



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* EM
CULTURAS DE MILHO E ALGODÃO POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES**

CAROLINA ALMEIDA RAMIRO DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**Brasília – DF
JUNHO – 2007**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
***Spodoptera frugiperda* EM CULTURAS DE MILHO E ALGODÃO POR MEIO**
DE MARCADORES MOLECULARES

CAROLINA ALMEIDA RAMIRO DA SILVA

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT
CO-ORIENTADOR: PAULO ROBERTO QUEIROZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 267/2007

BRASÍLIA/DF
JUNHO/2007

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
Spodoptera frugiperda EM CULTURAS DE MILHO E ALGODÃO POR MEIO
DE MARCADORES MOLECULARES**

CAROLINA ALMEIDA RAMIRO DA SILVA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO À FACULDADE DE
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO VEGETAL.**

**PAULO ROBERTO QUEIROZ DA SILVA, D.Sc. - Universidade de Brasília-
UnB CPF: 564300601-44, E-mail:pqsilva@uol.com.br
(CO-ORIENTADOR)**

APROVADA POR:

**ROSE GOMES MONNERAT, Ph.D. - Ecole Nationale Superieme
Agronomique de Mont pellur-ENSA-M, CPF:512803701-06,
E-mail:monnerat @cenargen. embrapa.br
(ORIENTADORA)**

**MARISA A. S. VELLOSO FERREIRA , D.Sc. - Universidade de Brasília-UnB
CPF:263121661-04, E-mail:marisavf@unb.br
(EXAMINADORA INTERNA)**

**LUZIA HELENA CORRÊA LIMA, Ph.D. - Universidade de Brasília - UnB
CPF: 046630801-97, E-mail: luzia@cenargen.embrapa.br
(EXAMINADORA EXTERNA)**

BRASÍLIA/DF, 25 de junho de 2007.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ramiro, Carolina Almeida

Análise da variabilidade genética de populações de *Spodoptera frugiperda* em culturas de milho e algodão por meio de marcadores moleculares. / Carolina Almeida Ramiro; orientação de Rose Gomes Monnerat; co-orientação de Paulo Roberto Queiroz. – Brasília, 2007.

123 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.

1. *Spodoptera frugiperda* 2. *Zea mays* 3. *Gossypium* spp. 4. RAPD

5. DNA mitocondrial 6. Lepidóptera 7. inseto praga

I. Monnerat, R. G. II. Ph.D.

III. Queiroz, P. R. IV. D.Sc.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

RAMIRO, C. A. Análise da variabilidade genética de populações de *Spodoptera frugiperda* em culturas de milho e algodão por meio de marcadores moleculares. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007. 123 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DA AUTORA: Carolina Almeida Ramiro da Silva

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Análise da variabilidade genética de populações de *Spodoptera frugiperda* em culturas de milho e algodão por meio de marcadores moleculares.

GRAU: Mestre

ANO: 2007

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito da autora.

Carolina Almeida Ramiro da Silva

Brasília – DF, Brasil

Telefone: 8167-5875 e-mail: carolramiro@yahoo.com.br

Dedicatória

Ao grande, único, companheiro e meu querido esposo
Carlos Eduardo Suarez Baptista
Pelo apoio, dedicação, encorajamento
nos momentos mais difíceis e felizes da minha vida;
Por ser o meu porto seguro quando o chão me faltou;
Por me amar de forma tão verdadeira e pura;
E Por demonstrar dia-a-dia o Deus que serve,
nas orações, nos louvores, nos serviços
e na fé.
Meu amor, eu te amo muito e por isso
lhe dedico com todo carinho.

Oferecimento

À minha querida mãezinha, Lina Almeida Ramiro da Silva,
Mulher de coragem, fé, temente a Deus, amável
Que sempre me ensinou o amor verdadeiro, Jesus Cristo,
e sempre esteve ao meu lado me apoiando.

Ao meu pai, Edson Ramiro da Silva,
Homem trabalhador, forte que sempre acreditou em mim.

Aos meus irmãos, Márcia, Larissa e Edson Júnior,
Pelo carinho e torcida.

A minha querida Fernandinha,
Por seu eterno e verdadeiro amor.

A minha cunhada Marina,
Pelo encorajamento e amizade.

Por tudo, ofereço à vocês.

Agradecimento Especial

Ao meu Grandioso Deus, Pai da eternidade,
Príncipe da Paz, Deus Forte, Conselheiro, Senhor dos Senhores,
Por tua fidelidade, amizade, força, amor,
capacitação, consolo e certeza
que são presentes diariamente em meu viver;
a ti toda glória, honra e louvor, hoje e eternamente, Amém!
Porque sem ti eu nada seria.
“O choro pode durar uma noite inteira,
mas a alegria vem pela manhã”
Salmo 30: 5

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu **Deus**, pois sem Ele nada deste sonho se tornaria realidade. Obrigada pela saúde, força, capacitação, amor, esperança e fé.

Ao meu **querido marido, Carlos** que me apoiou e se fez presente diariamente nesta caminhada. Você é o sol do meu dia.

A minha **família, Paizinho, Mãezinha querida, Márcia, Edson Jr., Marina, Larissa e Fernandinha**, obrigada pelo grande apoio de vocês, pela confiança e por serem tão importante para mim.

Ao **Pastor Eliezer, Missionária Sara, Josué e Anne Caroline** pelas orações, amizade, amor cristão e o alicerce espiritual para eu vencer esta etapa.

Aos **meus sogros**, Elisabete e Eduardo, pela confiança e carinho.

A minha orientadora, **Dr^a. Rose Monnerat** que me proporcionou esta oportunidade de crescimento profissional, pela compreensão e apoio nos momentos mais difíceis, e pela preciosa orientação deste trabalho, muito obrigada.

Ao meu co-orientador **Dr. Paulo Queiroz** pelos ensinamentos nas bancadas do laboratório, pela orientação, pelo encorajamento e por me mostrar, que o difícil é possível de se vencer, muito obrigada.

Aos jovens, Senhoras e Senhores da **Igreja Assembléia de Deus Ministério Prosperidade Lago Norte** pelas orações e carinho.

Aos amigos **Msc. Márcio e Luciane** pelas orações, amizade, encorajamento e ajuda. Ao **Dr. Prof. e amigo Ricardo Caldas (UnB)** pela explicação e apoio.

Aos amigos do laboratório de Bactérias Entomopatogênicas do Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela amizade e apoio ao longo desta caminhada, **Viviane, Felipe R., Dr^a. Francislete, Técnica do Laboratório Msc. Lílian, Msc. Carol D., Vinícius, Msc. Patrícia, Msc. Lenisa, Rafael, Renata, Msc. Karen B. e Márcia**, meus sinceros muito obrigada.

Aos colegas do laboratório de Bactérias Entomopatogênicas do Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que de alguma forma contribuíram, **Andréia, Msc. Cristina, Clarissa, Janaína, Elízia, Msc. Érica, Felipe W., Dr^a. Joseilde**.

Aos amigos do laboratório de Nematologia do Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo uso da cuba grande de eletroforese e compreensão, **Dr^a. Regina Carneiro, Fabiane, Marcilene, Edriana, Natália, Joelma** e a amiga e companheira de jornadas de trabalho a **Msc. Fátima** (Doutoranda da UFLA), meus sinceros muito obrigada.

Ao **Dr. Márcio Moretzsohn** pela amizade, apoio e explicações.

Ao **professor Dr. Jean Kleber** e a **professora Dr^a. Lucrecia** que nos momentos difíceis, me abraçaram e me apoiaram.

A **professora Dra. Marisa (UnB)** e a **Dra Luzia (Embrapa Cenargen)** por serem tão queridas e por participarem da banca examinadora.

