

**Determinação do Número de Marcadores
RAPD para a Análise da Variabilidade
Genética de uma Colônia de *Spodoptera
frugiperda* (J.E. Smith, 1797)
(Lepidoptera: Noctuidae)**

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 191

**Determinação do Número de Marcadores
RAPD para a Análise da Variabilidade
Genética de uma Colônia de *Spodoptera
frugiperda* (J.E. Smith, 1797)
(Lepidoptera: Noctuidae)**

Paulo Roberto Queiroz
Érica S. Martins
Lílian Botelho Praça
Luzia Helena Corrêa Lima
Rose G. Monnerat

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) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

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: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

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

D 479 Determinação do Número de Marcadores RAPD para a Análise da Variabilidade Genética de uma Colônia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) / Paulo Roberto Queiroz ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
20 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 191).

1. *Spodoptera frugiperda* - lagarta-do-cartucho. 2. *Spodoptera frugiperda* - insecta. 3. RAPD. 4. Marcadores moleculares. 5. Controle biológico. I. Queiroz, Paulo Roberto. II. Série.

631.5233 - CDD 21.

Sumário

Resumo.....	04
Abstract.....	05
Introdução.....	06
Materiais e Métodos.....	09
Resultados	13
Discussão.....	19
Conclusão.....	20
Referências Bibliográficas.....	22

Determinação do Número de Marcadores RAPD para a Análise da Variabilidade Genética de uma Colônia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

Paulo Roberto Queiroz¹
Érica S. Martins²
Lílian Botelho Praça³
Luzia Helena Corrêa Lima⁴
Rose G. Monnerat⁵

Resumo

Spodoptera frugiperda é uma praga que ocasiona danos a diversas culturas economicamente importantes, em várias regiões produtoras do país. Popularmente conhecida como lagarta do cartucho ou lagarta militar, é considerada a principal praga da cultura do milho no Brasil, apesar de danificar também outras culturas. A resistência a inseticidas é uma realidade no manejo de *S. frugiperda*, o que tem dificultado ainda mais o seu controle. Um aspecto importante para o controle é o conhecimento de suas características fenotípicas e genotípicas. Este conhecimento pode auxiliar no estabelecimento do perfil genético do inseto e na identificação de marcadores que apontem para populações resistentes a inseticidas ou para populações potencialmente transmissoras de doenças. Uma das estratégias para contornar o problema pode ser a utilização da técnica de RAPD. Uma característica deste tipo de marcador é o seu comportamento como marcador genético dominante. A dominância, neste caso, não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo *locus* e sim a interpretação relativa entre fenótipo e genótipo.

Palavras-chave: Insecta; lagarta-do-cartucho; RAPD; Marcadores moleculares.

¹ Biólogo – Doutor Biologia Animal – Universidade de Brasília – UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: queiroz@cenargen.embrapa.br

² Bióloga – Doutoranda Biologia Molecular – Universidade de Brasília – UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: erica@cenargen.embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma – Mestrado Ciências Agrárias - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: lilian@cenargen.embrapa.br

⁴ Pesquisador Dr. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: luzia@cenargen.embrapa.br

⁵ Pesquisador Dr. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: rose@cenargen.embrapa.br

Abstract

Spodoptera frugiperda is a pest that attacks several cultures economically important in several producing areas of the country. Popularly known as fall armyworm, is considered the main pest of corn crop in Brazil, in spite of also attacking other crops. The resistance to insecticides is a reality in the handling of *S. frugiperda*, what has been hindering the control. An important aspect for the control is the knowledge of their phenotype and genotype characteristics. This knowledge can aid in the establishment of a genetic profile of the insect and in the identification of markers that appear for resistant populations to insecticides or for populations, vectors of diseases. One of the strategies to outline the problem can be the use of the technique of RAPD. A characteristic of this molecular marker is the behavior as a dominant genetic marker. The dominance, in this case, doesn't refer to the genetic interaction among allele of the same *locus* but the relative interpretation between phenotype and genotype.

Key words: Insecta; fall armyworm; RAPD; Molecular Markers.

