

## Identificación y análisis de secuencias de retrotransposones en *Lycopersicon* spp\*

### Identification and Analysis of Retrotransposon Sequences in *Lycopersicon* spp.

M. Cristancho\*\*

#### RESUMEN

Secuencias de retrotransposones del tipo *Ty3/gypsy* fueron identificadas en los genomas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y otras especies de *Lycopersicon* por medio de análisis de PCR. Las secuencias fueron altamente heterogéneas, como ha sido el caso para otras secuencias de retrotransposones identificadas en plantas. Un análisis de las secuencias amplificadas por PCR mostró que la filogenia de las secuencias *Ty3/gypsy* de tomate fue similar a la del género *Lycopersicon*. Este análisis también mostró que las secuencias pertenecen a secuencias de retrotransposones de lenta evolución y que parecen ser residentes desde tiempos ancestrales del genoma del tomate. Se obtuvo alguna evidencia que sugiere que los elementos del tipo *Ty3/gypsy* en tomate podrían ser activos. Las líneas de evidencia en favor de la presencia de retrotransposones activos en tomate y su posible transmisión horizontal se analizan más profundamente.

**Palabras clave:** *Lycopersicon esculentum*, retrotransposones *Ty3/gypsy*, análisis filogenético.

**Abreviaturas:** ORF, open reading frame; LTR, long terminal repeat; PCR, polymerase chain reaction.

#### SUMMARY

Retrotransposon *Ty3/gypsy*-like sequences were identified in the genomes of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and several other *Lycopersicon* species by PCR analysis. The sequences were highly heterogeneous, as has been the case

for other retrotransposon sequences isolated from plants. Analysis of sequences amplified by PCR showed that the phylogeny of the tomato *Ty3/gypsy* sequences was similar to that of the genus *Lycopersicon*. This analysis also showed that the sequences belong to slowly changing retrotransposon sequences and that they seem to be long time residents of the tomato genome. Some evidence was obtained that suggests that some *Ty3/gypsy*-like elements in tomato might be active. The lines of evidence in favour of the presence of active retrotransposons in tomato and their possible horizontal transmission are further discussed.

**Keywords:** *Lycopersicon esculentum*, Gypsy-like retrotransposons, phylogenetic analysis.

#### INTRODUCCIÓN

Los retrotransposones son elementos genéticos móviles cuyo mecanismo de transposición incluye un intermediario de RNA (Finnegan, 1992). Los retrotransposones LTR son estructuralmente similares a retrovirus integrados, poseyendo LTR (Long Terminal Repeats) y ORF (Open Reading Frames) similares a *gag* y *pol*. Este tipo de retrotransposones LTR se clasifican en dos grupos: el grupo del tipo *Ty1-copia*, que incluye *Ty1* y *Ty2* de levaduras y *copia* de *Drosophila melanogaster*, y el grupo del tipo *gypsy* que incluye *Ty3* de levaduras y *gypsy* de *D. melanogaster* (Bingham y Zachar, 1989; Boeke y Sandmeyer, 1991). Los dos grupos se distinguen por diferencias en la organización de los dominios en el gen *pol* y por la presencia en algunos elementos del tipo *gypsy* de un tercer ORF relacionado con el gen retroviral *env* (Doolittle *et al.*, 1989).

Los dos tipos de retrotransposones han sido encontrados en un amplio rango de organismos eucariotes que incluyen levaduras, hongos, invertebrados, peces y plantas. Elementos del tipo *Ty3/gypsy* han sido identificados en diversas plantas, y ejemplos de éstos son *del1* en lilio (Smyth *et al.*, 1989), *IFG7* en pino (Kossack *et al.*, 1990), *magellan* en maíz (Purugganan y Wessler, 1994), *Tna1* en tabaco

\* Fragmento de la tesis "Gypsy-like sequences in *Lycopersicon* and other Solanaceae species" presentada para optar al título de Ph.D de la University of Manchester, U.K.

\*\* Disciplina de mejoramiento genético y biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones del Café-Cenicafé, Chinchiná, Caldas, email: fcmcri@cafedecolombia.com, mc245@cornell.edu

(Royo *et al.*, 1996) y diversas secuencias en tomate (Su y Brown, 1997). Se ha demostrado que los retrotransposones pueden alterar patrones de expresión genética en el genoma de la planta que los posee, pero su función no ha sido establecida con claridad (Weil y Wessler, 1990; Grandbastien, 1992). Pouteau *et al.* (1994) demostraron que el retrotransposón *Tnt1* en tabaco se moviliza en el genoma ante la presencia de varios factores microbianos, y recientemente Kenward *et al.* (1999) encontraron un retrotransposón ligado a resistencia a la roña negra de la raíz en tabaco. Debido a estos hallazgos se ha especulado que la activación de los retrotransposones puede desempeñar algún papel en la defensa de las plantas ante el ataque de un patógeno.

También ha sido interesante el hallazgo de secuencias de retrotransposones en organismos patógenos de plantas. Elementos de este tipo han sido identificados en *Magnaporthe grisea* patógeno de arroz (Shull y Hammer, 1996), aislamientos de *Fusarium oxysporum* de varias plantas (Julien *et al.*, 1992; Anaya y Rocero, 1995) y *Phytophthora infestans* patógeno de papa (Tooley *et al.*, 1996). En patógenos del tomate se han identificado el retrotransposón *Boty* de *Botrytis cinerea* y *CfT-1* en *Cladosporium fulvum*. La similitud de estos elementos con secuencias aisladas de plantas ha llevado a sugerir que eventos de transmisión horizontal de estos retrotransposones han ocurrido entre las plantas y sus patógenos (Smyth *et al.*, 1989; McHale *et al.*, 1992). Aunque estas especulaciones son sujeto de corriente debate, las evidencias que se han ido acumulando sugieren que estos eventos de transmisión horizontal pueden ocurrir frecuentemente (Flavell *et al.*, 1992).