A amiga (que admiro tanto) **Msc. Cássia Hiragi** pelo seu apoio, ajuda, explicações, paciência e amizade. Às amigas, **Camila e Vivi** pelos momentos descontraídos. A amiga **Msc. Irene Martins** pela amizade e companheirismo nos estudos das disciplinas do mestrado e nas apertadas horas de almoço.

Ao amigo e chefe **Dr. Ozanan Coelho** (DPJ – Novacap) por acreditar em mim, me apoiar e me proporcionar tamanho crescimento profissional.

Aos amigos da Novacap, **Dr. Raimundo, Silomar, Reginaldo, Donizetti, Msc. Fábio, Dani, Alfred, Bete, Constância, Adailton, Janaína e todos funcionários do Viveiro II.**

As minhas queridas **Tias Ceres** (*in memoriam*) e **Sidônia** (*in memoriam*) pelo amor e dedicação ao longo da minha vida, eterna saudade.

A minha **vózinha Celina** (*in memoriam*) pelo amor e exemplo. E ao meu **avô Miguel** (*in memoriam*) pelo carinho.

A minha **amiga Patrícia Kratka** que sempre esteve presente em minha vida com seu carinho, paciência e amizade.

A amiga e irmã **Shirley** pela força, amizade, orações e cuidados com a minha mãe.

Aos funcionários da Criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, **Claúdia Brod, Helinho e Rogério** por cederem uma população de *Spodoptera frugiperda*.

À amiga **Karen Bianchi** pelo envio da população da lagarta-militar do Paraná.

À Universidade Nacional Autônoma de México – UNAM, da cidade de Cuernavaca pelo envio de uma população da lagarta-do-cartucho.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio. À FACUAL pela bolsa de mestrado no primeiro ano do trabalho.

À Técnica do Laboratório de Física dos solos **Catharina** por ceder o espaço à apresentação da defesa, e pelo carinho e apoio.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, os meus sinceros e profundos, muito obrigada.

Homenagem
(*in memoriam*)

À minha querida e verdadeira **Tia Céres Almeida** (minha Tetéia) por
seu amor demonstrado ao longo do nosso viver,
por sua presença diária mesmo morando em Belém do Pará,
por seu exemplo de Serviço à Deus com tanto carinho,
por sua fé inabalável, por sua alegria
em presentear e fazer o próximo feliz,
por seu jeitinho de organização e controle de tudo,
e por sempre lutar para viver bem
a cada amanhecer não importando
com os problemas, dificuldades ou
o dia de amanhã.

Obrigada Deus por me permitir viver com uma pessoa tão
especial, amável e verdadeira.

Mensagem da Autora

“Tudo tem seu tempo determinado,
e há tempo para todo propósito debaixo do céu:
Há tempo de nascer e tempo de morrer;
tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou;
Tempo de chorar e tempo de rir;
tempo de prantear e tempo de saltar de alegria;
Tempo de espalhar pedras e tempo de juntar pedras;
tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar;
tempo de estar calado e tempo de falar;
Tempo de amar e tempo de aborrecer;
tempo de guerra e tempo de paz.

Tudo fez Deus formoso no seu devido tempo; também pôs a eternidade no coração do homem, sem que este possa descobrir as obras que Deus fez desde o princípio até o fim.

Sei que nada há melhor para o homem do que regozijar-se e levar vida regalada; e também que é dom de Deus que possa o homem comer, beber e desfrutar o bem de todo o seu trabalho.

Sei que tudo que Deus faz dura eternamente.”

(Eclesiastes 3:1,2,4,5,8,11-14a)

Bíblia Sagrada

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Tabelas.....	xv
Abreviaturas.....	xvi
Resumo Geral.....	xvii
General Summary.....	xviii
1. Introdução Geral.....	01
2. Revisão Bibliográfica.....	07
2.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith 1797	07
2.1.1. Aspectos gerais.....	07
2.1.2. Biologia e Descrição da lagarta.....	10
2.1.3. Danos Nacionais e Mundiais.....	15
2.1.4. Impactos nas culturas do algodão e do milho	16
2.2. Métodos de Controle.....	16
2.2.1. Controle Químico.....	17
2.2.1.1. Resistência de <i>S. frugiperda</i> a inseticidas.....	19
2.2.2. Controle Mecânico.....	21
2.2.3. Controle Cultural.....	21
2.2.4. Controle Biológico.....	22
2.2.5. Manejo Integrado de Pragas.....	25
2.3. Características da cultura do milho.....	27
2.4. Características da cultura do algodão.....	30
2.5. Importância econômica do milho e do algodão.....	34
2.6. Principais pragas agrícolas de ambas culturas.....	37
2.6.1. Aspectos Gerais.....	37
2.6.2. Pragas presentes na cultura do milho.....	38
2.6.3. Pragas presentes na cultura do algodão.....	40
2.6.4. Danos econômicos provocados por pragas.....	42
2.7. Caracterização molecular.....	43
2.7.1. Marcador Molecular.....	46
2.7.2. Métodos Moleculares de Caracterização.....	47
2.7.2.1. RAPD.....	48

2.7.2.2. DNA mitocondrial.....	51
2.7.3. O Marcador Molecular e o Controle Biológico.....	53
3. Hipótese e Objetivos.....	54
Referências Bibliográficas.....	55

CAPÍTULO ÚNICO

Análise da variabilidade genética por meio de marcadores RAPD e mtDNA de populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> em diferentes culturas do Brasil.....	78
Resumo.....	79
Chapter Summary.....	80
1. Introdução.....	81
2. Material e Métodos.....	85
3. Resultados e Discussão.....	92
3.1. Análise da variabilidade genética por meio do RAPD.....	92
3.2. Análise do DNA mitocondrial	108
4. Conclusões.....	113
5. Perspectivas.....	114
Referências Bibliográficas.....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Mapa de distribuição da lagarta-militar no mundo.....	10
2 - a) <i>S. frugiperda</i> macho adulto. b) <i>S. frugiperda</i> fêmea adulta. O tamanho da barra das figuras A e B correspondem aproximadamente a 20 mm.....	11
3 - Postura de ovos de <i>S. frugiperda</i>	11
4 - Larvas no final do primeiro ínstar na cultura do milho.....	12
5 - Lagarta-militar no final do terceiro ínstar na cultura do milho.....	13
6 - Pupa de <i>S. frugiperda</i> no solo de uma plantação de algodão.....	14
7 - a) Plantação de milho (<i>Zea mays</i> L.) na vitrine da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. b) Em detalhe, a espiga do milho e o estilo-estigmas (“cabelo do milho”).....	27
8 - a) Botão floral do algodão. b) Plantação de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>) em campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.....	31
9 - <i>S. frugiperda</i> atacando o cartucho do milho.....	40
10 - Lagarta <i>S. frugiperda</i> coletada atacando os primeiros botões florais do algodão.....	41

Capítulo Único

11 - Perfil eletroforético de RAPD com o oligonucleotídeo OPA-04 em gel de agarose 1,5% das populações de <i>S. frugiperda</i> nas culturas do milho e algodão. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: números de 1 a 10 – Criação; 11 a 20 – PADF; 21 a 30 – México; 31 a 39 – Paraná e 40 a 48 – Mato Grosso.....	93
12- Perfil eletroforético do RAPD com o oligonucleotídeo OPA-13 em gel de agarose 1,5% em populações de <i>S. frugiperda</i> nas culturas do milho e algodão. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: números de 1 a 10 – Criação; 11 a 20 – PADF; 21 a 30 – México; 31 a 39 – Paraná e 40 a 48 – Mato Grosso.....	94
13- Perfil eletroforético do RAPD com o oligonucleotídeo OPE-08 em gel de agarose 1,5% em populações de <i>S. frugiperda</i> nas culturas do milho e algodão. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: números de 1 a 10 – Criação; 11 a 20 – PADF; 21 a 30 – México; 31 a 39 – Paraná e 40 a 48 – Mato Grosso.....	95