Introdução

Spodoptera frugiperda (J. Smith 1797) é um importante lepidóptero praga que ocasiona danos a diversas culturas economicamente importantes, em várias regiões produtoras do país. É conhecida popularmente como lagarta do cartucho ou lagarta militar, sendo considerada a principal praga da cultura do milho no Brasil, mas ataca também outras culturas como: algodão, sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, batata, repolho, espinafre, abóbora, alface e couve (CRUZ et al., 1999; MONTESBRAVO, 2001; CRUZ e MONTEIRO, 2004). Apenas na cultura do milho, uma das mais importantes em escala nacional, essa praga pode provocar danos na ordem de 34 a 38%. (VALICENTE e CRUZ, 1991; CRUZ et al., 1995; MEREGE, 2001). Uma das principais razões para o aumento desta praga e de outras no Brasil têm sido devido às alterações no meio ambiente, provocadas pelo homem, com a expansão de fronteiras e desenvolvimento de novas tecnologias de produção (PARRA e OMOTO, 2004).

O ataque de *S. frugiperda* às folhas danifica o tecido meristemático, ocasionando o sintoma conhecido como folhas raspadas. Quando o ataque é mais intenso, as lagartas causam buracos nas folhas, redução da população de plantas, chegando a destruir completamente plantas pequenas e causando severos danos em plantas maiores e mudanças na sua arquitetura (MEREGE, 2001). Estas lagartas causam danos desde a emergência até a maturação das plantas, ou seja, em todos os estágios de desenvolvimento das diversas culturas (SANTOS, 2001; GALLO et al., 2002; CRUZ et al., 1997; FUNDAÇÃO MT, 2001). Em determinados anos, as lagartas atingem níveis populacionais elevados, podendo destruir totalmente as lavouras (BUSATO et al., 2004).

Os adultos de *S. frugiperda* são mariposas de aproximadamente 30 a 35mm de envergadura com asas anteriores de coloração marrom-acinzentada, tendo os machos, manchas no ápice bem visíveis, enquanto que, nas fêmeas são quase imperceptíveis. Em ambos os sexos as asas posteriores são esbranquiçadas e hialinas. No milho, este inseto faz a postura em massa na face adaxial das folhas, e cada fêmea coloca cerca de 1500 ovos durante a vida. Elas apresentam um “y” invertido na parte frontal da cabeça (CRUZ et al., 1995; GALLO et al., 2002). As lagartas passam por seis instares larval e no último instar pode atingir até 40 mm de comprimento (DEGRANDE, 1998).

Um aspecto importante no controle desta importante praga é o conhecimento de suas características fenotípicas e genotípicas. Este conhecimento pode auxiliar no estabelecimento do perfil genético deste inseto e na identificação de marcadores que apontem para populações resistentes a inseticidas ou para populações potencialmente

transmissoras de doenças. A resistência a inseticidas é uma realidade no manejo de *S. frugiperda*, o que tem dificultado ainda mais o seu controle. Uma das estratégias para contornar o problema da resistência tem sido a necessidade de aplicação rotacional de inseticidas de mecanismos de ação distintos, que pode ser auxiliado pela técnica de RAPD.

A técnica de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) tem sido muito utilizada 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 sequência arbitrária com potencial de reconhecer regiões desconhecidas do DNA alvo. Podendo vir a se tornar uma técnica importante no planejamento de sistemas de produção de culturas e um passo crucial para a implementação de estratégias efetivas de Manejo de Pragas, (PARRA e OMOTO, 2004) como *S. frugiperda*.

Os marcadores RAPD se baseiam na amplificação do DNA, gerando informações com simplicidade e rapidez a baixos custos. Assim, grande quantidade de polimorfismo na forma de segmentos de DNA podem ser 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. Lembrando que a dominância, neste caso, não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo *locus* e sim a interpretação relativa entre fenótipo e genótipo (CIAMPI e MAGALHÃES, 2001).

Objetivo

O objetivo desse trabalho foi determinar o número de marcadores moleculares de RAPD ideal para a análise da variabilidade genética dos indivíduos de *S. frugiperda* mantidos em uma colônia.

Materiais e Métodos

Insetos utilizados na análise molecular

Foram utilizados vinte indivíduos de *S. frugiperda* coletados aleatoriamente a partir de uma colônia estabelecida no laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e

Biotecnologia. Para a análise molecular dos indivíduos da colônia foram utilizadas larvas em seu terceiro ínstar de desenvolvimento que foram mantidas em etanol 100 % a – 20 °C até o momento do uso.

