

**Boletim de Pesquisa 75**

---

**e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 1340

Abril , 2004

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA  
POPULAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR MEIO DE  
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**

*José Amauri Dimázio*  
Presidente

*Clayton Campanhola*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Dietrich Gerhard Quast*  
*Sérgio Fausto*  
*Urbano Campos Ribeiral*  
Membros

**Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*  
Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*  
*Herbert Cavalcante de Lima*  
*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*  
Diretores-Executivos

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*José Manuel Cabral de Souza Dias*  
Chefe -Geral

*Maurício Antonio 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 75**

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
UMA POPULAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda*  
(J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE) POR MEIO DE MARCADORES  
MOLECULARES RAPD

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

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:** *Maria Isabel de Oliveira Penteadó*

**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 Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

A 532 Análise da variabilidade genética de uma população de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD / P. R. Queiroz ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

18 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 75)

1. Lagarta. 2. Insecta. 3. RAPD. 4. Caracterização molecular I. Queiroz, P. R. II. Série.

595.78139 – CDD 21

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA  
DE UMA POPULAÇÃO DE *Spodoptera*  
*frugiperda* (J.E. SMITH, 1797)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR  
MEIO DE MARCADORES  
MOLECULARES RAPD

P. R. Queiroz<sup>1</sup>

E. S. Martins<sup>2</sup>

R. G. Monnerat<sup>3</sup>

L. H. C. Lima<sup>3</sup>

---

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

<sup>2</sup> Bióloga - Mestranda em Patologia Molecular – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

# SUMÁRIO

Resumo .....	7
Abstract .....	8
Introdução .....	9
Material e Métodos .....	10
Resultados e discussão .....	12
Conclusão .....	17
Referências Bibliográficas .....	17

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD

**RESUMO**

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga que ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países. No Brasil, a perda de produção devido a esta lagarta pode chegar a 34%. Neste trabalho indivíduos de uma mesma população de *S. frugiperda* foram caracterizados geneticamente através 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: *Spodoptera frugiperda*, Insecta, RAPD, Caracterização molecular.

## ABSTRACT

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous insect that attacks many economically important crops in several countries. In Brazil, the loss of production due to this insect is about 34%. In this work, insects of the same *S. frugiperda* population were genetically characterized through RAPD-PCR. 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. A coefficient of genetic similarity between 35 to 90% showed a high degree of genetic variability in this population.



## INTRODUÇÃO

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga que ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países. No Brasil, este inseto pode atacar culturas como milho, sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, algodão, batata, repolho, espinafre, abóbora, couve, entre outras (CRUZ et al., 1999; MONTESBRAVO, 2001) ocasionando severos prejuízos, com perdas que variam de 15% a 34% da produção (CARVALHO, 1970; CRUZ e TURPIN, 1982).

A larva deste inseto pode atacar em todos os estágios da cultura (CRUZ et al., 1997), assumindo grande importância no México, América Central e América do Sul (MEREGE, 2001). Os danos são maximizados nas épocas secas do ano (CRUZ e TURPIN, 1982).

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) é muito utilizada na obtenção de informações na análise genômica. RAPD possui duas características distintas como a utilização de um único primer ao invés de um par e onde aquele tem seqüência arbitrária de modo que a região de DNA alvo é desconhecida.

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. Lembrando que a dominância, neste caso, não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo loco e sim a interpretação relativa entre fenótipo e genótipo (CIAMPI e MAGALHÃES, 2001).

## **OBJETIVO**

O presente trabalho tem como objetivo determinar a variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma população de *S. frugiperda* através de RAPD-PCR.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os indivíduos de *S. frugiperda* de terceiro ínstar foram coletados 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 de terceiro ínstar foram extraídos a partir dos protocolos modificados de Agusti et al. (1999) e Monnerat et al. (2004).

Submeteu-se um inseto inteiro 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 60 µg.mL<sup>-1</sup>), 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  $\mu\text{L}$  de uma reação de RAPD-PCR, contendo tampão Tris-HCl 6 mM (pH 8,8), KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, dNTP's 0,2 mM, 0,4  $\mu\text{M}$  de um primer de seqüência aleatória da Operon Technologies, Inc.(Tab. 1), 2,5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) e 5  $\mu\text{L}$  de DNA.

