointegrated into pa. <i>nifHa::</i> Km, Gm/Sp, Sm	DAVID ROMERO, unpublished

pDEL270	A type I deleted pSym derivative retaining from band 25 to 85.	ROMERO <i>et al.</i> 1995
pDEL300	A type III deleted pSym derivative retaining from band 22 to 85.	ROMERO <i>et al.</i> 1995
pMMB206	RSF1010 derivative <i>lacZ</i> $\alpha$ , <i>PtaclacUV5</i> , <i>lacI<sub>q</sub></i> , Cmr.	MORALES <i>et al.</i> 1991
pEYM1	pIC20H derivative carrying the 4.28 Kb <i>oriV-oriT</i> <i>Hind</i> II fragment from pTn5 <i>luxB</i> . Cbr.	This work
pEYM2	<i>oriV-oriT</i> from RK2, Kmr gene from pSV16.	This work
pEYM4	pSUP5011 derivative carrying the 3.9 Kb <i>Bgl</i> III <i>oriV-oriT</i> fragment from pEYM1. Cbr, Cmr, Kmr.	This work
pEYM5	pMMB206 derivative carrying the <i>trfA</i> gene under the control of <i>PtaclacUV5</i> . Cmr.	This work
pEYM9	pSUP202 derivative carrying a 4.5 Kb <i>Eco</i> RI fragment from band 47 of the pSym. Cbr, Tcr.	This work
pEYM10	pSUP202 derivative carrying a 2.8 Kb <i>Eco</i> RI fragment from band 81 of the pSym. Cbr, Tcr.	This work
pEYM11	Intermediate vector, <i>oriV-oriT</i> , Kmr.	This work
pEYM12	pCQ23 derivative containing the whole pEYM11. The <i>oriV</i> replication fork advances counterclockwise. Cbr, Kmr.	This work
pEYM13	Same as pEYM12 but with <i>oriV</i> advancing clockwise. Cbr, Kmr.	This work

---

TABLE 3

## Additional replication in the pSym increases recombination frequency

Strain	Position of GDYN2 in pSym	Plasmid introduced <sup>a</sup>	Deletion frequency of the symbiotic region x 10 <sup>-4</sup> (±SD) <sup>b</sup>
CFNX5	-	-	3 ± (2)
CFNX5	-	pRK7813	3 ± (1)
CFNX5	-	pEYM5	18 ± (26)
CFNX600	Band 12 <sup>c</sup>	-	6 ± (4)
CFNX600	Band 12 <sup>c</sup>	pMMB206	8 ± (4)
CFNX600	Band 12 <sup>c</sup>	pEYM5	6200 ± (2900)
CFNX601	Band 24 <sup>c</sup>	-	1.4 ± (0.32)
CFNX601	Band 24 <sup>c</sup>	pMMB206	10 ± (1)
CFNX601	Band 24 <sup>c</sup>	pEYM5	7600 ± (2300)
CFNX602	Band 69 <sup>d</sup>	-	5 ± (2)
CFNX602	Band 69 <sup>d</sup>	pMMB206	17 ± (15)
CFNX602	Band 69 <sup>d</sup>	pEYM5	7600 ± (2600)

<sup>a</sup> Introduced by mating with the appropriate strains.

<sup>b</sup> Deletion frequency is the number of sucrose-resistant cells divided by the total number of viable cells. Each datum is the mean of at least six independent determinations ± standard deviation. See MATERIALS AND METHODS.

<sup>c</sup> Inside the symbiotic region. See Figure 1B.

<sup>d</sup> Outside the symbiotic region. See Figure 1B.



**TABLE 4**  
**RER is strictly dependent on an active *recA* allele**

Strain	GDYN2 Position in the pSym	<i>recA</i> genotype	Presence of pEYM5 <sup>a</sup>	Deletion frequency of the symbiotic region x 10 <sup>-4</sup> (±SD) <sup>b</sup>
CFNX603	Band 12 <sup>c</sup>	+	-	5.0 ± (2.0)
CFNX603	Band 12 <sup>c</sup>	+	+	7750 ± (1500)
CFNX606	Band 12 <sup>c</sup>	ΩSp	-	< 0.32
CFNX606	Band 12 <sup>c</sup>	ΩSp	+	< 0.90
CFNX605	Band 69 <sup>d</sup>	+	-	3.0 ± (2.0)
CFNX605	Band 69 <sup>d</sup>	+	+	4000 ± (2700)
CFNX608	Band 69 <sup>d</sup>	ΩSp	-	< 0.36
CFNX608	Band 69 <sup>d</sup>	ΩSp	+	< 0.34

<sup>a</sup> Introduced by mating with the appropriate strains.

<sup>b</sup> Deletion frequency is the number of sucrose-resistant cells divided by the total number of viable cells. Each datum is the mean of at least six independent determinations ± standard deviation. Since no deletions were observed for *recA::ΩSp* strains, values given were calculated assuming one deletion per assay. See MATERIALS AND METHODS.

<sup>c</sup> Inside the symbiotic region. See Figure 1B.

<sup>d</sup> Outside the symbiotic region. See Figure 1B.

**TABLE 5**  
**RER displays regionality towards the symbiotic region.**

Strain	Cointegrated plasmid location <sup>a</sup>	Presence of pEYM5	Deletion frequency of the symbiotic region x 10 <sup>-4</sup> (± SD) <sup>b</sup>	Retention frequency of the Tcr marker x 10 <sup>-1</sup> (± SD) <sup>b</sup>
CFNX611	Plasmid b	-	7 ± (2)	8.3 ± (1.9)
CFNX611	Plasmid b	+	5900 ± (3100)	9.2 ± (1.7)
CFNX622	Band 47	-	8 ± (4)	9.3 ± (0.6)
CFNX622	Band 47	+	9300 ± (1500)	8.0 ± (1.4)
CFNX623	Band 81	-	15 ± (8)	7.8 ± (2.5)
CFNX623	Band 81	+	7100 ± (8000)	8.5 ± (2.1)

<sup>a</sup> All cointegrated plasmids were outside of the symbiotic region (see Fig. 1B).

<sup>b</sup> Deletion frequency is the number of cells resistant to the appropriate marker divided by the total number of viable cells. Each datum is the mean of at least six independent determinations ± standard deviation. See MATERIALS AND METHODS.

You're uncomfortable with scientific skepticism. But the reason it developed is that the world is complicated. It's subtle. Everybody's first idea isn't necessarily right....

...So the way you avoid the mistakes, or at least reduce the chance that you'll make one, is to be skeptical. You test the ideas. You check them out by rigorous standards of evidence. I don't think there is such a thing as a received truth. But when you let the different opinions debate, when any skeptic can perform his or her own experiment to check some contention out, then the truth tends to emerge. That's the experience of the whole history of science. It isn't a perfect approach, but it's the only one that seems to work.

**Carl Sagan.**

Contact.

## RESULTADOS ADICIONALES.

Los datos presentados en el artículo, demuestran que la inducción de rondas adicionales de replicación en el plásmido simbiótico de *R. etli* incrementan la frecuencia de formación de rearreglos en este plásmido mediante recombinación homóloga. Algunos aspectos de RER fueron explorados un poco más en detalle.

Las cepas y plásmidos que se emplearon para realizar los experimentos que no se reportaron en el artículo se listan en la Tabla 1. Las construcciones adicionales de cepas de *R. etli* se realizaron mediante cruza biparentales contra *E. coli* S17-1 portando el plásmido adecuado. Las bacterias se seleccionaron en PY con el antibiótico apropiado.

