



Revista MINERVA

Plataforma digital de la revista: <https://minerva.sic.ues.edu.sv>

Nota Técnica | Technical Note

Evaluación de un protocolo de extracción de ADN mínimamente destructivo en *Canthon sp.* (Coleoptera) y *Oxytrigona sp.* (Hymenoptera)

Evaluation of a Minimally Destructive DNA Extraction Protocol in *Canthon sp.* (Coleoptera) and *Oxytrigona sp.* (Hymenoptera)

Guillermo Alejandro Bonilla Saz^{1,3}, Nelson René Linares Hernández^{1,4}, Jonathan Alexis Rivera Méndez^{1,5}, Roberto Antonio Navarro Linares^{1,2,6}

- 1 Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de El Salvador
- 2 Grupo de Investigación en Bioinformática Estructural, Biomodelos y Biomarcadores
- 3  <https://orcid.org/0009-0004-9356-934X>
- 4  <https://orcid.org/0009-0008-9685-5500>
- 5  <https://orcid.org/0009-0008-6717-7202>
- 6  <https://orcid.org/0009-0003-7196-3365>

RESUMEN

Los insectos constituyen el grupo de animales más diverso del planeta y su identificación precisa es esencial para investigaciones en conservación, agricultura y taxonomía. En este contexto, las técnicas moleculares basadas en ADN representan una herramienta de gran valor para su estudio, estas herramientas se ven limitadas en especímenes preservados en colecciones, ya que los protocolos de extracción suelen ser invasivos y afectan la integridad del cuerpo del insecto. El presente estudio evaluó un protocolo de extracción de ADN mínimamente destructivo en dos géneros: *Canthon sp.* (Coleoptera) y *Oxytrigona sp.* (Hymenoptera). Se emplearon un total de 20 especímenes, procesados mediante una modificación del método descrito por Paydar et al. (2018), la calidad del ADN se determinó por espectrofotometría midiendo concentración y relaciones de pureza A260/A280 y A260/A230. Los resultados mostraron un desempeño notablemente superior en *Canthon sp.*,

DOI: <https://doi.org/10.66778/RM.v09ed01.14>

Enviado: 8 de abril de 2025
Aceptado: 2 de febrero de 2026

Palabras clave: No invasivo, identificación molecular, colecciones de museo, Hymenoptera, Coleoptera, SDS, CTAB, insecto.

Keywords: Noninvasive, molecular identification, museum collections, Hymenoptera, Coleoptera, Lepidoptera.



Este contenido está protegido bajo la licencia CC BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

con concentraciones de hasta 563.2 ng/μl y cocientes de pureza dentro de los valores de referencia, mientras que *Oxytrigona* sp. presentó concentraciones mucho más bajas (<3 ng/μl en la mayoría de los casos) y valores de pureza inadecuados. Estas diferencias pueden atribuirse tanto a la composición del exoesqueleto como a la formulación del tampón utilizado, tal como han señalado estudios previos. En conclusión, el protocolo adaptado resulta eficaz para escarabajos, ofreciendo una alternativa no destructiva para el análisis molecular de especímenes de colecciones, aunque requiere ajustes para su aplicación en himenópteros.

ABSTRACT

Insects constitute the most diverse group of animals on the planet, and their accurate identification is essential for research in conservation, agriculture, and taxonomy. In this context, DNA-based molecular techniques represent a highly valuable tool for their study; however, these tools are limited when working with specimens preserved in collections, as extraction protocols are often invasive and compromise the integrity of the insect body. The present study evaluated a minimally destructive DNA extraction protocol in two genera: *Canthon* sp. (Coleoptera) and *Oxytrigona* sp. (Hymenoptera). A total of 20 specimens were processed using a modification of the method described by Paydar et al. (2018). DNA quality was determined by spectrophotometry, measuring concentration and purity ratios A260/A280 and A260/A230. The results showed a markedly superior performance in *Canthon* sp., with concentrations of up to 563.2 ng/μl and purity ratios within the reference values, whereas *Oxytrigona* sp. yielded much lower concentrations (<3 ng/μl in most cases) and inadequate purity values. These differences can be attributed both to exoskeleton composition and to buffer formulation, as noted in previous studies. In conclusion, the adapted protocol proves effective for beetles, offering a non-destructive alternative for the molecular analysis of collection specimens, although adjustments are required for its application in hymenopterans.

