

Identificación de *Yarrowia lipolytica* (Ascomycota: Hemiascomycetes) como contaminante en la obtención de amplificadores del gen 28S rRNA de moluscos

Identification of *Yarrowia lipolytica* (Ascomycota: Hemiascomycetes) as a contaminant in obtaining amplified 28S rRNA gene of mollusks

Jenny Chirinos^{1,2}, Carlos Congrains^{1,2}, Rina Ramírez^{1,2}, Pablo Ramírez³

1 Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2 Departamento de Malacología y Carcinología, Museo de Historia Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Av. Arenales 1256, Apartado 14-0434, Lima-14, Perú.

3 Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Email Jenny Chirinos:
jennymartha.2609@gmail.com,
Email Rina Ramírez:
rina_rm@yahoo.com

Trabajo presentado a la XVIII Reunión Científica del Instituto de Investigaciones en Ciencias Biológicas Antonio Raimondi, "200 años del nacimiento de Charles Darwin y el 150 aniversario de la publicación de On the Origin of Species by Means of Natural Selection". Del 19 al 21 de agosto de 2009.

Publicado impreso: 20/10/2010
Publicado online: 29/09/2010

Introducción

Las técnicas moleculares basadas en el análisis del DNA constituyen herramientas muy poderosas que permiten establecer las relaciones filogenéticas y la identificación de especies. La técnica de PCR emplea *primers* universales y específicos para amplificar genes o segmentos de genes, siendo los primeros muy conservados en un amplio rango de especies (Liew et al. 1998, Palumbi 1996).

El gen RNA ribosomal (rRNA) está presente en todas las especies existentes y presumiblemente se remonta a las primeras formas de vida, por lo tanto, reflejaría la historia evolutiva de la vida y dilucidaría las relaciones evolutivas entre todas las especies de la tierra (Pace 1997). La unidad repetitiva del rDNA presenta diferentes regiones que varían en su tasa de mutación, proporcionando información para el análisis filogenético de poblaciones, especies y niveles taxonómicos superiores (Jorgensen & Cluster 1988, Schaal & Learn 1988). Las regiones codificantes constituyen secuencias muy conservadas y poseen la tasa más baja de divergencia. Los ITS muestran un nivel intermedio de variabilidad, mientras que los IGS presentan las regiones de evolución más rápida (Zhou et al. 1996). El rRNA constituye el componente estructural de los ribosomas. En moluscos, la subunidad mayor del rRNA nuclear es el 28S, mientras que en hongos es 25S-28S. Estudios realizados por Markmann y Tautz (2005), proponen a la región D3-D5 del 28S rRNA como marcador adecuado en la discriminación de una amplia gama de taxa. Los *primers* empleados en dicho estudio parecen ser universalmente aplicables a todos los taxa eucariotas. Sugieren además, que la región que comprende los dominios D1 y D2 podría discriminar taxa muy estrechamente relacionados.

Resumen

En el presente trabajo se identifica una secuencia de DNA no esperada proveniente de los amplificadores del gen 28S rRNA de moluscos terrestres. Las extracciones de DNA se realizaron del tejido del pie de caracoles terrestres por el método del CTAB modificado. Las PCR fueron llevadas a cabo con *primers* universales para el gen COI e iniciadores diseñados para moluscos, para el marcador 16S rRNA, 28S rRNA y la región ITS-2. Los tamaños aproximados de las bandas de los amplificadores de moluscos fueron de 706 pb para el COI, 330 pb para el 16S rRNA, 900 pb para el ITS-2 y 583 pb para el 28S rRNA; un amplificado del último marcador fue de una longitud inesperada, ~340 pb. Las secuencias de DNA fueron comparadas con la base de datos del GenBank mediante el programa BLASTn y la muestra con la banda de tamaño inesperado resultó en un 100% de identidad y cobertura del 99% con el gen 26S rRNA de la levadura *Yarrowia lipolytica*. El análisis filogenético con *Neighbour-Joining* y los valores de divergencia confirmaron la identificación, proporcionando resultados que apoyan la ubicación taxonómica de la especie dentro del clado de los Hemiascomycetes.

Palabras claves: 26S rRNA, Gastropoda, fungi, código de barras de DNA.