### 1) Complementación de deleciones para rastreo de la región inestabilizadora.

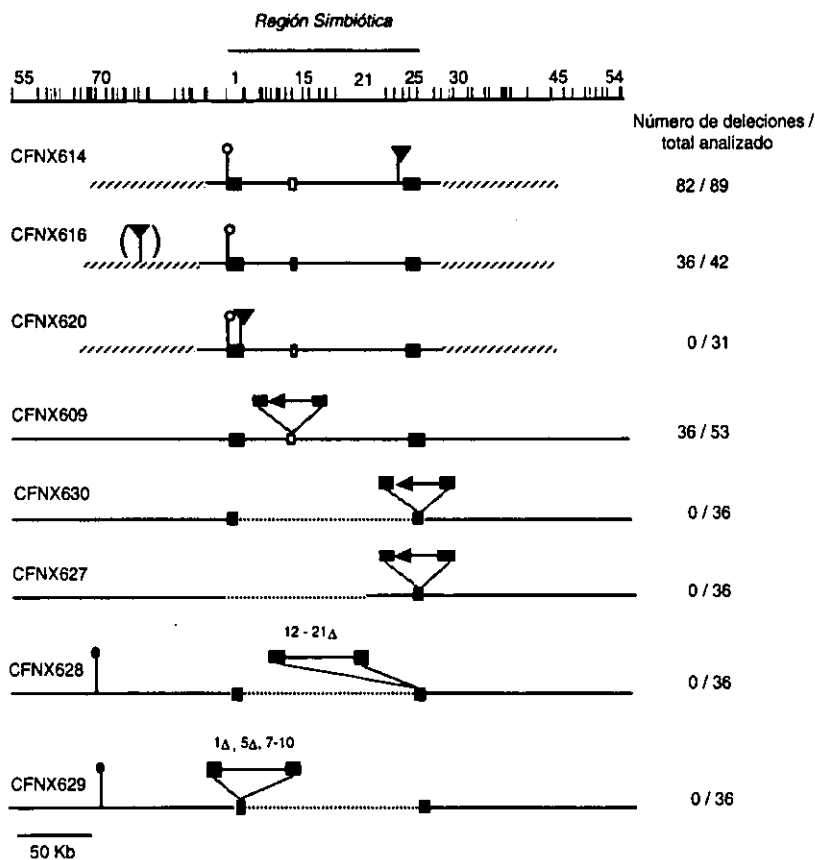
Con la finalidad de ampliar la búsqueda de la zona y/o gen responsable de la inestabilidad bajo condiciones de replicación activa, se construyeron nuevas cepas que portaban diferentes sectores de la región simbiótica. Las cepas son CFNX628 y CFNX629 (Tabla 1). Ambas son derivadas de CFNX602 (ver artículo) que había perdido la región simbiótica.

La cepa CFNX628 fue construida mediante introducción de pEDG5 (Tabla 1) en CFNX602/pSym $\Delta$ . El pEDG5 es un plásmido que resulta de la cointegración de pEDG4 (Tabla 1) y el cósmido 28 del pSym (Girard *et al.* 1991). pEDG5 y pSym $\Delta$  forman un cointegrado mediante recombinación homóloga en sus secuencias *nifH*, con lo que el pSym recupera el sector que abarca las bandas 9 a parte de la 21. Una representación del pSym de CFNX628 se muestra en la Figura 7. La cepa CFNX629 se construyó mediante la introducción del pSM991-25 (Tabla 1) El pSM991-25 porta algunas de las bandas (1 $\Delta$ , 5 $\Delta$ , 7-10, 11 $\Delta$ ) del pSym y se cointegró en el plásmido deletado mediante recombinación homóloga entre las regiones *nifH* de ambos. Una representación del pSym de CFNX629 se muestra en la Figura 7.

TABLA 1. Cepas y plásmidos empleados.

Cepa o Plásmido	Características Importantes	Referencia
CFNX628 <sup>a</sup>	Derivada de CFNX602, pSym $\Delta$ ::pEDG5	Este trabajo
CFNX629 <sup>a</sup>	Derivada de CFNX602, pSym $\Delta$ ::pSM991-25	Este trabajo
pEDG4	Derivado de pSUP202 portando un fragmento <i>EcoRI</i> de Lorist de 1.2 Kb. Cbr, Tcr, Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo
pGD28	Cósmido 28 de la colección del pSym. Contiene las bandas 9 a parte de la 21. Km <sup>r</sup> .	Girard <i>et al.</i> 1991
pEDG5 <sup>b</sup>	Cointegrado entre pEDG4 y pGD28.	Este trabajo
pSM991-25 <sup>b</sup>	Plásmido derivado del pSUP202 conteniendo las bandas 1 $\Delta$ , 5 $\Delta$ , 7-10, 11 $\Delta$ del pSym. Tcr.	Cevallos <i>et al.</i> 1989
pEYM7	pEYM5:: $\Omega$ Ap en el sitio de <i>EcoRI</i> . Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo
pEYM8	pEYM6:: $\Omega$ Ap en el sitio de <i>EcoRI</i> . Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo
pEYM14	pEYM6::att-trp en el sitio de <i>EcoRI</i> . Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo
pEYM15	pEYM5::att-trp en el sitio de <i>EcoRI</i> . Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo
pEYM16	pEYM6::TR1 en el sitio de <i>EcoRI</i> . Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo
pEYM17	pEYM5::TR1 en el sitio de <i>EcoRI</i> . Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo
pEDG1	Derivado del pMos-Blue conteniendo att-trp. Apr.	Este trabajo
pEDG2	Derivado del pMos-Blue conteniendo a TR1. Apr.	Este trabajo
pMos-Blue	Vector de clonación. Polilinker en lacZ, Apr.	Amersham

<sup>a</sup> Las cepas CFNX629 y CFNX629 son derivadas de CFNX602 que aún mantiene el GDYN2 el el pSym $\Delta$ . <sup>b</sup> pEDG5 y pSM991-25 no replican en *R. etli*. Forman un cointegrado con pSym $\Delta$  por recombinación empleando las regiones *nifH*.



**Figura 7. Mapas de las construcciones para rastreo de la zona generadora de RER.** Parte superior, mapa del pSym, las líneas verticales indican los sitios *Bam*HI, debido a la escala, no todos los sitios están representados. En todos los diagramas, los rectángulos corresponden a las regiones *nif*. Para las cepas CFNX614, CFNX616 y CFNX620, la parte del pGMI que corresponde al pSym se indica como una línea sólida, la que corresponde a pa por una línea achurada. El cassette Sp/Sm,Km/Gm se representa por la línea y círculo, mientras que la posición del GDYN2 por la línea y triángulo. Para las demás construcciones, la línea sólida representa al pSym, la línea punteada la región faltante del plásmido. Los cointegrados se muestran sobre los mapas como cuadrados unidos por líneas. Para las cepas con *oriV-RK2* en el cointegrado, la dirección de la replicación es indicada por la punta de la flecha. A la derecha se muestran los resultados obtenidos al introducir pEYM5 y analizar las bacterias por la técnica de Eckhardt. Número de deleciones indica el número de bacterias analizadas que perdieron la región simbiótica (CFNX614, CFNX616, CFNX620) o el cointegrado (CFNX609, CFNX630, CFNX628, CFNX627, CFNX629).

En ambas cepas se activó la replicación mediante la introducción de pEYM5. Como se puede observar en la Figura 7, en ninguna de las colonias analizadas derivadas de CFNX628 o CFNX629 se pierde el plásmido cointegrado. De esta forma, es probable que la zona responsable de inestabilidad se encuentre en alguna de las bandas que no han sido incluidas en nuestras construcciones (Bandas 2-4, 6 y regiones de las bandas 1, 5, 11 y 21) o bien, que se requiera de la región simbiótica íntegra para ver el fenómeno de RER.

## 2) La falta de reciprocidad de RER.

### 2a) Construcciones para evaluación de etapas tempranas de RER.

Los plásmidos pEYM5 (artículo) y pEYM6 (Tabla 1) nos habían permitido observar la formación de rearreglos al inducir replicación. Sin embargo, la fuerza de sus promotores (*pTaclacUV5* y *pTac*) respectivamente, provoca que la síntesis de TrfA sea continua, lo que nos impide evaluar etapas tempranas de RER. El no poder observar etapas tempranas del proceso, dificulta proponer un modelo para RER, así como determinar si en realidad es un evento de recombinación no recíproca.

Con la finalidad de controlar la activación de la replicación y de esta forma evaluar etapas tempranas de RER, se decidió modificar a pEYM5 y pEYM6 mediante la introducción entre sus respectivos promotores y el gen *trfA* del fragmento *EcoRI-EcoRI* de 1.2 Kb del plásmido pKT254 $\Omega$ Ap (Fellay *et al.* 1987). Este fragmento porta el cassette  $\Omega$ -ampicilina del pKT254 $\Omega$ Ap. El cassette está flanqueado por dos terminadores transcripcionales del gene 32 del fago T4. Los terminadores presentan una efectividad mayor del 90% (Prentki y Krisch 1984). Los plásmidos generados son pEYM7 y pEYM8 (Tabla 1).

