

Boletim de Pesquisa 80

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 1340

Abril, 2005

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DAS AMÉRICAS DE *Spodoptera frugiperda*
(J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR
MEIO DE MARCADORES MOLECULARES**



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

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

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

ISSN 1676 - 1340
Abril, 2005

*Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento* 80

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA
DE POPULAÇÕES DAS AMÉRICAS DE
Spodoptera frugiperda (J.E. SMITH, 1797)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR MEIO
DE MARCADORES MOLECULARES**

Paulo Roberto Queiroz

E. S. Martins

Luzia Helena C Lima

Rose G. Monnerat

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) 448-4700 Fax: (61) 340-3666
<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 Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

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

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

FICHA CATALOGRÁFICA

A 532 Análise da variabilidade genética de populações das Américas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares / Paulo Roberto Queiroz ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

Xx p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 80)

1. Insecta – *Spodoptera frugiperda* – caracterização molecular. 2. Marcadores moleculares – RAPD. I. Queiroz, Paulo Roberto. II. Série.

595.78 CDD - 21

SUMÁRIO

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DAS AMÉRICAS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES

Paulo Roberto Queiroz¹
E. S. Martins²
Luzia Helena C Lima²
Rose G. Monnerat³

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 à infestações por esta lagarta poder chegar a 34%. Neste trabalho, indivíduos de cinco populações de *S. frugiperda* originárias de vários países da América do Sul foram caracterizados geneticamente por meio da técnica de RAPD-PCR, onde foram testados diferentes primers. Para isso, utilizou-se uma metodologia de extração de DNA desenvolvida para a análise destas populações de lepidópteros. Com o uso dos primers selecionados OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13 foi encontrada variabilidade genética, permitindo ordenar as populações em 3 grupos principais. Os indivíduos coletados no Brasil apresentaram baixa similaridade em relação às demais populações. Além disso, foi possível distinguir duas populações originárias do México. Para as populações encontradas na Costa Rica e Colômbia não se observou separação entre estes grupos, o que sugere estar havendo o fluxo de indivíduos entre estas populações.

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*, Insecta, RAPD, Caracterização molecular.

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

² Bióloga – Mestre em Patologia Molecular – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

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 infestations by this insect is about 34%. In this work, five *S. frugiperda* populations originated from different regions of the South America were genetically characterized by RAPD using selected primers. To make this work, a DNA extraction protocol was developed. The primers OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11 and OPA-13 produced genetic variation allowing to separate the populations in three groups. Brazilian individuals showed low similarity when compared to the others. The use of this molecular approach was able to distinguish two Mexican populations. The population collected in Costa Rica and Colombia produced low genetic variation suggesting any genetic material change between these two groups.

INTRODUÇÃO

A lagarta do cartucho do milho *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) 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 seqüência arbitrária com potencial de reconhecer desconhecidas do DNA alvo.

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 loco e sim a interpretação relativa entre fenótipo e genótipo (CIAMPI e MAGALHÃES, 2001).

O presente trabalho tem como objetivo determinar a variabilidade genética entre populações de *S. frugiperda* provenientes de países do continente americano por meio de marcadores moleculares RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos de *S. frugiperda* foram oriundos de colônias de laboratório desenvolvidas a partir de insetos coletados aleatoriamente na cultura do milho em diferentes países das Américas (Tabela 1) e mantidos em etanol 100 % a – 20 °C.

Tabela 1 – Populações de *S. frugiperda* usadas na caracterização molecular.

Código da População	Colônia de Origem	Cidade/País
SF	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Cenargen/Embrapa	Brasília-Brasil
I	Centro de Investigación y estudios Avanzados CINVESTAV	Irapuato - México
MA	Universidad Nacional Autónoma de México - UNAM	Cuernavaca - México
CBCIB	Universidad de Costa Rica	São José – Costa Rica
CB	Corporación para Investigaciones Biológicas.	Medellin - Colômbia

MÉTODOS

Para os estudos de caracterização molecular, o DNA de dez indivíduos de terceiro ínstar foi extraído a partir de um método previamente estabelecido (Queiroz, 2004) seguindo-se adaptações dos protocolos 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 $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$), incubando-se por 30 min a $65 \text{ }^\circ\text{C}$. O homogenado foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e, o sobrenadante, transferido para um tubo plástico. Adicionou-se $500 \mu\text{L}$ 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 a $10 \text{ }^\circ\text{C}$. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, repetindo-se a etapa anteriormente descrita.