- 14-** Perfil eletroforético do RAPD com o oligonucleotídeo OPR-04 em gel de agarose 1,5% em populações de *S. frugiperda* nas culturas do milho e algodão. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: números de 1 a 10 – Criação; 11 a 20 – PADF; 21 a 30 – México; 31 a 39 – Paraná e 40 a 48 – Mato Grosso. 96
- 15-** Dendrograma indicando o padrão de similaridade genética entre as cinco populações de *S. frugiperda* nas culturas de milho e algodão a partir do emprego de 752 marcadores de RAPD submetidos ao método UPGMA..... 100
- 16 -** Matriz de similaridade genética entre as populações de *S. frugiperda* obtida por meio de marcadores RAPD após aplicação do coeficiente Jaccard (Sneath e Sokal, 1973)..... 102
- 17 -** Amplificação de uma região do gene da NADH - desidrogenase do mtDNA de *S. frugiperda* em gel de agarose 1,5%. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: México – 1, 2, 3; PADF – 4, 5, 6; Criação – 7, 8, 9, 10..... 109
- 18-** Amplificação de uma região do gene da NADH - desidrogenase do mtDNA de *S. frugiperda* em gel de agarose 1,5%. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: em culturas do milho no PADF – 1, 2, 3, 4 e 5; no México – 6, 7, 8, 9 e 10; e na cultura do algodão PR – 11, 12, 13, 14 e 15..... 109
- 19 -** Amplificação de uma região do gene da NADH - desidrogenase do mtDNA de *S. frugiperda* em gel de agarose 1,5%. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: em culturas do milho no PADF – 1, 2, 3; no México – 4, 5, 6; e na cultura do algodão MT – 7, 8, 9..... 110

ÍNDICE DE TABELAS

Tabelas	Páginas
1 - Confronto das Safras de 2005 e 2006 - Brasil - Novembro 2006.....	35
2 - Suprimento Mundial de Algodão em Pluma 2003/04 e 2005/06.....	36

Capítulo Único

3 - Populações de <i>S. frugiperda</i> utilizadas nos estudos com marcadores moleculares para avaliação de variabilidade genética.....	85
4 - Iniciadores de RAPD utilizados na determinação dos perfis eletroforéticos das diversas populações de insetos submetidas à análise molecular.....	88
5 - Iniciadores utilizados para a amplificação da região do DNA mitocondrial que codifica o gene NADH – desidrogenase.....	90
6 - Número de fragmentos de DNA polimórficos gerados pelo emprego dos oligonucleotídeos de RAPD.....	97
7 - Fragmentos de DNA monomórficos com potencial para a identificação de determinadas populações expresso por cada iniciador decâmero.....	98
8 - A Análise de variância molecular de todas as populações de <i>S. frugiperda</i> .	104

Abreviaturas

%	porcentagem
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
A	Adenina
C	Citosina
C	grau Celsius
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodismino tetracético
g	grama
h	hora
HCl	Ácido clorídrico
kDa	quiloDalton
L	litro
M	molar
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ng	nanograma
pb	pares de base
pH	potencial de Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	rotação por minuto
s	segundo
T	Timina

TE

Tris-EDTA

Tris

Tris (hidroximetil) aminometano

U

unidade de atividade enzimática

RESUMO GERAL

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) é uma praga de grande importância econômica em vários países do mundo. Por ser uma espécie polífaga que ataca severamente diferentes cultivos, ter uma grande capacidade de dispersão do adulto e apresentar uma ação voraz, esse lepidóptero ocasiona perdas na produção agrícola que variam de 15 a 34%. Uma importante ferramenta para melhorar as práticas de gerenciamento da praga e seu controle é a caracterização de diferenças genéticas entre populações. O objetivo desse trabalho foi analisar a variabilidade genética entre populações de *S. frugiperda* de ocorrência em diferentes regiões do Brasil nas culturas de milho e algodão utilizando-se marcadores RAPD e diferenciar essas populações por meio de um marcador do DNA mitocondrial. As amplificações do DNA das amostras de *S. frugiperda* utilizando 20 oligonucleotídeos para cinco populações produziram um total de 752 *loci* de RAPD. A análise por AMOVA revelou que a maior variabilidade genética (76,34 %) foi originária de variações dentro das populações e que entre as populações foi de 23,66 %. Através do dendrograma UPGMA observou-se dois agrupamentos distintos, os das populações de *S. frugiperda* do milho e os das populações desta praga na cultura de algodão. As análises de RAPD diferenciaram as populações de *S. frugiperda* por meio de fragmentos monomórficos presentes para todos indivíduos de determinadas populações. A análise da amplificação da região NADH-DH do DNAm_t mostrou a presença de um fragmento de 600 pb para as populações de *S. frugiperda* na cultura do milho do Brasil e do México. No entanto, nas populações oriundas das culturas do algodão do Sul e do Mato Grosso do Brasil não houve amplificação desse fragmento. Os resultados obtidos mostraram que há variabilidade genética entre as populações de *S. frugiperda* coletadas nas culturas do milho e do algodão de diferentes regiões do Brasil e que foi possível diferenciar as populações desta praga nessas duas culturas por meio dos marcadores de RAPD e DNAm_t. Com o auxílio desses marcadores, poderão ser desenvolvidas estratégias moleculares para o monitoramento da deriva genética, dinâmica da população e o controle da dispersão desse inseto.

Palavras-chave: RAPD, DNAm_t, variabilidade genética, planta hospedeira, praga, lagarta-do-cartucho.

GENERAL SUMMARY

The caterpillar *S. frugiperda* (J.E. Smith) is a pest of great economic importance in several countries around the world. Since it is a polyphagous species that severely attacks different cultures, has a great dispersion capacity by the adult and presents a voracious action, this lepidopteran causes losses in agricultural production that varies from 15% to 34%. An important tool to improve the practices of managing of the pest and its control is the characterization of genetic differences among populations. The objective of this work was to analyze the genetic variability among populations of *S. frugiperda* occurring in different regions of Brazil in the crops of corn and cotton, using RAPD markers and to differentiate these populations by the marker of DNAm_t. The amplifications of the DNA from the samples of *S. frugiperda* using 20 primers to five populations produced a total of 752 RAPD *loci*. Analysis by AMOVA revealed that the greatest genetic variability (76.34%) was derived from variations inside the populations and that among the populations it was 23.66%. Through the dendrogram UPGMA there are two distinct groupings, one from the populations of *S. frugiperda* from corn and the second from the populations of this pest in the cotton crops. The RAPD analyses differentiated the populations of *S. frugiperda* by the monomorphic fragments present to in? all the individuals of some populations. The analysis of the profile of the mitochondrial DNA shows in the NADH-DH the presence of a fragment of 600 bp to the populations of *S. frugiperda* in the corn culture in Brazil and Mexico. However in the populations derived from cotton crops in the South and in Mato Grosso in Brazil there was no amplification of this fragment. The results showed that there is a genetic variability among the populations of *S. frugiperda* collected on from corn and cotton from different regions of Brazil from the marker RAPD and that it was possible to differentiate the populations of this pest in these two cultures through the markers of RAPD and DNAm_t. This way, molecular strategies can be developed for the monitoring of genetic deriving, population dynamics and the dispersion control of this insect.

Key words: RAPD, DNAm_t, genetic variability, host plant, pest, fall armyworm.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Um dos grandes desafios para a consolidação da agricultura sustentável continua sendo o ataque de pragas que, quando não controladas, podem reduzir drasticamente a produção. A quantidade de pragas que atacam a agricultura ou o ser humano está estimada em 10% do total de insetos que ocorrem na superfície da Terra. Esses insetos causam prejuízos econômicos incalculáveis ao homem.

