

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA POPULAÇÃO DE
***Anthonomous grandis* (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE)**
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES RAPD

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 90

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA POPULAÇÃO
DE *Anthonomous grandis*
(COLEOPTERA:CURCULIONIDAE) UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES RAPD**

**P. R. Queiroz
E. S. Martins
R.G. Monnerat
L. H. C. Lima**

Brasília, DF
2005

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61)
3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Mariante*
Maria Alice Bianchi
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

Q 3 Queiroz, P. R.

Caracterização molecular de uma população de *Anthonomus grandis* (Coleóptera: Curculionidae) utilizando marcadores moleculares RAPD / P. R. Queiroz, E. S. Martins, R. G. Monnerat e L. H. C. Lima. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

19 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 90)

1. *Anthonomus grandis* (Coleóptera: Curculionidae) – Caracterização molecular. 2. *Anthonomus grandis* (Coleóptera: Curculionidae) – marcadores moleculares RAPD. I. Martins, R. G. II. Monnerat, R. G. III. Lima, L. H. C. IV. Série.

595.76 – CDD 21

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
MÉTODOS	9
REAÇÕES DE RAPD-PCR	10
OBTENÇÃO DE PERFIS ELETROFORÉTICOS.....	11
ANÁLISE DOS DADOS	11
RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	11
CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	18

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA POPULAÇÃO DE *Anthonomous grandis* (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE) UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES RAPD

P. R. Queiroz¹

E. S. Martins²

R. G. Monnerat³

L. H. C. Lima⁴

RESUMO

Indivíduos de uma população de *A.grandis* foram caracterizados geneticamente por meio da técnica de RAPD-PCR. Para isso foi desenvolvida uma metodologia para extração de DNA e testados diferentes primers. Os primers selecionados foram: OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13. Foi encontrada alta variabilidade genética, apontada por um coeficiente de similaridade que variou de 35 a 90%.

Palavras-chave: *Anthonomous grandis*, Insecta, RAPD, Caracterização molecular.

¹ Biólogo – Doutorando em Biologia Animal – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Bióloga – Doutoranda em Biologia Molecular – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

ABSTRACT

In this work, insects of the same *A. grandis* population were genetically characterized through RAPD-PCR markers. For this purpose a DNA extraction method was developed and different primers were tested. The selected primers were: OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 and OPA-13.

INTRODUÇÃO

O cultivo de algodão no Brasil possui expressão significativa pela produção econômica, política e social e situa-se entre as dez maiores fontes de riqueza no setor agropecuário do Brasil, ocupando o sexto lugar em superfície cultivada no Brasil (CRUZ e PASSOS, 2002). Na década de 1990, essa planta superava o preço de outros produtos também importantes, como a soja, milho e trigo (PONCHIO, 2001). Na indústria têxtil, a fibra do algodão é reconhecida como a mais importante e de maior valor de mercado.

O Brasil já foi um dos maiores produtores mundiais de fibras de algodão. Até o início da década de 80, o país produzia uma quantidade de plumas superiores ao consumo interno. Devido a uma série de problemas de natureza agrônômica e de mercado, a produção interna começou a cair gradativamente a partir de 1986, levando a um desequilíbrio na balança comercial desse produto no país (DOS SANTOS, 2003).

A cultura do algodão tem sido alvo de ataque de diversas pragas dentre elas destaca-se o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) Este coleóptero é considerado uma das pragas mais importantes da cotonicultura pelos danos que causa e pela dificuldade do seu controle. As principais consequências do ataque desta praga são a elevação dos custos de produção, a diminuição da produtividade e a quebra da produção. Cotonicultores de todas as regiões do país sofrem as consequências do ataque do bicudo do algodoeiro (MONNERAT et al., 2002).