El objetivo de este trabajo fue comparar la filogenia de secuencias de RNasa H de retrotransposones de tomate con la filogenia tradicional de la planta obtenida por métodos convencionales. Adicionalmente se comparó la evolución de las secuencias de la RNasa H y de la transcriptasa reversa obtenida por Su y Brown (1997) y finalmente se trató de obtener evidencia de la posible transmisión horizontal de secuencias de retrotransposones entre el tomate y sus patógenos *B. cinerea* y *C. fulvum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Semillas de variedades comerciales de tomate y otras especies de *Lycopersicon* fueron obtenidas de Suttons Seeds Ltd., U.K. y del AVRDC, Tainan, Taiwan.

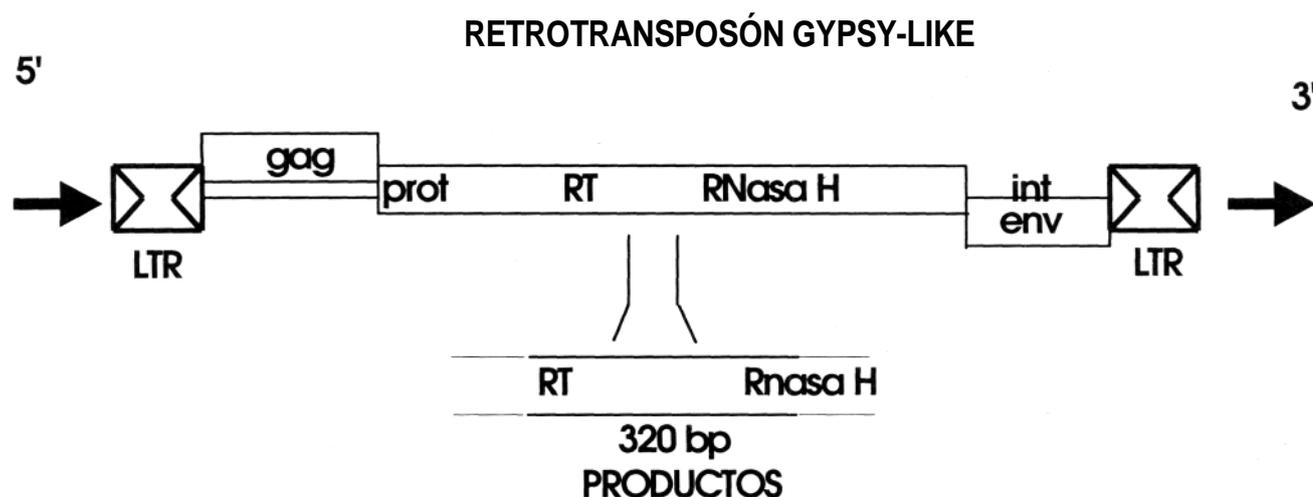
### Extracción de ADN

ADN de cada especie fue extraído por medio de una modificación del protocolo de Edwards *et al.* (1991). Una a diez semillas de cada especie se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml en 400  $\mu$ l de buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 7,4; 250 mM NaCl; 25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA pH 8,0; 0,5% SDS) y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. El tejido fue macerado con un triturador metálico y agitado en vortex por 20 segundos. Los tubos se incubaron por 2 h con agitación a 200 rpm a temperatura ambiente. Los extractos fueron centrifugados por 1 min para decantar grandes fragmentos de tejido, y de cada tubo se recuperaron 300  $\mu$ l de sobrenadante. El ADN se precipitó por medio de la adición de 600  $\mu$ l de etanol absoluto e incubación por 1 h a -20°C. La solución de ADN se lavó finalmente con etanol al 70%. La mayoría de protocolos adicionales de biología molecular fueron realizados de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989).

### Análisis de PCR y secuencias

Se diseñaron iniciadores degenerados con base en secuencias de retrotransposones del tipo *Ty3/gypsy*, en una región conservada entre el gen de la transcriptasa reversa y el dominio del gen de la RNasa H (figura 1). Los iniciadores utilizados fueron: iniciador A de 31pb (5'-tttttgatccTTCTTGGG (A,G) CATGT (A,G) GTTTC-3'); iniciador B de 29pb (5'-tttttgatcc GAGGCATCAGTGTAGACG-3'). Las secuencias en minúscula corresponden a la adición de un extremo que contenía un sitio de clonación *Bam*HI en cada iniciador. La temperatura de anillamiento ( $T_m$ ) de los iniciadores se calculó de acuerdo con la fórmula  $T_m = 2(A/T) + 4(G/C)$  (Innis *et al.*, 1990).

Para evitar la contaminación de las reacciones de amplificación, todos los reactivos, excepto la Taq polimerasa, fueron irradiados con luz UV y para asegurar sólo la amplificación de los fragmentos deseados, se utilizó la estrategia "Hot Start" (Erlich *et al.*, 1991). También se usaron controles negativos para monitorear posibles contaminaciones. La mezcla para la reacción de amplificación contenía: 2,5 U DNA Taq polimerasa (GIBCO), 1x buffer PCR, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dNTPs, 200 ng de cada iniciador y 10-100 ng de ADN. Las condiciones de la reacción fueron: 1 ciclo a 94°C por 2,5 min; 35 ciclos a 94°C por 1 min, 52°C por 2 min y 74°C por 1 min; y 1 ciclo adicional a 72°C por 9 min. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa NuSieve (FMC products) al 3% y visualizados por medio de tinción con bromuro de etidio.