A lagarta-do-cartucho-do-milho, também chamada de lagarta-militar foi descrita como praga, em 1797, na Geórgia, Estados Unidos. O inseto pode ser encontrado nas Américas e em algumas ilhas a oeste da Índia. Nos Estados Unidos, estes sobrevivem, no inverno, nas regiões tropicais do sul da Flórida e no Texas, de onde as mariposas migram durante a primavera, verão e outono, podendo se deslocar a grandes distâncias, atingindo as regiões ao norte do país, chegando até o Canadá. No Brasil, em função da alimentação diversificada e disponível o ano todo e das condições de clima favoráveis ao inseto, é encontrado em todas as regiões do território nacional (Cruz, 1995).

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) pertence a ordem Lepidoptera e a família Noctuidae, apresenta coloração parda a esverdeada, dependendo do estágio em que se encontra, e é muito voraz. Na fase adulta, as mariposas medem entre 35 a 40 mm de envergadura apresentando um ciclo de vida de aproximadamente 12 dias. No milho esta praga faz a postura na parte superior das folhas, em grupos de 50 a 300 ovos, totalizando 1500 a 2000 ovos por fêmea. Após três dias, eclodem os ovos e as lagartas jovens começam o dano raspando as folhas mais novas do milho. A duração do período larval varia entre 12 a 30 dias. Findo este período, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas de coloração avermelhada e permanecem assim por oito dias no verão e vinte e cinco dias

no inverno. Após o rompimento das pupas, surgem as mariposas (Alves *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 1995; Gallo *et al.*, 2002).

S. frugiperda é uma praga 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), causando severos prejuízos, devido à grande capacidade de desfolhamento que causa à parte aérea das plantações (Gallo *et al.*, 1998), ocasionando perdas que variam de 15 a 37%, dependendo da produção (Busato *et al.*, 2005).

Apesar da característica de polifagia desta espécie, foi relatada a existência de duas raças associadas às plantas hospedeiras, caracterizadas nos Estados Unidos da América e no Brasil. Estas raças de *S. frugiperda* estavam associadas às plantas de milho e algodão (raça C) e às plantas de arroz e a certas gramíneas de pastagens (raça R) (Pashley *et al.*, 1992; Pashley, 1993; Lu *et al.*, 1994; Busato *et al.*, 2004a). Segundo os resultados obtidos por Busato *et al.* (2005) com indivíduos de diferentes regiões do Rio Grande do Sul do Brasil, existe grande influência da planta hospedeira na performance das populações de *S. frugiperda* oriundas do milho e arroz, assim como as alterações nos processos fisiológicos estão associadas às plantas hospedeiras.

O ataque dessa praga à cultura do milho acontece em dois momentos: na fase vegetativa e na fase reprodutiva. A lagarta-do-cartucho é considerada a principal praga da cultura do milho no Brasil. Ela causa prejuízos anuais da ordem de aproximadamente R\$ 800 milhões (Duarte, 2000). A importância econômica na fase vegetativa é quando o ataque na planta ocorre desde a sua emergência até o pendoamento e espigamento. Com o seu desenvolvimento, o inseto localiza-se no cartucho da palha destruindo-o, mas devido ao

canibalismo é comum encontrar-se apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho podendo, em separadas lâminas das folhas de um mesmo cartucho, encontrar lagartas em instares diferentes. O estágio da planta do milho mais sensível ao ataque é de 8 a 10 folhas. A época ideal de realizar medidas para o controle é quando 17% das plantas estiverem com o sintoma de folhas raspadas (Gallo *et al.*, 2002).

Na fase reprodutiva, as perdas devido ao ataque da lagarta na espiga podem ser altíssimas, pois pode haver queda da espiga ou até mesmo falta de enchimento dos grãos. Muitas vezes, a falta de controle ou o controle inadequado do inseto na fase do cartucho, faz com que se tenha a presença na espiga de lagartas bem desenvolvidas com grande capacidade de destruição. Os orifícios na palha são um bom indicativo da presença da praga, bem como, espigas caídas e/ou danos no ponto de inserção da espiga com o colmo e a má formação dos grãos, visto que a lagarta pode atacar os estilo-estigmas (“cabelo do milho”) (Cruz *et al.*, 1995; Duarte, 2000).

Para o controle desta praga na primeira fase pode-se usar os químicos ou controle biológico. Existe um grande número de inseticidas registrados para o controle da lagarta que podem ser aplicados via pulverização e, em alguns casos, através de água de irrigação (insetigação) (Cruz *et al.*, 2000). No entanto, esses inseticidas diferem em seletividade, ou seja, causam impactos diferenciados sobre os inimigos naturais e, ainda, tem ocorrido casos de resistência em algumas populações da lagarta aos inseticidas (Martinelli *et al.*, 2004). Portanto, iniciou-se a busca por novas alternativas como o controle biológico que consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataca outro que esteja causando danos econômicos às lavouras e não causa danos ao meio ambiente. Alguns métodos de controle podem ser aplicados, tais como, o predador *Doru luteipes*, conhecido com tesourinha, e os parasitóides *Trichogramma spp.*, *Telenomus sp.*, *Chelonus insularis* e

Camponotus flavicincta, que são importantes agentes de controle biológico dessa praga. Ainda existem vários microrganismos entomopatogênicos causadores de doenças que também atacam a lagarta, tais como, os fungos (*Nomurae rileyi* (Farlow) Smason, *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuillemin), o vírus (baculovírus *Spodoptera*), as bactérias (*Bacillus thuringiensis* subespécie *Kurstaki e Aizawai*) e outros agentes.

O controle da praga na segunda fase é muito difícil com métodos convencionais em função da dificuldade de colocação do inseticida químico no local onde se encontra a praga, mesmo quando ela está exposta nos estilos-estigma. O controle biológico especialmente com os predadores *D. luteipes* e *Orius* spp. têm sido importante na manutenção dessa praga em níveis populacionais reduzidos na espiga de milho (Cruz *et al.*, 2000).

Também a cultura do algodão, que é considerada a mais importante das fibras têxteis, naturais ou artificiais, e a planta de aproveitamento mais completo que oferece os mais variados produtos, tem sido alvo de ataque da lagarta *S. frugiperda* (Mello *et al.*, 2000). Essa lagarta causa a desfolha do algodoeiro e provoca um prejuízo de até 30% na produção de fibras. O Brasil que já foi um grande exportador mundial encontra-se hoje na condição de segundo maior importador.

Como estratégias de controle de pragas têm-se o manejo integrado de pragas (MIP) que tem como base fundamental a integração de várias técnicas de controle, tais como: seleção de cultivar resistente ou tolerante, controle cultural (plantio, conservação do solo e adubação, densidade de plantio, catação de botões florais, capulhos e maçãs caídas no solo, destruição dos restos de cultura e rotação de cultura), controles biológico e químico.

O aumento da intensidade dos grandes ataques de *S. frugiperda* em ambas culturas tem resultado uma expansão e intensificação de sucessivos cultivos de milho e algodão ano após ano, principalmente no centro-oeste do Brasil (Martinelli *et al.*, 2006). Apesar de

esforços integrados a diferentes controles táticos administrados em populações de *S. frugiperda* no Brasil, o uso de inseticidas tem sido a maior ferramenta dos agricultores (Diez-Rodriguez e Omoto, 2001). No entanto, o uso constante e muitas vezes indiscriminado dos agrotóxicos, vem selecionando populações resistentes de insetos aos inseticidas e a redução ou eliminação da população de inimigos naturais de pragas, a contaminação ambiental, além do aumento de custo de produção (Valicente e Cruz, 1991). A detecção e caracterização de diferenças genéticas entre populações de insetos é uma questão importante para melhorar as práticas de manejo e controle da praga (Martinelli *et al.*, 2006). Então, conhecer o perfil genético, objetivando identificar marcadores moleculares que indiquem a caracterização e a identificação de populações naturais de *S. frugiperda*, bem como a variabilidade genética e a dinâmica da população desta praga no Brasil e no mundo, tornou-se uma importante ferramenta para auxiliar as práticas de gerenciamento da praga e seu controle.