A fase larval deste inseto é endofítica, portanto não é passível de ser controlada por biopesticidas ou por métodos convencionais. Na fase adulta, este inseto se alimenta dos botões florais e das maçãs, onde deposita seus ovos. Na época da colheita do algodão, o bicudo se abriga em refúgios localizados nas matas auxiliares ou nas soqueiras aguardando o novo plantio. Nas regiões nordeste, sudeste e sul são efetuadas em média 18 aplicações de produtos durante uma cultura. Na região centro-oeste, onde as lavouras são mais recentes está previsto que nesta safra serão necessárias onze aplicações só para controlar o bicudo. O custo do controle desta praga pode chegar a 25% do custo total da cultura.

Um aspecto importante no controle de pragas é o conhecimento de suas características fenotípicas e genotípicas. Este conhecimento pode auxiliar no estabelecimento do perfil genético dos insetos e na identificação de marcadores que

apontem para populações resistentes a inseticidas ou potencialmente transmissoras de doenças. A técnica de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) tem sido muito utilizada na obtenção de informações para a análise genômica e por apresentar características que permitem a obtenção de um grande número de informações para a análise de genomas onde pouco se conhece a respeito de sua composição, uma vez que, emprega a utilização de um único primer de seqüência arbitrária com potencial de reconhecer seqüências desconhecidas do DNA alvo ao acaso. Os marcadores RAPD se baseiam na amplificação do DNA gerando simplicidade e rapidez a baixos custos. Assim, grande quantidade de polimorfismo e segmentos de DNA são obtidos em curto espaço de tempo. Para que haja a amplificação de um fragmento RAPD duas seqüências de DNA complementares ao primer devem estar adjacentes (a menos de 4 kb) e em orientação oposta, para permitir a amplificação pela *Taq* DNA polimerase (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Uma característica deste tipo de marcador é o seu comportamento como marcador genético dominante (CIAMPI e MAGALHÃES, 2001). O objetivo deste trabalho foi obter perfis de marcadores moleculares e determinar a variabilidade genética entre indivíduos de uma população de *A. grandis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos de *A. grandis* em estágio larval foram coletadas aleatoriamente de uma colônia mantida no laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e mantidos em etanol 100 % a – 20 °C.

MÉTODOS

Para os estudos de caracterização molecular, o DNA de vinte indivíduos em estágio larval foi extraído a partir de um método previamente estabelecido (QUEIROZ et al., 2004) seguindo-se adaptações dos protocolos de Agusti et al. (1999) e Monnerat et al. (2004).

Submeteu-se uma larva inteira à maceração e, a seguir, adicionou-se 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e Proteinase K 120 µg.mL⁻¹), incubando-se por 30 min a 65 °C. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e, o sobrenadante, transferido para um tubo

plástico. Adicionou-se 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e as fases foram homogeneizadas em vortex por 5 s. O material foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e a 10 °C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, repetindo-se a etapa anteriormente descrita.

O DNA foi precipitado pela adição de 30 µL de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto incubando-se por 2 h a – 20 °C. Após centrifugação a 10.000xg por 10 min a 10 °C, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) e armazenado a – 20 °C. Para as análises de RAPD, utilizou-se o DNA diluído 10 X em TE 0,1 X.

REAÇÕES DE RAPD-PCR

Para os estudos de caracterização molecular, O DNA extraído a partir de cinco indivíduos de cada população foi utilizado em 30 µL de uma reação de RAPD-PCR, contendo tampão Tris-HCl 6 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 0,2 mM, 0,4 µM de um primer de seqüência aleatória da Operon Technologies, Inc.(Tab. 1), 2,5 U.µL⁻¹ de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) e 5 µL de DNA.

Tabela 1 – Primers usados nas reações de RAPD-PCR.

Primer	Seqüência (5' → 3')
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-13	CAG CAC CCA C

OBTENÇÃO DE PERFIS ELETROFORÉTICOS

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC 100 MJ Research) programado para 45 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a

94 °C. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1 min a 93 °C, anelamento por 1 min a 35 °C e extensão por 2 min a 72 °C. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5 % submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 9 mM e EDTA 1 mM), fotografados e arquivados no sistema Eagleeye. Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Ladder 100 bp - GIBCO) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

