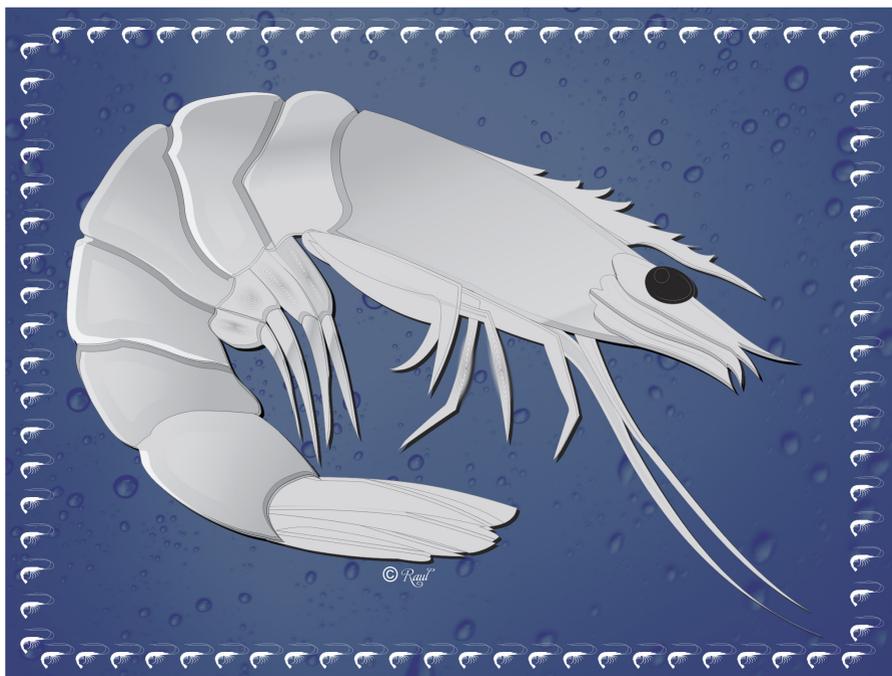


**Comparação de Diferentes
Métodos de Extração do DNA
Genômico de Músculo de
Camarão-cinza (*Litopenaeus
vannamei*)**

Imagem: Raul Cesar Pedroso da Silva



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 326

Comparação de Diferentes Métodos de Extração do DNA Genômico de Músculo de Camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*)

Nayelle Meyre Lisboa Silva
Gleison Ricardo de Biazio
Naiara Milagres Augusto da Silva
Alcebíades Renato Nepomuceno
Alexandre Rodrigues Caetano
Patrícia Ianella

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretária-Executiva: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols
 Lígia Sardinha Fortes
 Lucas Machado de Souza
 Márcio Martinelli Sanches
 Rosamares Rocha Galvão
Suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
 João Batista Tavares da Silva

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Normalização bibliográfica: Rosamares Rocha Galvão
Editoração eletrônica e tratamento das imagens: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Comparação de diferentes métodos de extração do DNA genômico de músculo de camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*). / Nayelle Meyre Lisboa Silva ... [et al.] – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017.

22 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 326).

1. Extração de DNA. 2. *Litopenaeus vannamei*. I. Silva, Nayelle Meyre Lisboa. II. Biazio, Gleison Ricardo de. III. Silva, Naiara Milagres Augusto da. IV. Nepomuceno, Alcebíades Renato. V. Caetano, Alexandre Rodrigues. VI. Ianella, Patrícia. VII. Série.

591.8 – CDD 21

Sumário

Resumo	05
Abstract	07
Introdução	09
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	14
Conclusões	18
Referências Bibliográficas	20

Comparação de Diferentes Métodos de Extração do DNA Genômico de Músculo de Camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*)

*Nayelle Meyre Lisboa Silva*¹

*Gleison Ricardo de Biazio*²

*Naiara Milagres Augusto da Silva*³

*Alcebíades Renato Nepomuceno*⁴

*Alexandre Rodrigues Caetano*⁵

*Patrícia Ianella*⁶

Resumo

Metodologias para extração do DNA genômico de diversos materiais biológicos já foram descritas, porém estudos específicos referentes à extração de DNA em camarões são inexistentes na literatura. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi comparar diferentes métodos de extração de DNA de tecido muscular do camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*). As metodologias de extração testadas foram: um método que utiliza CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) e os kits comerciais *Qiagen Genra Puregene* e *DNeasy Blood & Tissue Kit*. O DNA obtido foi quantificado e analisado por espectrometria e eletroforese, e por meio de RAPD-PCR e digestão enzimática. Estimativas de custo de cada metodologia foram realizadas. Os resultados mostraram que os três métodos avaliados produziram DNA genômico de alta qualidade e quantidade suficientes para ser utilizado em diversas metodologias da biologia molecular. Porém, o método

CTAB foi o que proveu maior quantidade de DNA e apresentou menor tempo de manuseio e custo.