**Figura 1.** Organización de un retrotransposón del tipo gypsy. En la figura se señala la región amplificada por PCR.

Fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron purificados de los geles por electroelución en tubos de diálisis (tamaño 2) y la fracción electroeluida fue purificada adicionalmente por cromatografía en columna (Promega). Los fragmentos amplificados fueron ligados en el vector pGEM-T (Promega) y electroporados en células electrocompetentes de *Escherichia coli* XL-1 Blue MRF'. Los fragmentos clonados fueron secuenciados por el método de terminación de la cadena (Sanger *et al.*, 1977) en un secuenciador automático (Applied Biosystems) o manualmente usando la enzima Sequenase (Amersham). Las secuencias fueron alineadas usando CLUSTALW (Higgins y Sharp, 1988) y ajustadas al ojo. Árboles filogenéticos fueron obtenidos por el método "Neighbor-joining" usando CLUSTALW y su topología fue verificada por el método de las máximas probabilidades con PHYLIP 3.57 (Felsenstein, 1995).

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

### Análisis de PCR

En la tabla 1 se describen los productos de amplificación de PCR que se consiguieron en todas las especies e introducciones de *Lycopersicon* utilizadas. Estos productos se obtuvieron en por lo menos dos repeticiones realizadas en experimentos diferentes con cada una de las introducciones. Inesperadamente se obtuvo en la gran mayoría de introducciones ensayadas, un fragmento de 520 bp adicional al fragmento esperado de 320 bp. Esta banda fue en muchos casos de mayor intensidad que la banda de 320 bp y en algunos casos fue la única que se obtuvo. Un fragmento

adicional de 600 bp se amplificó en *L. pimpinellifolium* L00101.

### Análisis de secuencia de los fragmentos amplificados

Fragmentos de PCR del tamaño esperado de 320 bp fueron clonados y secuenciados a partir de las introducciones *L. esculentum* 0320, *L. esculentum* 1327, *L. esculentum* 0285, *L. esculentum* 0422, *L. chmielewskii* 1052, *L. glandulosulom* 0634, *L. hirsutum* 0643, *L. peruvianum* 0635, *L. chilense*, 1176 y *L. pimpinellifolium* 0101. Las secuencias de nucleótidos fueron alineadas con el programa CLUSTALW y se obtuvo una matriz de distancias de sustituciones nucleotídicas con la opción DNADIST del programa PHYLIP 3.57. Las secuencias variaron en tamaño entre 312 bp y 324 bp. Un análisis de estas secuencias indicó que éstas tuvieron una similitud mayor al 90% entre ellas (figura 2).

Adicionalmente se clonó y secuenció un producto de amplificación de 520 bp de la introducción *L. esculentum* 0422 para tratar de determinar la naturaleza de esta secuencia. La comparación de la secuencia de 520 bp con la de 317 bp de esta introducción mostró que el fragmento mayor posee dos inserciones en las posiciones 260 y 304. El resto de las dos secuencias alinean con bastante precisión en las demás regiones. Este resultado es un indicio de la alta tasa de mutación que puede sufrir el dominio de la RNasa H en retrotransposones en comparación con otras regiones en estos elementos. Su y Brown (1997) detectaron una menor tasa de cambio en la región de la transcriptasa reversa (RT) de secuencias de tomate, ya que no

**Tabla 1.** Tamaño de las bandas amplificadas en especies de *Lycopersicon*. Se hizo distinción en la intensidad de las bandas cuando ésta fue evidente

Especies de tomate	Introducción	Fragmento 600-bp	Fragmento 520-bp	Fragmento 320-bp
<i>L. pimpinellifolium</i>	L00101	*	*	*
<i>L. pimpinellifolium</i>	L00134		**	*
<i>L. esculentum</i>	cv. Ailsa Craig		**	*
<i>L. esculentum</i>	cv. Alicante		**	*
<i>L. esculentum</i>	L00285		**	*
<i>L. esculentum</i>	L00320		**	*
<i>L. esculentum</i>	L00422		*	**
<i>L. esculentum</i>	L00793		**	*
<i>L. esculentum</i>	L01327-A		*	**
<i>L. esculentum</i>	L01985		*	**
<i>L. glandulosum</i>	L00634			**
<i>L. glandulosum</i>	L00641		*	**
<i>L. peruvianum</i>	L00635		*	*
<i>L. peruvianum</i>	L00638		**	*
<i>L. hirsutum</i>	L00643		**	
<i>L. hirsutum</i>	L00645		*	**
<i>L. cheesmanii</i>	L04253		**	*
<i>L. cheesmanii</i>	TL 1030		**	
<i>L. chmielewskii</i>	TL 1052		*	**
<i>L. chmielewskii</i>	TL 1078			**
<i>L. chilense</i>	TL 1176		**	
<i>L. chilense</i>	TL 1177		**	*

\* Banda débil \*\* Banda brillante

encontraron deleciones ni inserciones en las secuencias analizadas (tabla 2). En retrovirus se ha estimado que la RNasa H tiene una tasa de mutación 1,6 mayor que la transcriptasa reversa (McClure *et al.*, 1988). Adicionalmente, las secuencias de la RNasa H están acumulando mayor número de mutaciones nocivas en la forma de transversiones y deleciones/inserciones, en tanto las secuencias de la transcriptasa reversa están acumulando principalmente mutaciones que en su mayoría son silenciosas en la forma de transiciones (tabla 2).

El alineamiento de nucleótidos se usó para construir un árbol filogenético con el fin de comparar la evolución de secuencias de RNasa H con la filogenia del género *Lycopersicon* (figura 3). En términos generales, las relaciones filogenéticas que se encontraron fueron muy similares a las encontradas por Miller y Tanksley, (1990) usando marcadores RFLR. Este resultado es poco usual ya que las secuencias de retrotransposones no siguen en general la evolución filogenética de los organismos que los contienen (Flavell *et al.*, 1992; Purugganan y Wessler, 1994).