Abstract

In this paper we identify an unexpected DNA sequence from the amplicons of 28S rRNA gene of terrestrial mollusks. DNA extractions were performed from foot tissues of land snails using a modified CTAB protocol. PCRs were carried out with universal primers for COI gene and oligonucleotides designed for molluscs, for the markers 16S rRNA, 28S rRNA, and ITS-2. Amplified lengths were 706 pb for COI, 330 pb for 16S rRNA, 900 pb for ITS-2, and 583 pb for 28S rRNA. One amplicon of the last marker was of an unexpected length, ~340 pb. DNA sequences were compared in the GenBank database through the BLASTn program and the sample, with the unexpected length, resulted in 100% identity and 99% query coverage with 26S rRNA gene of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Phylogenetic analysis with *Neighbour-Joining* and the divergence values confirmed the identification, providing results that support the taxonomic placement of the species within the Hemiascomycetes clade.

Keywords: 26S rRNA, Gastropoda, fungi, DNA barcode.

El tipo de RNA más abundante en las células es el ribosomal. Los hongos poseen cien o más copias de genes ribosomales en su genoma (Maleszka & Clark-Walker 1993). Esta característica, aunada a la naturaleza altamente conservada de la molécula y a la alta sensibilidad de la técnica de PCR, puede conducirnos a resultados falso-positivos, en casos de contaminación con DNA de levaduras.

En el presente trabajo, mediante métodos *in silico*, es identificada una secuencia de DNA no esperada en los amplificadores del gen 28S rRNA de moluscos.

Materiales y métodos

Entre los meses de enero y junio de 2009, en el laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima-Perú), se obtuvieron amplificadores de DNA nuclear y mitocondrial de distintas especies de moluscos terrestres de la familia Scolodontidae y de los géneros *Megalobulimus* (Megalobulimidae) y *Bostryx* (Orthalicidae).

Se realizaron extracciones de DNA empleando una modificación del método del CTAB (Ramírez 2004). Para la remoción de las proteínas se utilizó cloroformo-alcohol isoamílico (96:4). El DNA fue precipitado usando etanol absoluto frío y acetato de amonio. El *pellet* obtenido fue lavado en alcohol absoluto y secado a temperatura ambiente. Luego se resuspendió en agua bidestilada y finalmente fue conservado a -20 °C.

La amplificación de las secuencias siguió el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al. 1988). Las PCR fueron realizadas con *primers* universales para el gen mito-

condrial COI (Folmer 1994) e iniciadores diseñados específicamente para moluscos, para el marcador de los genes ribosomales mitocondrial, 16S rRNA (Ramírez 2004) y nucleares, 28S rRNA y la región ITS-2 (Wade & Mordan 2000).

La detección de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis submarina en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X. Las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador y sus tamaños fueron determinados por comparación con un marcador de tamaño molecular *GeneRuler 100bp DNA Ladder* (Fermentas).

Los amplificados fueron purificados y secuenciados en Macrogen USA (<http://www.macrogenusa.com/>). La muestra problema, codificada como cP13, fue secuenciada con el *primer* LSU4. Dicha secuencia se obtuvo de un amplificado con los *primers* LSU2 y LSU4, para el 28S rDNA de un individuo de *Systrophia eatoni* (Gastropoda, Scolodontidae), una especie procedente del bosque tropical lluvioso del Departamento de Madre de Dios (Perú); posteriormente se obtuvo de este mismo espécimen un segmento amplificado del tamaño esperado. Los electroferogramas, obtenidos en formato AB1, fueron evaluados con ayuda del programa Chromas (McCarthy 1996). Las

Tabla 1. Especies de levaduras ascomicetas y caracol terrestre, con país de procedencia y número de accesión en el GenBank, para secuencias de LSU rDNA empleadas en el presente estudio.

Especie	País	Nº accesión	Gen rRNA
Fungi, Ascomycetes:			
Clado Hemiascomycetes (Orden Saccharomycetales)			
<i>Candida albicans</i>	España	FJ627956	26S
<i>Candida deformans</i>	Australia	EF405984	26S
<i>Candida glabrata</i>	Bélgica	FN393990	26S
<i>Candida tropicalis</i>	Bulgaria	HM627137	26S
<i>Clavispora lusitaniae</i>	China	GQ179987	26S
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Reino Unido	FM200044	26S
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	China	GU565207	26S
<i>Lachancea thermotolerans</i>	China	HM191681	26S
<i>Pichia angusta</i>	EE.UU.	U75524	26S
<i>Pichia anomala</i>		U74592	26S
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tanzania	FJ972219	26S
<i>Saccharomyces servazzii</i>	China	GQ227689	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	China	AJ616903	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Países Bajos	AM268436	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Francia	AM268457	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Rusia	AM268458	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Antártica	EU304244	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Reino Unido	FM212452	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	China	FJ357148	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	China	FJ480852	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	China	FJ219597	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	China	GQ121611	26S
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Bulgaria	HM627078	26S
<i>Zygoascus hellenicus</i>	Tailandia	AB557757	26S
cP13 *	Perú	HQ148659	26S
Fungi, Ascomycetes: clado Archiascomycete			
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		AY048171	26S
Mollusca, Gastropoda, Scolodontidae			
<i>Systrophia eatoni</i> *	Perú: Dpto. Madre de Dios	HM116229	28S