ANÁLISE DOS DADOS

As fotos das amplificações realizadas com os primers selecionados foram usadas para a análise do polimorfismo entre os indivíduos da população. As bandas presentes nos géis foram consideradas como marcadores RAPD. Foi gerada então uma matriz de similaridade levando-se em consideração as relações entre indivíduos, primers e massas moleculares das bandas obtidas com um dado primer. Utilizou-se o valor 1 para a presença de um marcador e 0 para a ausência. No caso de dúvida o número 9 foi usado como padrão. A seguir, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para a determinação das distâncias genéticas entre os indivíduos. A matriz de similaridade foi obtida por meio do coeficiente de Jaccard, após, o que, através da análise por UPGMA produziu-se um dendograma que evidenciou o agrupamento dos indivíduos, utilizando-se o programa NTSYS versão 2.02 pc (RHOLF, 1993).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

A partir da metodologia de extração de DNA estabelecida, foi possível obter perfis eletroforéticos de RAPD a partir dos indivíduos de uma população de *A. grandis*. A preservação dos indivíduos em etanol, seguida da conservação em baixa temperatura, permitiu a extração de DNA em quantidade e em qualidade para as reações de amplificação utilizando-se os primers OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13, que produziram diferentes perfis eletroforéticos entre os indivíduos analisados (Fig. 1).