**Tabla 2.** Número estimado de transiciones, inversiones y deleciones/inserciones por sitio en las secuencias de la transcriptasa reversa (RT) y RNasa H de *Lycopersicon*. Los valores para las secuencias de la transcriptasa reversa fueron tomados de Su (1996).

	Transiciones	Transversiones	Delec./Inser.	Total
RT	0,0199	0,0108	0,0000	0,0307
RNasa H	0,0053	0,0113	0,0113	0,0279

	<b>1</b>				<b>49</b>
ESC0320	ttcttgggac	atgtggtttc	taa-ggatgg	ggtgatgtgt	ggatccttct
ESC1327	.....g.	....a.....	...-.....	.....	.....
ESC0422	.....g.	....a.....	...-.....	.....a-a	.....
ESC0285	.....g.	....a.....	...-a..a..	a.....a-a	.....
PIM0101	.....	.....g	...a.....	.....ca-	.....
PER0635	.....	.....g	...a.....	.....-	.....
CHM1052	.....	.....t	a.....	.....-	.....
CHI1176	.....	.....-	...a.....	.....-	.....
GLA0634	.....	.....g	...a.....	.....-	.....
HIR0643	.....	.....g	...a.....	.....-	.....
	<b>50</b>				<b>97</b>
ESC0320	aagattgaga	caatga-aga	attgggtaag	acctactaat	gtgtca-gaa
ESC1327	.....	.....-	.....	.....	.....-
ESC0422	.....	.....-	.....	.....	.....-
ESC0285	.....	.....-	.....	.....	.....-
PIM0101	.....	.....-	.....	.....	.....-
PER0635	.....	.....-	.....	.....	.....-
CHM1052	.....	.....-	.....	.....	.....-
CHI1176	.....	.....-	.....	.....t.....	.....-
GLA0634	.....	..gg..ccc.	.....	.....	.....-
HIR0643	.....	.....-	.....	.....	.....g.....
	<b>98</b>				<b>144</b>
ESC0320	ataaggagct	ttgttggttt	agctagctac	taccgccgat	ttgtc---aa
ESC1327	.....	.....	.....	.....	.....---
ESC0422	.....	.....	.....	.....	.....---
ESC0285	..t.....	-----	.....	.....	.....---
PIM0101	.....	.....	..a.....	..g.....g	g.....---
PER0635	.....	.....	.....	.....	.....cttcg
CHM1052	.....	.....	.....	.....	.....---
CHI1176	t.....	.....	.....	.....	.....---
GLA0634	.....	.....	.....	.....	.....---
HIR0643	.....	.....	.....	..gg.....g	g.....---
	<b>145</b>				<b>194</b>
ESC0320	ggggttctct	tctattgctt	cccaattgac	gaacttgacg	aagcagaatg
ESC1327	.....	.....	.....	.....	.....
ESC0422	.....	.....	.....	.....t	.....
ESC0285	.....	.....	.....	.....t	.....
PIM0101	....a....	.....	.....	.....	.....
PER0635	.....	.....	.....c..a	.....	.....
CHM1052	.....	.....	.....	.....	.....
CHI1176	.....	.....	.....	.....	.....
GLA0634	.....	.....	.....	.....t	.....
HIR0643	.....	.....	.....	.....	.....

(continúa)

Figura 2. Alineamiento de secuencias de RNasa H de especies de *Lycopersicon*.

(viene)

	<b>195</b>				<b>243</b>
ESC0320	ttccatttgt	at-gtctgac	gaatgtgagg	aaagctttaa	gaaacgtcaa
ESC1327	.....	..-.....	.....	.....	.....
ESC0422	.....	..-.....	.....	.....	.....c....
ESC0285	.....	..-.....	.....	.....	.....c....
PIM0101	.....	..-.....	.....	.....	.....c..g.
PER0635	.....	..-.....	.....cc..	.....	.....c..g.
CHM1052	.....	..-.....	.....	.....	.....c..g.
CHI1176	.....	.g.....	.....	.....	.....---.t.
GLA0634	.....	t.t.....	.....	.....c.	c.----...
HIR0643	.....	t.t.....	.....	.....c.	-....c....
	<b>244</b>				<b>292</b>
ESC0320	gaccttggtg	actactacac	caatccttac	cct-gacagt	agaaggtaag
ESC1327	.....	.....	.....	..-.....	.....
ESC0422	.....	.....	.....	..-.....	.....
ESC0285	.....	.....	.....	..-.....	.....
PIM0101	.....	.....	.....	..-.....	.....
PER0635	.....	.....	.....	..-.....	.....
CHM1052	.....	.....	.....	..-.....	.....
CHI1176	.....	.....	.....	..-.....	.....
GLA0634	c.....	.....	.....	..-c.c..	g.....c..
HIR0643	.....	.....	.....g..	..g.....	.....cc.
	<b>293</b>				
ESC0320	-aattt--ca	tcgtctacac	tgatgcctc		<b>318</b>
ESC1327	-.....--..	.....	.....		<b>318</b>
ESC0422	-.....--..	.....	.....		<b>318</b>
ESC0285	-.....--..	.....	.....		<b>312</b>
PIM0101	-.....--..	.....	.....		<b>319</b>
PER0635	-.....--..	.....	.....		<b>322</b>
CHM1052	-.....--..	.....	.....		<b>318</b>
CHI1176	-.....--..	.....	.....		<b>315</b>
GLA0634	-.....--..	.....	.....		<b>320</b>
HIR0643	a.....cc..	.....	.....		<b>324</b>

Las sustituciones de nucleótidos se detallan en negrilla.  
 Los puntos "." indican sitios conservados.  
 Los guiones "-" indican sitios de delección/inserción.