*Secuencias obtenidas en el presente estudio.

secuencias editadas fueron comparadas con la base de datos del GenBank en el programa BLASTn (Altschul et al. 1997). La secuencia en estudio está depositada en el GenBank con el número de accesión HQ148659, así como la del molusco *Systrophia eatoni* (HM116229).

Para el análisis filogenético, se levantó un total de 24 secuencias de especies de levaduras (Tabla 1) de la base de datos del GenBank. Las secuencias fueron sometidas a alineamiento múltiple usando el programa ClustalX2 (Larkin et al. 2007). Para la presentación de alineamientos de las figuras 2 y 3 se usó el programa BOXSHADE 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). El programa MEGA v4.0 (Tamura et al. 2007) se usó para la obtención de la frecuencia de bases nucleotídicas, distancias genéticas, reconstrucción filogenética por el método *Neighbour-Joining* (NJ) con corrección de distancias genéticas con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2-parámetros (Kimura 1980), y el método de *bootstrap* con 1000 réplicas para evaluación de la consistencia del árbol filogenético. Los *gaps* no fueron considerados en la obtención de la filogenia; el árbol fue enraizado con una secuencia del archiascomyceto *Schizosaccharomyces pombe*, siguiendo a Kurtzman y Robnett (1998).

Resultados

Los tamaños de las bandas obtenidas en la amplificación de marcadores mitocondriales, fueron de 706 pb para el COI y alrededor de 330 pb para el 16S rRNA. Para los marcadores nucleares, se amplificaron segmentos de alrededor de 900 pb para el ITS-2 y 583 pb para el 28S rRNA, evidenciando para este último marcador una muestra de tamaño inesperado con ~340 pb (Fig. 1). Luego de contrastar las secuencias con la base de datos del GenBank, sólo la muestra con la banda de tamaño inesperado

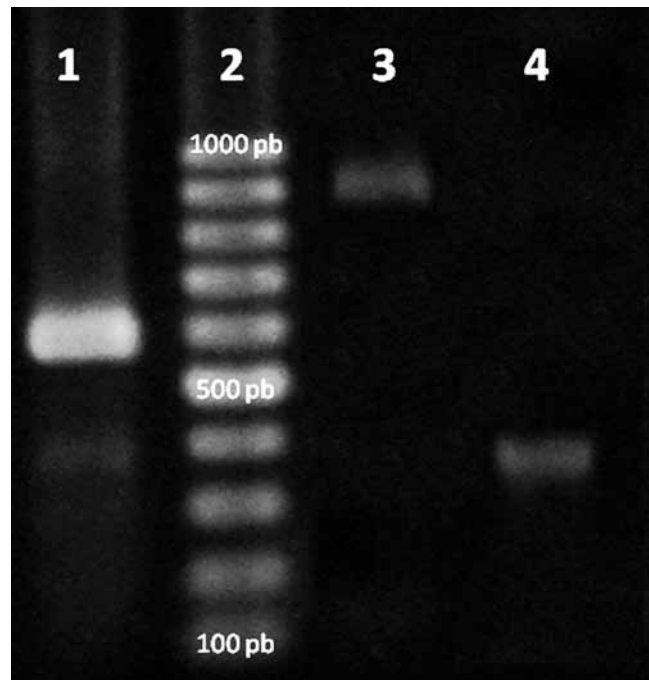


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de amplificadores de caracoles terrestres de la familia Scolodontidae. En el carril 1 se observa una banda de DNA correspondiente al amplificado del gen 28S rRNA con 583 pb, el carril 2 es el marcador de tamaño molecular, el carril 3 corresponde a secuencias de la región ITS-2 de aproximadamente 900 pb, y el carril 4 corresponde a amplificadores de la secuencia reportada con aproximadamente 340 pb.

```

Yarrowia lipolytica FJ219597 GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGC
Yarrowia lipolytica EU304244 GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGC
Yarrowia lipolytica GQ121611 GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGC
Yarrowia lipolytica FJ357148 GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGC
Yarrowia lipolytica AJ616903 GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGC
Yarrowia lipolytica HM627078 GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGC
cP13 HQ148659 GGGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGC
Systrophia eatoni HM116229 GGGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGC
    
```