Termos para indexação: CTAB, extração de DNA, kit de extração, *L. vannamei*.

¹ Graduanda em Biologia, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

² Biólogo, mestre, técnico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

³ Veterinária, mestra, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁴ Farmacêutico, mestre, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁵ Zootecnista, doutor, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁶ Bióloga, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Comparison of Different Methods of Genomic DNA Extraction of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Muscle

Abstract

Several different methods for extracting genomic DNA from various biological materials have been described, however, specific studies on DNA extraction from shrimp tissues are absent from the literature. Thus, the objective of this work was to compare different DNA extraction methods from muscle tissue from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The extraction methodologies tested were: a method using CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) and commercial kits Qiagen Genra Puregene and DNeasy Blood & Tissue Kit. The obtained DNA was quantified and analyzed by spectrophotometry and electrophoresis, and by means of RAPD-PCR and enzymatic digestion. Cost estimates of each methodology were performed. Obtained results showed that the three methods tested produced genomic DNA of high quality and sufficient quantity to be used in several molecular biology methodologies. However, CTAB provided the most amount of DNA and presented a shorter time of handling and lowest cost.

Index terms: CTAB, DNA extraction, extraction kit, *L. vannamei*.

Introdução

Estudos em biologia molecular, genética e genômica são altamente dependentes da qualidade, pureza e quantidade dos ácidos nucleicos obtidos das amostras, fazendo com que a extração de DNA faça parte da rotina dos laboratórios que realizam estudos nessas áreas. Inúmeros protocolos foram desenvolvidos para extração e purificação de DNA genômico de diferentes materiais biológicos, incluindo uma grande variedade de kits comerciais. Os diferentes tipos de tecido ou material apresentam peculiaridades, fazendo com que se opte por um método mais adequado para determinado tecido entre os inúmeros métodos existentes.

De modo geral, pode-se dizer que o método de extração ideal é aquele que alcança o melhor rendimento, produz a menor degradação do DNA, resultando em uma solução de DNA purificado com o menor resquício de contaminantes possível, seja do próprio tecido ou dos componentes do processo de extração (CHEN et al., 2010). Além disso, é desejável que o método seja também eficiente em termos de custos, tempo e trabalho aplicado, e, se possível, passível de escalonamento e automação.

Estudos específicos referentes à extração de DNA em camarões são inexistentes na literatura, podendo ser utilizados como base os estudos desta natureza realizados com outras espécies de crustáceos (VALENTIM et al., 2003; MANAFFAR et al., 2010; LI et al., 2011). No entanto, há uma grande variedade de protocolos que têm sido utilizados no isolamento deste material genético de tecido de camarão, como adaptações de métodos orgânicos (YOU et al., 2008), protocolos salinos (LI et al., 2007) e mesmo kits comerciais (WAQAIRATU et al., 2012; DIERENS et al., 2014; SELLARS et al., 2014; RUMISHA et al., 2017).

Uma das desvantagens da extração orgânica é a toxicidade de alguns produtos químicos utilizados, como o fenol e o clorofórmio,

sendo que os resíduos desses reagentes podem ficar aderidos ao DNA, afetando a atuação de enzimas em reações subsequentes (FREITAS, 2005; OLIVEIRA et al., 2007). Já os kits comerciais são mais onerosos e limitantes no que concerne à quantidade de amostra inicial a ser utilizada. Isso ocorre devido à saturação das membranas ou da capacidade dos tampões utilizados para lise celular – de volume restrito, fazendo com que a quantidade total de DNA obtida por extração seja restrita (DI BERNARDO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

De acordo com Freitas (2005), a extração do DNA de tecidos musculares de camarões tem como limitação a grande quantidade de polissacarídeos. Esses carboidratos podem ocasionar problemas como a inibição das enzimas de restrição e da Taq DNA polimerase. Métodos que utilizam CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) têm se mostrado eficientes quando utilizados com tecidos com altos teores de polissacarídeos, uma vez que o composto age separando o DNA e os polissacarídeos por meio da diferença de solubilidade entre essas macromoléculas (ROMANO; BRASILEIRO, 1998). Alguns trabalhos com outros tipos de crustáceos (VALENTIM et al., 2003) e camarão (GUSMÃO; SOLÉ-CAVA, 2002) utilizaram protocolos baseados no CTAB.