El sistema fue evaluado en *E. coli* con ayuda del plásmido pEYM2 (ver artículo). El pEYM2 sólo puede ser mantenido en bacterias que produzcan TrfA. Al introducirlo mediante conjugación en las cepas de *R. etli* conteniendo pEYM7 o pEYM8 no se obtuvieron colonias. Esto indicaba que los terminadores estaban siendo efectivos en detener la transcripción de TrfA y que las construcciones tal vez podrían cumplir su propósito. A continuación se realizaron nuevamente las cruces, pero ahora las bacterias se sembraron en medio conteniendo IPTG, con lo que se pretendía inducir la transcripción a voluntad. Sin embargo, no fue posible recuperar bacterias que mantuvieran al pEYM2, a pesar de que se usaron diferentes dosis del inductor (entre 0.1 y 10 mM).

Dado que los terminadores transcripcionales contenidos en el cassette  $\Omega$ -Ap resultaron demasiado fuertes, se decidió probar con otros terminadores con grado de efectividad variable. Se eligieron para este propósito el terminador transcripcional TR1 del fago lambda y el atenuador de triptofano (*att-trp*) de *E. coli*. TR1 es un terminador rho-dependiente con una efectividad de 80% (Rosenberg *et al.* 1978; Lau *et al.* 1982; Lau y Roberts 1985), mientras que el atenuador de triptofano presenta una efectividad que varía entre 60 y 90% dependiendo de las concentraciones de triptofano en el medio de cultivo (Lee *et al.* 1976). Su efectividad como terminador no depende de rho *in vitro*, pero parece ser rho dependiente *in vivo* (Lee y Yanofsky 1977).

Tanto TR1 como el *att-trp* se obtuvieron mediante PCR a partir de DNA del fago lambda y de *E. coli* DH5 $\alpha$ , respectivamente. Los oligos para las reacciones fueron los siguientes:

- 1) UpATN.- 5'TgA **gAA TTC** ggT ATC gAC AAT gAA AgC 3' Oligonucleótido upper para *att-trp*.
- 2) LwATN.- 5' CTA **gAA TTC** Agg gCg TTA TCC AgT AgT g 3' Oligonucleótido lower para *att-trp*.
- 3) UpTN.- 5' ATT **gAA TTC** CgC ATA ACC CTg AAA gAT 3' Oligonucleótido upper para TR1.
- 4) LwTN.- 5' TTT **gAA TTC** TTT AAg CAA CgC ACT CTC g3' Oligonucleótido lower para TR1.

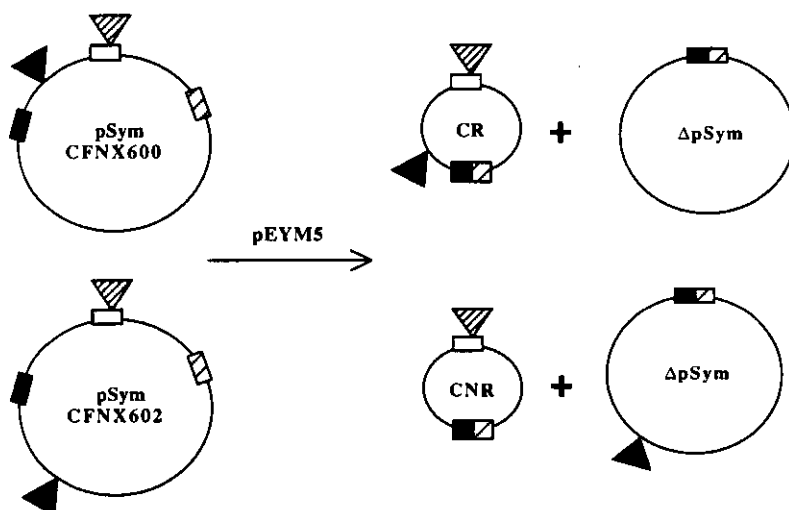
Como se puede observar, los oligos sintetizados poseen sitios de restricción para *EcoRI* (negritas), lo cual facilitaría su clonación en pEYM5 ó 6. Los plásmidos derivados de estas construcciones son pEYM14 a pEYM17 (Tabla 1). La evaluación de estas construcciones se hizo directamente en *R. etli*. Desafortunadamente, al introducir estos plásmidos en las cepas CFNX600 o CFNX602 y analizar el perfil de plásmidos, se observó que las deleciones se forman a igual frecuencia que en las cepas a las que se introducen los plásmidos sin los terminadores. Así pues, no fue posible regular la producción de TrfA mediante esta estrategia.

## **2b) Búsqueda de círculos escindidos de la región simbiótica.**

Otra alternativa para determinar la reciprocidad de RER consiste en buscar los productos esperados de un evento de recombinación homóloga. En nuestro sistema, estos deberían ser: a) las deleciones y b) círculos de la región simbiótica (ver Figura 8). Los círculos escindidos mediante un proceso de recombinación entre los operones *nifHDK* del pSym han sido observados y caracterizados con anterioridad (Flores *et al.* 1993; Romero *et al.* 1991). En las cepas CFNX600 y CFNX601, los



círculos escindidos deberían tener capacidad replicativa dado que llevan el GDYN2. Como en nuestros ensayos había sido imposible recuperar ampliaciones, se decidió hacer uso del GDYN1 presente en CFNX600 y CFNX602 para obtener ampliaciones incrementando la concentración de antibióticos en las que se crece a las bacterias, tal y como había sido reportado por Romero *et al.* (1991). Se empleó una concentración de espectinomycin de 400  $\mu\text{g/ml}$ , con lo que fue posible obtener duplicaciones de la región simbiótica. Una vez que se obtuvieron las cepas con duplicaciones, se introdujo en ellas al pEYM5 y se analizó el perfil de plásmidos mediante Eckhardt y Southern blot de los mismos.



**Figura 8. RER podría generar círculos replicables.** En los diagramas, los rectángulos representan las regiones *nifHDKa* (gris), *nifHDKb* (achurado), *nifHc* (blanco). Los triángulos a *GDYN1* (achurado) y *GDYN2* (negro). Después de activar replicación, en un evento de recombinação recíproca empleando las secuencias *nifHDK a* y *b*, deberían generarse círculos replicables (CR) a partir de CFNX600 además de los pSym deletados. Esto no ocurre en las derivadas de CFNX602 donde el *GDYN2* permanece en el  $\Delta\text{pSym}$  por lo que el círculo escindido no replica (CNR).

El análisis mostró que en las cepas se presentan deleciones, y que es posible observar señales de hibridación en la posición donde deberían migrar los círculos escindidos. Sin embargo, los datos no son concluyentes para favorecer la interpretación de que RER es un fenómeno de recombinação recíproca. La señal se observa, en intensidad similar, también en la cepa CFNX602, donde los círculos escindidos no presentarían capacidad replicativa. Por otra parte, la señal correspondiente a los

círculos desaparece conforme avanzan las resiembras en ambas cepas y en este caso, la señal sí se presenta en un número de resiembras mayor en las derivadas de CFNX600. Estos resultados indican que: i) los círculos escindidos son capaces de replicar, aunque son inestables y ii) que es probable que la mayoría de los círculos observados tanto en CFNX600, como en CFNX602 provengan de eventos de desamplificación espontáneos (Romero *et al.* 1991) y no por el efecto RER.

### **3) La búsqueda de RER en otros plásmidos.**

Ya se había mostrado que RER es específico para la molécula que porta el nuevo origen. A continuación se decidió probar si al insertar el GDYN2 en otro plásmido de *R. etli* y activar replicación se presentaba el efecto RER. Para estos experimentos, se eligió el plásmido a de *R. etli* por dos razones i) este plásmido presenta secuencias repetidas (Girard *et al.* 1991) y ii) ya se habían observado con anterioridad rearrreglos en él (Flores *et al.* 1993). Se probaron 2 diferentes cepas con inserciones del GDYN2 en pa. En ninguna de las cepas se observaron rearrreglos. Estos resultados refuerzan la conclusión de que RER parece ser un efecto regional que se presenta solo en la región simbiótica del pSym o pGM1 (ver artículo).