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

REAÇÕES DE RAPD-PCR

Para os estudos de caracterização molecular, O DNA extraído (100 ng) a partir de dez 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, MgCl_2 2 mM, dNTP's 0,2 mM, $0,4 \mu\text{M}$ de um primer de seqüência aleatória da Operon Technologies, Inc.(Tabela 2), $2,5 \text{ U.}\mu\text{L}^{-1}$ de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) e $5 \mu\text{L}$ de DNA.

Tabela 2 – 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 ampliações 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 (QUEIROZ et al., 2004), foi possível obter DNA em condições adequadas para a geração dos perfis eletroforéticos das diferentes populações de *S. frugiperda* originárias de vários países da América do Sul. 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 (Figura 1).

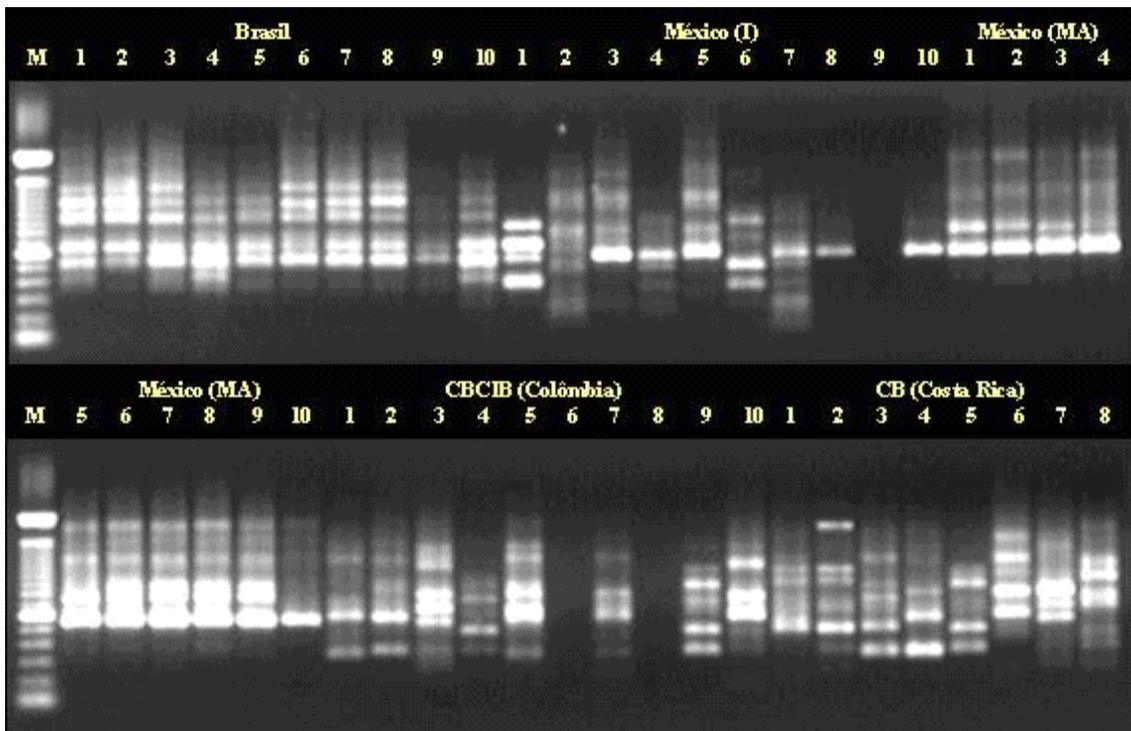
