



Revista MINERVA

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

Nota Técnica | Technical Note

Optimización de un protocolo de extracción de ADN en *Ganoderma sp.*

Optimization of a DNA extraction protocol for *Ganoderma sp.*

Osmín Alejandro Díaz Marengo^{1,3}, Cristina Michelle León Jurado^{1,4}, Andrea Carolina Molina Andino^{1,5}, Roberto Antonio Navarro Linares^{1,2,6}

¹Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de El Salvador

²Grupo de Investigación en Bioinformática Estructural, Biomodelos y Biomarcadores

³  <https://orcid.org/0009-0008-7260-8855>

⁴  <https://orcid.org/0009-0001-6843-1996>

⁵  <https://orcid.org/0009-0001-2105-5356>

⁶  <https://orcid.org/0009-0003-7196-3365>

RESUMEN

La obtención de ADN de alta calidad constituye un paso esencial en estudios genéticos y moleculares. En hongos, la región ITS del ADN ribosomal se ha consolidado como un marcador de referencia para identificación taxonómica, filogenia y aplicaciones de metabarcoding. Sin embargo, la extracción de ADN en basidiomicetos como *Ganoderma* enfrenta dificultades derivadas de la rigidez de la pared celular y la presencia de compuestos secundarios que afectan la pureza del material genético. En este estudio se evaluó y optimizó un protocolo de extracción de ADN para *Ganoderma sp.*, reemplazando

DOI: <https://doi.org/10.66778/RM.v09ed01.16>

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

Palabras clave: CTAB, Buffer SB, optimización, basidiomiceto, protocolo no comercial, identificación molecular.

Keywords: CTAB, SB buffer, optimization, basidiomycete, non-commercial protocol, and molecular identification.



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

el uso de SDS por CTAB y el ajuste en la concentración de NaCl. Se analizaron seis muestras en dos grupos de diferente cantidad de tejido (25 y 50 mg), verificando la calidad del ADN mediante electroforesis y su viabilidad a través de la amplificación de la región ITS2 por PCR. Los resultados mostraron bandas definidas y libres de contaminantes en todas las muestras, sin diferencias significativas en la calidad del ADN entre ambos grupos, siempre que se ajustara el volumen de buffer. La amplificación de ITS2 se logró en el 100% de los casos, obteniéndose fragmentos de aproximadamente 900 pb, tamaño mayor al reportado en la literatura, lo que podría deberse a variaciones intraespecíficas o al uso de cebadores diferentes. Estos hallazgos confirman la eficacia del protocolo optimizado y resaltan la necesidad de estudios adicionales para profundizar en la diversidad genética de *Ganoderma* sp. y su potencial biotecnológico.

ABSTRACT

The extraction of high-quality DNA is an essential step in genetic and molecular studies. In fungi, the ITS region of ribosomal DNA has been established as a reference marker for taxonomic identification, phylogeny, and metabarcoding applications. However, DNA extraction in basidiomycetes such as *Ganoderma* faces challenges due to the rigidity of the cell wall and the presence of secondary compounds that compromise DNA purity. In this study, a DNA extraction protocol for *Ganoderma* sp. was evaluated and optimized by replacing SDS with CTAB and adjusting NaCl concentration. Six samples were analyzed in two groups with different tissue amounts (25 and 50 mg), assessing DNA quality by agarose gel electrophoresis and its suitability through PCR amplification

of the ITS2 region. Results showed well-defined, contaminant-free DNA bands in all samples, with no significant differences in DNA quality between groups, if buffer volume was properly adjusted. ITS2 amplification was successful in 100% of the cases, yielding fragments of approximately 900 bp, larger than previously reported in the literature. This discrepancy may be explained by intraspecific variation or differences in primer selection. These findings confirm the effectiveness of the optimized protocol and highlight the need for further studies to deepen the understanding of the genetic diversity of *Ganoderma* sp. and its biotechnological potential.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la obtención de ADN de alta pureza y calidad constituye un paso fundamental en los estudios genéticos y moleculares, ya que provee el material esencial para investigaciones que van desde análisis filogenéticos y de expresión génica, hasta la identificación de especies (Kauserud, 2023). La región del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal se ha establecido como el marcador molecular de referencia para la identificación y caracterización de hongos, debido a su alta variabilidad entre especies y, al mismo tiempo, a su conservación dentro de grupos taxonómicos cercanos. Su utilidad ha sido ampliamente demostrada en diversos contextos: en el ámbito médico, la secuenciación del ITS permite una identificación rápida, precisa y costo-efectiva de hongos patógenos en comparación con métodos fenotípicos tradicionales, en el ámbito ecológico, la región ITS ha sido empleado en estrategias de metabarcoding para caracterizar comunidades fúngicas en suelos, revelando