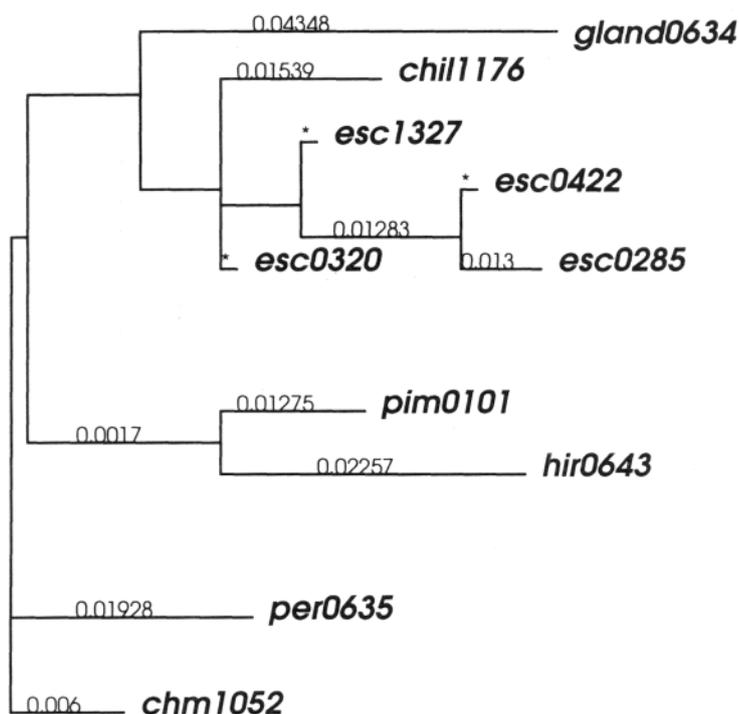
**Figura 2.** Alineamiento de secuencias de RNasa H de especies de *Lycopersicon*. (Cont).

**Análisis de las secuencias de aminoácidos**

Las secuencias de nucleótidos fueron traducidas usando la opción TRANSLATE del paquete GCG 8.1.0. Seis de las diez secuencias de aminoácidos inferidas tenían codones de terminación o cambios de fase. Resultados similares han sido encontrados por otros investigadores buscando retrotransposones en plantas. Voytas *et al.* (1992) encontraron que solamente 29 de 102 clones secuenciados tenían ORF no interrumpidos, Hirochika e Hirochika (1992) encontraron que 38 de 72 clones secuenciados tenían

codones de terminación o cambios de fase, y ninguna de las secuencias del retrotransposón *Tna1* identificadas en *Nicotiana alata* tenía ORF ni presentó transcriptos detectables (Royo *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que la acumulación de mutaciones es un fenómeno general en retrotransposones. Las cuatro secuencias de aminoácidos inferidas con ORF no interrumpidos fueron usados en los subsiguientes análisis.

Estas cuatro secuencias fueron usadas para realizar una búsqueda de secuencias homologas con el programa



**Figura 3.** Árbol filogenético derivado de secuencias de RNasa H de *Lycopersicon*.

El árbol se construyó usando las opciones DNAML y DRAWGRAM de PHYLIP 3.57. El número arriba de cada línea horizontal indica la longitud del brazo y representa las sustituciones de nucleótidos esperadas por sitio. Los asteriscos "\*" indican valores <0,006.

BLAST (Altschul *et al.*, 1990). La búsqueda produjo 19 secuencias de diversos grupos de organismos que fueron al menos 26% idénticas a las secuencias de RNasa H de tomate. Todas las secuencias fueron usadas para construir un alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW utilizando el método "Neighbor-joining" desarrollado por Saitou y Nei (1987) (figura 4). Dentro de las secuencias analizadas hay secuencias de vertebrados (*por1*), insectos (*gypsy*, 412, Osvaldo, TED, Woot, Micropia, MAG), hongos (*CfT-1*, *Boty*, Tf2, MAGGY), plantas (*del*), baculovirus (Baculo) y retrovirus (GALV, BAEVN, ECE1). Esta similitud entre secuencias de retrotransposones aislados de grupos tan diversos de organismos es una de las evidencias que existen de la amplia ocurrencia de transmisión horizontal de estos elementos en la naturaleza (Doolittle *et al.*, 1989; Xiong y Eickbush, 1990).

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos fue usado para calcular una matriz de distancias con el programa PROTDIST y para construir un árbol filogenético con los programas DRAWGRAM y CLUSTALW. Se lograron establecer claramente varios grupos. Las secuencias de *Lycopersicon* agruparon con la secuencia *del* de lilio, todas

las secuencias de hongos se agruparon juntas y los retrovirus se agruparon con Micropia, MAG y *Por1* (figura 5). También existió un agrupamiento de las secuencias de plantas con los retrotransposones 412 y *gypsy* de *Drosophila melanogaster*, los cuales a su vez se encuentran distantes de los retrotransposones de hongos. De nuevo se evidencia la cercana relación que existe entre elementos aislados de muy diversos grupos de organismos. Sin embargo, la relación que existe entre los elementos aislados de tomate y retrotransposones de patógenos de la planta como *Boty* y *CfT-1*, no brinda una clara evidencia sobre la posible transmisión horizontal de este tipo de elementos entre la planta y sus patógenos.

## CONCLUSIONES

El genoma del tomate (*L. esculentum*) y algunas otras especies de *Lycopersicon* contienen múltiples secuencias de retrotransposones del tipo *gypsy*, las cuales parecen ser muy heterogéneas. Un análisis de las secuencias demostró que ellas han seguido un patrón de evolución similar al del género *Lycopersicon*.