Levando-se em consideração as informações acima expostas, o objetivo do presente estudo foi testar diferentes métodos de extração de DNA de tecido muscular do camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*) que resultem em DNA com rendimento e qualidade satisfatórios para as análises subsequentes de sequenciamento de nova geração e genotipagem de marcadores de base única (SNP) em plataformas de genotipagem de médio e alto desempenho, e com a melhor relação custo-benefício.

Material e Métodos

Fragmentos de tecido muscular abdominal de camarão-cinza

(*Litopenaeus vannamei*) fixados em álcool 96% foram utilizados para testes de três diferentes métodos de extração de DNA: o método CTAB adaptado de Boyce et al. (1989), e os kits comerciais *Qiagen Gentra Puregene* (QIAGEN 2014) e *DNeasy Blood & Tissue Kit* (DNEASY, 2006). Para cada método, utilizou-se a maior quantidade inicial possível de tecido indicado por cada protocolo: CTAB - 100 mg; DNeasy - 10 mg; Puregene - 10 mg de tecido.

Método I – CTAB modificado por BOYCE et al. (1989)

Aproximadamente 100 mg de tecido muscular foram macerados em 500 μ L de tampão de extração CTAB – 2% (p/v) CTAB; 0,2% 2-mercaptoetanol; NaCl 1,4 M; Tris HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 0,2 M – com o auxílio de um equipamento de ruptura de células (Tissue Lyser - Qiagen) por 2 minutos na frequência de 30 Hertz, com posterior incubação de uma hora a 56°C após adição de 10 μ L de Proteinase K (10 mg/ μ L). Em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 500 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A solução foi gentilmente homogeneizada e posteriormente centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, e o DNA precipitado com a adição de 250 μ L de Isopropanol 100% gelado e incubado a -4°C por 30 minutos. O precipitado obtido após centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos foi lavado com etanol 75% gelado e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. Em seguida, o precipitado foi lavado com etanol absoluto gelado e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. O álcool foi descartado, e após secagem o DNA foi ressuspenso em 200 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 M) e tratado com 6 μ L de RNase (10 mg/mL) por 2 minutos sob temperatura ambiente.

Método II – *Qiagen Gentra Puregene* (QIAGEN 2014)

Cerca de 10 mg de tecido muscular foram macerados em 300 μ L de solução de lise com o auxílio de um equipamento de ruptura de

células (Tissue Lyser - Qiagen) por 2 minutos na frequência de 30 Hertz. Em seguida, foram adicionados 7 μL da solução de Proteinase K (20 mg/mL). Esta solução foi invertida 10 vezes e incubada a 55°C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, 1,5 μL da solução de RNase A foi adicionado ao lisado, que permaneceu incubado a 37°C durante 15 minutos, seguido de outra incubação no gelo por 1 minuto. Procedeu-se, então, à precipitação de proteínas com 100 μL do tampão fornecido pelo fabricante, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi removido para um novo microtubo contendo 300 μL de Isopropanol 100% (2-propanol), invertendo-se, gentilmente, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O DNA precipitado foi lavado com 300 μL de etanol 70%, centrifugado a 10.000 rpm por um minuto e depois seco ao ar durante 10 minutos. Finalmente, foram adicionados 100 μL da solução de hidratação e armazenados sob temperatura de -20°C para posterior quantificação.

Método III – *DNeasy Blood e Tissue Kit* (QUIAGEN 2016)

Aproximadamente 10 mg de tecido muscular foram macerados em 180 μL de solução de lise com o auxílio de um equipamento de disrupção de células (Tissue Lyser - Qiagen) por 2 minutos na frequência de 30 Hertz. Em seguida, foram adicionados 20 μL da solução de Proteinase K (20 mg/mL). Esta solução foi homogeneizada por vortex e incubada a 56°C por 3 horas. Posteriormente, a solução foi agitada com vigor e foram adicionados 200 μL de tampão fornecido pelo fabricante. Em seguida, foi feita a adição de 200 μL de etanol absoluto com posterior homogeneização com vortex. A mistura foi aplicada em uma coluna montada sobre um tubo coletor e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O líquido que passou pela coluna foi recolhido em um novo microtubo e foram adicionados 500 μL de tampão AW1, seguida de centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto para lavagem do DNA. A coluna foi transferida para um novo microtubo. Foram adicionados 500 μL de tampão AW2, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. A coluna foi colocada em um novo microtubo, e 50 μL de

tampão de eluição foram pipetados diretamente na membrana DNeasy. Por fim, a solução foi incubada sob temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto.