patrones de diversidad y distribución asociados a gradientes ambientales o a procesos ecológicos específicos, como la dinámica de secuestro de carbono, así, la versatilidad de la región ITS la convierte en una herramienta esencial en los estudios micológicos modernos (Pryce et al., 2003; Tonjer et al., 2021).

La región ITS2 ha sido utilizada exitosamente en la reconstrucción filogenética de especies del género *Ganoderma*, así como, en la identificación de especies de importancia comercial en muestras diversas, incluyendo cuerpos fructíferos silvestres, micelio, esporas y extractos crudos, demostrando su versatilidad como herramienta molecular (Liao et al., 2015).

Los hongos basidiomicetes son un grupo muy diversos, los cuales desempeñan roles clave en los ecosistemas y poseen una variedad de aplicaciones en la medicina, biotecnología y agricultura, este proceso se enfrenta a desafíos técnicos que demandan protocolos específicos y cuidadosamente diseñados (Niego et al., 2023). La estructura celular de los basidiomicetes se compone por una pared celular rígida formada por polisacáridos, quitina y proteínas, que actúan como una barrera física para la liberación de ADN, sumado a esto, la presencia de compuestos secundarios y otros contaminantes como proteínas y lípidos representan un obstáculo adicional para la obtención de ADN puro y funcional (Sułkowska-Ziaja et al., 2023). Estos factores han llevado a la comunidad científica a desarrollar métodos que combinen técnicas mecánicas, térmicas y químicas para superar estas dificultades. El uso de herramientas como nitrógeno líquido para maceración, tampones específicos como el CTAB, y tratamientos enzimáticos han demostrado ser prometedoras estrategias que garantizan resultados consistentes (Pilo et al., 2022).

Este estudio se enfoca en la adecuación y optimización de un protocolo de extracción de ADN para *Ganoderma* sp., con el objetivo de establecer una metodología eficiente que permita obtener ADN de alta calidad mediante la aplicación de técnicas de lisis celular, separación de fases, precipitación y lavado. La meta final es contribuir al desarrollo de herramientas genéticas más precisas que impulsen tanto el avance del conocimiento biológico como el aprovechamiento biotecnológico de los hongos.

METODOLOGÍA

Obtención de muestras

Se recolectaron seis cuerpos fructíferos maduros de *Ganoderma* sp. en el parqueo de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, entre los meses de septiembre y octubre del año 2024.

Preparación de la muestra

Se limpió el exterior del cuerpo fructífero utilizando papel toalla y etanol al 70%, se utilizó un rallador de mano estéril para fragmentar el tejido, posteriormente, este tejido se colocó en un desecador con gel de sílice por dos días para lograr la deshidratación del tejido.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología de la Universidad de El Salvador. Se realizó siguiendo un protocolo optimizado basado en metodologías previamente establecidas por Ruiz y Quintero (2017). Las modificaciones al protocolo incluyeron la sustitución del SDS por CTAB y el aumento en la concentración de NaCl, con el objetivo de mejorar la lisis de la pared celular, así como ajustes en las cantidades de buffer agregado. Se

utilizaron seis muestras de *Ganoderma sp.*, divididas en dos grupos: las muestras G1 a G3 consistieron en 50 mg de tejido fúngico, mientras que las muestras G4 a G6 fueron de 25 mg. Esta variación permitió evaluar el efecto de la cantidad de tejido en la calidad del ADN extraído.