Obtenção de ácido nucléico total

Para os estudos de caracterização molecular, o DNA dos indivíduos 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 cada larva a uma maceração individual 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 60 min a 65 °C. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10.000 $\times g$ 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 10.000 $\times g$ 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 16 h a – 20 °C. Após centrifugação a 10.000 $\times g$ por 10 min a 10 °C, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente, 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 (aproximadamente 100 ng) em TE 0,1 X.

Reações de RAPD

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 contendo 24,9 µL de água milliQ, 3,0 µL de tampão 10 X (Amersham Bioscience), 1,2 µL de *primer* 10 µM (Operon technologies, Inc., CA, USA) (Tabela 1), 0,6 µL de dNTP's (10 mM) e 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase na concentração de 5 U.µL⁻¹ (Amersham) e 5 µL (20 ng) de DNA.

Tabela 1 – Seqüência dos oligonucleotídeos de RAPD utilizados na determinação dos perfis eletroforéticos das diversas populações de insetos submetidas a análise molecular.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')
OPA-02	TGC CGA GCT G
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
OPA-18	AGG TGA CCG T
OPA-20	GTT GCG ATC C
OPE-03	CCA GAT GCA C
OPE-07	AGA TGC AGC 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.

Análise por eletroforese dos fragmentos de DNA gerados por RAPD

Os produtos de amplificação originários das reações de RAPD foram separados em gel de agarose 1,5 % submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 3 h a 160 V. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30 min em uma solução corante contendo brometo de etídio (**5 µg.mL⁻¹**), descorados por 30 min em água destilada e fotografado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 300 nm. A documentação fotográfica foi feita usando-se o sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene).

Em todos os géis, marcadores de massa molecular (100 bp Ladder - INVITROGEN) foram usados para a determinação da massa molecular dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD.

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 então gerada 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 (SNEATH e SOKAL, 1973) e que, por meio da análise por UPGMA (unweighted pair-group method analysis), produziu-se um dendrograma que evidenciou o agrupamento dos indivíduos, utilizando-se o programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 2.02 pc (RHOLF, 1993).

A seguir, os valores obtidos e tabelados em uma planilha foram submetidos à análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação estatística das possíveis origens das variabilidades encontradas nas populações pela aplicação de algoritmos específicos pelo programa Arlequin ver. 2000 (SCHNEIDER et al., 2000).

Resultados

Em trabalho anterior, Queiroz et al. (2004) utilizaram 5 *primers* (OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13) para a determinação dos perfis eletroforéticos de marcadores moleculares de RAPD adequados para a detecção de indivíduos de *S. frugiperda*, como também, para o estudo da variabilidade genética de uma população mantida em uma colônia. A seguir, questionou-se qual número de *primers* de RAPD deveriam ser utilizados para o rápido levantamento da variabilidade genética dentro de uma população de *S. frugiperda* mantida sob condições controladas. Sendo assim, procedeu-se a uma análise molecular empregando dez *primers* de RAPD (OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-18, OPA-20, OPE-03 e OPE-07) para a avaliação do número mínimo necessário e efetivo para uma rápida avaliação da variabilidade genética dentro de uma população de *S. frugiperda*.

Os dados obtidos a partir do emprego dos dez *primers* indicaram que os mesmos produziram diferentes informações com relação à seleção de bandas candidatas para o emprego em estratégias de identificação de *S. frugiperda* (Tabela 1).

Tabela 1 – Determinação do número total de fragmentos obtidos com o emprego de dez *primers* de RAPD.

Fragmentos	Primer										Total
	OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-10	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-20	OPE-03	OPE-07	
Monomórficos	3	3	6	3	2	4	3	1	1	4	30
Polimórficos	0	7	3	5	5	4	0	0	1	0	30
Total	3	10	9	8	7	8	3	1	2	4	60

O emprego dos dez oligonucleotídios produziu um total de 60 fragmentos de RAPD sendo que, cada oligonucleotídio produziu, em média, $5,5 \pm 3,2$ fragmentos de DNA. Ainda, a partir desses resultados, observou-se que os *primers* OPA-04, OPA-13 e OPE-07 forneceram o maior número de fragmentos monomórficos úteis para a identificação molecular dos indivíduos da espécie *S. frugiperda*. Além disso, os *primers* OPA-03, OPA-10 e OPA-11 produziram o maior número de fragmentos polimórficos de RAPD adequados para os estudos de variabilidade genética dessa espécie em questão. Observou-se, ainda, que os *primers* OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13 foram os oligonucleotídios que produziram o maior número de fragmentos de RAPD. Essa característica é particularmente importante no que diz respeito à seleção de *primers* de RAPD capazes de gerar o maior número de informação para a análise de variabilidade genética dentro de uma população.