### **4) Las cepas que no deletan.**

El efecto RER incrementa la recombinación en forma espectacular, llegando a presentarse en más del 60% de las células analizadas. Dado que en aquellas bacterias donde se formó la delección es imposible observar las etapas iniciales del proceso, se decidió analizar algunas de las bacterias que no presentan delección para tratar de encontrar alteraciones que pudieran contribuir a identificar la zona y/o gen responsable de RER.

Se analizaron derivadas de las cepas CFNX600, CFNX602 y CFNX614 que no deletaban. Primero se curó el pEYM5 de ellas mediante resiembras en medio sin antibiótico. Una vez que se eliminó el pEYM5, se reintrodujo este plásmido nuevamente en ellas. Esto tenía la finalidad de comprobar que efectivamente no deletaban la región simbiótica y que esto no se debía a mutaciones en el pEYM5 que se les introdujo la primera vez. Una vez que se comprobó que no deletaban, se procedió a extraer DNA genómico y hacer hibridaciones tipo Southern contra los cósmidos de la región simbiótica. Estos experimentos mostraron que las cepas CFNX600 y CFNX602 no mostraban alteraciones evidentes del patrón de bandas. Sin embargo, al analizar el patrón de la CFNX614, se observó que presenta una delección de las bandas 16 a 21 (datos no mostrados).

Adso —dijo Guillermo—, resolver un misterio no es como deducir a partir de primeros principios. Y tampoco es como recoger un montón de datos particulares para inferir después una ley general. Equivale más bien a encontrarse con uno, dos o tres datos particulares que al parecer no tienen nada en común, y tratar de imaginar si pueden ser otros tantos casos de una ley general que todavía no se conoce, y que quizá nunca ha sido enunciada.....

...si te he mencionado esta cuestión, era para mostrarte que la búsqueda de las leyes explicativas, en los hechos naturales, procede por vías tortuosas. Cuando te enfrentas con unos hechos inexplicables, debes tratar de imaginar una serie de leyes generales, que aún no sabes como se relacionan con los hechos en cuestión. Hasta que de pronto, al descubrir determinada relación, uno de aquellos razonamientos te parece más convincente que otros. Entonces tratas de aplicarlo a todos los casos similares, y de utilizarlo para formular previsiones, y descubres que habías acertado. Pero hasta el final no podrás saber qué predicados debes introducir en tu razonamiento, y que otros debes descartar. Así es como estoy procediendo en el presente caso. Alineo un montón de elementos inconexos e imagino hipótesis. Pero debo imaginar muchas, y gran parte de ellas son tan absurdas que me daría vergüenza decírtelas...

— Pero entonces —me atreví a comentar— aún estáis lejos de la solución...

— Estoy muy cerca, pero no sé de cuál.

— O sea que no tenéis una única respuesta para vuestras preguntas....

— Si la tuviera, Adso, enseñaría Teología en París.

— ¿En París siempre tienen la respuesta verdadera?

— Nunca, pero están muy seguros de sus errores.

— ¿Y vos? — dije con infantil impertinencia— ¿Nunca cometéis errores?.

— A menudo —respondió—. Pero en lugar de concebir uno solo, imagino muchos, para no convertirme en esclavo de ninguno.

**Umberto Eco.**

El Nombre de la Rosa.

## DISCUSION Y PERSPECTIVAS.

La activación de rondas adicionales de replicación en el pSym de *R. etli* conducen a un incremento en la frecuencia de formación de rearrreglos en este plásmido a través de un mecanismo de recombinación homóloga. El hecho que el pSym sea una molécula que puede ser eliminada de *R. etli* sin que esto afecte su viabilidad (Brom *et al.* 1992), la distribución de sus secuencias repetidas (Girard *et al.* 1991) y el que los rearrreglos que se presentan sobre él hayan sido caracterizados con anterioridad (Flores *et al.* 1987; Flores *et al.* 1988; Romero *et al.* 1991; Romero *et al.* 1995) lo hacen un modelo ideal para el estudio de las relaciones entre replicación y recombinación. Los estudios realizados en otros organismos encuentran como dificultad, por una parte, el hecho de tener que crear las secuencias repetidas para poder evaluar el efecto de la replicación sobre la recombinación (Noirot *et al.* 1987; Petit *et al.* 1992; Morel De Ville 1996) y por otra parte, el que introducir un origen de replicación adicional en el cromosoma es deletéreo para la bacteria (Yamaguchi y Tomizawa 1980; Louarn *et al.* 1982; Eliasson *et al.* 1996). Ambos problemas no se presentan con el pSym de *R. etli*.

### 1) El efecto RER: eliminando las explicaciones triviales.

Hay varias hipótesis "simples" que podrían proponerse para explicar el fenómeno RER. Por ejemplo, incompatibilidad entre los plásmidos empleados en el estudio, colisiones entre las horquillas de replicación del pSym y la del GDYN2, choques entre la horquilla de replicación del GDYN2 y la maquinaria de transcripción del pSym, efectos tóxicos de TrfA en una bacteria con el pSym completo, ventaja selectiva de las bacterias con una delección sobre las bacterias que no han deletado el pSym o bien, RER es generado por el proceso de conjugación al realizar las cruza para introducir al pEYM5 o pEYM6. Sin embargo, un análisis más detallado revela que estas explicaciones para RER son insostenibles.

RER no puede ser debido a incompatibilidad dado que, construcciones basadas en el pRK2 son empleadas rutinariamente para complementar mutantes de *R. etli*, sin que en las bacterias complementadas se presenten incrementos en la formación de rearrreglos o curaciones de plásmidos. Estas construcciones llevan también un gen *trfA* activo y esto no disminuye la viabilidad de *R. etli*, por lo que RER no se debe a efectos citotóxicos de TrfA.

En lo que respecta a las explicaciones de RER por choques entre las horquillas de replicación o contra la maquinaria de transcripción, de ser éste el caso, en las derivadas de la cepa CFNX602, donde el origen de replicación se mantiene en el pSym deletado y continúa activo (basados en experimentos de incompatibilidad y en el hecho de la transcripción de TrfA siempre activa a partir de

*pTac*), la molécula debería ser altamente inestable y curarse, algo que no se observa en más de 200 colonias derivadas de CFNX602 analizadas a la fecha.

En cuanto a una posible ventaja selectiva de las bacterias que han deletado la región simbiótica, se realizaron curvas de crecimiento para bacterias deletadas conteniendo a pEYM5 y con el pSym completo. Ambas curvas son similares (datos no mostrados).

Finalmente, acerca de la posibilidad de que el proceso de conjugación sea el responsable de RER, se debe mencionar que en todas las construcciones se introduce el plásmido que activa replicación o los plásmidos emplados como controles, mediante conjugación. Con los plásmidos control, no se observan rearrreglos después de la cruce en las transconjugantes, a pesar de que el plásmido entró como cadena sencilla de DNA. Además, cuando se movilizó al pSym para hacer las diferentes construcciones ya sea a otro *R. etli* o *Agrobacterium tumefaciens*, el pSym no presentó rearrreglos. Esto hace insostenible la hipótesis de que RER sea generada por la conjugación.

RER solo se presenta hasta que el GDYN2 se encuentra en el pSym y se introduce en estas bacterias el pEYM5. De esta forma, la explicación más "simple" para RER es que éste se debe a un incremento en recombinación homóloga generado por replicación en el pSym. Ahora bien ¿Cómo se genera este efecto?. A continuación se proponen tres posibles explicaciones.

## 2) Los posibles causas de RER.

2a) **La región simbiótica contiene un sitio "hotspot" para recombinación.** Existen pequeñas secuencias de DNA capaces de favorecer recombinación en su vecindad. El ejemplo clásico de ellas es la secuencia  $\chi$  de *E. coli* (Myers y Stahl 1994). En otras bacterias, existen secuencias similares a  $\chi$  que también son capaces de activar recombinación en sus alrededores (Biswas *et al.* 1995; El-Karoui *et al.* 1998; Sourice *et al.* 1998). Características similares entre todas estas secuencias es su riqueza en GC, su pequeño tamaño (no más de 11 pb) y el que su efecto de activación de recombinación decrece con la distancia; no promueven recombinación en zonas a más de 10 Kb de ellos. Una de las diferencias importantes entre ellas radica en el hecho de que el incremento de la recombinación podría depender o no de la orientación en la que las enzimas de recombinación se acercaran a  $\chi$  o sus homólogos. Por las características de RER, en caso de existir una secuencia o secuencias semejantes a  $\chi$  en el pSym de *R. etli*, suponemos ésta debería pertenecer a las del grupo que muestran independencia en orientación. Además, sería única por su capacidad de activar

recombinación en secuencias repetidas separadas por más de 100 Kb. Cabe mencionar que estudios previos en Rhizobiaceas no detectaron actividad de corte de un sitio  $\chi$  canónico (Schultz y Smith 1986), por lo que la hipotética secuencia  $\chi$  en caso de existir podría ser muy diferente. Estas características hacen atractiva la idea de localizarla.