Inicialmente, se agregaron 450 μ L del buffer de extracción CTAB (CTAB 1%, Tris-HCl 100mM, EDTA 50mM, NaCl 1.4M) a cada muestra. Sin embargo, las muestras G1 a G3, al tener mayor cantidad de tejido, absorbiendo más buffer, lo que resultó en una cobertura insuficiente. Para solucionar esto, se añadieron 400 μ L adicionales de buffer CTAB a estas muestras, alcanzando un volumen total de 850 μ L. Las muestras G4 a G6 no presentaron problema y se mantuvieron con el volumen inicial de 450 μ L. Las muestras se homogeneizaron mediante vortex durante tres segundos y se incubaron en un termobloque a 65 °C durante 15 minutos para facilitar la lisis celular.

Después de la incubación, se agregó cloroformo: isoamílico en una proporción de 0.55 veces el volumen total de cada muestra. Para las muestras G1 a G3, se añadieron 468 μ L de cloroformo: isoamílico 24:1, mientras que las muestras G4 a G6, se añadieron 250 μ L. Las muestras se mezclaron suavemente y se centrifugaron a 13,000 RPM durante cinco minutos para separar las fases orgánica y acuosa. Se extrajo la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL. Para asegurar la pureza del material genético, se realizó un segundo lavado con cloroformo: isoamílico, seguido de otra centrifugación a 13,000 RPM durante cinco minutos y se separó nuevamente la fase acuosa en un nuevo tubo de 1.5 mL. Se añadió isopropanol en una proporción equivalente al volumen de la fase acuosa para precipitar el ADN.

Las muestras se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm durante cinco minutos, y se observó la formación de un pellet de ADN. El pellet se lavó con etanol al 70% para eliminar las impurezas y se dejó secar a temperatura ambiente para evaporar el etanol residual. Finalmente, el ADN se suspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

Electroforesis en gel de agarosa

Para verificar la calidad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado con buffer SB (Sodio-Borato). Las muestras se cargaron en el gel utilizando 1 μ L de buffer de carga y 4 μ L de ADN. La electroforesis se corrió a 120 V durante 15 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa

Con la finalidad de comprobar la viabilidad del ADN para posteriores aplicaciones, se amplificó la región ITS2 con cada una de las muestras. Para ello, se utilizaron los cebadores ITS-S2F (ATGCGATACTTGGTGTGAAT), ITS4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) y el termociclador MultiGene Mini TC020-24, utilizando la master mix Platinum™ SuperFi™ (Invitrogen, USA) con los siguientes componentes: 0.5 μ L de cada cebador (0.2 μ M), 12.5 μ L de master mix, 8.5 μ L de agua ultrapura y 3 μ L de ADN total. La amplificación inició con un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 95°C, 45 segundos de alineamiento a 55°C, 40 segundos de extensión a 74°C y un ciclo de extensión final a 74°C por 7 minutos. Los resultados del PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% junto al marcador de peso molecular Invitrogen® 100 bp DNA Ladder, este se corrió por 30 minutos a 90 V utilizando buffer SB 1X.