Figura 2. Alineamiento en ClustalX2 de dos secuencias obtenidas con los *primers* específicos para el gen 28S rRNA de moluscos, junto con secuencias del gen 26S rRNA de la levadura ascomiceta *Yarrowia lipolytica* obtenidas del GenBank. El recuadro corresponde al *primer forward* LSU2 en la secuencia en estudio (cP13) y en el caracol terrestre. Los sitios variables están sombreados. Los códigos corresponden a números de acceso de las secuencias en el GenBank.

```

Yarrowia lipolytica FJ219597 AATCCAC---CCATTTACCCGTCCTTGAAG-ACGGACCCAAAATATGTAA
Yarrowia lipolytica EU304244 AATCCAC---CCATTTACCCGTCCTTGAACACGGACC-----
Yarrowia lipolytica GQ121611 AATCCAC---CCATTTACCCGTCCTTGAACACGGACC-----
Yarrowia lipolytica FJ357148 AATCCAC---CCATTTACCCGTCCTTGAACACGGACAAA-----
Yarrowia lipolytica AJ616903 AATCCAC---CCATTTACCCGTCCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAAT
Yarrowia lipolytica HM627078 AATCCAC---CCATTTACCCGTCCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAAT
cP13 HQ148659 AATCCAC-----
Systrophia eatoni HM116229 TGTCTGGCATTCCACCCGACCCGTCCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAAC
    
```

Figura 3. Alineamiento en ClustalX2 de dos secuencias obtenidas con los *primers* específicos para el gen 28S rRNA de moluscos, junto con secuencias del gen 26S rRNA de la levadura ascomiceta *Yarrowia lipolytica* obtenidas del GenBank. El recuadro corresponde a la reversa complementaria del *primer reverse* LSU4 en la secuencia del caracol terrestre; el amplificado cP13 fue secuenciado con este primer por lo que falta nucleótidos de su extremo 3'. Los sitios variables están sombreados. Los códigos corresponden a números de acceso de las secuencias en el GenBank.

(cP13) no fue identificada como gastrópodo, mostrando un porcentaje de identidad del 100% y cobertura del 99% con el gen 26S rRNA de la levadura *Yarrowia lipolytica* (GQ121611). Los *primers* que flanquean tal fragmento se ubican en los sitios 252–271 (LSU2) y 599–580 (LSU4) de la secuencia completa del gen 26S rRNA de *Yarrowia lipolytica* (AJ616903); ambos *primers* difieren en un solo nucleótido de sus extremos 5' con esta secuencia de *Y. lipolytica* (Figs. 2 y 3).

La secuencia de 583 pb del gen 28S rRNA del molusco terrestre *Systrophia eatoni* (HM116229) tiene sus extremos coincidentes con dos regiones conservadas del gen 26S rRNA de la levadura ascomiceta *Yarrowia lipolytica*, 138 sitios en su extremo 5' y apenas 40 sitios en su extremo 3' (Figs. 2 y 3).

El alineamiento de la secuencia problema junto con otras 24 secuencias del gen 26S rRNA de levaduras ascomicetas obtenidas del GenBank constó de 342 sitios (sólo incluye el primer LSU2), con 157 sitios conservados y 178 sitios variables, de los cuales 138 correspondieron a sitios parsimoniosamente informativos. En cuanto al contenido nucleotídico, la secuencia cP13 presenta 20,2% de timina, 20,5% de citosina, 29% de adenina y 30% de guanina, semejante al de *Y. lipolytica*, con un alto contenido de C+G (51%) para el gen 26S rRNA, a diferencia de la de otras levaduras (Tabla 2).

El árbol filogenético NJ mostró un clado muy robusto que agrupó las secuencias de la especie *Yarrowia lipolytica* y la secuencia en estudio con un valor de *bootstrap* del 99% (Fig. 4).

En relación a la distancia genética, la secuencia cP13 presenta una mínima divergencia (0,3%) con la especie *Yarrowia lipolytica* y un 10,7% con *Candida deformans*; con las demás tiene una alta divergencia que varía de 36,2% (*Candida albicans*) a 45,5% (*Schizosaccharomyces pombe*) (Tabla 3).

Tabla 2. Frecuencias nucleotídicas (%) y tamaño de secuencias del gen 26S rRNA de levaduras ascomicetas empleadas en el presente estudio.