Desafortunadamente, los experimentos de rastreo de esta región hipotética complementando deleciones del plásmido simbiótico no mostraron una zona que estimulara recombinación, lo cual podría indicar que o bien esta secuencia no se encuentra en los sectores probados o se encuentra incompleta en nuestras construcciones. Así pues, lo que procede es completar el rastreo empleando las zonas que faltan por probar. Por otra parte, si se pudiera contar con la secuencia completa del pSym, un análisis de la región simbiótica en el que se trataran de localizar zonas ricas en GC sería de gran utilidad para enfocar los esfuerzos. La secuencia  $\chi$  de *Haemophilus influenzae* se localizó empleando esta estrategia (Sourice *et al.* 1998). En este sentido, si el efecto RER se presenta en el pSym de *Rhizobium* sp NGR234 como lo hace en *R. etli* y en *R. tropici* (P. Mavingui y R. Palacios, Com. Pers.) se podría hacer uso de la secuencia de este plásmido (Freiberg *et al.* 1997) para tratar de localizar la zona y/o gen responsable de recombinación bajo replicación activa, comparando las secuencias presentes en la zona deletable contra secuencias reconocidas como activadores de recombinación en otros organismos.

Si los experimentos de complementación y búsqueda de secuencias fallan, se podría hacer uso de sistemas de recombinasas específicos como *lox-cre* (Ayres *et al.* 1993; Kilby *et al.* 1993) en el pSym para deletar zonas a voluntad y hacer un mapeo más preciso, eliminando de esta forma la posibilidad de haber partido la hipotética secuencia recombinogénica.

**2b) La región simbiótica posee una “superestructura” que la hace hiper-recombinogénica al activar replicación.**

En algunos organismos se ha observado que para ciertas regiones, su capacidad recombinogénica puede ser alterada entre otros factores, por la superestructura que presente el DNA (Pato *et al.* 1995; Haber 1998). Cambios en el enrollamiento de la molécula generados por unión de proteínas o por la propia replicación permiten que se presente o no recombinación. La región simbiótica como un todo es capaz de mantener sus propiedades recombinogénicas aún y cuando ahora forme parte de otra molécula (ver artículo). Si esta capacidad en realidad depende de toda la región, eso explica las fallas al tratar de complementar el fenotipo RER usando solo fragmentos de ella. Para

explicar la regionalidad y no reciprocidad de RER bastaría argumentar que sólo la región simbiótica posee la estructura que le permite recombinar y que ésta es independiente del contexto en que se encuentre inmersa. En este sentido, la predicción es que, si se lograran obtener mutantes de *R. etli* para proteínas encargadas de organizar al DNA, por ejemplo, el equivalente de HU o IHF, topoisomerasas, estas mutantes tal vez se verían afectadas en su fenotipo RER.

**2c) La región simbiótica presenta una zona de pausa para la horquilla de replicación.**

Estudios previos (Bierne y Michael 1994; Bierne *et al.* 1997; Kuzminov 1995) proponen que el detener el avance de la horquilla de replicación puede causar su colapso y activar recombinación para ser rescatada. Además, los estudios realizados en la zona de término de replicación del cromosoma de *E. coli* demuestran que ésta es una zona muy activa de recombinación, aún y cuando en ella la presencia de secuencias  $\chi$  es casi nula (Louarn *et al.* 1991; Horiuchi *et al.* 1994; Horiuchi y Fujimura 1995; Corre *et al.* 1997). Si el pSym presentara una zona donde la horquilla de replicación fuera detenida, esto podría desencadenar recombinación que utilizara las secuencias repetidas de mayor tamaño para resolver el problema (operones *nifHDK*). La presencia de una posible zona de término críptica en el pSym podría explicar también la falta de reciprocidad en los productos obtenidos. La generación de una amplificación de la zona simbiótica sólo agravaría el problema de la horquilla de replicación, habría más zonas donde ésta pudiera ser detenida. Bajo esta perspectiva, el plásmido más estable sería aquel donde esta "zona de conflicto" se perdiera. Además, en caso de que se escindieran círculos de la región simbiótica, para aquellos círculos portando el GDYN2, el problema persistiría, la horquilla continuaría siendo detenida y esto provocaría que los círculos fuesen muy inestables y se perdieran rápidamente.

En los cromosomas de *E. coli* y *B. subtilis*, así como para algunos plásmidos, la horquilla de replicación se detiene gracias a una interacción entre la proteína Tus (en *E. coli*) o RTP (en *B. subtilis*) con una secuencia específica en la zona de término. Tus o RTP son antihelicidas orientación dependiente (Sahoo *et al.* 1995; Manna *et al.* 1996). El análisis de la secuencia disponible de la región simbiótica revela que hay un sitio similar al sitio de reconocimiento de Tus en la cercanía del gen *nifA* (Banda 21 del mapa del pSym). Si existe en *R. etli* una proteína capaz de unirse a esta zona y detener la replicación, es una alternativa que tal vez valga la pena explorar. Por otra parte, la banda 21 es una de las zonas que no han sido cubiertas en su totalidad en el rastreo de la región responsable de la inestabilidad generada por replicación y además, es una de las bandas faltantes en las derivadas de CFNX614 que no deletan la región simbiótica.

Para explicar RER podría omitirse la necesidad de una proteína específica encargada de detener la replicación. Lesiones en el DNA que pudieran ser originadas por la propia actividad replicativa serían excelentes candidatos para reclutar la maquinaria de recombinación.

### 3) Acerca de la aparente falta reciprocidad de RER.

Eventos de recombinación no recíprocos inducidos por replicación se han observado en *B. subtilis* (Noirot *et al.* 1987). Los experimentos realizados con *R. etli* para evaluar si RER es un fenómeno de recombinación recíproca no aportaron datos concluyentes. De tal forma, la propuesta es modificar el sistema para responder este punto. El experimento sería similar a los realizados por Yamamoto *et al.* (1988) y Mahan y Roth (1989). En esencia, la idea es emplear secuencias repetidas no en orientación directa, sino en orientación inversa como sustratos de recombinación. De esta forma, un evento de recombinación no recíproco generaría un pSym abierto, lo que seguramente provocaría su degradación y que las transconjugantes aparecieran como “curadas” del pSym. Dado que hasta el momento no conocemos si RER requiere que las secuencias repetidas sobre el pSym se encuentren a 120 Kb de distancia, lo que se necesitaría hacer es invertir una de las dos reiteraciones *nifHDK*. Cabe mencionar que, la tercera copia incompleta del operón *nifH*, que se encuentra precisamente en orientación inversa respecto a los operones completos, no es empleada frecuentemente para recombinar (Rodríguez y Romero 1998). Sin embargo, recientemente, parece haberse generado una inversión en una de las derivadas de CFNX600 en las que se introdujo pEYM5 (datos no mostrados). Si se confirma esta observación, el análisis de esta cepa podría arrojar datos importantes acerca de la reciprocidad y regionalidad de RER ya que, al invertirse toda la zona entre *nifHDKa* y *nifHc*, seguramente la estructura de toda la región se altera. ¿Es esta cepa capaz de deletar la región simbiótica al activar nuevamente replicación?

### 4) RER en la “vida normal” de los *Rhizobia*.

Los requisitos necesarios para RER básicamente son rondas adicionales de replicación y un sistema de recombinación activo. Es obvio que los *Rhizobia* poseen un sistema de recombinación activo (Romero *et al.* 1991; Romero *et al.* 1995; Mavingui *et al.* 1998) pero, ¿cómo podrían activarse rondas adicionales de replicación en sus plásmidos? y de ser posible, ¿esto tendría consecuencias?