Avaliação da qualidade do DNA

A qualidade e quantidade do DNA obtido com os três diferentes métodos foram avaliadas por análises em eletroforese de gel de agarose e espectrofotometria. Para aferir a aplicabilidade do DNA extraído pelas diferentes metodologias de extração de DNA em procedimentos subsequentes, foi realizada digestão enzimática do DNA obtido e amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se primers aleatórios.

As amostras obtidas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% (100 V), corado com Brometo de Etídeo (0,5 $\mu\text{g/mL}$), para verificar a integridade do DNA, e analisadas em espectrofotômetro a uma absorbância de 260 e 280 nm para determinação da relação de absorbância A 260/A280 e verificação da concentração e pureza, respectivamente.

Digestão enzimática

Um micrograma do DNA obtido de cada amostra foi digerido com 10U da enzima de restrição de corte simétrico Hae III e tampão 1X em uma reação de 25 μL de volume final. As reações foram incubadas em banho-maria a 37°C por 24 horas. O volume total da reação foi aplicado em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo (0,5 $\mu\text{g/mL}$), submetido a eletroforese (100 V) e posteriormente visualizado em luz ultravioleta.

RAPD

Para as reações de PCR, foram utilizados dois pares de primers aleatórios, OPA-1 e OPA-3. As reações de amplificação foram

realizadas em volume final de 10 μL , contendo: 0,4 mM de primer; 0,2 mM de cada dNTP; 1U de Taq DNA polimerase (Promega); 1X tampão da Taq DNA polimerase (Promega); 2 mM de MgCl_2 (Promega); e 9 ng de DNA. A ciclagem da reação consistiu de um passo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 35°C por 15 segundos, 72°C por 1 minuto, e, por fim, uma etapa de 72°C por 7 minutos. O volume total da reação foi aplicado em gel agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), submetido a eletroforese (100 V) e posteriormente visualizado em luz ultravioleta.

Estimativa de custo e tempo

Para realizar a estimativa de custo de cada método, baseou-se nos valores dos reagentes e itens consumíveis utilizados para obtenção de 1 μg de DNA por amostra. Como referência dos valores, utilizou-se o valor do menor pacote de consumível e do kit com menor capacidade com relação ao número de amostras. O tempo estimado baseou-se no tempo necessário para a extração de uma amostra, excluindo-se o preparo de reagentes.

Resultados e Discussão

As razões de absorvância 260/280 obtidas indicam que o DNA obtido pelo método I resultou em amostras de melhor qualidade, uma vez que são considerados DNA puro amostras com valores das razões que estiverem entre 1,8 e 2 (Tabela 1). A média de valor da razão de absorvância 260/280 do método I foi maior do que 1,8; no entanto, a diferença entre médias observadas foi estatisticamente significativa somente entre método I e III. As amostras extraídas com ambos os kits apresentaram razões com valores próximas (Puregene) e inferiores (DNeasy) a 1,8. Neste último caso, os resultados indicam a contaminação por resíduos de proteínas ou outro contaminante que tenha absorvância neste comprimento de onda, como, por exemplo, RNA ou nucleotídeos.

Com relação à quantidade de DNA obtida, o método I foi o que gerou melhor resultado, produzindo maior quantidade de DNA por miligrama de tecido (pelo menos nove vezes mais do que os outros dois métodos) mostrando-se, assim, mais eficiente para a extração nessas condições (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação e análise de pureza dos DNAs extraídos com os métodos I, II, III, a partir de amostras de tecido caudal de camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*).