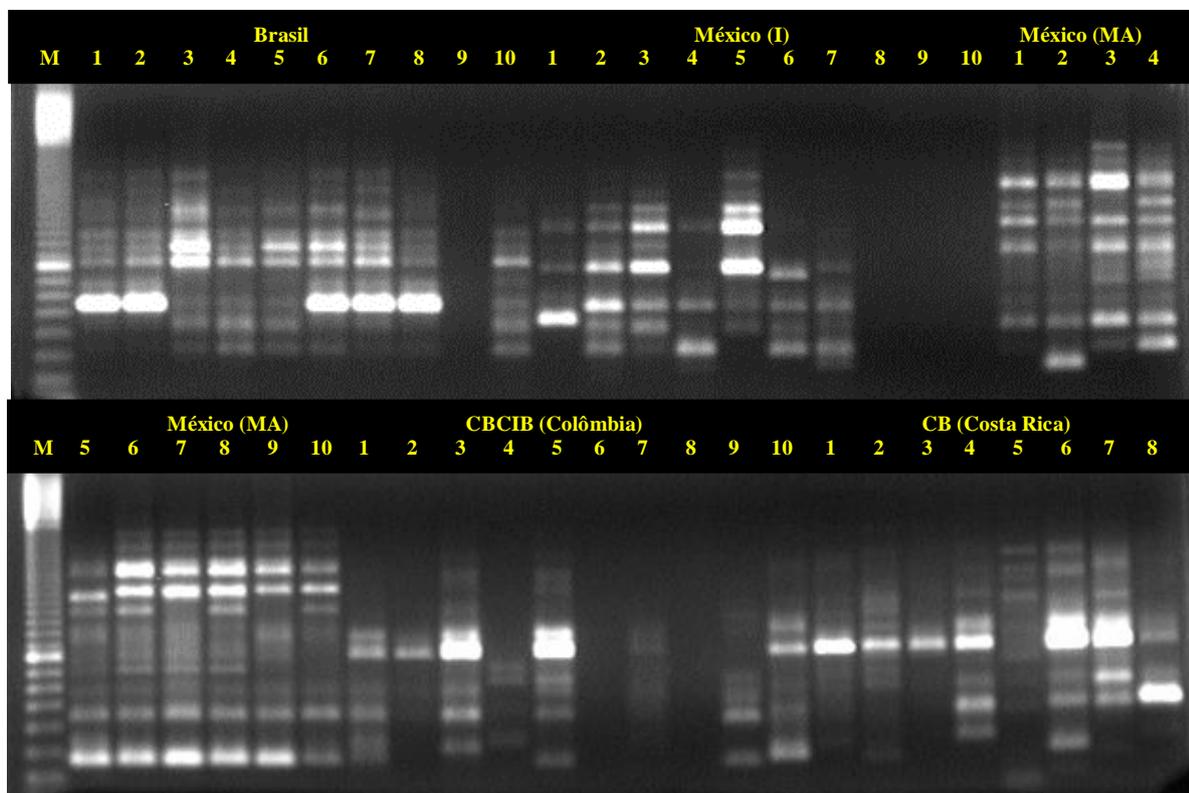


Figura 1 – Perfis eletroforéticos de RAPD de várias populações de *S. frugiperda* obtidos a partir do primer OPA-13. A letra M representa o marcador 100 pb ladder. Os números representam os indivíduos analisados dentro de cada população.

O uso dos primers de RAPD produziu marcadores relacionados para cada população em estudo. O primer OPA-04 produziu bandas de 850 pb e 950 pb para as populações de *S. frugiperda* coletadas no Brasil. O mesmo primer gerou uma banda de 1350 pb monomórfica para a população da UNAM coletada no México. A análise dos perfis de bandas das populações da Costa Rica e Colômbia permitiu identificar uma banda de 800 pb comum a estas duas populações (Figura 2).



obtidos a partir do primer OPA-04. A letra M representa o marcador 100 pb ladder. Os números representam os indivíduos analisados em cada população.