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

Primer	Seqüência (5' $\rightarrow$ 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 ampliações 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

Utilizando-se a metodologia de extração de DNA estabelecida, foi possível obter perfis eletroforéticos de *S. frugiperda* por meio de reações de RAPD. A fixação das células em etanol, seguida da conservação em baixa temperatura, permitiu a extração de DNA em quantidade e em qualidade para as reações de amplificação por RAPD. Nessas reações foram usados os primers OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13 que produziram diferentes perfis eletroforéticos entre os indivíduos analisados (Fig. 1).

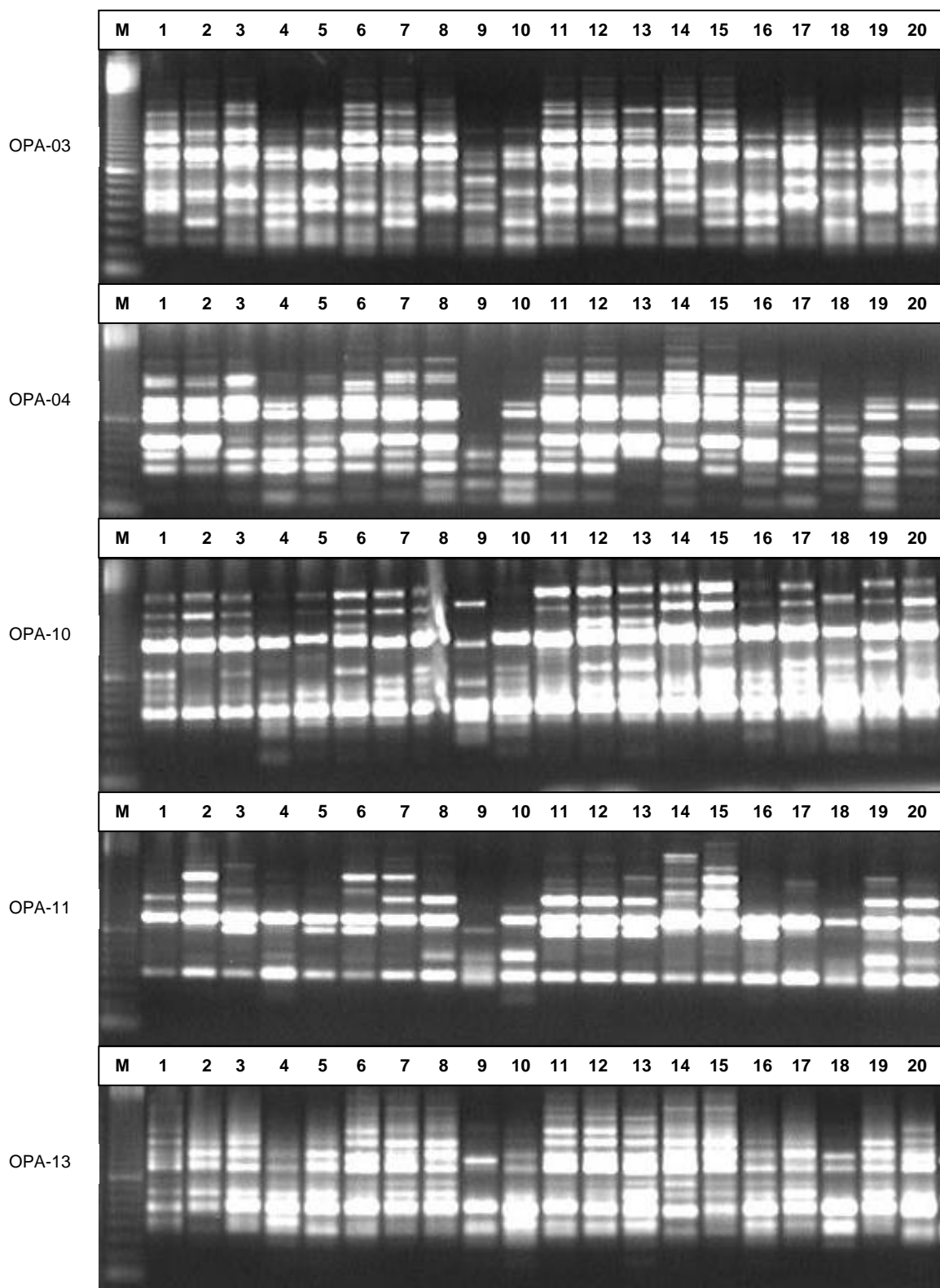


Figura 1 – Perfis eletroforéticos de vinte indivíduos de *S. frugiperda* produzido por cinco primers de RAPD. A letra M representa o marcador 100 pb ladder. Os números de 1 a 20 representam os indivíduos analisados nas reações de amplificação.