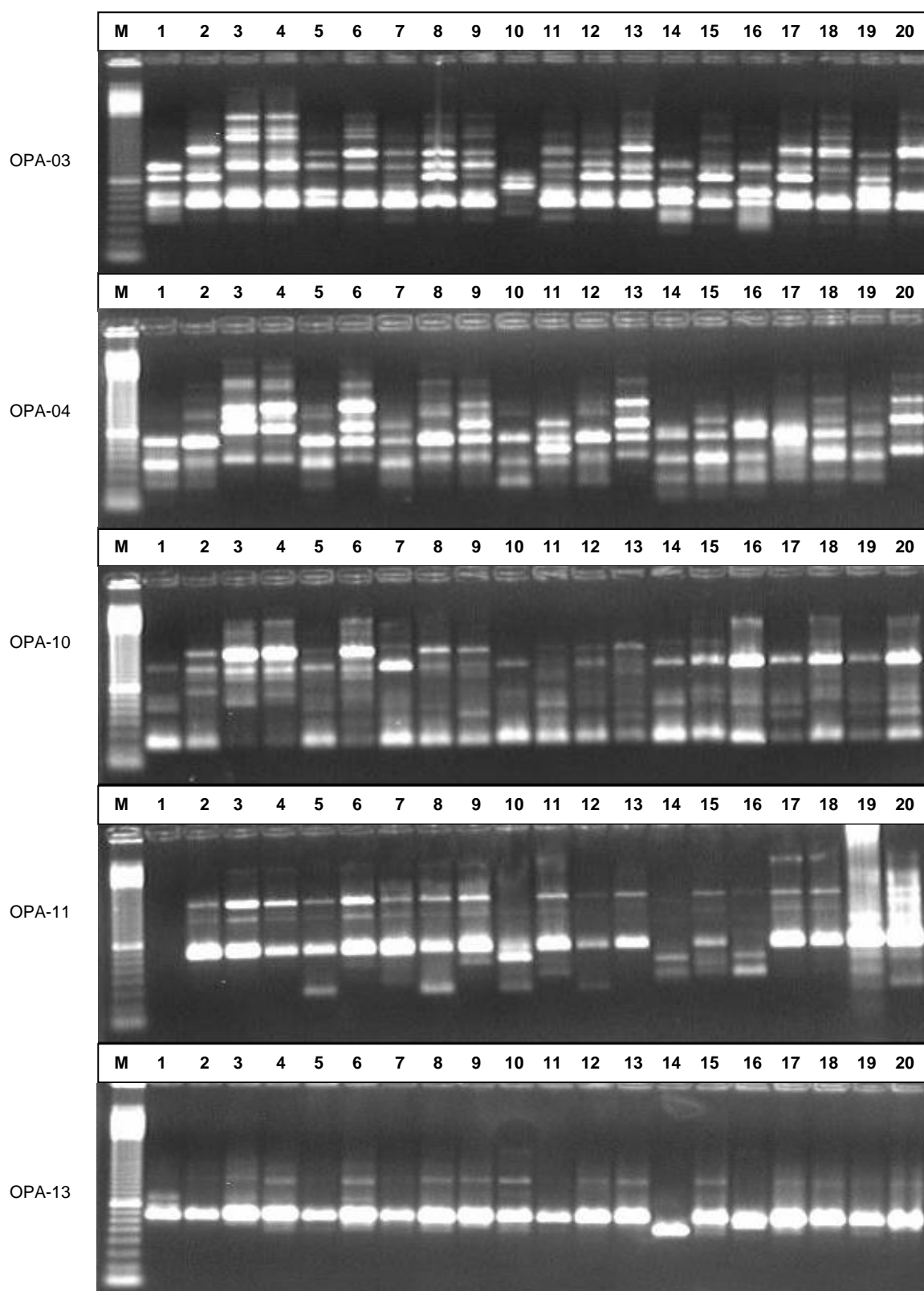


Figura 1 – Perfis de marcadores moleculares de RAPD de vinte indivíduos de uma população de *A. grandis* obtidos a partir do uso de cinco primers de sequência aleatória. A letra M representa o marcador 100 pb ladder. Os números de 1 a 20 representam o número de indivíduos analisados na população.

Com o primer OPA-03 observou-se polimorfismo de bandas entre os indivíduos da população da *A. grandis*. Com esse primer, foi possível determinar uma banda monomórfica de 550 pb na maioria dos indivíduos analisados. Entretanto, o décimo indivíduo apresentou-se como exceção. Empregando-se o primer OPA-04 também foi possível obter padrões polimórficos entre os indivíduos analisados. Uma banda de 400 pb foi observada nas amostras 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18 e 19. Já para os indivíduos 3, 4, 6, 8, 9, 13 e 20 observou-se um padrão de bandejamento variando de 3 a 5. Para o primer OPA-10 obteve-se uma banda de 250 pb comum à maioria das amostras. Entretanto, os indivíduos 3, 4 e 6 apresentaram um padrão de bandejamento diferente em relação aos demais do grupo analisado. Uma banda de 750 pb foi identificada nas amostras estudadas, exceto para os indivíduos 14 e 16 quando utilizou-se o primer OPA-11. Finalmente, o primer OPA-13 produziu uma banda monomórfica de 700 pb em 19 dos indivíduos da população. Apenas a amostra 14 apresentou variação nesse marcador. Dessa forma, foi possível demonstrar que a metodologia de extração de DNA desenvolvida para *Spodoptera frugiperda* (QUEIROZ et al., 2004) poderia ser aplicada na análise de marcadores moleculares de *A. grandis*. Empregando-se cinco primers foi possível demonstrar a variabilidade genética do grupo de forma rápida. Essa estratégia poderá ser usada quando houver a necessidade de se fazer uma análise de variabilidade genética de forma rápida, a baixos custos e com a utilização de poucos primers para identificar polimorfismos entre os indivíduos de uma população.

O polimorfismo produzido por cada organismo foi então utilizado para a determinação da matriz de distância (tabela 1) pelo programa NTSYS.

Tabela 1 - Matriz de distância genética entre 20 indivíduos de uma população de *A. grandis*.