Amostras	Concentração (ng/μL)			Concentração* (ng/μL)			Razão 260/280		
	Método 1	Método 2	Método 3	Método 1	Método 2	Método 3	Método 1	Método 2	Método 3
LV_01	452,18	86,65	281,13	90,43	8,66	14,05	1,83	1,83	1,7
LV_02	1265,32	134,14	139,03	253,06	13,41	6,95	1,86	1,86	1,65
LV_03	752,43	165,99	142,02	150,48	16,59	7,10	1,85	1,85	1,63
LV_04	747,64	164,07	224,35	149,52	16,40	11,21	1,85	1,85	1,75
LV_05	775,54	79,6	186,03	155,10	7,96	9,30	1,77	1,77	1,72
Média**	798,62 ^a	126,09 ^b	194,51 ^{b,c}	159,72 ^a	12,60 ^b	9,72 ^{b,c}	1,83 ^a	1,83 ^a	1,69 ^b
D.P.	292,87	41,28	59,79	58,58	4,13	2,99	0,04	0,04	0,05

* Estimativa da quantidade de DNA por miligrama de tecido utilizado.

** Letras diferentes para as mesmas medidas representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (P<0,001).

Observa-se pelas médias obtidas que pelo método I o rendimento foi significativamente maior do que pelos outros dois métodos. Além disso, uma vez que uma maior quantidade total inicial de material pode ser usada por extração no método I, o rendimento total de cada reação é significativamente maior. Os kits comerciais possuem uma limitação de quantidade inicial de material, o que leva à restrição de seu uso quando são necessárias quantidades maiores de materiais para a realização de experimentos subsequentes.

A visualização do DNA extraído de diferentes amostras pelos três métodos em gel de agarose permite uma análise de integridade do DNA obtido (Figura 1). Foram obtidas amostras íntegras pelos três métodos, com tênue rastro nas amostras obtidas com os métodos I e II, indicando uma pequena degradação da amostra.

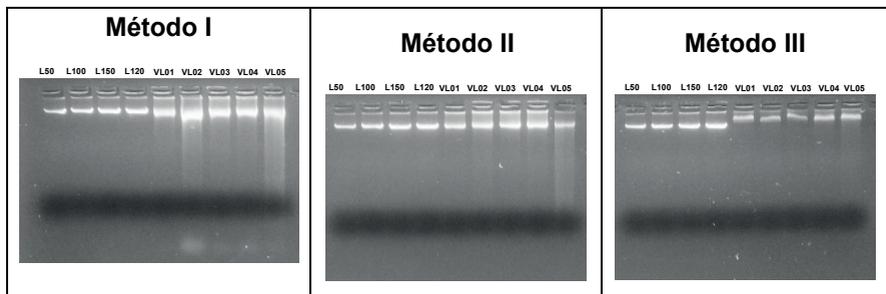


Figura 1. 1 μ L de DNA genômico extraído a partir de tecido muscular caudal de *L. vannamei* utilizando-se três diferentes protocolos submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%.

Avaliação da qualidade do DNA

O resultado da análise de digestão enzimática por Hae III foi satisfatório nos três métodos avaliados, indicando a ausência de contaminantes em quantidades capazes de inibir atividade enzimática. Contudo, nota-se que o padrão de digestão das amostras extraídas com o método III difere dos outros dois métodos (Figura 2).

Com o objetivo de analisar o potencial de amplificação do DNA extraído por diferentes métodos e excluir a possibilidade da presença de inibidores, as amostras de DNA obtidas foram avaliadas por amplificação de RAPD. O DNA extraído pelas três diferentes metodologias foi amplificado de maneira satisfatória nas reações de PCR utilizando-se os primers aleatórios (PCR-RAPD) (Figura 3). Nas amostras extraídas com o método III, os fragmentos de DNA amplificados foram menos evidentes (setas) em comparação com as reações realizadas com DNA proveniente dos outros métodos, indicando que a amplificação foi menos eficiente. Vários são os fatores que podem levar a uma reação de PCR menos eficiente, como, por exemplo, quantidades insuficientes de fita molde e a presença de inibidores da reação. A ação inibitória de algumas substâncias pode estar associada à precipitação ou desnaturação do DNA, ou interferência na habilidade da Taq polimerase de se ligar aos íons de magnésio.