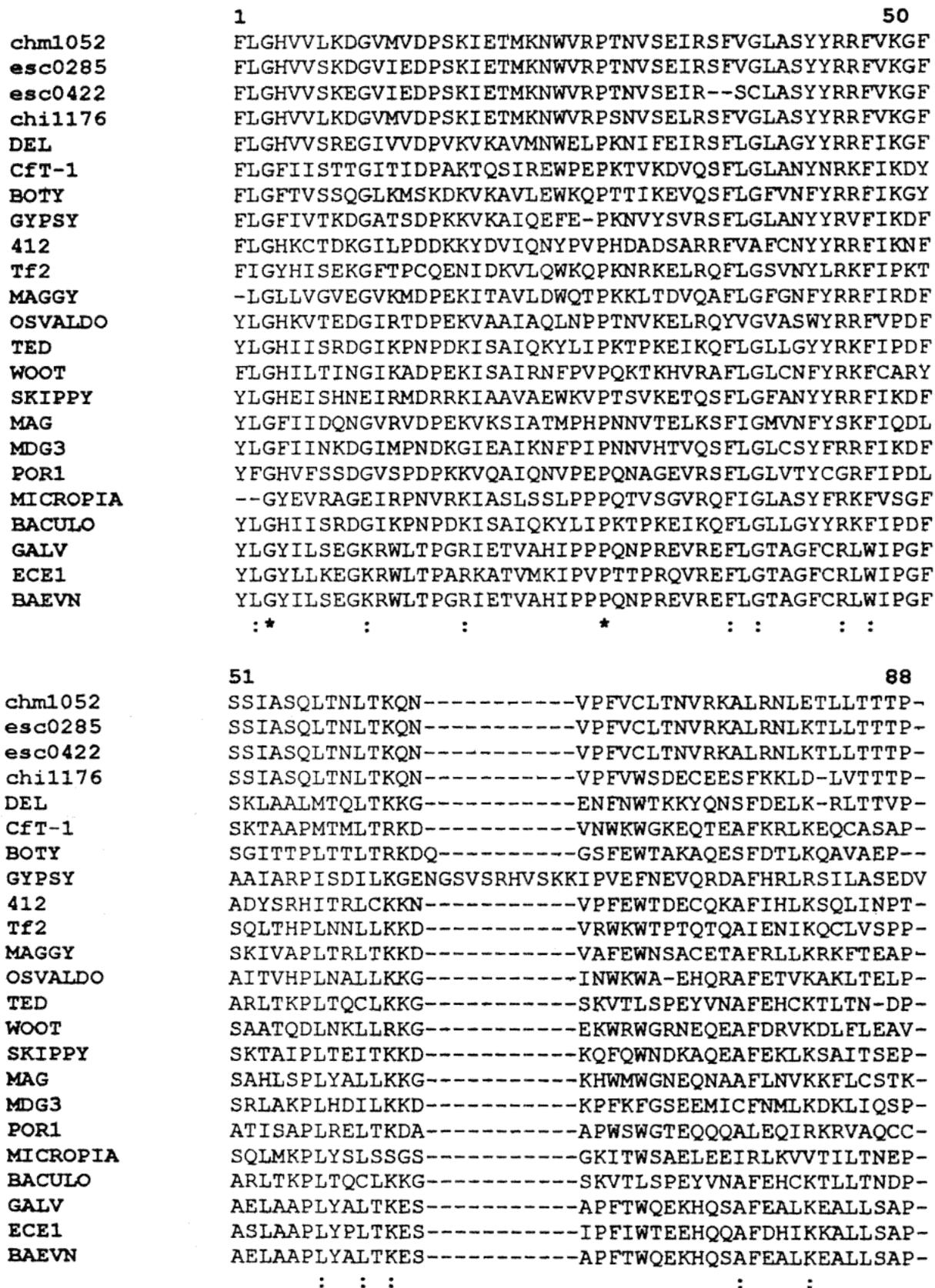


Figura 4. Múltiple alineamiento de secuencias de aminoácidos de retrotransposones de *Lycopersicon*, secuencias de elementos tipo *Ty3/gypsy* y retrovirus.

	<b>89</b>	
chm1052	ILTLTVEGKNFIVYTDAS	106
esc0285	ILTLTVEGKNFIVYTDAS	106
esc0422	ILTLTVEGKNFNVYTDAS	104
chi1176	ILTLTVEGKNFIVYTDAS	106
DEL	VLTIPISG>PFVYTDAS	104
Cft-1	TLRLFDSKEVHIETDAS	106
BOTY	ILLTFDPEKEIIVETDSS	106
GYPSY	MLMYPNFQKPFDLTTDAS	117
412	LLQYPDFSKEFCITTDAS	106
Tf2	VLRHFDFSKILLETDAS	106
MAGGY	VLAHFDWEKDVILETDAS	105
OSVALDO	VLACPDLKPFCLQTDAS	105
TED	ILQYPDFTREFNLTTDAS	105
WOOT	LLRYPDLNKIFYVQTDSS	106
SKIPPY	VLVMFDPDRQVELETAS	106
MAG	ALAHFDMLESVLTVDAS	106
MDG3	VLAIYNHKKHETELHCDAS	106
POR1	TMAYFDPAKKTEILVDAS	106
MICROPIA	ALVIFDPGYPIELHTDAS	104
BACULO	ILQYPDFTREFNLTTDAS	106
GALV	ALGLPDTSKPFTLFIDEK	106
ECE1	ALALPDLTKPFTLYIDER	106
BAEVN	ALGLPDTSKPFTLFIDEK	106
	:	*::

**Figura 4.** Múltiple alineamiento de secuencias de aminoácidos de retrotransposones de *Lycopersicon*, secuencias de elementos tipo *Ty3/gypsy* y retrovirus. (Cont.)