Técnicas moleculares tornaram-se instrumentos essenciais no estudo genético de populações naturais de vários organismos. Entre elas está a técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD), desenvolvida por grupos de pesquisadores nos EUA (Williams *et al.*, 1990).

O marcador molecular RAPD é um método sensível, rápido, relativamente simples, que utiliza apenas um oligonucleotídeo arbitrário de 10 nucleotídeos, com pelo menos 6 C ou G, e que revelam vários *loci* dispersos pelo genoma sem exigir conhecimento prévio da informação genética de seqüências alvo. Embora algumas técnicas baseadas na reação da polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction – PCR) produzam resultados satisfatórios utilizando-se DNA em pequenas quantidades e com algum grau de degradação (Reis *et al.*, 1995) outras, como o RAPD, exigem um DNA íntegro e sua grande vantagem é

que pode ser usado para qualquer organismo. É por meio da técnica de PCR que a seqüência única reconhece o DNA alvo, sendo então flanqueado por duas cópias da seqüência do oligonucleotídeo. O resultado é um conjunto de bandas de DNA amplificadas de tamanhos diferentes (Griffiths *et al.*, 1998).

As aplicações dos marcadores moleculares RAPD incluem: obtenção de impressões digitais (*fingerprintings*) de natureza genômica de indivíduos, variedades e populações; análise de estrutura e diversidade genética em populações naturais; definição das relações filogenéticas entre diferentes espécies; construção de mapas genéticos de alta cobertura genética; e a localização de genes (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Esse trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética entre populações de *S. frugiperda* de ocorrência em diferentes regiões do Brasil nas culturas de milho e algodão por meio do marcador molecular RAPD.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A lagarta-do-cartucho do milho pertence a família Noctuidae cujas representantes desse grupo são as mariposas. Apresentam o corpo robusto, asas densamente escamosas, tamanho bastante variável, antenas filiformes ou pectinadas. Lagartas, em geral, fitófagas, de tegumento liso, algumas são canibais, outras predadoras de cochonilhas; muitas são de importância agrícola. Esta família compreende cerca de 20.000 espécies descritas, divididas em várias subfamílias. As principais espécies são: *Thysania agrippina*, a maior mariposa que se conhece (300 mm de envergadura); o gênero *Agrotis* compreende as lagartas-roscas; *S. frugiperda* uma espécie polífaga; *Mocis latipes*; *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*; *Anticarsia gemmatalis*; *A. argillacea*; *Pseudaletia sequax* (Gallo *et al.*, 2002).

Existem algumas características particulares à biologia de *S. frugiperda* que contribuem para a severidade de seus ataques. Os adultos de *S. frugiperda* apresentam grande capacidade de dispersão e o hábito migratório da espécie resulta em uma elevada taxa de movimento. Esta espécie apresenta um comportamento alimentar polífago, que inclui o consumo de diferentes plantas cultivadas como o milho, algodão e o arroz (Yu *et al.*, 2003).

2.1. *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith 1797

2.1.1. Aspectos gerais

A lagarta-do-cartucho-do-milho, também chamada de lagarta-militar foi descrita como praga, em 1797, na Geórgia, Estados Unidos. Este inseto pode ser encontrado nas

Américas e em algumas ilhas a oeste da Índia. Nos Estados Unidos, os insetos sobrevivem, no inverno, nas regiões tropicais do sul da Flórida e no Texas, de onde as mariposas migram durante a primavera, verão e outono, podendo se deslocar a grandes distâncias, atingindo as regiões ao norte do país, chegando até o Canadá. No Brasil, em função da alimentação diversificada e disponível o ano todo e das condições de clima favoráveis ao inseto, a sua distribuição é geral em todas as regiões (Cruz, 1995).

Este inseto-praga é polífago e ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países (Gallo *et al.*, 2002), podendo facilitar a migração para outras culturas. No Brasil, este inseto pode atacar e causar prejuízos a mais de 23 famílias de plantas (Cruz *et al.*, 1999; Montesbravo, 2001), normalmente associado ao desfolhamento à parte aérea das plantações (Gallo *et al.*, 1988), ocasionando perdas na produção que variam de 15 a 37%. Apenas na cultura do milho, essa praga pode provocar danos na ordem 37% (Valicente e Cruz, 1991; Cruz *et al.*, 1995; Merege, 2007).

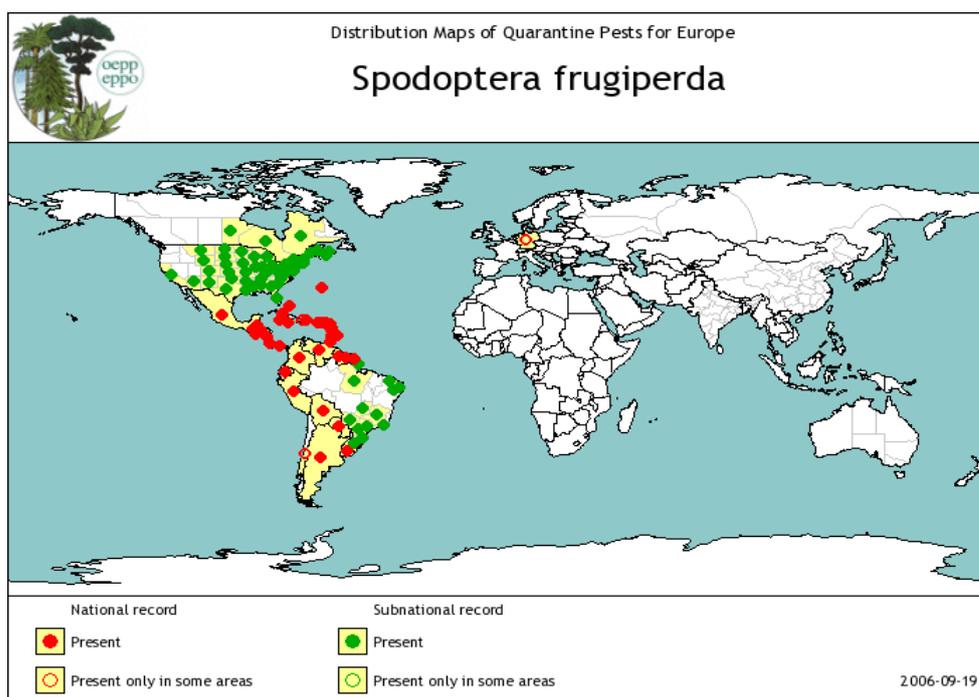
Nos Estados Unidos (EUA) foram detectadas duas raças da lagarta-militar, a raça “milho” que se alimenta de milho, sorgo e algodão e a raça “arroz” que foi encontrada alimentando-se de arroz, grama-seda e outras gramíneas forrageiras (Pashley, 1993; Lu *et al.*, 1994). No México, diferenças biológicas e de compatibilidade reprodutiva, detectadas entre cinco populações de *S. frugiperda* provenientes da cultura do milho, evidenciaram a existência de duas raças que representam espécies crípticas (Edwards *et al.*, 1999).

No Brasil, foi observado por Busato *et al.* (2005) que existe grande influência da planta hospedeira na performance das populações de *S. frugiperda* oriundas do milho e arroz, assim como as alterações nos processos fisiológicos estão também associadas. E as diferenças constatadas entre as populações de *S. frugiperda* coletadas em milho e arroz para

os parâmetros biológicos até a fase de pupa, independente do local de coleta, não foram estendidas à fase adulta.

A existência de raças de *S. frugiperda* tem fundamental importância, pois pode haver um comportamento diferenciado na suscetibilidade a inseticidas e na resistência de plantas aos biótipos (Busato *et al.*, 2005). As raças desta praga são morfologicamente idênticas, mas há diferenças significativas fisiológicas a cada um destes grupos de inseto com relação às taxas de desenvolvimento e ao peso de lagartas e pupas (Pashley, 1988; Whitford *et al.*, 1992).