A seguir, procurou-se determinar os fragmentos, gerados pelos vários *primers* de RAPD, candidatos para a identificação molecular dos indivíduos de *S. frugiperda*. A partir do emprego dos dez *primers* de RAPD foram obtidos 25 prováveis fragmentos candidatos para a identificação molecular dos indivíduos de *S. frugiperda* (Tabela 2).

Tabela 2 – Fragmentos gerados pelo emprego de dez *primers* de RAPD com potencial de emprego na identificação molecular dos indivíduos de *S. frugiperda*.

	<i>Primer</i>									
	OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-10	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-20	OPE-03	OPE-07
Fragmentos de RAPD (pb)	400, 650 e 1100	800 e 1000	450, 550, 800 e 1000	500 e 1200	400 e 950	500, 950 e 1100	550, 1100 e 1300	650	950	400, 600, 850 e 1450
Total	3	2	4	2	2	3	3	1	1	4

Dos resultados obtidos observou-se que os oligonucleotídeos OPA-04 e OPE-07 foram os *primers* de RAPD que produziram o maior número de fragmentos de DNA com potencial para a identificação molecular de *S. frugiperda*. A seguir, os oligonucleotídeos OPA-02, OPA-13 e OPA-18 produziram 3 fragmentos de DNA adequados para a finalidade sugerida anteriormente. O emprego dos *primers* OPA-20 e OPE-03 nas reações de amplificação de RAPD geraram um fragmento com potencial para a clonagem e o desenvolvimento de um novo marcador molecular como, por exemplo, o marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). Sendo assim, para a identificação molecular dos indivíduos de *S. frugiperda*, sugere-se a combinação de dois ou mais *primers* que estejam listados na tabela 2.

A partir da planilha de dados binários obtida pela análise dos perfis eletroforéticos de marcadores moleculares, obteve-se a distância genética entre os indivíduos componentes de uma mesma colônia. Das informações obtidas, observou-se variação dentro do grupo analisado (Figura 1).

	SF01	SF02	SF03	SF04	SF05	SF06	SF07	SF08	SF09	SF10	SF11	SF12	SF13	SF14	SF15	SF16	SF17	SF18	SF19	SF20
SF01	0.00																			
SF02	0.17	0.00																		
SF03	0.14	0.17	0.00																	
SF04	0.38	0.40	0.38	0.00																
SF05	0.29	0.31	0.19	0.24	0.00															
SF06	0.21	0.19	0.07	0.40	0.21	0.00														
SF07	0.17	0.14	0.26	0.36	0.26	0.24	0.00													
SF08	0.21	0.33	0.31	0.36	0.36	0.33	0.33	0.00												
SF09	0.57	0.69	0.57	0.33	0.43	0.60	0.64	0.50	0.00											
SF10	0.38	0.40	0.38	0.14	0.33	0.40	0.40	0.36	0.33	0.00										
SF11	0.17	0.19	0.12	0.36	0.17	0.19	0.14	0.33	0.55	0.40	0.00									
SF12	0.12	0.19	0.07	0.40	0.21	0.14	0.24	0.24	0.55	0.40	0.10	0.00								
SF13	0.29	0.21	0.24	0.48	0.33	0.21	0.26	0.26	0.71	0.48	0.26	0.17	0.00							
SF14	0.31	0.29	0.31	0.36	0.31	0.29	0.29	0.29	0.60	0.50	0.29	0.29	0.26	0.00						
SF15	0.19	0.12	0.24	0.38	0.29	0.21	0.07	0.36	0.67	0.43	0.21	0.26	0.24	0.26	0.00					
SF16	0.36	0.43	0.36	0.26	0.26	0.38	0.33	0.29	0.40	0.36	0.33	0.33	0.36	0.33	0.36	0.00				
SF17	0.26	0.33	0.36	0.40	0.40	0.33	0.33	0.14	0.60	0.40	0.43	0.33	0.26	0.24	0.36	0.29	0.00			
SF18	0.45	0.43	0.40	0.21	0.36	0.48	0.48	0.40	0.17	0.43	0.43	0.45	0.52	0.45	0.38	0.43	0.00			
SF19	0.26	0.24	0.21	0.26	0.21	0.24	0.24	0.29	0.45	0.31	0.14	0.19	0.31	0.24	0.26	0.38	0.38	0.38	0.00	
SF20	0.31	0.29	0.31	0.31	0.31	0.33	0.29	0.24	0.60	0.40	0.29	0.29	0.26	0.38	0.26	0.38	0.38	0.43	0.24	0.00