	ant1	ant2	ant3	ant4	ant5	ant6	ant7	ant8	ant9	ant10	ant11	ant12	ant13	ant14	ant15	ant16	ant17	ant18	ant19	ant20
ant1	0.00																			
ant2	0.25	0.00																		
ant3	0.45	0.32	0.00																	
ant4	0.48	0.29	0.10	0.00																
ant5	0.25	0.13	0.32	0.29	0.00															
ant6	0.50	0.25	0.06	0.03	0.31	0.00														
ant7	0.25	0.19	0.19	0.29	0.19	0.25	0.00													
ant8	0.41	0.28	0.23	0.19	0.22	0.22	0.34	0.00												
ant9	0.47	0.28	0.16	0.19	0.34	0.16	0.28	0.25	0.00											
ant10	0.36	0.29	0.56	0.44	0.29	0.46	0.46	0.29	0.43	0.00										
ant11	0.29	0.23	0.30	0.40	0.29	0.35	0.10	0.39	0.32	0.52	0.00									
ant12	0.28	0.16	0.29	0.26	0.09	0.28	0.22	0.13	0.25	0.21	0.26	0.00								
ant13	0.47	0.34	0.16	0.13	0.34	0.16	0.34	0.19	0.13	0.46	0.39	0.25	0.00							
ant14	0.26	0.45	0.60	0.63	0.39	0.65	0.39	0.55	0.61	0.48	0.43	0.48	0.61	0.00						
ant15	0.38	0.25	0.32	0.29	0.31	0.31	0.25	0.34	0.28	0.29	0.23	0.22	0.28	0.39	0.00					
ant16	0.22	0.41	0.61	0.58	0.41	0.59	0.41	0.56	0.63	0.36	0.45	0.50	0.63	0.10	0.34	0.00				
ant17	0.28	0.22	0.23	0.32	0.28	0.28	0.28	0.25	0.19	0.39	0.32	0.25	0.25	0.55	0.34	0.50	0.00			
ant18	0.41	0.22	0.23	0.19	0.28	0.16	0.22	0.31	0.25	0.29	0.32	0.25	0.31	0.55	0.28	0.44	0.31	0.00		
ant19	0.34	0.28	0.42	0.52	0.34	0.47	0.34	0.44	0.31	0.32	0.32	0.31	0.44	0.42	0.28	0.38	0.19	0.38	0.00	
ant20	0.50	0.38	0.19	0.23	0.44	0.19	0.38	0.28	0.16	0.39	0.42	0.34	0.22	0.71	0.31	0.59	0.22	0.28	0.34	0.00

Pela determinação da matriz de similaridade, foi possível observar que a distância genética entre os indivíduos analisados variou de 3 % a 65 %. Essa informação sugere uma elevada variabilidade genética dentro do grupo em estudo.

A seguir, os dados binários correspondentes aos vários indivíduos foram utilizados para a determinação de um dendrograma para o estabelecimento das relações genéticas entre os indivíduos de *A. grandis* (Figura 2).