Al menos dos mecanismos diferentes pueden generar rondas adicionales de replicación en los plásmidos. El primero, pérdida de control de número de copias. El segundo, mediante cointegración con plásmidos de diferente número de copias. La cointegración de replicones es un proceso particularmente común en los *Rhizobia* (S. Brom; R. Palacios, Com. Personal). Acerca de las



consecuencias de estas interacciones, se tiene por ejemplo, que en *R. etli* la movilización del pSym depende de la presencia del plásmido *a* (que es autotransferible) y también de la presencia de un gen *recA* activo. Las mutaciones en *recA* afectan la capacidad del pSym de movilizarse, pero no la del propio *pa* (S. Brom, comunicación personal). Entre las transconjugantes obtenidas, muchas presentan cointegrados entre *pa*-pSym. Sin embargo, tal vez las transconjugantes más interesantes son aquellas que aparentemente poseen un pSym "normal", pero que al ser analizadas muestran que este nuevo pSym es un híbrido de zonas de *pa* y pSym (S. Brom Com Personal). Estos rearrreglos ¿son ocasionados por el proceso de transferencia o porque *pa* tiene un mayor número de copias que el pSym y está activando recombinación en los cointegrados? Los experimentos realizados por Christensen y Schubert (1983) parecen favorecer la hipótesis de que los rearrreglos son generados por la cointegración y no por la transferencia. Estos autores hallaron que, después de que *R. trifolii* recibía un pSym de *R. leguminosarum*, este plásmido se cointegraba con el pSym de *R. trifolii* a frecuencias altas y que, de esta interacción, surgían pSyms híbridos que alteraban las propiedades simbióticas de *R. trifolii*. En *R. etli*, el pGM1 (ver artículo) podría haber sido generado mediante un mecanismo parecido. Así pues, un fenómeno similar a RER podría ser responsable de los rearrreglos en los plásmidos cointegrados y de esta manera contribuir a la dinámica del genoma de los *Rhizobia*.

##### 5) La utilidad del ensayo RER para otros propósitos.

Hasta el momento, el único gen involucrado directamente en recombinación en *R. etli* que se ha caracterizado es *recA* (Martínez-Salazar *et al.* 1991). Una de las dificultades que se ha presentado para identificar otros genes es la falta de un sistema experimental que permita evaluar mutaciones que afecten recombinación de manera sencilla. Dada la magnitud del efecto RER y el que sus consecuencias no afectan la viabilidad de *R. etli*, este sistema tal vez permita encontrar genes involucrados en recombinación. La estrategia sería una mutagénesis extensiva de *R. etli*, seguida por activación de replicación sobre el pSym. Las candidatas interesantes serían bacterias afectadas en su capacidad de deletar la región simbiótica.

El GDYN2 y los plásmidos pEYM5 y pEYM6 por sí solos podrían ser muy útiles para mutagénesis y recuperación de la zona mutada. Al contar el GDYN2 con un origen de replicación, lo único que se tendría que hacer para recuperar la mutación sería extraer el DNA, digerir con *Bam*HI, religar y transformar bacterias que contengan pEYM5 o pEYM6.

Finalmente, plásmidos como el pEYM2 podrían ser la base para nuevos vectores "duales" i. e. suicidas o replicativos dependiendo de si se les combina o no con pEYM5 o pEYM6.

Somos una civilización científica. Eso significa una civilización en la que el saber y su integridad son factores cruciales. Ciencia no es más que una palabra latina que significa conocimiento....Nuestro destino es el conocimiento.

**J. Bronowski.**

El ascenso del hombre.

## CONCLUSIONES.

- 1) La inducción de rondas adicionales de replicación tipo  $\theta$  en el pSym de *R. etli* generan un incremento de tres ordenes de magnitud en la frecuencia de recombinación del plásmido. Denominamos a este efecto RER (Recombination Enhancement by Replication).
- 2) La recombinación depende de la presencia de un gen *recA* activo, i. e. RER es un fenómeno de recombinación homóloga.
- 3) La alteración de las secuencias repetidas (reducción de homología) empleadas por RER para recombinar anula el efecto RER.
- 4) RER es independiente de la posición del nuevo origen de replicación así como de la dirección de avance de la horquilla de replicación.
- 5) Otras zonas del genoma analizadas aparentemente no presentan incremento en la frecuencia de recombinación.
- 6) RER presenta regionalidad, se restringe a la zona simbiótica. Cointegrados en otras regiones del pSym no son inestabilizados.
- 7) La regionalidad de RER se mantiene independientemente del contexto en que se encuentre la región simbiótica, por lo tanto, los elementos indispensables para generar RER deben estar contenidos en ella.
- 8) RER podría ser un evento de recombinación homóloga no recíproco.
- 9) RER presenta semejanzas con el fenómeno de hiper-recombinación presente en la zona de término de replicación del cromosoma de *E. coli*.

## REFERENCIAS.

- Al-Deib, A. A., A. A. Mahdi, y R. Lloyd, 1996 Modulation of recombination and DNA repair by the RecG and PriA helicases of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6782-6789.
- Asai, T., S. Sommer, A. Bailone y T. Kogoma, 1993 Homologous recombination-dependent initiation of DNA replication from DNA damage-inducible origins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**: 3287-3295.
- Asai, T. y T. Kogoma, 1994 Roles of *ruvA*, *ruvC* and *recG* gene functions in normal and DNA damage-inducible replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Genetics* **137**: 895-902.
- Asai, T., D. B. Bates y T. Kogoma, 1994 DNA replication triggered by double-stranded breaks in *E. coli*: dependence on homologous recombination functions. *Cell* **78**: 1051-1061.
- Asai, T., M. Imai y T. Kogoma, 1994 DNA damage-inducible replication of the *Escherichia coli* chromosome is initiated at separable sites within the minimal *oriC*. *J. Mol. Biol.* **253**: 1459-1469.
- Ayres, E. K., V. J. Thomson, G. Merino, D. Balderes y D. H. Figurski, 1993 Precise deletions in large bacterial genomes by vector-mediated excision (VEX). *J. Mol. Biol.* **230**: 174-185.
- Bi, X y L. F. Liu, 1994 *recA*-independent and *recA*-dependent intramolecular plasmid recombination: differential homology requirement and distance effect. *J. Mol. Biol.* **235**: 414-423.
- Bierne, H. y B. Michel, 1994. When replication forks stop. *Mol. Microbiol.* **13**: 17-23.
- Bierne, H., S. D. Ehrlich y B. Michel, 1997 Deletions at stalled replication forks occur by two different pathways. *EMBO J.* **16**: 3332-3340.
- Biswas, I., E. Maguin, S. D. Ehrlich y A. Gruss, 1995 A 7-base-pair sequence protects DNA from exonucleolytic degradation in *Lactococcus lactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 2244-2248.
- Blattner, F. R., G. Plunkett 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland *et al.*, 1997 The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Brom, S., A. García-de los Santos, T. Stepkowski, M. Flores, G. Dávila *et al.*, 1992 Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* **174**: 5183-5189.

- Camerini-Otero D. R. y P. Hsieh, 1995 Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Genetics.* **29**: 509-552.
- Cao, Y. y T. Kogoma, 1993 Requirement for the polymerization and 5' -> 3' exonuclease activities of DNA polymerase I in initiation of DNA replication at *oriK* sites in the absence of RecA in *Escherichia coli mha* mutants. *J. Bacteriol.* **175**: 7254-7259.
- Cao, Y. y T. Kogoma, 1995 The mechanism of *recA polA* lethality: supression of RecA-independent recombination repair activated by the *lexA* (Def) mutation in *Escherichia coli*. *Genetics.* **139**: 1483-1494.
- Cevallos, M. A., Vázquez, M., Dávalos, A., Espín, G., Sepúlveda, J. y C. Quinto, 1989 Characterization of *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host-range specificity. *Mol. Microbiol.* **3**: 879-889.
- Corre, J., F. Cornet, J. Patte y J. M. Louarn, 1997 Unraveling a region-specific hyper-recombination phenomenon: genetic control and modalities of terminal recombination in *Escherichia coli*. *Genetics* **147**: 979-989.
- Christensen A. H y K. R. Schubert, 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**: 592-599.
- Clark, A. J. y S. J. Sandler, 1994 Homologous genetic recombination: The pieces begin to fall into place. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 125-142.
- deMassy, B., O. Fayet y T. Kogoma, 1984 Multiple origin usage for DNA replication in *sdrA* (*mh*) mutants of *Escherichia coli* K12: initiation in the absence of *oriC*. *J. Mol. Biol.* **178**: 227-236.
- Eliasson, A., K. Nordström y R. Bernander, 1996 *Escherichia coli* strains in which chromosome replication is controlled by a P1 or F replicon integrated into *oriC*. *Mol. Microbiol.* **20**: 1013-1023.
- El-Karoui, M., S. D. Ehrlich, y A. Gruss, 1998 Identification of the lactococcal exonuclease/recombinase and its modulation by the putative Chi sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 626-631.
- Fellay, R. J. Frey y H. Krisch, 1987 Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of

DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene*. **52**: 147-154.