Figura 1 – Valores indicativos da distância genética dos indivíduos de *S. frugiperda* obtidos após a análise dos marcadores moleculares obtidos pelo emprego de 10 *primers* de RAPD. Os valores destacados em um quadrado representam as maiores distâncias e os valores indicados em elipses representam as menores distâncias entre dois indivíduos.

Observou-se que as maiores distâncias genéticas ficaram entre os indivíduos: a) SF09 e SF13 (71 %) e; b) SF02 e SF09 (69%). Além disso, observou-se que os indivíduos: a) SF03 e SF06; b) SF03 e SF12 e; c) SF07 e SF15, apresentaram apenas 7 % de distância entre si. Esse resultado demonstra a grande variabilidade dentro do grupo em estudo, uma vez que, este apresentou grandes amplitudes de variação entre os indivíduos.

A seguir, realizou-se a mesma análise para o conjunto de 10 *primers* de RAPD, onde não foram observadas variações em relação ao resultado anterior (Figura 2).

	SF01	SF02	SF03	SF04	SF05	SF06	SF07	SF08	SF09	SF10	SF11	SF12	SF13	SF14	SF15	SF16	SF17	SF18	SF19	SF20
SF01	0.00																			
SF02	0.17	0.00																		
SF03	0.14	0.17	0.00																	
SF04	0.38	0.40	0.38	0.00																
SF05	0.29	0.31	0.19	0.24	0.00															
SF06	0.21	0.19	0.07	0.40	0.21	0.00														
SF07	0.17	0.14	0.26	0.36	0.26	0.24	0.00													
SF08	0.21	0.33	0.31	0.36	0.36	0.33	0.33	0.00												
SF09	0.57	0.69	0.57	0.33	0.43	0.60	0.64	0.50	0.00											
SF10	0.38	0.40	0.38	0.14	0.33	0.40	0.40	0.36	0.33	0.00										
SF11	0.17	0.19	0.12	0.36	0.17	0.19	0.14	0.33	0.55	0.40	0.00									
SF12	0.12	0.19	0.07	0.40	0.21	0.14	0.24	0.24	0.55	0.40	0.10	0.00								
SF13	0.29	0.21	0.24	0.48	0.33	0.21	0.26	0.26	0.71	0.48	0.26	0.17	0.00							
SF14	0.31	0.29	0.31	0.36	0.31	0.29	0.29	0.29	0.60	0.50	0.29	0.29	0.26	0.00						
SF15	0.19	0.12	0.24	0.38	0.29	0.21	0.07	0.36	0.67	0.43	0.21	0.26	0.24	0.26	0.00					
SF16	0.36	0.43	0.36	0.26	0.26	0.38	0.33	0.29	0.40	0.36	0.33	0.33	0.36	0.33	0.36	0.00				
SF17	0.26	0.33	0.36	0.40	0.40	0.33	0.33	0.14	0.60	0.40	0.43	0.33	0.26	0.24	0.36	0.29	0.00			
SF18	0.45	0.43	0.40	0.21	0.36	0.48	0.48	0.48	0.40	0.17	0.43	0.43	0.45	0.52	0.45	0.38	0.43	0.00		
SF19	0.26	0.24	0.21	0.26	0.21	0.24	0.24	0.29	0.45	0.31	0.14	0.19	0.31	0.24	0.26	0.38	0.38	0.38	0.00	
SF20	0.31	0.29	0.31	0.31	0.31	0.33	0.29	0.24	0.60	0.40	0.29	0.29	0.26	0.38	0.26	0.38	0.38	0.43	0.24	0.00

Figura 2 – Valores indicativos da distância genética dos indivíduos de *S. frugiperda* obtidos após a análise dos marcadores moleculares obtidos pelo emprego de 10 *primers* de RAPD. Os valores destacados em um quadrado representam as maiores distâncias e os valores indicados em elipses representam as menores distâncias entre dois indivíduos.