	T	C	A	G	Total
cP13 HQ148659 *	20,2	20,5	29,0	30,3	307
<i>Yarrowia lipolytica</i> AM268457	20,2	20,5	29,3	30,0	307
<i>Yarrowia lipolytica</i> EU304244	20,2	20,5	29,3	30,0	307
<i>Yarrowia lipolytica</i> AM268458	20,2	20,5	29,3	30,0	307
<i>Yarrowia lipolytica</i> AJ616903	20,5	20,5	29,2	29,9	308
<i>Yarrowia lipolytica</i> HM627078	20,1	20,5	29,2	30,2	308
<i>Yarrowia lipolytica</i> GQ121611	20,2	20,5	29,3	30,0	307
<i>Yarrowia lipolytica</i> FJ357148	20,2	20,5	29,3	30,0	307
<i>Yarrowia lipolytica</i> FJ219597	20,2	20,5	29,3	30,0	307
<i>Yarrowia lipolytica</i> FM212452	20,2	20,5	29,3	30,0	307
<i>Yarrowia lipolytica</i> FJ480852	20,2	20,5	29,3	30,0	307
<i>Yarrowia lipolytica</i> AM268436	20,2	20,5	29,3	30,0	307
<i>Candida deformans</i> EF405984	23,4	17,5	31,4	27,7	303
<i>Clavispora lusitanae</i> GQ179987	20,8	18,8	29,2	31,3	288
<i>Zygoascus hellenicus</i> AB557757	25,5	14,5	32,4	27,7	318
<i>Candida albicans</i> FJ627956	23,6	17,1	27,0	32,3	322
<i>Candida tropicalis</i> HM627137	27,1	14,6	27,4	30,8	321
<i>Debaryomyces hansenii</i> FM200044	27,6	15,2	27,6	29,7	323
<i>Pichia anomala</i> U74592	28,9	14,5	28,0	28,6	325
<i>Pichia angusta</i> U75524	28,3	14,5	28,3	28,9	318
<i>Candida glabrata</i> FN393990	22,1	18,8	27,3	31,8	330
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FJ972219	25,9	15,1	29,0	29,9	324
<i>Saccharomyces servazzii</i> GQ227689	24,2	17,1	28,0	30,7	322
<i>Kluyveromyces marxianus</i> GU565207	25,3	14,8	29,0	31,0	297
<i>Lachancea thermotolerans</i> HM191681	24,1	16,4	28,4	31,2	324
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> AY048171	25,6	15,0	29,4	30,0	340

*Secuencia obtenida en el presente estudio.