INTRODUCCIÓN

Los insectos son considerados el grupo de animales más exitoso del planeta, contando con al menos 1,060,328 especies descritas (Eggleton, 2020). Se piensa que parte de esta riqueza se origina debido a sus hábitos de vida variados, que van de la mano con una historia prolongada de más de 400 millones de años, con escasa respuesta a las extinciones masivas (Amat-García y Fernández, 2011). La descripción e identificación precisa en este grupo resulta ser bastante importante para futuros investigaciones con diversos enfoques, como lo pueden ser la conservación de especies (Giordani

et al., 2023), de su impacto en la agricultura (Kaur et al., 2022), o para su propia identificación taxonómica (Patzold et al., 2020). Si bien tradicionalmente se usan técnicas morfológicas para su identificación taxonómica, en años recientes se ha dado mayor interés a métodos de identificación basados en el ADN, que ofrecen mayor precisión y rapidez en la identificación de un espécimen (Yang et al., 2021). Las colecciones de insectos preservados son un recurso de incalculable valor para la realización de dicho tipo de estudios, ya que ofrecen una amplia fuente de muestras de distintas especies, locaciones geográficas y momentos temporales (Korlević et al., 2021). La mayoría de los protocolos de extracción de ADN requieren una intervención invasiva del espécimen, lo que afecta la morfología de las muestras, empobreciendo así dichas colecciones, por lo que es importante el desarrollo de protocolos poco destructivos que garanticen la preservación de estas. Es por estos motivos que la presente investigación busca la adecuación de un protocolo de extracción de ADN mínimamente destructivo puesto a prueba en muestras de dos géneros pertenecientes a ordenes de insectos de importancia ecológica y comercial *Canthon* sp. (Coleoptera) y *Oxytrigona* sp. (Hymenoptera).

METODOLOGÍA

Obtención de los especímenes

Diez especímenes de *Oxytrigona* sp. “abeja sin aguijón” y diez especímenes de *Canthon* sp. “escarabajo pelotero” fueron donados como excedentes de cajas entomológicas preparadas por estudiantes de la Escuela de Biología, capturados de manera directa en el campus central de la Universidad de El Salvador entre febrero y mayo del 2025. Se utilizó el método de eutanasia por congelación para sacrificar a los especímenes, posteriormente fueron colocados en un desecador de laboratorio relleno con gel de sílice por dos días, una vez deshidratados, los insectos fueron almacenados en frascos de vidrio.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología de la Universidad de El Salvador, empleando una modificación del protocolo descrito por Paydar et al. (2018). Para ello, cada espécimen se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 ml al que se adicionaron 1,000 μl de buffer de digestión (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 1 M, CTAB 2%, β-mercaptoetanol 2%) y 100 μl de SDS al 10%, incubándose a 70 °C durante 60 minutos con agitación suave cada 5 minutos.

Concluida la incubación, se retiraron los cuerpos de los insectos y los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 5 minutos, recuperándose 800 µl del sobrenadante, los cuales se transfirieron a un nuevo microtubo junto con 400 µl de NaCl 5 M y 400 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos hasta formar una emulsión y luego se centrifugó a 5,000 rpm por 10 minutos para separar las fases; de la fase acuosa se tomaron cuidadosamente 700 µl, evitando la interfase orgánica y se trasladaron a un microtubo de 1.5 ml. A continuación, se añadieron 700 µl de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos, lo que permitió precipitar y compactar el ADN, lo que facilita el descarte del sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se decantó, el proceso se repitió dos veces y se dejó secar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en 100 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM) y se almacenó a 4 °C hasta su posterior análisis. Las extracciones se realizaron en cinco individuos de cada género, realizándose una réplica, para un total de 20 individuos, se utilizó el código Esc para los especímenes de *Canthon sp.* y Ab para los especímenes de *Oxytrigona sp.*