Dos resultados obtidos foram observadas as mesmas amplitudes de variação de distância genética entre os indivíduos do grupo em estudo. Esses resultados indicam para a possibilidade do emprego de um menor número de *primers* de RAPD no que diz respeito ao estudo das características genéticas de uma população estabelecida em uma criação sob condições controladas.

Da análise do dendrograma obtido com 5 *primers* (QUEIROZ et al., 2004) observou-se que o coeficiente de similaridade variou de uma amplitude de 35 % a 92 % entre os indivíduos da colônia de *S. frugiperda*. No dendrograma obtido foram identificados dois agrupamentos com 54 % de similaridade genética. Ainda, o indivíduo SF09 apresentou o menor coeficiente de similaridade (35 %), separando-se dos demais no dendrograma. Além disso, o indivíduo SF13 agrupou-se próximo ao indivíduo SF05.

O novo dendrograma gerado a partir dos dez oligonucleotídeos de RAPD indicou alteração no agrupamento de um indivíduo do grupo (Figura 3).

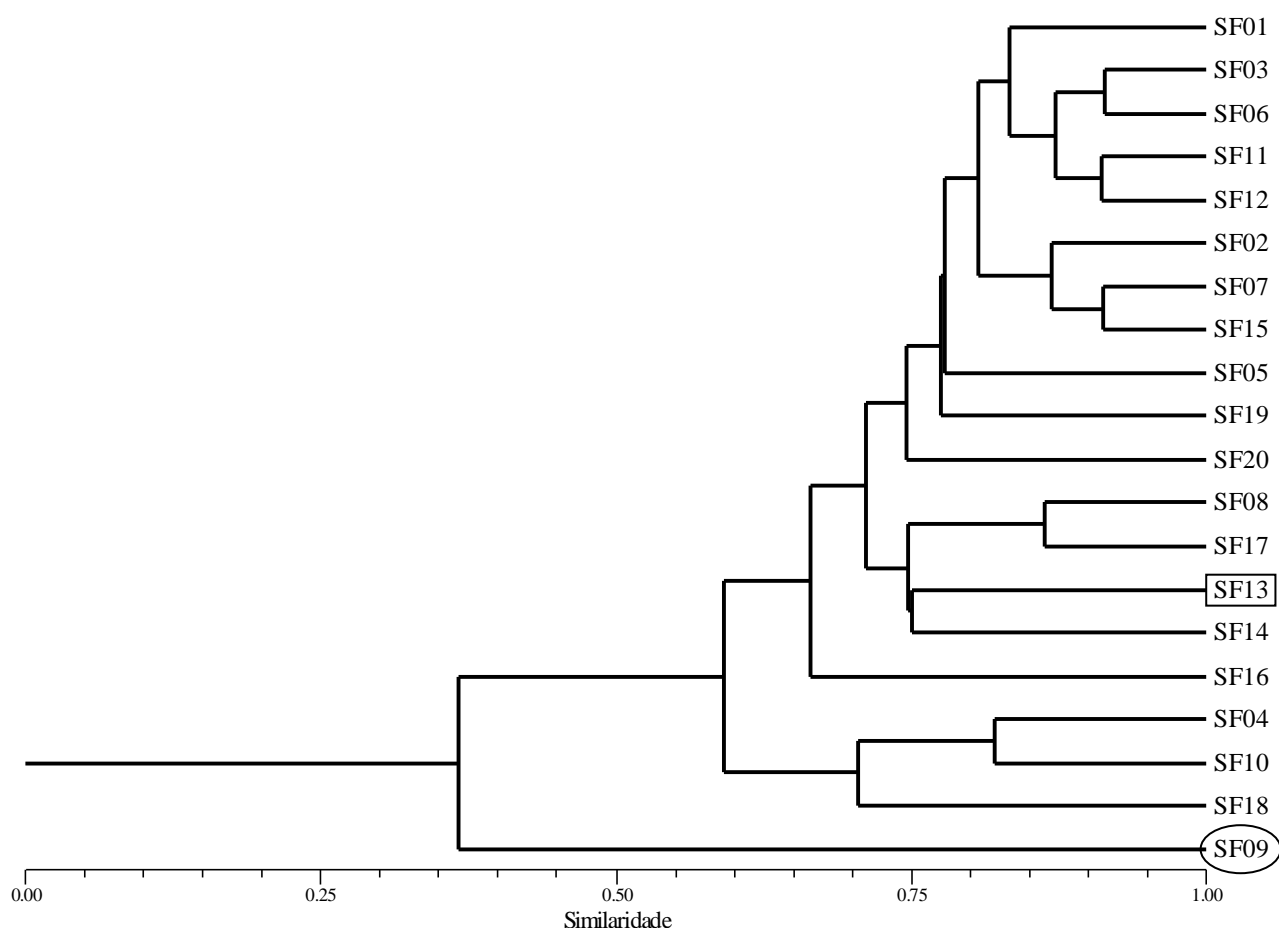


Figura 3 – Dendrograma obtido a partir do emprego de dez oligonucleotídios de RAPD para um grupo de *S. frugiperda* estabelecidos em uma colônia. O quadrado indica o indivíduo de *S. frugiperda* que apresentou alteração em relação ao dendrograma gerado com dez *primers* de RAPD. A elipse indica o indivíduo de *S. frugiperda* que apresentou o menor coeficiente de similaridade entre os demais indivíduos da população.

A análise do dendrograma gerado pelo emprego de 10 *primers* de RAPD indicou uma amplitude de coeficiente de similaridade variando de 37 % a 93 %. Além disso, foram obtidos dois grupos principais com 59 % de similaridade entre si. Ainda, como resultado, observou-se que o indivíduo SF09 apresentou 37 % de similaridade em relação aos demais

indivíduos da colônia. O novo dendrograma gerado pelos dez oligonucleotídeos de RAPD indicou uma alteração para o SF13, sendo este agrupado com o indivíduo SF14.

Discussão