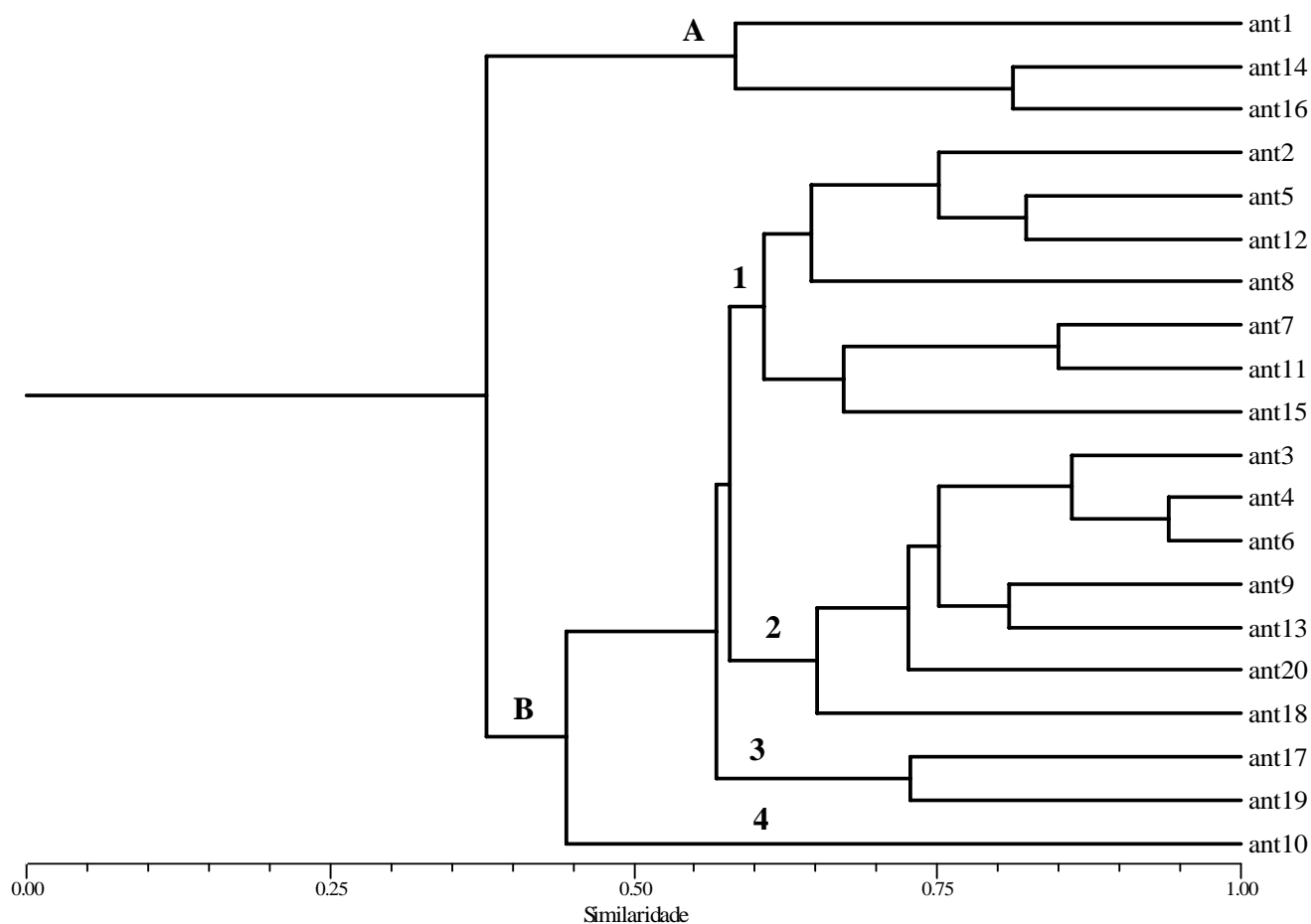


Figura 2 – Dendrograma construído a partir dos marcadores de RAPD obtidos de uma população de 20 indivíduos de *A. grandis* mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A análise do dendrograma possibilitou identificar dois grupos principais (A e B). O grupo A apresentou 32 % de similaridade genética em relação ao grupo B, sendo constituído pelos indivíduos 1, 14 e 16. Para o grupo B foi possível determinar quatro sub-grupos básicos. O sub-grupo 1 apresentou similaridades de 53 % e 52 % em relação ao subgrupos 2 e 3, respectivamente. O sub-grupo 3 foi formado pelo agrupamento dos indivíduos 19 e 17. Essas informações confirmam a variabilidade genética existente dentro da população de *A. Grandis* usada nesse estudo.

Em virtude de seu amplo espectro de uso, a técnica de RAPD tem sido aplicada em diferentes níveis de estudo na caracterização molecular tanto de populações de insetos-praga quanto das possíveis espécies relacionadas. Monnerat et al. (2004), por exemplo, demonstraram que não havia variabilidade genética intra-populacional em três espécies de *Diadegma* (Himenoptera: Ichneumonidae), um importante parasitóide de larvas das traças das crucíferas *Plutela xylostella*. Além disso, marcadores moleculares gerados por RAPD podem ser usados para o desenvolvimento de primers específicos para espécies de coleópteros. Essa estratégia já foi aplicada em lepidópteros por Agusti et al. (1999) que desenvolveram primers específicos para a detecção de *H. armigera* no intestino de possíveis predadores dessa espécie. Usando a técnica de RAPD gerou-se um fragmento de 1200 pb - presente apenas em *H. armigera* e ausente no predador *Dicyphus tamaninii* - que foi então usado para a obtenção de um par de primers específico para essa região em *H. armigera*. Com essa estratégia foi possível detectar o inseto no intestino do respectivo predador.

Dessa forma, os marcadores moleculares obtidos por RAPD mostram-se úteis para o desenvolvimento de várias estratégias para o estudo da dinâmica das populações de lepidópteros, assim como, para a caracterização de potenciais agentes de biocontrole.