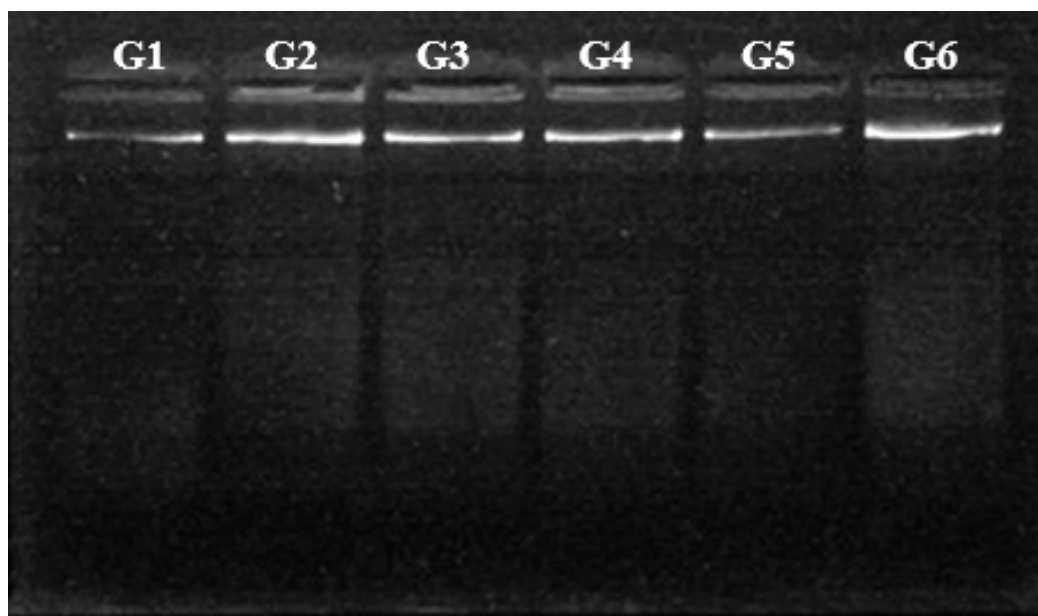
RESULTADOS

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% revelaron la presencia de bandas de ADN bien definidas en todas las muestras de *Ganoderma sp.* analizadas (figura 1). Estas bandas, visualizadas bajo luz ultravioleta tras la tinción con Gel Red, confirmaron la efectividad del protocolo de extracción de ADN optimizado. Las muestras G1 a G6 mostraron bandas de alta intensidad y nitidez, con poco barrido o presencia de otras bandas, lo que indica la obtención de ADN de alta calidad y pureza, libre de contaminantes como proteínas o polisacáridos residuales.

En cuanto a la cantidad de ADN extraído, no se observaron diferencias significativas en el brillo de las bandas entre las muestras G1 a G3 (50 mg de tejido) y las muestras G4 a G6 (25 mg de tejido). Esto sugiere que la cantidad inicial de tejido no afectó de manera considerable la eficiencia del protocolo, siempre y cuando se ajuste el volumen de buffer CTAB para garantizar una cobertura adecuada del material. Sin embargo, se notó que las muestras con mayor cantidad de tejido requirieron un volumen adicional de buffer CTAB para lograr una homogeneización efectiva, mientras que las muestras más pequeñas mantuvieron un volumen estándar.

Figura 1

Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN aislado de Ganoderma sp.



Nota. G1 a G3=50mg de tejido, G4 a G6=25 mg de tejido.

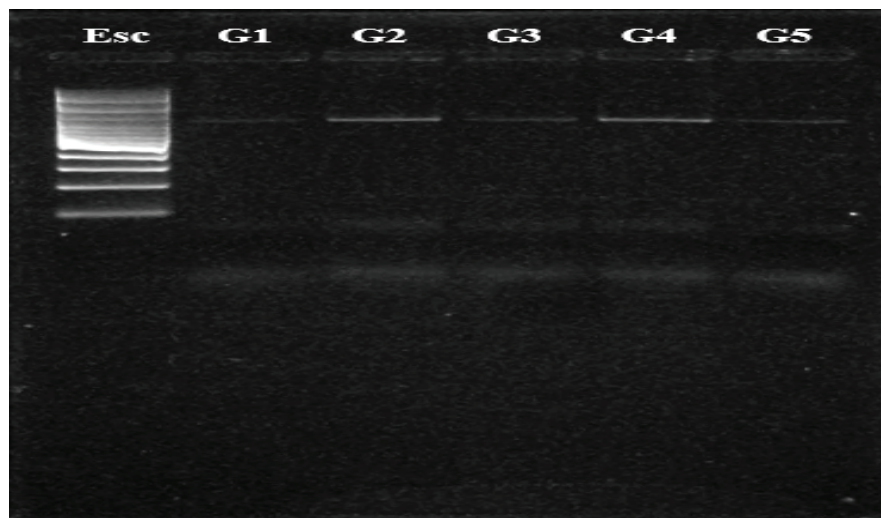
La electroforesis de los productos de PCR muestra una eficacia del 100% en la amplificación de la región ITS2, las muestras G2 y G4 mostraron un mayor brillo, lo que evidencia mayor cantidad de ADN. Todas las

bandas mostraron un tamaño homogéneo de aproximadamente 900 pb (figura 2). Esto no concuerda con la literatura, ya que (Liao et al., 2015) reporta un tamaño promedio de 517 pb para la región amplificada, mientras

que (Bang Pham et al., 2021) reporta 600 pb para la misma región, estas diferencias pueden ser explicadas por las diferencias entre los cebadores usados por ambos autores y los utilizados en este estudio, a su vez, es importante considerar las posibles diferencias en el tamaño de la región ITS2 entre las especies de *Ganoderma* asiáticas con las especies americanas.