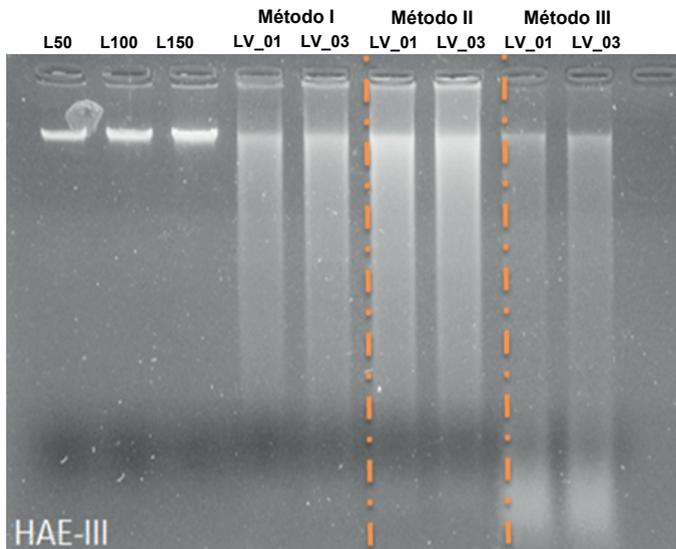


Figura 2. Perfil de digestão enzimática do DNA, extraído com os três diferentes métodos digerido com a enzima Hae III.

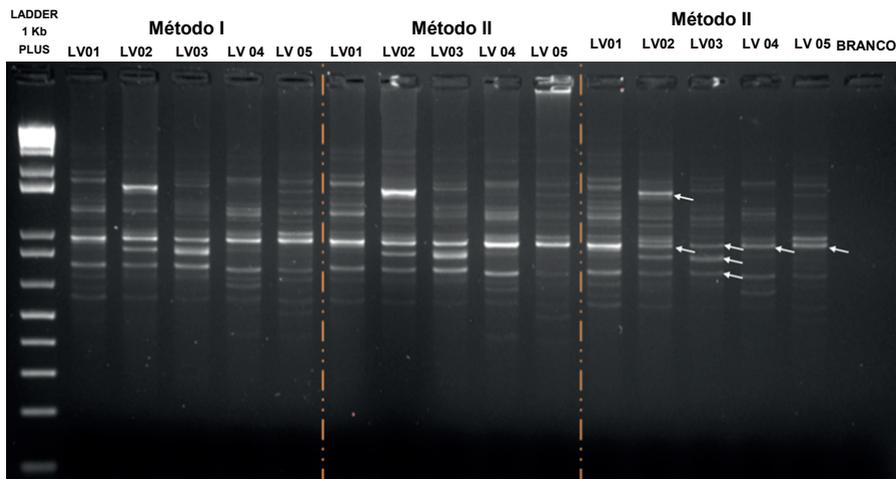


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos gerados por RAPD-PCR – primers OPA 3 – oriundos de amostras de DNA extraídas por meio dos métodos I (CTAB), II (PUREGENE) e III (DNeasy®). As setas indicam bandas com menos quantidade de produto.

Os testes de amplificação e digestão enzimática do DNA mostram que os protocolos fornecem o isolamento de material genômico de alta qualidade e em quantidades suficientes para ser utilizado em diversas metodologias da biologia molecular, indicando que os três métodos avaliados resultam em DNA de qualidade suficiente para experimentos subsequentes. No entanto, as amostras provenientes de extração realizada com DNeasy produziram reações menos eficientes, com bandas amplificadas de menor intensidade e definição.

Estimativa de custo e tempo

As estimativas de custo e tempo para cada metodologia avaliada estão apresentadas na tabela 2. A extração feita pelo método I (CTAB) foi a mais rápida, enquanto as extrações por kits comerciais apresentaram tempos similares. O custo por amostra diferiu significativamente entre os métodos, sendo que a extração pelo método CTAB apresentou um custo total de cerca de 18% do valor da extração realizada com o método II e 6,5% do valor da extração realizada com o método III.

Tabela 2. Análise de custo e tempo necessário para extração de DNA genômico a partir das três metodologias utilizadas.

	Método I	Método II	Método III
Custo* por amostra (R\$)	1,53	8,30	23,46
Tempo de manuseio (min)	117	211	187

* Custos de mão de obra e depreciação de equipamentos não foram contabilizados.

Conclusões

Com base nos experimentos realizados, conclui-se que os três métodos testados são eficientes na extração e purificação de DNA de qualidade e em quantidade suficiente para procedimentos subsequentes dependentes de atividade enzimática a partir de tecido muscular caudal

de *L. vannamei*. No entanto, o método que utiliza CTAB foi o que proveu maior quantidade de DNA e apresentou menor custo/benefício para obtenção do DNA. Trata-se de um método de baixo custo, de fácil execução e que proporciona DNA de qualidade e quantidade satisfatórias pelas condições avaliadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Aquatec – Larvicultura de Camarão Marinho pela cessão de amostras.