O primer OPA-10 gerou uma banda específica de 900 pb para as populações do Brasil. Com o primer OPA-11 foi visualizado um marcador de 600 pb para a população (CINVESTAV) do México.

A seguir, os dados binários correspondentes às populações de *S. frugiperda* provenientes dos diferentes países do continente americano foram utilizados para a

determinação de um dendrograma para o estabelecimento das relações filogenéticas entre estas populações (Figura 3).

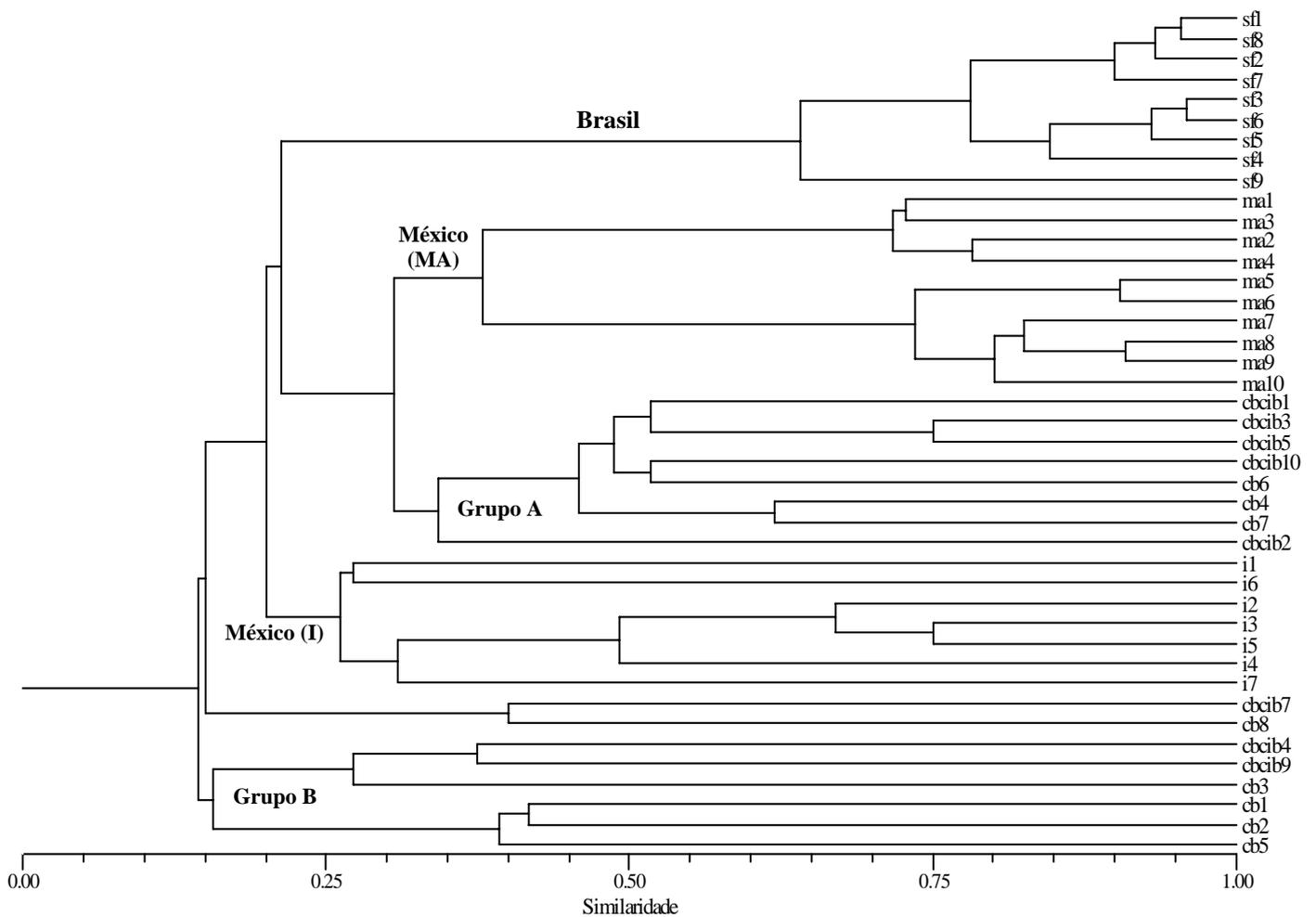


Figura 3 – Dendrograma construído a partir dos perfis de marcadores moleculares gerados por RAPD das populações de *S. frugiperda* coletadas em vários países do continente americano.

A análise do dendrograma permitiu identificar 3 agrupamentos principais. O primeiro grupo correspondeu aos indivíduos das populações coletadas no Brasil,

México (UNAM), Costa Rica e Colômbia apresentando 20 % de similaridade em relação às demais populações. Dentro desse grupo, os indivíduos coletados no Brasil apresentaram 22 % de similaridade em relação às demais populações. A seguir, uma população do México (UNAM) e uma combinação de indivíduos das populações da Costa Rica e Colômbia (denominado grupo A) formaram um conjunto com 31 % de similaridade. A análise dos indivíduos do México (UNAM) permitiu identificar uma separação dentro dessa população, onde os indivíduos de ma1 até ma5 se dividiram em relação aos indivíduos de ma6 até ma10 com similaridade em torno de 37 %. Além disso, houve uma combinação entre os marcadores gerados pelos indivíduos das populações coletadas na Costa Rica e Colômbia, não ocorrendo separação entre estas populações.

O segundo agrupamento gerado pelos marcadores de RAPD ficou relacionado à população do México (CINVESTAV). Esse grupo apresentou 20 % de similaridade em seus marcadores quando comparado às populações do primeiro agrupamento e 14 % de similaridade em relação ao terceiro agrupamento. Além disso, detectou-se intensa variabilidade entre os indivíduos constituintes desse grupo, variando de 27 % até 75 %.

O terceiro agrupamento ficou constituído por uma mistura entre indivíduos coletados nas populações da Costa Rica e Colômbia (denominado grupo B). Dentro desse grupo detectou-se intensa variação entre os marcadores de RAPD.