Flores, M., V. González, S. Brom, E. Martínez, D. Piñero *et al.*, 1987 Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* **169**: 5782-5788.

Flores, M., S. Brom, T. Stepkowski, M. L. Girard, G. Dávila *et al.*, 1993 Gene amplification in *Rhizobium*: Identification and *in vivo* cloning of discrete amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 4932-4936.

Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal *et al.*, 1997 Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394- 401

Galitsky, T. y J. R. Roth, 1997 Pathways for homologous recombination between chromosomal direct repeats in *Salmonella typhimurium*. *Genetics* **146**: 751-767.

García-de los Santos, A., S. Brom y D. Romero, 1996 *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* **12**: 119-125..

Girard, M. L., M. Flores, S. Brom, D. Romero, R. Palacios *et al.*, 1991 Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *J. Bacteriol.* **173**: 2411-2419.

Gross, J. D., J. Grunstein y E. M. Witkin, 1971 Inviability of *recA*- derivatives of the DNA polymerase mutant of De Lucia and Cairns. *J. Mol. Biol.* **58**: 631-634.

Haber, J. E. 1998 Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 561-599.

Haber, J. E. 1999 DNA recombination: the replication connection. *Trends in Biol Sci.* **24**: 271-275.

Hong, X. y T. Kogoma, 1993 Absence of a direct role for RNaseH in initiation of DNA replication at the *oriC* site on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **175**: 6731-6734.

Hong, X., G. W. Cadwell y T. Kogoma, 1995 *Escherichia coli* RecG and RecA proteins in R-loop formation. *EMBO J.* **14**: 2385-2392.

Horiuchi, T., Y. Fujimura, H. Nishitani, T. Kobayashi y M. Hidaka, 1994 The DNA replication fork blocked at the *Ter* site may be an entrance for the RecBCD enzyme into duplex DNA. *J. Bacteriol.*

176: 4656-4663.

Horiuchi, T. y Y. Fujimura, 1995 Recombinational rescue of the stalled DNA replication fork: a model based on analysis of an *Escherichia coli* strain with a chromosome region difficult to replicate. *J. Bacteriol.* **177**: 783-791.

Kilby, N. J., M. R. Snaith y J. A. H. Murray, 1993 Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends in Genet.* **9**: 413-421.

Kogoma, T. y K. G. Lark, 1975 Characterization of the replication of *Escherichia coli* DNA in the absence of protein synthesis: stable DNA replication. *J. Mol. Biol.* **94**: 243-256.

Kogoma T., T. A. Torrey y M. J. Connaughton, 1979 Induction of UV-resistant DNA replication in *Escherichia coli*: induced stable DNA replication as an SOS function. *Mol. Gen. Genet.* **176**: 1-9.

Kogoma T., K. G. Bernard y X. Hong, 1994 RecA, Tus protein and constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli rnhA* mutants. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 557-562.

Kogoma, T. 1996 Recombination by replication. *Cell* **85**: 625-627.

Kogoma, T., G. W. Cadwell, K. G. Barnard y T. Asai, 1996 The DNA replication priming protein, PriA is required for homologous recombination and double-strand break repair. *J. Bacteriol.* **178**: 1258-1264.

Kogoma, T. 1997 Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 212-238

Kogoma, T. y R. R. Maldonado, 1997 DNA polymerase I in constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 2109-2115.

Kowalczykowski, S. C., D. A. Dixon, A. K. Eggleston, S. D. Lauder y W. R. Rehauer, 1994 Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**: 401-465.

Kreuzer, K. N., M. Saunders, L. J. Weislo y H. W. E. Kreuzer, 1995 Recombination- dependent DNA replication stimulated by double-strand breaks in bacteriophage T4. *J. Bacteriol.* **177**: 6844-6853.

Kuzminov, A. 1995 Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**:

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

373-384.

Kuzminov, A. y F. W. Stahl, 1999 Double-strand end repair via the RecBCD pathway in *Escherichia coli* primes DNA replication. *Genes Dev.* **13**: 345-356.

Lark, C. A., J. Riazzi y K. G. Lark, 1981 *dnaT*, dominant conditional-lethal mutation affecting DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **136**: 1008-1017.

Lau, L. y J. W. Roberts, 1985  $\rho$ -dependent transcription termination at  $\lambda_{t_{R1}}$  requires upstream sequences. *J. Biol. Chem.* **260**: 574-584.

Lau, L., J. W. Roberts y R. Wu, 1982 Transcription terminates at  $\lambda_{t_{R1}}$  in three clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 6171-6175.

Lee, F., C. L. Squires, C. Squires y C. Yanofsky, 1976. Termination of transcription *in vitro* in the *Escherichia coli* tryptophan operon leader region. *J. Mol. Biol.* **103**: 383-393.

Lee, F. y C. Yanofsky, 1977 Transcription termination at the *trp* operon attenuators of *Escherichia coli* and *Samonella typhimurium*: RNA secondary structure and regulation of termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 4365-4369.

Lindahl, G. y T. Lindahl, 1984. Initiation of DNA replication in *Escherichia coli*: RNase H-defective mutants do not require the *dnaA* function. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 283-289.

Lloyd, R. G. y C. Buckman, 1991 Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J. Bacteriol.* **173**: 1004-1011.

Long, S. R. 1989 *Rhizobium* genetics. *Ann. Rev. Genet.* **23**: 483-506.

Louarn, J., J. Patte y J-M. Louarn, 1982 Suppression of *Escherichia coli dnaA46* mutations by integration of plasmid R100.1 derivatives: constraints imposed by the replication terminus. *J. Bacteriol.* **151**: 657-667.

Louarn, J. M., J. Louarn, V. François y J. Patte, 1991 Analysis and posible role of hyperrecombination in the termination region of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **173**: 5097-5104.



- Lovett, S. T., T. J. Gluckman, P. J. Simon, V. A. Sutter Jr. y P. T. Drapkin, 1994 Recombination between repeats in *Escherichia coli* by a *recA*-independent, proximity-sensitive mechanism. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 294-300.
- Magee, T. R., T. Asai, D. Malka y T. Kogoma, 1992 DNA damage-inducible origins of DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**: 4219-4225.
- Magee, T. R. y T. Kogoma, 1990 Requirement of RecBC enzyme and an elevated level of activated RecA for induced stable DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 1834-1839.
- Mahan, M. J. y J. R. Roth, 1989 Role of *recBC* function in formation of chromosomal rearrangements: a two-step model for recombination. *Genetics* **121**: 433-443.
- Malkova, A., E. L. Ivanov y J. E. Haber, 1996 Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 7130-7136.
- Manna A. C., K. S. Pai, D. E. Bussiere, C. Davies, S. W. White y D. Bastia 1996 Helicase-contrahelicase interaction and the mechanism of termination of DNA replication. *Cell* **87**: 881-891.
- Martínez-Romero, E., D. Romero y R. Palacios, 1990 The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**: 59-93.
- Martínez-Salazar, J., D. Romero, M. L. Girard y G. Dávila, 1991 Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. *J. Bacteriol.* **173**: 3035-3040.
- Masai, H. y K. Arai 1988 Operon structure of *dnaT* and *dnaC* genes essential for normal and stable DNA replication *in vitro* is dependent on primosome protein *i* encoded by *dnaT*. *J. Biol. Chem.* **263**: 15016- 15023.
- Masai, H., T. Asai, Y. Kubota, K. Arai y T. Kogoma, 1994 *Escherichia coli* PriA protein is essential for inducible and constitutive stable DNA replication. *EMBO J.* **13**: 5338-5346.
- Mavingui, P., T. Laeremans, M. Flores, D. Romero, E. Martínez-Romero y R. Palacios, 1998 Genes essential for Nod factor production and nodulation are located on a symbiotic amplicon (AMP*Rtr* CFN299pc60) in *Rhizobium tropici*. *J. Bacteriol.* **180**: 2866-2874.