O primeiro grande surto registrado na história ocorreu em 1899, quando uma grande parte dos Estados Unidos, a leste das Montanhas Rochosas, foi invadida pela lagarta-do-cartucho, causando severos danos em milho, feijão, arroz, sorgo e trigo. Em 1902, cerca de 16.187.43 hectares de pastagens foram severamente danificados pelo inseto, no Texas. Também nos Estados Unidos, ataques intensos foram verificados em aveia, algodão e pastagens. Atualmente, tem sido considerada a principal praga de milho, pastagem e amendoim nos estados americanos do Sudeste. No Brasil, o primeiro surto foi relatado em 1964, com enormes danos em milho, arroz e pastagens. O inseto é também considerado uma das pragas mais importantes do milho na Colômbia, Venezuela, Guatemala, México, Peru e Chile (Figura 1) (Cruz, 1995).



Figura

1: Mapa de distribuição da lagarta *S. frugiperda* no mundo.
 (www.eppo.org/.../LAPHFR_map.htm)

2.1.2. Biologia e Descrição da lagarta

A mariposa mede cerca de 40 mm de envergadura e o comprimento do corpo é de aproximadamente 15 mm, de coloração pardo escura nas asas anteriores e branco acizentada nas posteriores. O ciclo de vida dura aproximadamente 12 dias. As asas anteriores do macho possuem manchas mais claras, diferenciando-o das fêmeas (Figura 2). No milho, esta praga faz a postura na parte superior das folhas, em grupos de 50 a 300 ovos, totalizando 1500 a 2000 ovos por fêmea (Alves *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 1995; Gallo *et al.*, 2002).

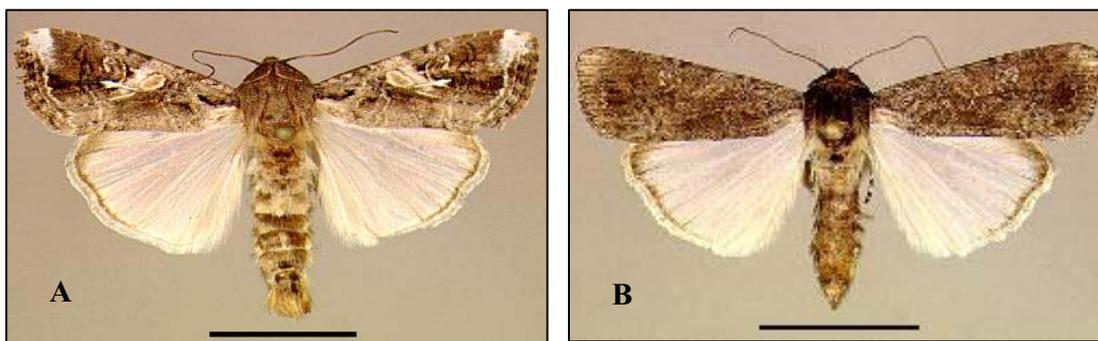


Figura 2: a) *S. frugiperda* macho adulto. b) *S. frugiperda* fêmea adulta. O tamanho da barra das figuras A e B correspondem aproximadamente a 20 mm. (www.msstate.edu/org/mississippiemuseum/images/export.sp.maps/Spodoptera.frugiperda.jpgeimgrefurl)

O período de incubação dos ovos é de aproximadamente três dias sob temperaturas variando entre 25 °C e 30 °C. Em temperaturas inferiores a 25 °C esse período pode se prolongar em até dez dias. Inicialmente, o ovo é de coloração verde-clara, passando a uma coloração mais alaranjada após 12 a 15 horas (Figura 3). Próximo à eclosão das larvas, mostra-se escurecido devido à cabeça da larva, vista atrás da casca do ovo, este apresenta forma oblonga esferoidal. Sua superfície é esculpada com pontos quadrangulares, que são retangulares na região central e mais triangular nos pólos. Os ovos são cobertos com uma camada fina e longa de escamas, deixadas pela fêmea por ocasião da postura e mostram-se achatados nos pontos de contato com os locais de postura (Praça, 2003).



Figura 3: Postura de ovos de *S. frugiperda* (Praça, 2003).

Após a eclosão, as lagartas alimentam-se da própria casca do ovo, e permanecem em repouso por um tempo que varia de duas a dez horas. Em seguida, as lagartas recém-eclodidas, passam a alimentar-se das folhas centrais e novas do milho, raspando-as (Alves *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 1995; Gallo *et al.*, 2002; Busato *et al.*, 2004b). A duração do período larval é de 12 a 30 dias, sendo que ao final a lagarta pode medir aproximadamente 50 mm de comprimento (Gallo *et al.*, 2002).



Figura 4: Larvas no final do primeiro ínstar na cultura do milho.

As larvas no primeiro instar (Figura 4) são esbranquiçadas e medem aproximadamente 1,90 mm de comprimento (Cruz *et al.*, 1999). A partir do segundo estágio de desenvolvimento, as lagartas podem apresentar canibalismo e por isso é comum encontrar-se apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho (Cruz *et al.*, 1997; Gallo *et al.*, 2002). Neste estágio apresentam a mesma coloração, porém com um sombreamento marrom no dorso e comprimento de 3,5 mm a 4,0 mm. Devido ao fato delas migrarem em bandos em busca de alimento, são chamadas também de lagartas militares (Cruz *et al.*, 1999).

É possível encontrar lagartas em ínstares diferentes em um mesmo cartucho, separadas por lâminas das folhas (Gallo *et al.*, 2002). As larvas de terceiro e quarto estágio, destroem completamente uma planta pequena, pois fazem buracos nas folhas e ainda podem dirigir-se ao cartucho, causando redução dos grãos de milho. No algodão, os primeiros estágios preferem danificar as brácteas dos botões florais, raspando-as. Quando desenvolvidas, podem ser encontradas no interior das flores ou na base das maçãs raspando-as até perfurarem (Barros *et al.*, 2005). No terceiro ínstar (Figura 5), elas são de coloração marrom-clara no dorso, esverdeada na parte ventral com linhas dorsais brancas e com comprimento variando de 6,35 mm a 6,50 mm. No quarto ínstar, a larva apresenta cabeça marrom-avermelhada, corpo marrom-escuro no dorso e podem medir 10 mm (Cruz *et al.*, 1999; Praça, 2003).



Figura 5: Lagarta-militar no final do terceiro ínstar na cultura do milho.

As larvas de quinto e sexto íntares são as que causam maiores danos nas plantações (Gallo *et al.*, 2002) pois migram com frequência para o cartucho. Sua presença pode ser indicada pela quantidade de excrementos ainda frescos existentes na planta (Merege, 2007),

ou abrindo-se as folhas e observando lagartas com cabeça escura e corpo mais escuro e com comprimento de aproximadamente 18 mm (Cruz *et al.*, 1999).

Quando o milho é muito precoce ou em infestações tardias, a lagarta pode migrar para o colmo e causar um dano semelhante ao da broca da cana-de-açúcar (Gallo *et al.*, 2002). Nestas fases, elas têm o corpo cilíndrico, com coloração marrom-acinzentada com uma listra clara no dorso, esverdeada na parte ventral. A cabeça é mais escura com a presença de um Y invertido na parte frontal e medem, em comprimento, aproximadamente 35 a 50 mm (Cruz *et al.*, 1999; Meregge, 2007). Findo o período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em crisálidas (Figura 6) de coloração avermelhada, medindo cerca de 16 mm de comprimento. O período pupal é de 8 dias no verão e 25 dias no inverno (Gallo *et al.*, 2002). A pupa é frágil e muito sensível a danos, quando tocada ela se movimenta vigorosamente com a porção cefálica do corpo (Cruz *et al.*, 1999).