Figura 2

Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras sometidas a PCR



Nota. Esc= Marcador de peso molecular, G1 a G3=50mg de tejido, G4 y G5=25 mg de tejido.

CONCLUSIONES

El protocolo de extracción de ADN optimizado en este estudio demostró ser eficaz para la obtención de ADN de alta calidad a partir de muestras de *Ganoderma sp.* Las modificaciones introducidas, como la sustitución del SDS por CTAB y el ajuste en la concentración de NaCl, permitieron una lisis celular eficiente y minimizaron la presencia de contaminantes, garantizando la pureza del material genético. Los resultados de la electroforesis confirmaron

la efectividad del protocolo, evidenciando bandas bien definidas en todas las muestras analizadas. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de ADN obtenido entre los dos grupos de muestras evaluados, esto podría deberse al corto tiempo de lisis ocupado en este protocolo, dando tiempo limitado para digerir las muestras, independientemente de la cantidad inicial de tejido utilizado.

La amplificación exitosa de la región ITS2 mediante PCR en todas las muestras

verificó la viabilidad del ADN extraído para aplicaciones moleculares. Sin embargo, la discrepancia en el tamaño del fragmento amplificado con respecto a los valores reportados en la literatura sugiere posibles variaciones intraespecíficas o diferencias en los cebadores utilizados. Estos resultados resaltan la importancia de continuar con estudios complementarios que permitan caracterizar con mayor precisión la diversidad genética de *Ganoderma sp.*, y de otras especies de hongos, en el país y la región.

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 BIBLIOGRÁFICAS

- Bang Pham, P., Nguyen Huu, T., & Van La, H. (2021). Identification of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. species isolated from ironwood (*Erythrophloeum fordii* Oliver) in Viet Nam through ITS1 sequence and phylogenetic analysis. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*.
- Kauserud, H. (2023). ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. *Fungal Ecology*, 65, 101274. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101274>
- Liao, B., Chen, X., Han, J., Dan, Y., Wang, L., Jiao, W., Song, J., & Chen, S. (2015). Identification of commercial *Ganoderma* (Lingzhi) species by ITS2 sequences. *Chinese Medicine*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13020-015-0056-7>
- Niego, A. G. T., Lambert, C., Mortimer, P., Thongklang, N., Rapior, S., Grosse, M., Schrey, H., Charria-Girón, E., Walker, A., Hyde, K. D., & Stadler, M. (2023). The contribution of fungi to the global economy. *Fungal Diversity*, 121(1), 95–137. <https://doi.org/10.1007/S13225-023-00520-9>
- Pilo, P., Tiley, A. M. M., Lawless, C., Karki, S. J., Burke, J., & Feechan, A. (2022). A rapid fungal DNA extraction method suitable for PCR screening fungal mutants, infected plant tissue and spore trap samples. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101758. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101758>
- Pryce, T. M., Palladino, S., Kay, I. D., & Coombs, G. W. (2003). Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Medical Mycology*, 41(5), 369–381. <https://doi.org/10.1080/13693780310001600435>
- Ruiz Marin, V., y Quintero Osorio, J. D. (2017). *Uso de técnicas moleculares en hongos basidiomicetos, en fase monospórica y fase reproductiva*.
- Sułkowska-Ziaja, K., Balik, M., Szczepkowski, A., Tropa, M., Zengin, G., Kała, K., & Muszyńska, B. (2023). A review of chemical composition and bioactivity studies of the most promising species of *Ganoderma* spp. *Diversity*, 15(8), 882. <https://doi.org/10.3390/d15080882>
- Tonjer, L. R., Thoen, E., Morgado, L., Botnen, S., Mundra, S., Nybakken, L., Bryn, A., & Kauserud, H. (2021). Fungal community dynamics across a forest–alpine ecotone. *Molecular Ecology*, 30(19), 4926–4938. <https://doi.org/10.1111/mec.16095>
- Tonjer, L. R., Thoen, E., Morgado, L., Botnen, S., Mundra, S., Nybakken, L., Bryn, A., & Kauserud, H. (2021). Fungal community dynamics across a forest–alpine ecotone. *Molecular Ecology*, 30(19), 4926–4938. <https://doi.org/10.1111/MEC.16095>