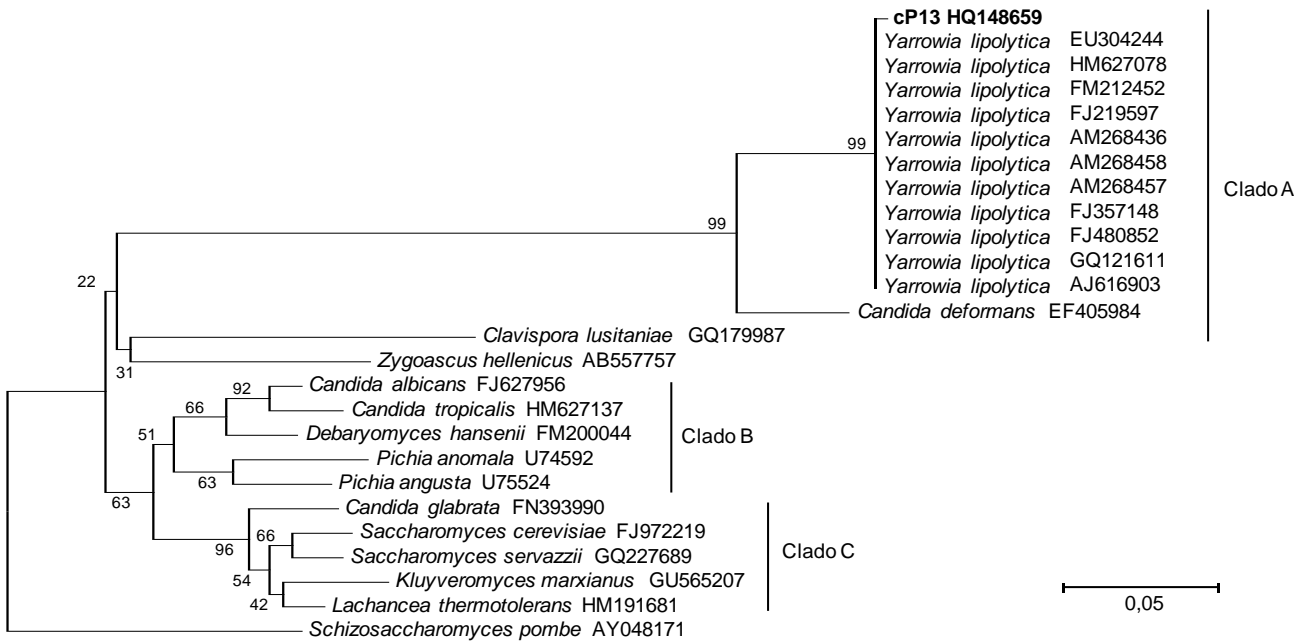


Figura 4. Árbol filogenético NJ basado en un segmento de los dominios D1/D2 del gen 26S rRNA de levaduras ascomicetas, enraizado con *S. pombe*. Se muestran los valores de *bootstrap*; la escala representa 5% de distancia. El taxon al que corresponde la secuencia reportada en este estudio (cP13 HQ148659) forma parte del clado de la especie *Yarrowia lipolytica*. Los clados A-C corresponden a grupos monofiléticos formados con las secuencias completas de los dominios D1/D2 (Kurtzman & Robnett 1998).

Discusión

Yarrowia lipolytica es el único taxón conocido del género. Según estudios realizados con el gen 18S rRNA (Barns et al. 1991) y el gen 26S rRNA (Kurtzman y Robnett 1998; Kurtzman y Robnett 1995) se ha demostrado que la especie se encuentra dentro del linaje Hemiascomycetes, que contiene grupos de levaduras ascomicotas muy divergentes, las cuales difieren en varias propiedades, tales como el alto contenido de C+G en el DNA nuclear (Kurtzman & Fell 1998), y en la organización genómica única de los genes del rRNA (Fournier et al. 1986). Sin embargo, posee regiones conservadas coincidentes con el gen 28S rRNA de moluscos, lo que permitió su amplificación

con los *primers* LSU2 y LSU4 (Wade & Mordan 2000), como lo aquí reportado.

En el análisis filogenético NJ, la secuencia problema (cP13) se ubicó en el clado de *Yarrowia lipolytica*. Ello indicaría que el segmento de 340 pb obtenido de entre amplificadas del marcador 28S rRNA de moluscos terrestres corresponde al gen 26S rRNA de *Yarrowia lipolytica*. Al mismo tiempo, este segmento que corresponde parcialmente a los dominios D1 y D2 del gen 26S rRNA, ha sido suficiente como para agrupar a las especies utilizadas en los mismos clados que formaron en una filogenia de los dominios D1/D2 de levaduras ascomicetas, con ~600 pb (Kurtzman & Robnett 1998).

Tabla 3. Distancia genética por delección a pares de secuencias del marcador 26S rRNA de hongos ascomicetos, debajo de la diagonal en número de diferencias y encima con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2p. Las celdas sombreadas corresponden a las comparaciones de la secuencia en estudio (cP13) con *Yarrowia lipolytica*