El alineamiento se realizó con el programa CLUSTALW. Las secuencias de retrovirus y retrotransposones se obtuvieron de la base de datos SWISSPROT. Las referencias de las secuencias son: secuencias de *Lycopersicon*: chm1052 (*L. chmielewskii* 1052), esc0285 (*L. esculentum* 0285), esc0422 (*L. esculentum* 0422), chi1176 (*L. chilense* 1176).

RETROTRANSPOSONES: DEL (*Lilium henryi* prf1510387A), Cft-1 (*Cladosporium fulvum* pirS23570), BOTY (*Botrytis cinerea* Diolez et al. 1995), GYPSY (*Drosophila melanogaster* spP 10401), 412 (*D. melanogaster* prf 12053331 A), Tf2 (*Schizosaccharomyces pombe* pirJN0791), MAGGY (*Magnaporthe grisea* gi52302), OSVALDO (*Drosophila buzzatii* pirS52564), TED (*Trichoplusia ni* pirB36329), WOOT (*Tribolium castaneum* gi510697), MAG (*Bombyx mori* pirS08405), MDG3 (*D. melanogaster* gnlPIDe223896), POR1 (*Pisaster ochreus* -pez estrella- gi000387), MICROPIA (*D. melanogaster* pirS02021), BÁCULO (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus gi1226168).

RETROVIRUS: GALV (Gibbon Ape Leukemia Virus spP21414), ECE1 (Feline Endogenous Virus spP31792), BAEVN (Baboon Endogenous Virus spP10272).

Los guiones "-" señalan sitios de delección/inserción.

Los codones de terminación se señalan con el símbolo ">".

Los asteriscos "\*" señalan sitios conservados en todas las secuencias.

Los dos puntos ":" señalan sitios conservados en más del 80% de las secuencias (>18 secuencias).

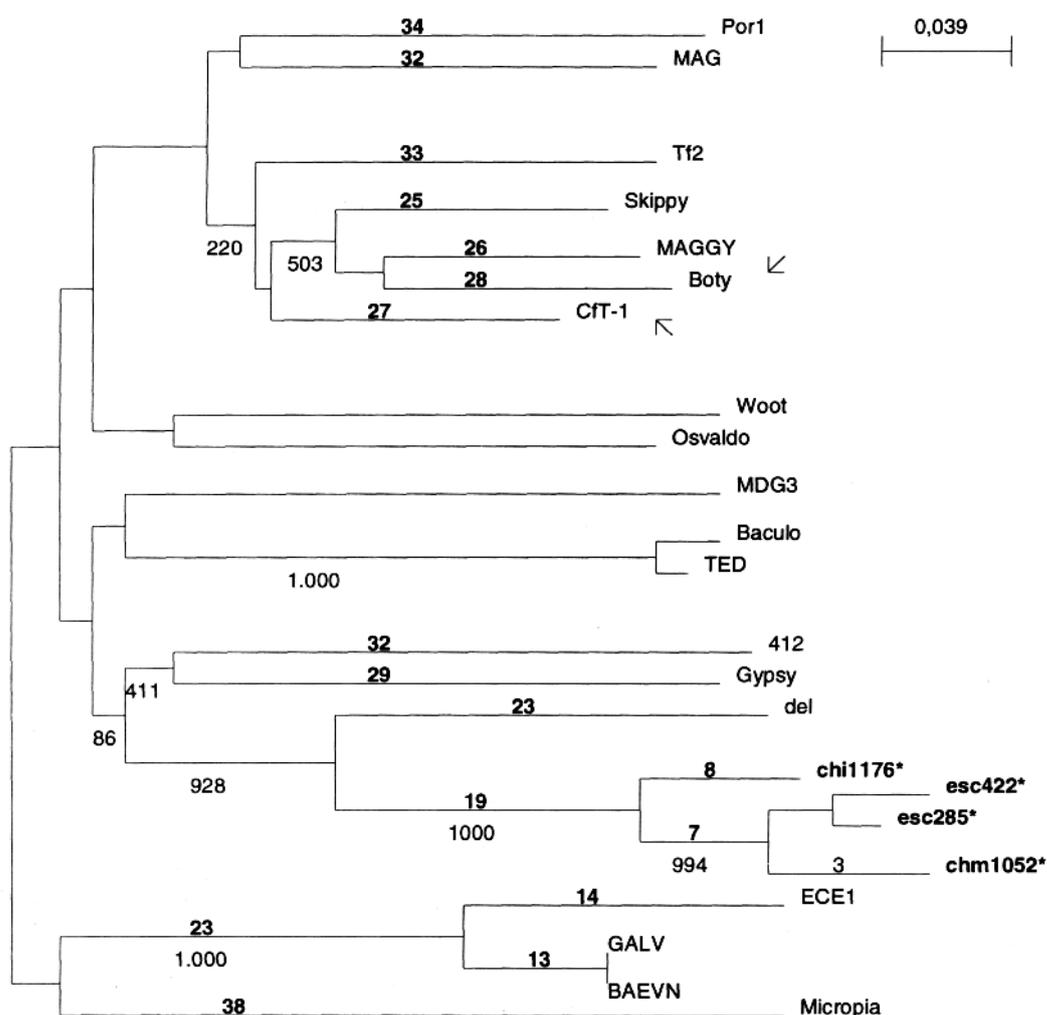
Las secuencias de RNasa H de tomate analizadas en este estudio parecen pertenecerá secuencias de retrotransposones de lenta evolución y tienen una tasa similar de cambio al de las secuencias de la transcriptasa reversa de los mismos elementos. Estas secuencias parecen ser residentes desde tiempos ancestrales del genoma del tomate.

No se logró obtener una clara evidencia sobre la transmisión horizontal de retrotransposones entre el tomate y sus patógenos *B. cinerea* y *C. fulvum*.