O primer OPA-10 produziu duas bandas monomórficas de 500 pb e 1200 pb identificável em todos os indivíduos de *S. frugiperda*. Utilizando-se o primer OPA-11 foram geradas duas bandas monomórficas de 400 pb e de 950 pb. Nos géis de agarose foi possível detectar uma diferença no perfil de bandas correspondente ao nono indivíduo da população (SF09). Para os demais primers observou-se um padrão de bandejamento similar entre os indivíduos. Contudo, mesmo com a utilização de poucos primers, foi possível identificar polimorfismos entre os indivíduos analisados nesse estudo.

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 *S. frugiperda*

	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

Por esses dados, foi possível identificar o indivíduo SF09 como sendo aquele de maior distância genética em relação aos demais organismos da população, variando de 55 % em relação aos indivíduos SF11 e SF12 até 71 % em relação ao indivíduo SF13. Por essa metodologia, observou-se variabilidade entre os indivíduos analisados.

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

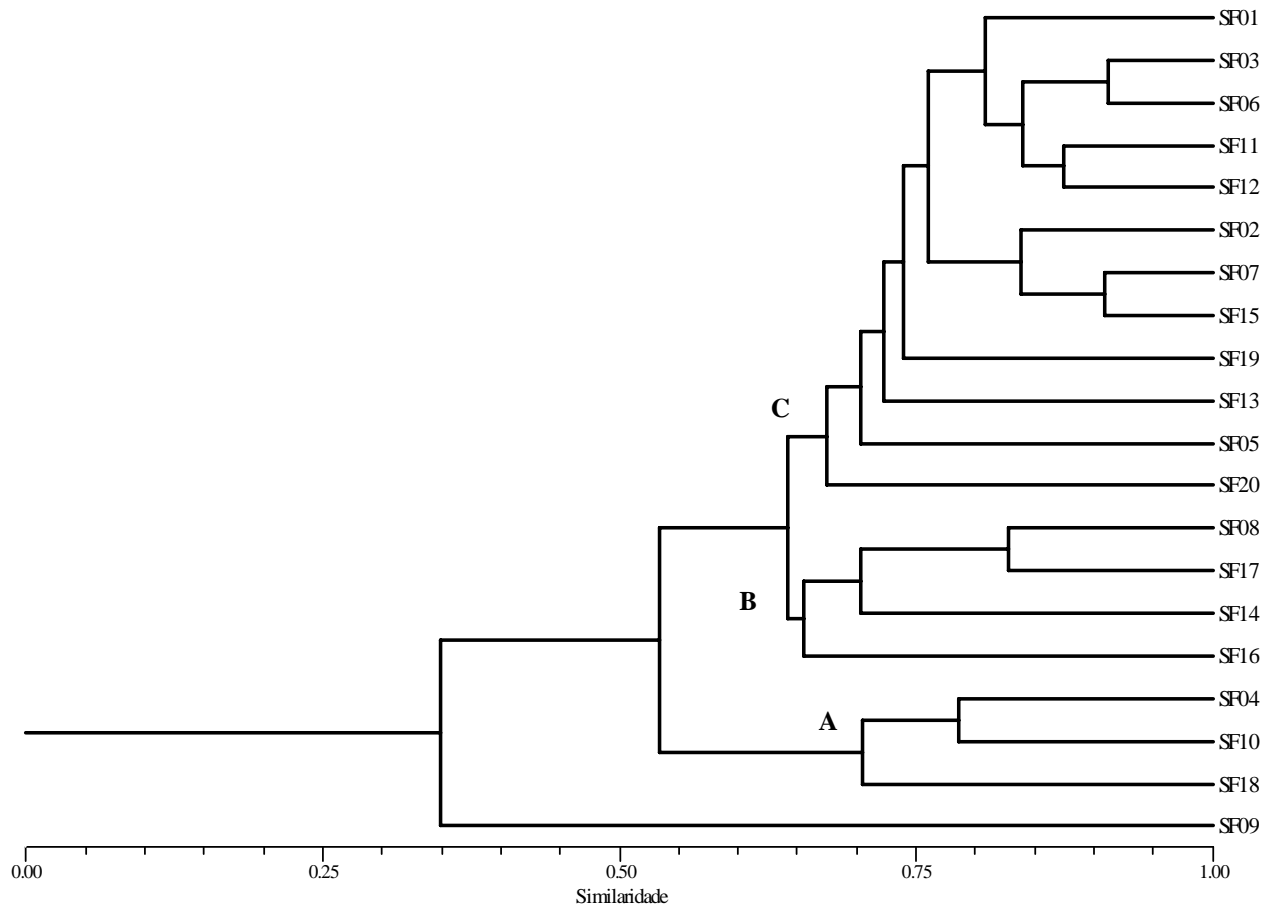


Figura 2 – Dendrograma construído a partir de dados obtidos de RAPD de uma população de 20 indivíduos de *S. frugiperda* mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A análise do dendrograma permitiu identificar 4 grupos principais sendo que o indivíduo SF09 (grupo **A**) apresentou a menor relação filogenética (35 %) em relação aos demais da população. O grupo **B** formado pelos indivíduos SF04, SF10 e SF18 apresentou 53 % de similaridade em relação aos grupos **C** e **D**. Os indivíduos do grupo C, SF08, SF17, SF14 e SF16, apresentaram similaridade de 64 % em relação ao grupo **D**. Por sua vez, o grupo **D** foi formado pelos demais indivíduos da população, apresentando 68 % de similaridade genética.

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*. Tsai et al. (1999) utilizando essa mesma técnica, demonstraram o potencial de uso do RAPD para a análise filogenética de parasitas intercelulares obrigatórios do gênero *Nosema* que foram isolados de lepidópteras, tais como, *Spodoptera litura*, *S. exígua*, *Helicoverpa armigera*, *P. xylostella* e *Pieris* spp. Nesse trabalho, observou-se que os isolados de *Nosema*, presentes em *Pieris* spp., *S. exígua* e *H. armigera*, eram mais próximos filogeneticamente. A importância do gênero *Nosema* está no fato de que as ordens de insetos Lepidóptera e díptera são os hospedeiros mais suscetíveis e, dessa forma, o gênero *Nosema* desempenha um papel importante em regular o tamanho das populações de insetos.