Determinación de la calidad del ADN

La calidad del ADN se evaluó mediante espectrofotometría en un Nano Espectrofotómetro UV/Vis Nabi NB1-H, registrando las absorbancias a 260, 280 y 230 nm. A partir de estos valores se calcularon las relaciones A260/A280 y A260/A230,

empleadas como indicadores de pureza respecto a contaminación por proteínas y por compuestos orgánicos o sales, respectivamente. Valores de A260/A280 próximos a 1.8 y de A260/A230 en el rango de 2.0 a 2.2 se consideran característicos de ADN de alta calidad. Adicionalmente, la concentración de ADN se determinó a partir de la absorbancia a 260 nm, tomando como referencia que una absorbancia de 1.0 equivale a 50 µg/ml de ADN bicatenario (Promega, 2025).

RESULTADOS

Las mediciones obtenidas por medio de espectrofotometría mostraron diferencias notables entre las muestras de *Canthon sp.* (Esc) y *Oxytrigona sp.* (Ab). Las muestras de escarabajos presentaron, en general, concentraciones de ADN significativamente más altas, con valores que oscilaron entre 30.1 y 563.2 ng/µl. Entre estas, las muestras Esc7 y Esc10 destacaron por alcanzar las concentraciones más elevadas (563.2 y 446.5 ng/µl, respectivamente), con cocientes A260/A280 cercanos a 1.9 y valores de A260/A230 dentro o próximos al rango óptimo, lo que indica una muy buena calidad del ADN aislado. Sin embargo, algunas muestras como Esc8 y Esc9 mostraron concentraciones intermedias acompañadas de cocientes A260/A230 bajos (1.4 y 1.3, respectivamente), lo que sugiere la presencia de contaminantes orgánicos o sales. Por otro lado, las muestras con menor concentración (Esc3 y Esc6) mostraron cocientes A260/A280 adecuados, aunque Esc6 presentó un valor de A260/A230 de 1.59, lo que evidencia la persistencia de impurezas.

Tabla 1

Lecturas de espectrofotometría de tratamientos evaluados

Muestra	Conc. (ng/µl)	A260/280	A260/230	Muestra	Conc. (ng/µl)	A260/280	A260/230
Esc1	248.418	1.920	2.151	Ab1	0.638	1.927	0.334
Esc2	235.436	1.944	1.928	Ab2	1.238	3.784	0.228
Esc3	45.224	1.907	2.123	Ab3	1.059	2.013	0.461
Esc4	111.718	1.935	2.029	Ab4	1.264	3.258	0.744
Esc5	88.617	1.929	2.031	Ab5	36.771	0.821	0.100
Esc6	30.102	2.007	1.594	Ab6	0.430	0.000	0.020
Esc7	563.167	1.900	1.800	Ab7	2.870	2.940	0.190
Esc8	163.330	1.960	1.400	Ab8	1.440	5.560	0.100
Esc9	91.065	1.970	1.300	Ab9	2.530	2.060	0.190
Esc10	446.450	1.950	2.000	Ab10	0.370	0.640	1.200

En contraste, las muestras de abejas mostraron concentraciones de ADN mucho menores, en la mayoría de los casos inferiores a 3 ng/μl, con excepción de Ab5, que alcanzó una concentración de 36.8 ng/μl, sin embargo, presentó valores de pureza deficientes ($A_{260}/A_{280} = 0.821$ y $A_{260}/A_{230} = 0.100$), lo que evidencia la presencia de contaminantes. En varias réplicas, como Ab1, Ab6 y Ab8, se obtuvieron concentraciones casi nulas (<2 ng/μl) y cocientes A_{260}/A_{230} muy bajos (<0.5), lo que refleja una calidad de ADN inadecuada. Algunos casos atípicos, como Ab2, Ab4 y Ab8, mostraron cocientes A_{260}/A_{280} anormalmente elevados (>3), lo que probablemente se deba a interferencias en la medición debido a las bajas concentraciones de ácidos nucleicos presentes (tabla 1).