[1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
[1] cP13 HQ148659		0,003	0,003	0,003	0,107	0,373	0,403	0,362	0,397	0,394	0,436	0,369	0,38	0,389	0,38	0,391	0,377	0,455
[2] <i>Yarrowia lipolytica</i> EU304244	1		0	0	0,104	0,367	0,397	0,356	0,391	0,387	0,43	0,363	0,374	0,383	0,374	0,385	0,371	0,448
[3] <i>Yarrowia lipolytica</i> AJ616903	1	0		0	0,104	0,372	0,401	0,36	0,395	0,392	0,434	0,367	0,378	0,387	0,378	0,389	0,375	0,452
[4] <i>Yarrowia lipolytica</i> HM627078	1	0	0		0,104	0,367	0,397	0,356	0,391	0,387	0,43	0,363	0,374	0,383	0,374	0,385	0,371	0,448
[5] <i>Candida deformans</i> EF405984	30	29	29	29		0,383	0,366	0,34	0,38	0,365	0,359	0,362	0,357	0,372	0,369	0,372	0,37	0,448
[6] <i>Clavispora lusitaniae</i> GQ179987	80	79	80	79	81		0,198	0,189	0,198	0,193	0,216	0,221	0,226	0,234	0,22	0,221	0,237	0,279
[7] <i>Zygoascus hellenicus</i> AB557757	92	91	92	91	85	48		0,244	0,24	0,187	0,225	0,206	0,218	0,213	0,232	0,209	0,219	0,312
[8] <i>Candida albicans</i> FJ627956	86	85	86	85	81	47	65		0,1	0,126	0,17	0,191	0,183	0,185	0,186	0,161	0,201	0,299
[9] <i>Candida tropicalis</i> HM627137	92	91	92	91	88	49	64	30		0,138	0,186	0,18	0,184	0,166	0,151	0,149	0,165	0,281
[10] <i>Debaryomyces hansenii</i> FM200044	91	90	91	90	85	48	52	37	40		0,146	0,172	0,144	0,18	0,177	0,153	0,16	0,284
[11] <i>Pichia anomala</i> U74592	99	98	99	98	85	53	61	48	52	42		0,14	0,202	0,192	0,218	0,188	0,212	0,297
[12] <i>Pichia angusta</i> U75524	86	85	86	85	84	53	57	53	50	48	40		0,185	0,138	0,154	0,161	0,15	0,322
[13] <i>Candida glabrata</i> FN393990	90	89	90	89	85	56	60	52	52	42	57	52		0,11	0,097	0,094	0,099	0,29
[14] <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FJ972219	91	90	91	90	87	56	59	52	47	51	54	40	33		0,052	0,075	0,083	0,316
[15] <i>Saccharomyces servazzii</i> GQ227689	89	88	89	88	86	53	63	52	43	50	60	44	29	16		0,088	0,062	0,318
[16] <i>Kluyveromyces marxianus</i> GU565207	87	86	87	86	83	54	53	43	40	41	49	42	26	21	24		0,094	0,25
[17] <i>Lachancea thermotolerans</i> HM191681	89	88	89	88	87	57	60	56	47	46	59	43	30	25	19	26		0,309
[18] <i>Schizosaccharomyces pombe</i> AY048171	103	102	103	102	101	67	81	79	75	76	79	83	79	83	83	63	82	

Las estrategias de identificación basadas en secuencias constituyen el nuevo *gold standard* en la identificación de especies (Hebert et al. 2003, Hajibabaei et al. 2006). El *DNA barcoding* es una nueva técnica de diagnóstico molecular que emplea una corta secuencia de DNA para la identificación a nivel de especie (CBOL: www.barcoding.si.edu). En el presente, la metodología que emplea esta técnica se basa en la asignación de identidad referida a una mínima distancia genética con la secuencia consultada (Ratnasingham & Hebert 2007). En este contexto, se han propuesto valores estimativos para el mtDNA del 1–2% de variación intraespecífica y valores mayores para separar especies. Estudios utilizando la región D1/D2 del gen 26S rRNA para identificar especies de *Candida* mostraron un rango de variación de 0 a 2 nucleótidos (Kurtzman & Robnett, 1997), menos del 1% de divergencia en *Issatchenkia*, *Pichia* y *Saccharomyces* (Peterson & Kurtzman, 1991). Aunque al presente aun no hay consenso en el marcador “universal” para obtener código de barras de DNA en hongos, la región D1/D2 del 26S rDNA ofrece buena resolución en análisis filogenéticos (Kurtzman & Robnett 1998), y sirvió, en este trabajo, también para identificar un fragmento de 307 pb, que fue prácticamente idéntico al de *Yarrowia lipolytica*, con apenas 0,3% de divergencia. Cabe mencionar que la especie *Candida deformans* se mostró muy relacionada a *Yarrowia lipolytica* y a la secuencia problema, tanto en el árbol filogenético NJ, como en los valores de divergencia (10,4 y 10,7%, respectivamente). Mediante comparaciones fenotípicas, *Candida deformans* fue considerada como un sinónimo de *Y. lipolytica* (Kurtzman & Fell 1998; Barnett et al. 2000). Los resultados del presente estudio demuestran que *Y. lipolytica* y *C. deformans* forman taxa diferentes aunque muy relacionados, coincidente con lo obtenido por Bigey et al. (2003) y Knutsen et al. (2007). Además, sugieren un claro ejemplo de la utilidad del *DNA Barcoding* en la identificación de especies pertenecientes a taxa difícilmente diagnosticables sobre la base morfológica.

