AMPLIFICACION, CLONACION Y OBTENCION DE LA SECUENCIA DE UN FRAGMENTO DEL GEN ORNITINA DESCARBOXILASA (*Pc ODC*) DEL HONGO FITOPATOGENO *Phytophthora capsici*

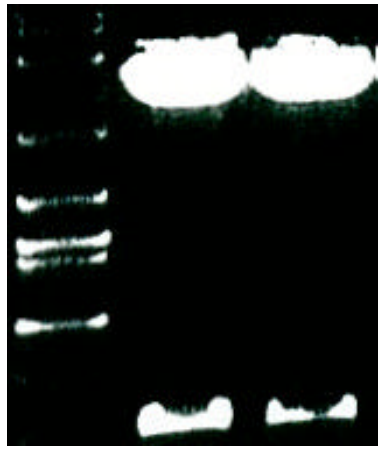
Julieta K. Cruz-Vázquez., Ramón G. Guevara-González., Claudia I. Muñóz-Sánchez., y Lorenzo Guevara-Olvera.
Instituto Tecnológico de Celaya. Depto. Ingeniería Bioquímica. Av. Tecnológico y A. García Cubas S/N, colonia FOVISSSTE; C.P. 38010. Tel. (461)175-75 ext. 324. Fax (461)1-79-79. Celaya, Guanajuato. México.
correo electrónico: lorenzogo@yahoo.com

Palabras clave: *Phytophthora, PCR, clonación*

Introducción. *Phytophthora capsici* es un hongo fitopatógeno que ocasiona la enfermedad conocida como "marchitez de la planta de chile" la cual consiste en la muerte rápida de la planta por desecamiento de la raíz provocada por el desarrollo del hongo, ocasionando así, pérdidas del 30 al 40 % en las superficies sembradas. Los estudios relacionados con la patogénesis del hongo, se han enfocado principalmente al reconocimiento del hospedante y las interacciones planta-patógeno (1) y han demostrado que existe una correlación directa entre la diferenciación celular y el fenómeno de patogénesis y que ornitina descarboxilasa, la enzima inicial del metabolismo de poliaminas juega un papel importante en la diferenciación de los hongos (2). Así, la detección de genes que codifican para moléculas involucradas en el fenómeno de la diferenciación de los hongos fitopatógenos ha sido considerada como una de las estrategias de elección para el control de esta problemática. En el presente trabajo reportamos la amplificación por PCR de un fragmento del gen *Pc ODC*, como una primera etapa para analizar desde un enfoque Molecular, el papel de este gen en la diferenciación celular y la patogénesis de *P. capsici*.

Metodología. La extracción del ADN de *P. capsici* se realizó empleando el método descrito por (3). El ADN obtenido, fue empleado como molde para amplificar un fragmento del gen *Pc ODC* empleando oligonucleotidos degenerados, derivados de las secuencias conservadas de las proteínas ODC´s descritas en la literatura (4). El producto de PCR fue purificado por el método Qiagen y clonado en el vector pCRII-TOPO empleando el procedimiento TOPO TA cloning (Invitrogen). El plásmido conteniendo el inserto fue amplificado en *Escherichia coli* TOP10F´ y purificado por minipreparación empleando el procedimiento Qiagen. La secuencia del producto de PCR fue obtenida en un secuenciador automático y comparada con la base de datos empleando el sofware BLAST de NCBI.

Resultados y discusión. Se amplificó por PCR un fragmento de aprox 500 pb el cual fue revelado con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1.5 % (Figura 1). La secuencia de bases obtenida confirmó la presencia de un fragmento de 489 pb el cual codifica para 163 aminoácidos que mosrtraron un alto grado de homología al ser comparadas con las regiones centrales de las ODC´s de hongos registradas en la base de datos.



500 pb →

Fig 1. Verificación del Producto de PCR.clonado en pCRII Carril 1 MPM. Carril 2 y 3 digestión del plásmido Pc ODC con Eco RI.

Conclusiones. Los resultados obtenidos han permitido confirmar que la técnica de PCR empleando oligonucleotidos degenerados los cuales fueron derivados de las regiones concenso de proteínas descritas en la literatura, son herramientas útiles y confiables para la amplifcación específica de fragmentos de ADN.

Agradecimiento. Los autores agradecen a COSNET el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

Biliografía.

1. SAGAR, 1997. Anuario estadístico
2. McCann, P. P., Pegg, A. E.. (1992). Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmac. Ther*. 54: 195-215.
3. Reader, U., Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol*. 1:17-20.
4. Guevara-Olvera, L., Hung G-Y., Yu J-J., Cole, G. T. (2000). Sequence, expression and functional analysis of the *Coccidioides immitis ODC* (ornithine decarboxylase) gene. *Gene*. 242: 437-448.