DISCUSIÓN

Una de las principales dificultades presentes en el aislamiento de ADN de insectos es la presencia de su exoesqueleto rico en quitina, ya que funge como barrera al proteger los tejidos de los compuestos encargados de digerir las muestras, a la vez que sus productos de descomposición (mono y polisacáridos) actúan como contaminantes y posibles inhibidores de aplicaciones posteriores, como PCR, qPCR o secuenciación (Demeke y Jenkins, 2010; Liu et al., 2012). Considerando esto, diversos autores optan por el uso del detergente CTAB para el procesamiento de muestras de insectos, especialmente en grupos como Coleoptera, que presentan un exoesqueleto muy desarrollado, ya que este tiene la capacidad de descomponer polisacáridos de alto peso molecular (Al-Dhafer et al., 2025; Murthy et al., 2022; Paydar et al. 2018; Rizzo et al., 2021). Los resultados obtenidos en los especímenes de *Canthon* sp. (Coleoptera) presentaron elevada concentración de ADN y pureza, similares a los reportados por (Paydar et al. 2018) en áfidos. Cabe resaltar que esto se logró sin la necesidad de destruir el cuerpo del insecto, presentando así un valioso método para ser utilizado en especímenes antiguos preservados en colecciones o en ejemplares raros que pretenden ser añadidos a estas.

Si bien los resultados obtenidos en *Oxytrigona* sp. no fueron comparables a los alcanzados en *Canthon* sp. ni a los reportados por Paydar et al. (2018), es importante considerar que, tal como señalan Waldschmidt et al. (1997), las variaciones en la concentración de los componentes del tampón de extracción pueden tener un efecto determinante en la calidad del ADN. En su estudio Waldschmidt et al. 1997) evaluaron tres formulaciones distintas para la extracción de ADN en *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera):

el método A, que incluyó concentraciones más altas de Tris-HCl, CTAB y NaCl, mostró resultados adecuados; en contraste, el método B, con menores concentraciones de estos compuestos, no fue efectivo para la obtención de ADN; mientras que el método C, basado en SDS como agente desnaturalizante, presentó un desempeño diferente al de los dos anteriores, resaltando como pequeñas modificaciones en la composición del buffer de digestión pueden impactar significativamente en la eficiencia de la extracción, lo que podría explicar las diferencias observadas en las especies analizadas.

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que la eficiencia en la extracción de ADN de insectos depende no solo de las características intrínsecas de cada grupo, como la composición del exoesqueleto, sino también de la formulación del tampón utilizado. Por lo tanto, la estandarización y optimización de los protocolos resulta un paso esencial para garantizar la obtención de ADN de calidad, especialmente cuando se trabaja con múltiples taxones o con especímenes valiosos preservados en colecciones.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos indican que el protocolo de extracción de ADN mínimamente destructivo evaluado en este estudio demostró ser efectivo en *Canthon* sp., logrando altas concentraciones y pureza sin comprometer la integridad morfológica de los especímenes. Sin embargo, su aplicación en *Oxytrigona* sp. evidenció limitaciones, reflejando la necesidad de optimizar las condiciones de extracción en función de las características específicas de cada grupo taxonómico. Estos resultados refuerzan la importancia de estandarizar protocolos según el orden de insectos analizado, con el fin de ampliar su aplicabilidad en investigaciones taxonómicas y moleculares a partir de especímenes preservados en colecciones científicas, ya que si bien, ciertos protocolos pueden obtener resultados positivos para estos grupos en muestras con tratamientos destructivos no garantizan la obtención de ADN en cantidades deseables y pureza óptima sin al usarlos sin destruir las muestras.