Yarrowia lipolytica es un habitante común de materia en descomposición y tiene una amplia distribución geográfica y de hábitats, tal como lo evidencia el trabajo realizado por Knutsen et al. (2007). Su población puede verse incrementada en condiciones de humedad elevada. Aunque este factor pudo haber influenciado en los resultados obtenidos en este estudio, no fue determinante, ya que de un total de 60 amplificadores empleando DNA de moluscos terrestres, 10 de ellos designados para el marcador 28S rRNA, sólo se detectó un caso de contaminación. Sin embargo, cabe la posibilidad de que haya sido un contaminante que estuvo en el pie del caracol (*Systrophia eatoni*), y que aun luego de los lavados con etanol 96° no fue removido. Un caso semejante ha sido reportado entre amplificadores de las regiones ITS y 5,8S del rDNA de bambús (Bambuseae) con hongos no-ascomycetos, por lo que los autores remarcan la posibilidad de amplificaciones por PCR de DNAs contaminantes en estudios filogenéticos, particularmente cuando son usados *primers* universales (Zhang et al. 1997).

Agradecimientos

Este trabajo fue parte del proyecto 091001041, financiado por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Agradecemos a V. Borda por la edición de las figuras.

Literatura Citada

- Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Barnett J.A., R.W. Payne & D. Yarrow. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press. 1138 pp.
- Barns S.M., D.J. Lane, M.L. Sogin, et al. 1991. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J. Bacteriol.* 173: 2250–2255.
- Bigey F., K. Tuery, D. Bougard, et al. 2003. Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. *Yeast.* 20: 233-248.
- Consortium for the Barcode of Life (CBOL). 2004. (en línea). www.barcodinglife.si.edu
- Folmer O., M. Black, W. Hoen, et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molec. Mar. Biol. Biotech.* 3: 294-299.
- Fournier P., C. Gaillardin, M.C. Persuy, et al. 1986. Heterogeneity in the ribosomal family of the yeast *Yarrowia lipolytica*: genomic organization and segregation. *Gene* 42: 273–282.
- Hajibabaei M., M.A. Smith, D.H. Janzen, et al. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 6: 959-964.
- Hebert P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. deWaard. 2003. Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. SerB.* 270(1512): 313-321.
- Jorgensen R.A. & P.D. Cluster. 1988. Modes and tempos in the evolution nuclear ribosomal DNA: New characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 1238-1247.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Knutsen A.K., V. Robert, G.A. Poot, et al. 2007. Polyphasic re-examination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. and *Candida hollandica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2426-2435.
- Kurtzman C.P. & C.J. Robnett. 1995. Molecular relationships among hyphal ascomycetous yeasts and yeastlike taxa. *Can. J. Bot.* 73: S824-S830.
- Kurtzman C.P. & C.J. Robnett. 1997. Identification of clinically important Ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the Large-Subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35(5):1216–1223.
- Kurtzman C.P. & C.J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73: 331–371.
- Kurtzman C.P. & J.W. Fell. 1998. *The Yeasts: a Taxonomic Study*. 4th edn. Amsterdam: Elsevier. 1075 pp.
- Larkin M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- Liew E.C.Y., L.D. Guo, V.M. Ranghoo, et al. 1998. Molecular approaches to assessing fungal diversity in the natural environment. *Fungal Diversity* 1: 1-17.
- Maleszka R. & G.D. Clark-Walker. 1993. Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast* 9: 53-58.
- Markmann, M. & D. Tautz, 2005. Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1917-1924.
- McCarthy C. 1996. *Chromas: version 1.3*. Griffith University, Brisbane, Australia.

- Pace N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734–740.
- Palumbi S. R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: D.H. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable, eds. *Molecular systematics*. 2nd edition. Sinauer, Sunderland, Mass. Pp. 205-247.
- Peterson S.W., & C.P. Kurtzman. 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 14:124–129.
- Ramírez R. 2004. *Sistemática e Filogeografia dos Moluscos do Ecossistema de “Lomas” do Deserto da Costa Central do Peru*. Tese de Doutorado em Zoologia. PURS, Brasil.
- Ratnasingham S. & P.D.N. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes.* 7: 355–364.
- Saiki R., D. Gelfand, S. Stoffel, et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- Schaal B.A. & G.H. Learn Jr. 1988. Ribosomal DNA variation within and among plant populations. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75:1207-1216.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Wade C.M. & P.B. Mordan. 2000. Evolution within the Gastropod molluscs; using the ribosomal RNA gene cluster as an indicator of phylogenetic relationships. *J. Mollus. Stud.* 66(4): 565-570.
- Zhang W., I.F. Wendel & L.G. Clark. 1997. Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 8: 205-217.
- Zhou Y., Y.-P. Zou, D.-Y. Hong & Sh.-Y. Chen. 1996. ITS1 sequences of nuclear ribosomal DNA in wild and cultivated rice of China and their phylogenetic implications. *Acta. Bot. Sin.* 38: 785-791.