Figura 6: Pupa de *S. frugiperda* no solo de uma plantação de algodão.

A quantidade e qualidade do alimento consumido por uma lagarta afetam a taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento, peso final, dispersão e sobrevivência e, em outros

casos, a atividade dos adultos, como a fecundidade, fertilidade e dispersão (Busato *et al.*, 2004b). A 25 °C, o ciclo total do inseto pode ser completado em menos de 30 dias, possibilitando a essa espécie a produção de várias gerações durante o ano (Cruz *et al.*, 1999; Busato *et al.*, 2004b).

2.1.3. Danos Nacionais e Mundiais

O dano causado pela lagarta-do-cartucho no milho é influenciado pelo vigor da planta e pelo clima. Na região tropical, o rigoroso ataque deste inseto-praga vem aumentando em algumas áreas, podendo chegar até 60% de redução no rendimento de grãos (Cruz *et al.*, 1999; Merege, 2007). Os danos maiores ocorrem na fase de oito a dez folhas, podendo reduzir em até 20% no rendimento de grãos (Cruz e Turpin, 1982).

No Brasil, reduções no rendimento do milho devido ao ataque da lagarta-do-cartucho chegam a 37%, dependendo da fase de desenvolvimento da planta. As perdas econômicas causadas por esta praga na cultura do milho são estimadas em mais de 400 milhões de dólares (Busato *et al.*, 2005).

Na literatura entomológica mundial é comum encontrar referências sobre os prejuízos quantitativos e qualitativos da lagarta-militar, para a cultura do milho, na Venezuela, no México, nos Estados Unidos e na Nicarágua. Cruz (1986) cita esta lagarta como a praga mais disseminada e a mais importante na cultura do milho no Brasil. Mitchell e McLaughlin (1982) a relataram como uma das duas mais sérias pragas agrícolas das Américas. No México, foi verificada uma redução de 37,7% na produção de milho devido ao ataque deste inseto-praga (Merege, 2007).

As lagartas *S. frugiperda* ocasionam danos à cultura desde a emergência até a maturação das plantas (Santos, 2001). Podem ser encontradas no algodão danificando o caule, folhas, botões florais, maçãs e capulhos, e no milho, em caule, nas folhas e no cartucho (Gallo *et al.*, 2002). No entanto, as lagartas pequenas (alta densidade populacional) têm distribuição agregada no campo, enquanto que as lagartas grandes (baixa densidade populacional) podem ser mais dispersas no campo, tendendo à aleatoriedade (Farias *et al.*, 2001).

2.1.4. Impactos nas culturas do algodão e milho

Os impactos dos cultivos de algodão e milho em uma mesma região agrícola sobre a análise da variabilidade genética de *S. frugiperda* são esperados porque alguns trabalhos disponíveis na literatura classificam as populações desta praga que ocorrem nestas culturas como pertencentes à mesma raça. E também, o movimento e acasalamento destas populações podem influenciar diretamente a organização da variabilidade da espécie em uma determinada região. Martinelli *et al.* (2006) pesquisaram por meio da técnica de RAPD, 10 populações de lagarta-militar coletadas das plantações de algodão e milho em diferentes regiões geográficas do Brasil, no qual os resultados demonstraram que essas populações em culturas de milho e algodão, em uma mesma região, apresentam um nível significativo de fluxo gênico. Assim, para o manejo efetivo deste inseto-praga torna-se necessário um melhor entendimento e quantificação do fluxo gênico entre as populações associadas às diferentes plantas hospedeiras dentro da faixa de distribuição da lagarta-do-cartucho e nos diversos sistemas agrícolas.

2.2. Métodos de Controle

A necessidade de adoção de métodos culturais que viabilizem a produção de alimentos com sustentabilidade ambiental torna essencial uma abordagem mais abrangente da questão de manejo de pragas nas lavouras. Resultados de pesquisas indicam que a produção integrada para o alcance da sustentabilidade nos ambientes agrícolas, onde métodos culturais e manejo de pragas em geral (insetos, doenças e plantas invasoras) são abordados conjuntamente e com amplitude regional, inclusive os ambientes naturais (Sujii *et al.*, 2003).

A época ideal de realizar medidas para o controle é quando cerca de 20% das plantas estiverem com o sintoma de folhas raspadas (Duarte, 2000; Merege, 2007). A amostragem deve ser feita percorrendo a área na diagonal, iniciando-se quando as plantas tiverem uma a duas folhas, observando-se um total de 25 plantas/ha e mais seis plantas por cada hectare adicional. É importante contar o número de massas de ovos e larvas de diferentes estágios de todas as folhas de cada planta (Montesbravo, 2001).

2.2.1. Controle químico

Os produtos químicos devem ser aplicados quando os sintomas de folhas raspadas em 20% das plantas até 30 dias após o plantio e de 10% de plantas com o sintoma de 40 a 60 dias forem atacadas. O ideal é que se controlem as lagartas quando essas são pequenas, para melhor eficiência dos inseticidas (Santos, 1997; Papa *et al.*, 1999). Podem ser usados inseticidas fosforados, clorofosforados, organofosforados, carbamatos e piretróides (Alves *et al.*, 1992; Gallo *et al.*, 2002; Tomquelski, 2006; ANVISA, 2007) ou reguladores de

crescimento em pulverizações com bico de leque, visando o cartucho da planta. O novo lufenuron tem sido aplicado em 40% da área de milho tratada, devido às suas características, adequa-se ao contexto do Manejo Integrado de Pragas - MIP (Schmidt, 2002). Os inseticidas granulados também poderão ser utilizados no cartucho com aplicadores manuais ou em dispositivos adaptados as plantadoras de tração animal (Gallo *et al.*, 2002). Os inseticidas líquidos devem ser aplicados nas horas de maior grau de umidade relativa do ar e com sol baixo, usando-se bicos de gotas grandes, direcionados ao centro do cartucho, no entanto, o controle é relativamente baixo (Cruz *et al.*, 1999). Recomenda-se, ainda, utilizar produtos com características de seletividade aos inimigos naturais e de baixa toxicidade (Degrande, 1998).

Garcia *et al.* (2005) avaliaram a eficiência de diversos inseticidas para o controle de *S. eridania* na cultura do algodoeiro e concluíram que os químicos Tracer 480 SC, Talstar 100 CE, Karate Zeon 250 SC, Meothrin 300 CE e Fury 400 CE foram eficazes até aos 7 dias após a aplicação e o Talstar foi até 11 dias. Aguillera e Bottan (2005) avaliaram o controle químico da lagarta *Spodoptera* spp. na cultura do algodão em Campo Verde (MT), os fisiológicos e o químico Avaunt atingiram eficiência satisfatória no controle destas pragas. Paula *et al.* (2005) analisaram os princípios clorfluazuron, lufenuron, fenprothrin, bifenthin concluíram que os produtos químicos utilizados no período em que se estabeleceu o experimento não foram eficientes no controle de *S. frugiperda* no algodoeiro da região do Cerrado.

É interessante que se faça a rotação de inseticidas, considerando o mecanismo de ação, a frequência de resistência observada para os diferentes grupos químicos e época de plantio. O abuso no uso de inseticidas não seletivos e de amplo espectro, às vezes, mata a

praga e elimina os seus inimigos naturais, além de diminuir os inimigos naturais de outras pragas e insetos benéficos, como os polinizadores (Praça, 2003).

Atualmente, muitos dos inseticidas antes empregados com sucesso no controle desta praga não têm se mostrado eficientes, pois, devido ao uso indiscriminado dos produtos químicos que pode levar à evolução das resistências a níveis bastantes críticos. Fracassos no controle desta praga são frequentemente relatados com o uso dos produtos tradicionais como fosforados e piretróides no Brasil (Schmidt, 2002). Há na literatura inúmeros casos documentados de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas. Yu (1991) verificou na Flórida a razão de resistência a piretróides que variou de 2 a 216 vezes. Para os fosforados, a intensidade variou de 12 a 271 vezes e para os carbamatos de 14 a 192 vezes.