Além disso, a partir dos marcadores moleculares gerados por RAPD é possível o desenvolvimento de primers específicos para as espécies de lepidópteras. Essa estratégia foi aplicada 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 lepidópteras, assim como, para a caracterização de potenciais agentes de biocontrole.

Contudo, o sucesso na obtenção de marcadores moleculares via 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 *S. frugiperda* utilizando-se primers de RAPD. O uso de apenas 5 primers permitiu analisar a variabilidade genética de uma colônia. Essa estratégia poderá ser utilizada para se estudar futuras modificações de marcadores moleculares quando novos indivíduos forem introduzidos na colônia.



Além disso, com a técnica de extração de DNA foi possível obter DNA a partir de indivíduos de terceiro instar, permitindo analisar os marcadores moleculares em estágios iniciais do desenvolvimento desses insetos.

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 modificado para uso nesse 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 *S. frugiperda*. Os primers OPA-10 e OPA-11 produziram duas bandas monomórficas identificáveis em todos os indivíduos. O dendograma indicou a presença de três grupos principais sendo que, o indivíduo SF09 apresentou baixa similaridade genética (em torno de 30 %) em relação aos demais indivíduos da população em estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, GB, 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. 170 f. Tese(Doutorado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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. 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).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

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

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

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

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, GB, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

TSAI, SHU-JEN; LO, CHU-FANG; SOICHI, YAMANE; WANG, CHUNG-HSIUNG. The Characterization of microsporidian isolates (Nosematidae: Nosema) from five important lepidopteran pests in Taiwan. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, California, v. 83, p. 51-59, 2003.