Perfis eletroforéticos de fragmentos de DNA gerados por RAPD têm sido utilizados para a identificação molecular de espécies de insetos. Por exemplo, em 1993, Gawel e Bartlett utilizaram a técnica de RAPD para o estudo de *Bemisia tabaci*. Utilizando vinte *primers* de RAPD, os autores distinguiram dois biótipos de ocorrência nas culturas dos Estados Unidos: os biótipos A e B. Em função desses resultados, os autores apontam para a aplicação do RAPD na diferenciação de biótipos de *B. tabaci* que apresentem semelhança morfológica e proximidade genética.

Martinelli et al. (2006) analisaram a variabilidade genética entre dez populações de *S. frugiperda* coletadas em milho (*Zea mays*) e algodão (*Gossypium hirsutum*) utilizando a técnica de RAPD. A partir dos 206 fragmentos de RAPD analisados, os autores observaram que 98 % desses marcadores eram polimórficos. Os resultados obtidos sugeriram a ocorrência de considerável fluxo gênico entre as populações de *S. frugiperda* estabelecidas nas culturas de milho e algodão localizadas em uma mesma região do Brasil.

A importância do emprego da técnica de RAPD na análise molecular de espécies de insetos de interesse agrícola está relacionada com a identificação de fragmentos de RAPD que sejam específicos a uma dada espécie de inseto. Uma vez identificados esses fragmentos, novos marcadores podem ser desenvolvidos para a identificação molecular mais precisa da espécie de interesse. Por exemplo, Agusti et al. (1999) descrevem o desenvolvimento de marcadores SCAR para a detecção de *Helicoverpa armigera* no intestino de possíveis predadores. Um fragmento de 1200 pb resultante da amplificação por RAPD usando o DNA de *H. armigera* permitiu o desenho de três conjuntos de *primers* sendo que dois desses foram capazes de detectar vestígios de *H. armigera* no intestino médio do seu predador *Dicyphus tamaninii* mesmo após 4 h da ingestão dos ovos de *H. armigera*. Esses resultados indicaram a possibilidade de seleção de determinados fragmentos de DNA, gerados por RAPD e específicos para cada espécie, para o desenvolvimento de *kits* para a identificação das mesmas.