Contudo, o sucesso na obtenção de marcadores moleculares por RAPD é dependente da qualidade do DNA obtido a partir dos tecidos do inseto. A técnica de extração utilizada nesse trabalho, forneceu DNA com qualidade para analisar a variabilidade genética de uma população de *A. grandis* utilizando-se cinco primers de RAPD, como também, permitindo analisar os marcadores moleculares em estágios iniciais do desenvolvimento desse inseto.

Uma futura aplicação pode ser o desenvolvimento de um banco de marcadores moleculares de RAPD para o monitoramento dessa espécie em campo. Para isso várias populações devem ser analisadas representando locais diferentes de ocorrência da espécie e hospedeiros (culturas) diferentes.

CONCLUSÃO

O protocolo de extração que foi adaptado para esse trabalho produziu DNA em quantidade e em qualidade para as reações de amplificação usando os cinco

primers de RAPD. Esses primers produziram perfis eletroforéticos para a caracterização e a análise da variabilidade genética dos indivíduos da população de *A. grandis*. Os primers OPA-03, OPA-10, e OPA-13 produziram bandas monomórficas que podem ser características para essa espécie de coleóptero, para confirmar este dado será necessário realizar a análise de outras populações deste inseto. Apesar da utilização de poucos marcadores RAPD, o dendrograma indicou a organização dessa população em dois grupos principais indicando uma variabilidade genética entre 45 % e 92 %. Estes resultados mostram que a técnica pode ser eficiente em estudos de variabilidade genética de *A. grandis*, quando se utiliza um maior número de marcadores RAPD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGUSTI, N.; DE VICENTE, M. C.; GABARRA, R. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1467-1474, 1999.

CARVALHO, R. P. L. **Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo.** 1970. 170p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

CIAMPI, A. Y.; MAGALHÃES, M. T. Q. **Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 8 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 60)

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 355-359, 1982.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; SANTOS, F. H. dos; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. **Manual de Identificação de Pragas da Cultura do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1997. 71p.

CRUZ, I., VIANNA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Manejo das pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1999. 39p. (EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 31).

CRUZ, V. R. da; PASSOS, S. M. de G. **Algodão (*Gossypium hirsutum*)**. Disponível em: < http://www.agrocasas.com.br/Arquivos_culturas/Culturas/ALGOD%C3O.htm >. Acesso em: set., 2002.

DOS SANTOS, R. C. **Estudos biológicos e moleculares da colesterol oxidase visando o controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843)**. Brasília: UNB, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20)

MEREGE, W. H. **Milho (*Zea mays* L.)**. Disponível em: < <http://www.agrobyte.com.br/milho.htm> >. Acesso em: 4 maio, 2001.

MONNERAT, R. G.; LEAL-BERTIOLI, S.; BERTIOLI, D.; BUTT, T.; BORDAT, D. Variabilidade Genética do Parasitóide *Diadegma* sp. através de RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 90-92, 2004.

MONNERAT, R. G.; NOBRE, S. D. N.; OLIVEIRA NETO, O. B.; SCHMIDT, F. G. V.; DIAS, S. C.; LAUMAN, R.; GROSSI DE SÁ, M. F.; SUJI, E. R. **Parâmetros bionômicos do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) criado em dieta artificial para a realização de bioensaios**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 22 p. – (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 29).

MONTESBRAVO, E. P. **Control biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith em maiz.** Disponível em: < <http://codagea.edoags.gov.mx/~produce/SPODOPTTE.htm> >. Acesso em: 26 abr., 2001.

PONCHIO, L. A. **Paridade de preços nos mercados nacional e internacional do algodão e a competitividade da cotonicultura brasileira.** 2001. 48p. Monografia (Graduação) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

QUEIROZ, P. R.; MARTINS, E. S.; MONNERAT, R. G.; LIMA, L. H. C. **Análise da variabilidade genética de uma população de *Spodoptera frugiperda* (j.e. smith, 1797) (lepidoptera: noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 18 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 75).

RHOLF, F. J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate System.** Version 2.9. New York: Applied Biostatistics, 1993.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.