- McGlynn, P., A. A. Al-Deib, J. Liu, K. J. Mariani y R. G. Lloyd, 1997 The DNA replication protein PriA and the recombination protein RecG bind D-loops. *J. Mol. Biol.* **270**: 212-221.
- Mohanty, B. K., Sahoo, T. y D. Bastia, 1996 The relationship between sequence specific termination of DNA replication and transcription. *EMBO J.* **15**: 2530-2539.
- Monk, M. y J. Kinross, 1972 Conditional lethality of *recA* and *recB* derivatives of a strain of *Escherichia coli* K-12 with a temperature sensitive deoxyribonucleic acid polymerase I. *J. Bacteriol.* **109**: 971-978.
- Morel-Deville, F. y S. D. Ehrlich, 1996 Theta-type DNA replication stimulates homologous recombination in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol. Microbiol.* **19**: 587-598.
- Mosig, G. 1998 Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 379-413.
- Myers, R. S y F. W. Stahl, 1994  $\chi$  and the RecBCD enzyme of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **28**: 29-70.
- Noirot, P., M.-A. Petit y S. D. Ehrlich, 1987 Plasmid replication stimulates recombination in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **196**: 39-48.
- Ogawa, T. G. G. Pickett, T. Kogoma y A. Kornberg, 1984 RNaseH confers specificity in the *dnaA*-dependent initiation of replication at the unique origin of the *Escherichia coli* chromosome in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 1040-1044.
- Pato, M. L., M. Karlok, C. Wall y N. P. Higgins 1995 Characterization of Mu prophage lacking the central strong gyrase binding site: localization of the block in replication. *J. Bacteriol.* **177**: 5937-42.
- Petit, M.-A., J. M. Mesas, P. Noirot, F. Morel-Deville y S. D. Ehrlich, 1992 Induction of DNA amplification in the *Bacillus subtilis* chromosome. *EMBO J.* **11**: 1317-1326.
- Prentki, P. y H. M. Krisch, 1984 In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene.* **29**: 303-313.
- Rattray, A. J. y L. S. Symington, 1993 Stimulation of meiotic recombination in yeast by an *ARS* element. *Genetics* **134**: 175-188.

- Rodríguez, C. 1998 Mecanismos de variación concertada entre secuencias reiteradas en el genoma de *Rhizobium etli* CFN42. Tesis Doctoral. CIFN-UNAM, México.
- Rodríguez, C. y D. Romero, 1998 Multiple recombination events maintain sequence identity among members of the nitrogenase multigene family in *Rhizobium etli*. *Genetics*, **149**: 785-794.
- Romero, D. y R. Palacios, 1997 Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 91-111.
- Romero, D., S. Brom, J. Martínez-Salazar, M. L. Girard, R. Palacios *et al.*, 1991 Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* **173**: 2435-2441.
- Romero, D., J. Martínez-Salazar, L. Girard, S. Brom, G. Dávila *et al.*, 1995 Discrete amplifiable regions (amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J. Bacteriol.* **177**: 973-980.
- Romero, D., G. Dávila y R. Palacios, 1997 The dynamic genome of *Rhizobium*, pp. 153-161 in *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis* edited by F. J. de Bruijn, J. R. Lupski and G. Weinstock, Chapman & Hall, New York.
- Rosenberg, M. D. Court, H. Shimatake y C. Brady, 1978 The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in phage  $\lambda$ . *Nature* **272**: 414-422.
- Sahoo, T., B. K. Mohanty, M. Lobert, A. C. Manna y D. Bastia, 1995 The contrahelicase activities of the replication terminator proteins of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* are helicase-specific and impede both helicase translocation and authentic DNA unwinding. *J. Biol. Chem.* **270**: 29138-29144.
- Sandler, S. J., H. S. Samra y A. J. Clark, 1996 Differential suppression of *priA2::kan* phenotypes in *Escherichia coli* K-12 by mutations in *priA*, *lexA* and *dnaC*. *Genetics* **143**: 5-13.
- Saveson, C. J. y S. T. Lovett, 1997 Enhanced deletion formation by aberrant replication in *Escherichia coli*. *Genetics* **146**: 457-470.
- Schultz, D. W. y G. R. Smith, 1986 Conservation of Chi cutting activity in terrestrial and Marine enteric bacteria. *J. Mol. Biol.* **189**: 585-595.

- Segovia, L., J. P. W. Young y E. Martínez-Romero, 1993 Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 374-377.
- Sharpless, G. J., M. C. Whitby, L. Ryder, y R. G. Lloyd 1994 A mutation in helicase motif 111 of *E. coli* RecG protein abolishes branch migration of Holliday junctions. *Nucleic Acids Res.* **22**: 308-313.
- Shlomag, J. y A. Kornberg, 1980 An *Escherichia coli* replication protein that recognizes a unique sequence with a hairpin region in  $\phi$ X174 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 799-803
- Smith, G. R. 1989 Homologous recombination in *E. coli*: myths and mechanisms. *Cell.* **64**: 19-27.
- Sourice, S., V. Blaudet, M. El-Karoui, S. D. Ehrlich y A. Gruss, 1998 Identification of the Chi site of *Haemophilus influenzae* as several sequences related to the *Escherichia coli* Chi site. *Mol. Microbiol.* **27**: 1021-1029.
- Stahl, F. W. 1994 The Holliday junction on its thirtieth anniversary. *Genetics* **138**: 241-246.
- Stahl, F., 1996 Meiotic recombination in yeast: coronation of the double-strand-break repair model. *Cell* **87**: 965-968.
- Steiner, W. W., y P. L. Kuempel 1998 Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the *dif* resolvase site. *J. Bacteriol.* **180**: 6269-6275.
- Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein y F. W. Stahl, 1983 The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35.
- Thaler, D. S. y F. W. Stahl 1988 DNA double-chain breaks in recombination of phage  $\lambda$  and of yeast. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 169-197.
- Torrey, T. A. y T. Kogoma, 1982 Suppressor mutations (*rin*) that specifically suppress the *recA*-dependence of stable DNA replication in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 420-427.
- Torrey, T. A., T. Atlung y T. Kogoma, 1984 *dnaA* supressor (*dasF*) mutants of *Escherichia coli* are

stable DNA replication (*sdr/rnh*) mutants. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 350-355.

Vincent, S. D., A. A. Mahdi y R. G. Lloyd 1996 The RecG branch migration protein of *E. coli* dissociates R-loops. *J. Mol. Biol.* **264**: 713-721.

vonMeyenburg, K., E. Boye, K. Skarstad, L. Koppes y T. Kogoma, 1987 Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**: 2650-2658.

West, S. C. 1992 Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 603-640.

West, S. C. y B. Connolly, 1992 Biological roles of the *Escherichia coli* *ruvA*, *ruvB* and *ruvC* proteins revealed. *Mol. Microbiol.* **6**: 2755-2759.

Yamaguchi, K. y J. Tomizawa, 1980 Establishment of *Escherichia coli* cells with an integrated high copy number plasmid. *Mol. Gen. Genet.* **178**: 525-533.

Yamamoto, K., H. Yoshikura, N. Takahashi e I. Kobayashi, 1988 Apparent gene conversion in an *Escherichia coli* *rec+* strain is explained by multiple rounds of reciprocal crossing-over. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 393-404.

Yap, W. Y. y K. N. Kreuzer, 1991 Recombination hotspots in bacteriophage T4 are dependent on replication origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 6043-6047.

Zaman, M. M. y T. C. Boles, 1996 Plasmid recombination by the RecBCD pathway of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 3840-3845.

Zavits, K. H. y K. J. Marians, 1992 ATPase-deficient mutants of the *Escherichia coli* DNA replication protein PriA are capable of catalyzing the assembly of active primosomes. *J. Biol. Chem.* **267**: 6933-6940.