Esses dados indicam e demonstram a variabilidade genética existente dentro e entre algumas das populações de insetos-praga de interesse agrícola. Essas avaliações são particularmente importantes no que diz respeito a seleção de fragmentos de RAPD potenciais para o desenvolvimento de *kits* que sejam sensíveis e eficientes para a detecção

e a identificação de espécies de insetos de interesse agrícola. A partir dessas informações poderão ser desenvolvidas estratégias moleculares para o monitoramento e o controle da dispersão de insetos que sejam de interesse agrônomo, como também, para a associação com outras características biológicas, tais como, a resistência a inseticidas químicos e a susceptibilidade a ação de bactérias entomopatogênicas.

Conclusão

O emprego de *primers* de RAPD permitiu obter perfis eletroforéticos específicos para a identificação de *S. frugiperda*. Das informações obtidas observou-se que os *primers* de RAPD OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-18, OPA-20, OPE-03 e OPE-07 foram adequados para a análise molecular dos indivíduos da espécie *S. frugiperda*. Dos *primers* previamente analisados sugerem-se o emprego dos oligonucleotídeos OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13 para a identificação molecular de indivíduos que sejam pertencentes à espécie *S. frugiperda*. Entretanto, para indivíduos que foram mantidos em colônia, o emprego dos dez *primers* de RAPD para análise da variabilidade genética seria a maneira mais plausível. A partir do emprego de dez oligonucleotídeos de RAPD foram obtidos 60 marcadores que permitiram obter um dendrograma onde as populações em estudo foram organizadas em dois grupos principais. Além disso, os *primers* OPA-20 e OPE-03 apresentaram potencial para o desenvolvimento de marcadores SCAR que são mais específicos para a identificação desse inseto e para o monitoramento do mesmo em campo.

Referências

- 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, UK, v. 8, p. 1467-1474, 1999.
- BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; ANDERSON, D.; GARCIA, M. S.; GIOLO, F. P.; ZOTTI, M. J.; MAGALHÃES, T. R. Tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz irrigado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, RS, v. 10, n. 4, p. 449-455, 2004.
- 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. 170 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- CIAMPI, A. Y.; MAGALHÃES, M. T. Q. de. **Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 8 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 60)

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. **Controle biológico da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitóide *Trichogramma pretiosum***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 4 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 98).

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, 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. 71 p.

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

CRUZ, I.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; VALICENTE, F. H. Pragas: diagnóstico e controle. In: COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. de. **Seja o doutor do seu milho**. 2ª ed. ampl. rev. Piracicaba: POTAFOS, 1995. p. 10-14. (Arquivo do agrônomo, n. 2).

DEGRANDE, P. E. Manejo integrado de pragas do algodoeiro. In: EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Algodão: informações técnicas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Campina Grande: Embrapa Algodão, 1998. 267 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular técnica, 7). p. 154-191.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).

FUNDAÇÃO MT. **Boletim de pesquisa de algodão**. Rondonópolis, 2001. 238 p. (Boletim, 4).

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; DE BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GAWEL, N. J. E.; BARTLETT, A. C. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. **Insect Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 2, n. 1, p. 33-38, 1993.

MARTINELLI, S.; BARATA, R. M.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-FILHO, M. C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 99, n. 2, p. 519-526, 2006.

MERGE, 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, DF, v. 22, n. 1, p. 90-92, 2004.

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.

PARRA, J. R. P.; OMOTO, C. Cada vez mais terríveis. **Cultivar**, v. 6, n. 59, p. 18-20, 2004.

QUEIROZ, P. R.; MARTINS, E. S.; MONNERATT, R. G.; LIMA, L. H. C. **Análise da variabilidade de uma população de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD**. Brasília, DF: 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.

SANTOS, W. J. Identificação, biologia e amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: **ALGODÃO: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p. 197-199.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000**: a software for populations genetics data analysis. Geneva: Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, 2000.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. Freeman: San Francisco, 1973. 573 p.

VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovirus**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1991. 23 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, 15).

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**, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.