Referências Bibliográficas

BOYCE, T. M.; ZWICK, M. E.; AQUADRO, C. F. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. **Genetics**, v. 123, n. 4, p. 825-836, 1989.

CHEN, H.; RANGASAMY, M.; TAN, S. Y.; WANG, H.; SIEGFRIED, B. D.; LALUEZA-FOX, C. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. **PLoS One**, v. 5, n. 8, 2010, Article e11963.

DI BERNARDO, G.; DEL GAUDIO, S.; GALDERISI, U.; CASCINO, A.; CIPOLLARO, M. Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 297-301, 2007.

DIEREN, L.; HENSHALL, J.; SELLARS, M. An industry friendly, inexpensive DNA extraction method for Penaeid shrimp that is compatible with Sequenom® iPLEX Platinum SNP pedigree genotyping platforms. **Aquaculture**, v. 433, p. 102-104, 2014.

DNEASY Blood & Tissue Handbook. [Hilden]: Qiagen, 2006.

FREITAS, P. D. **Estudo da diversidade genética de camarões utilizando marcadores moleculares**: manual prático. São Carlos: UFSCAR, 2005.

GENTRA Puregene Handbook. 4. ed. [Hilden]: Qiagen, 2014. (Qiagen Sample Assay Technology).

GUSMÃO, J.; SOLÉ-CAVA, A. M. Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. In: CONGRESO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2002, Zaragoza. [**Anais...**]. Zaragoza: [s.n.], 2002. p. 754-764.

LI, Y.; WANG, W.; LIU, X.; LUO, W.; ZHANG, J.; GUL, Y. DNA extraction from crayfish exoskeleton. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, n. 12, p. 953-957, 2011.

LI, Y.; WONGPRASERT, K.; SHEKHAR, M.; RYAN, J.; DIERENS, L.; MEADOWS, J.; PRESTON, N.; COMAN, G.; LYONS, R. E. Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. **Aquaculture**, v. 266, n. 1, p. 279-288, 2007.

MANAFFAR, R.; MALEKI, R.; ZARE, S.; AGH, N.; SOLTANIAN, S.; SEHATNIA, B.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P.; VAN STAPPEN, G. A new method for rapid DNA extraction from *Artemia* (Branchiopoda, Crustacea). **International Journal of Biological and Life Sciences**, n. 6, n. 2, p.123-127, 2010.

OLIVEIRA, M. C. de S.; REGITANO, L. C. de A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCINIO, E. do; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMOTEO, W. H. B.; BELICUAS, S. N. **J. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1998.

ROSSEN, L.; NORSKOV, P.; HOLMSTROM, K.; RASMUSSEN, O. F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 37-45, 1992.

RUMISHA, C.; LEERMAKERS, M.; ELSKENS, M.; MDEGELA, R. H.; GWAKISA, P.; KOCHZIUS, M. Genetic diversity of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in relation to trace metal pollution at the Tanzanian coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 114, n. 2, p. 759-767, 2017.

SELLARS, M. J.; DIERENS, L.; MCWILLIAM, S.; LITTLE, B.; MURPHY, B.; COMAN, G. J.; BARENDSE, W.; HENSHALL, J. Comparison of microsatellite and SNP DNA markers for pedigree assignment in Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 3, p. 417-426, 2014.

VALENTIN, M.; VARGAS, L.; MOREIRA, H. M.; RIBEIRO, R. P. Comparação de protocolos de extração do DNA de *Lernaea* sp. (Copepoda: Cyclopoida). **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 25, n. 2, p. 219-222, 2003.

WAQAIRATU, S. S.; DIERENS, L.; COWLEY, J. A.; DIXON, T. J.; JOHNSON, K. N.; BARNES, A. C.; LI, Y. Genetic analysis of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) across its natural distribution range reveals more recent colonization of Fiji and other south pacific islands. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 8, p. 2057-2071, 2012.

YOU, E. M.; CHIU, T. S.; LIU, K. F.; TASSANAKAJON, A.; KLINBUNGA, S.; TRIWITAYAKORN, K.; DE LA PEÑA, L. D.; LI, Y.; YU, H. T. Microsatellite and mitochondrial haplotype diversity reveals population differentiation in the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Indo-Pacific region. **Animal Genetics**, v. 39, n. 3, p. 267-277, 2008.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