Essa variação detectada entre as populações pode estar relacionada com a localização geográfica desses grupos e com a possibilidade de troca de indivíduos entre grupos próximos. Além disso, existe a possibilidade de que o tratamento químico para a contenção de cada um desses grupos possa estar selecionando novas combinações que podem ser detectadas por marcadores de RAPD.

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 *Plutella xylostella*. Tsai et al. (2003) 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 lepidópteros, tais como, *Spodoptera litura*, *S. exigua*,

Helicoverpa armigera, *P. xylostella* e *Pieris* spp. Nesse trabalho, observou-se que os isolados de *Nosema*, presentes em *Pieris* spp., *S. exigua* e *H. armigera*, eram mais próximos filogeneticamente. A importância do gênero *Nosema* está no fato de que as ordens de insetos Lepidoptera e Diptera 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 lepidópteros. 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 lepidópteros, 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 adotado como protocolo padrão 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 de cinco populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes localidades da América do Sul. Os primers OPA-04, OPA-10 e OPA-11 produziram bandas específicas para os indivíduos de uma determinada população, permitindo identificar marcadores de DNA específicos para algumas populações de lepidópteros. O dendograma indicou a presença de três grupos principais sendo que, os indivíduos pertencentes às populações da Costa Rica e Colômbia não apresentaram distinção entre os seus marcadores de DNA. Por essa técnica foi possível identificar a separação da população do Brasil em relação aos demais grupos, como também, separar as duas populações provenientes do México.

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 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, Piracicaba.

CIAMPI, A. Y.; MAGALHÃES, M. T. Q. de. **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, 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.

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: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 18 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 75).

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

TSAI, S.-J.; LO, C.-F.; SOICHI, Y.; WANG, C.-H. 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.

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.