## AGRADECIMIENTOS

A AVRDC, Tainan, Taiwan, por proveer semillas de diversas especies de *Lycopersicon*.

Los estudios de Ph.D de M. A. Crístancho fueron financiados por el British Council y Colciencias.



**Figura 5.** Árbol filogenético derivado de secuencias de aminoácidos de RNasa H.

El árbol se construyó usando las opciones NEIGHBOR y DRAWGRAM de PHYLIP 3.57. Las abreviaturas son las mismas de la figura 4. Los números que aparecen encima de las líneas indican el número estimado de sustituciones de aminoácidos por sitio. Los números debajo de las líneas indican los valores *bootstrap* a partir de 100 ensayos. Las flechas señalan la posición de retrotransposones de patógenos del tomate en el árbol.

## REFERENCIAS

- Altschul, S. R., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215:403-410.
- Anaya, N. and Rocero, M. I. G. 1995. *Skippy*, a retrotransposon from the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Gen. Genet* 249:637-647.
- Bingham, R. M. and Zachar, Z. 1989. Retrotransposons and the FB transposon from *Drosophila melanogaster*. In: Mobile DNA. D.E. Berg y M.M. Howe, Eds. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 485-502.
- Boeke, J. D. and Sandmeyer, S. B. 1991. Yeast transposable elements. In: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Genome dynamics, protein synthesis, and energetics. J.R. Broach, J. Pringle and E. Jones. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 193-261.
- Doolittle, R. R., Reng, D. R., Hohnson, M. S. and McClure, M. A. 1989. Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Quart. Rev. e/o.* 64:1-30.
- Edwards, W., Johnstone, C. and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nuc. Acids Res.* 19:1349.
- Erllich, H. A., Gelfand, D. and Sninsky, J. J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252:1643-1651.
- Relsenstein, J. 1995. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) versión 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Rinnegan, D. J. 1992. Transposable elements. *Curr. Opin. Genet Dev.* 2:861-867.
- Rlavell, A. J., Dunbar, E., Anderson, R., Pearce, S. R., Hartley, R. and Kumar, A. 1992. *Ty1-copia* group of retrotransposons are ubiquitous in higher plants. *Nuc. Acids Res.* 20:3639-3644.
- Grandbastein, M. A. 1992. Retroelements in higher plants. *Trends Genet.* 8:103-108.
- Higgins, D. G. and Sharp, R. M. 1988. CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73:237-244.
- Hirochika, H. and Hirochika, R. 1992. *Ty1 -copia* retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. *Jap. J. Genet.* 68:35-46.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (Eds.) 1990. PCR protocols. Academic Press, Inc., San Diego.
- Julien, J., Poirier, S. and Brygoo, Y. 1992. *Foretl*, a reverse transcriptase-like sequence in the filamentous fungi *Fusarium oxysporum*. *Nuc. Acids Res.* 20:3933-3937.
- Kenward, K. D., Bai, D., Ban, M. R. and Brandk, J. E. 1999. Isolation and characterisation of *Tnd-1*, a retrotransposon marker linked to black root rot resistance in tobacco. *Theor. App. Genet.* 98:387-395.
- Kossack, D. S., Barrios, M. and Kinlaw, C. S. 1990. IRG: An abundant family of retrotransposons in pine. IURRO Molecular Genetics Meeting, Lake Tahoe, USA. (Abstract).
- McClure, M. A., Jhonson, M. S., Reng, D. R. and Doolittle, R. R. 1988. Sequence comparisons of retroviral proteins: relative rates of change and general phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2469-2473.
- McHale, M. T., Roberts, I. N., Noble, S. M., Meaumont, C., Whitehead, M. R., Seth, D. and Oliver, R. P. 1992. *CfT-1*: An LTR-retrotransposon in *Cladosporium fulvum*, a fungal pathogen of tomato. *Mol. Gen. Genet.* 233:337-347.
- Miller, J. C. and Tanksley, S. D. 1990. RRLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. App. Genet.* 80:437-448.
- Pouteau, S., Grandbastein, M. A. and Boceara, M. 1994. Microbial elicitors of plant defence responses activate transcription of a retrotransposon. *Plant J.* 5:535-542.
- Purugganan, M. D. and Wessler, S. R. 1994. Molecular evolution of *magellan*, a maize *Ty3/gypsy*-like retrotransposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11674-11678.
- Royo, J., Nass, N., Matton, D. R., Okamoto, S., Clarke, A. E. and Newbiggin, E. 1996. A retrotransposon-like sequence linked to the S-locus of *Nicotiana glauca* is expressed in styles in response to touch. *Mol. Gen. Genet.* 250:180-188.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sambrook, J., Ritsch, E. R. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, R., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Shull, V. and Hammer, J. E. 1996. Genetic differentiation in the rice blast fungus revealed by the distribution of the *Fosbury* retrotransposon. *Fungal Genet. Biol.* 20:59-69.
- Smyth, D. R., Kalitssis, P., Joseph, J. L. and Sentry, J. W. 1989. Plant retrotransposon from *Lilium henryi* is related to *Ty3* of yeast and the *gypsy* group of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5015-5019.
- Su, P.-Y. and Brown, T. 1997. *Ty3/gypsy*-like retrotransposon sequences in tomato. *Plasmid* 38:148-157.
- Tooley, P. W. and Garfinkel, D. J. 1996. Presence of *Ty1-copia* group sequences in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Mic. Int.* 9:305-309.
- Voytas, D. R., Cummings, M. P., Konieczny, A., Ausubel, R. M. and Roderick, S. R. 1992. Cop/a-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:7124-7128.
- Weil, C. R. and Wessler, S. R. 1990. The effects of plant transposable element insertion on transcription initiation and RNA processing. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:527-552.
- Xiong, Y. and Eickbush, T. H. 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 9:3353-3362.