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigación en Bioinformática Estructural, Biomodelos y Biomarcadores de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad de El Salvador por proporcionar los reactivos y equipos necesarios para esta investigación.

REFERENCIAS

- Al-Dhafer, H. M., Balaji, R., Abdel-Dayem, M. S., Rasool, I., Mohamed, A., & Palanisamy, S. (2025). Simple DNA extraction for museum beetle specimens to unlock genetic data from historical collections. *MethodsX*, 14, 103236. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2025.103236>
- Amat-García, G., y Fernández, F. (2011). La diversidad de insectos (Arthropoda: Hexapoda) en Colombia I. Entognatha a Polyneoptera. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 205–219. <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319028008016.pdf>
- Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 1977–1990. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3150-9>
- Eggleton, P. (2020). The state of the world's insects. *Annual Review of Environment and Resources*, 45, 61–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-enviro-012420-050035>
- Giordani, G., Whitmore, D., & Vanin, S. (2023). A new, non-invasive methodology for the molecular identification of adult Sarcophagidae from collections. *Insects*, 14(7), 635. <https://doi.org/10.3390/insects14070635>
- Korlević, P., McAlister, E., Mayho, M., Makunin, A., Flicek, P., & Lawniczak, M. K. N. (2021). A minimally morphologically destructive approach for DNA retrieval and whole-genome shotgun sequencing of pinned historic dipteran vector species. *Genome Biology and Evolution*, 13(10). <https://doi.org/10.1093/gbe/evab226>
- Kaur, N., & Kaleka, A. S. (2022). Diversity, importance and decline of pollinating insects in present era. In *Global decline of insects*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100316>
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C., & Yang, Q. (2012). Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*, 17(4), 4604–4611. <https://doi.org/10.3390/molecules17044604>
- Murthy, M. K., Khandayataray, P., Tara, M., Buragohain, P., Giri, A., & Gurusubramanian, G. (2022). Optimisation of DNA isolation and PCR techniques for beetle (Order: Coleoptera) specimens. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(3), 2761–2771. <https://doi.org/10.1007/s42690-022-00736-3>
- Paydar, S., Ucar, E., Yari, P., Safavi, S. M., Kahrizi, D., Nateqi, M., Mirmoayedi, A., & Yari, K. (2018). A simplified and optimized protocol for total DNA extraction from insect species: Applicable for studying genetic diversity and PCR-based specimen identification via partial amplification of cytochrome oxidase I (COI) gene. *Cellular and Molecular Biology*, 64(12), 22. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.12.5>
- Patzold, F., Zilli, A., & Hundsdoerfer, A. K. (2020). Advantages of an easy-to-use DNA extraction method for minimal-destructive analysis of collection specimens. *PLOS ONE*, 15(7), e0235222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235222>
- Promega. (2025). *How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?* <https://www.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>
- Rizzo, D., Luchi, N., Da Lio, D., Bartolini, L., Nugnes, F., Cappellini, G., Bruscoli, T., Salemi, C., Griffo, R. V., Garonna, A. P., & Rossi, E. (2021). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the identification of the invasive wood borer *Aromia bungii* (Coleoptera: Cerambycidae) from frass. *3 Biotech*, 11(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02602-w>
- Waldschmidt, A. M., Fernandes Salomão, T. M., De Barros, E. G., & De Antônio Oliveira Campos, L. (1997). Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20(3), 421–423. <https://doi.org/10.1590/S0100-84551997000300011>
- Yang, R.-S., Ni, M.-Y., Gu, Y.-J., Xu, J.-S., Jin, Y., Zhang, J.-H., Wang, Y., & Qin, L. (2021). Newly emerging pest in China, *Rhynchaenus maculosus* (Coleoptera: Curculionidae): Morphology and molecular identification with DNA barcoding. *Insects*, 12(6), 568. <https://doi.org/10.3390/insects12060568>