Desta maneira, as diferentes populações de *S. frugiperda* têm sofrido constantes pressões de seleção por inseticidas nos distintos sistemas agrícolas, o que possivelmente tem contribuído e acarretado o estabelecimento de populações resistentes a várias classes de inseticidas (Diez-Rodriguez e Omoto, 2001; Yu, 2006).

2.2.1.1. Resistência de *S. frugiperda* a inseticidas

Um dos grandes problemas enfrentados pela agricultura mundial diz respeito ao uso constante e muitas vezes indiscriminado dos agrotóxicos, causando, em muitos casos, resistência dos insetos aos inseticidas e a redução ou eliminação da população de inimigos naturais de pragas, a contaminação ambiental, além do aumento de custo de produção (Valicente e Cruz, 1991).

A escolha incorreta de produtos químicos, seu uso desregrado, excessivo e a má regulação dos equipamentos também têm aumentado o número médio de aplicações. Na

cultura do milho, a cada ano, os danos provocados pela lagarta do cartucho têm sido mais severos (Cruz, 1995) indicando a seleção de populações resistentes. Há um verdadeiro círculo vicioso dos pesticidas tornarem as pragas resistentes e novos produtos serem sintetizados para combater novas linhagens que, em pouco tempo, por pressão de seleção, tornar-se-ão também resistentes a esses novos produtos (Rüegg, 1991).

O desenvolvimento de populações resistentes a produtos químicos, verificados em algumas regiões e a diminuição sensível da diversidade de agentes de controle biológico (Cruz, 1999), são os impactos diferenciados, ou seja, a seletividade. Essa resistência caracteriza-se por ser pré-adaptativa, genética e, portanto, hereditária. A resistência pré-adaptativa significa dizer que antes da aplicação dos inseticidas já se encontram no campo indivíduos resistentes logo, o uso constante de um determinado produto com um mesmo mecanismo de ação levará à seleção de indivíduos resistentes (Martinelli *et al.*, 2004).

No trabalho realizado por Yu (1992), detectou-se resistência ao peritróide (263 vezes), fosforado (516 vezes) e carbamato (560 vezes). E também verificou-se um aumento de 1,2 a 11 vezes na concentração de enzimas detoxificantes das populações de *S. frugiperda* provenientes do campo quando comparada com a de populações de laboratório. Segundo o trabalho de Schmidt (2002), observa-se que há diferenças na suscetibilidade a lufenuron das populações de *S. frugiperda* em diferentes regiões do Brasil.

Dentre os fatores que afetam a evolução da resistência, os conhecimentos da estrutura genética e do fluxo gênico entre as populações desta praga têm sido reconhecidos como informações de grande importância para o MIP. O entendimento da estrutura genética e do nível intra-específico de fluxo gênico entre populações de uma praga é essencial para o delineamento de práticas de manejo com o objetivo de retardar a evolução à resistência a qualquer tática de controle de insetos (Caprio e Tabashnik, 1992).

Deste modo, a utilização indistinta dos pesticidas desequilibra todo o meio ambiente, as pragas, o homem, os animais domésticos e silvestres, a água, o solo, os alimentos, pois podem deixar resíduos (Annebelli, 2005). Portanto, para evitar os problemas acarretados pelos agrotóxicos, torna-se imperativa a busca de medidas alternativas para o controle de pragas (Valicente e Cruz, 1991).

2.2.2. Controle mecânico

Entre os aspectos que contribuem para a redução da população de *S. frugiperda* é muito importante o controle das pupas que permanecem no solo, que podem ser combatidas através de sistemas rápidos de preparo do mesmo. Este sistema eleva as pupas à superfície e, assim, elas morrem por efeito da temperatura e das condições adversas ou por esmagamento. Outro fator a ser levado em consideração é a eliminação de plantas daninhas ao redor das plantações através do preparo de solo, que ajuda a diminuir a infestação, pois estas plantas podem servir de hospedeiros alternativos para lagarta do cartucho do milho (Cruz *et al.*, 1995; Montesbravo, 2001; Karam e Melhorança, 2005).

Este método tem sido eficaz no controle, por exemplo, de curuquerê-da-couve em pequenas hortas por meio de esmagamento de ovos e catação de lagartas; catação manual de bichos-cestos em cafezal; esmagamento de brocas de ramos e tronco em frutíferas como a figueira; corte de lagartas em fumos e mandiocas com tesouras; formação de barreiras ou sulcos contra ataque do curuquerê-dos-capinzais e gafanhotos em surtos graves (Gallo *et al.*, 2002).

2.2.3. Controle cultural

O uso de certas práticas culturais para controle, baseando-se em conhecimentos ecológicos e biológicos das pragas, como exemplo, a rotação de cultura que consiste no plantio alternado, em anos sucessivos, de culturas que ainda não sejam hospedeiras da lagarta-militar como girassol, guandu e outros (Gallo *et al.*, 2002). Desta maneira, evita-se o estabelecimento da mesma nas áreas destinadas ao cultivo do milho ou algodão, minimizando os danos e a incidência do inseto-praga (Cruz *et al.*, 1995; Montesbravo, 2001).

Outra alternativa é o policultivo, muito utilizado pelos produtores de agricultura familiar na região da América Central e Caribe, incluindo Cuba, com resultados satisfatórios para o sistema de milho x feijão além da redução substancial da incidência da praga (Montesbravo, 2001).

Também são importantes as seguintes práticas culturais: a época de plantio e colheita, destruição total de restos de culturas, poda, limpeza, adubação e irrigação de forma correta, cultura-armadilha nas áreas marginais ao plantio, o plantio direto e outros sistemas de cultivo (Gallo *et al.*, 2002; Freire e Morello, 2003).

2.2.4. Controle biológico

O controle biológico consiste no uso de organismos vivos (predador, parasita ou patógenos) que atacam insetos-pragas e, dessa maneira, mantém a população de determinada praga em equilíbrio no agrossistema, não ocasionando danos econômicos ao produtor. Na natureza há vários organismos que utilizam como alimento, os insetos-pragas,

tais como, aves, répteis, anfíbios, peixes, mamíferos, diferentes tipos de insetos (parasitóides e predadores), ácaros, aranhas e os entomopatógenos (fungos, bactérias, vírus, protozoários, nematóides, rickettsias e mollicutes) que têm papel importante no controle de pragas (Valicente e Cruz, 1991; Gallo *et al.*, 2002). Esse método de controle é uma estratégia muito utilizada em sistema agroecológico, bem como no manejo integrado de pragas na agricultura convencional. O controle biológico é, portanto, um fenômeno natural que consiste na regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais, que constituem os agentes de mortalidade biótica (Gallo *et al.*, 2002).

O conhecimento da existência de inimigos naturais de insetos começa no século III, com os chineses usando formigas predadoras contra insetos-pragas de citros. No começo do século XVIII, pássaros predadores e joaninhas foram usados como agentes de controle natural, e em algumas localidades da Europa foram feitas transferências de insetos predadores para combater surtos de insetos-pragas. Por volta de 1830, os fungos, as bactérias e os protozoários, foram identificados como agentes causais de doenças em insetos, sendo que em 1870 foi feita a primeira tentativa de controle de insetos com patógenos. Os vírus foram identificados no início do século XX. O grande marco deste método aconteceu em 1888 com a introdução na Califórnia (USA) da joaninha *Rodolia cardinalis*, trazida da Austrália para o controle do pulgão-branco-dos-citros, *Icerya purchasi*, que finalizou com sucesso, dois anos após a liberação do inseto-predador (Gallo *et al.*, 2002).

Para o controle biológico da lagarta *S. frugiperda* existem diversos parasitóides e predadores dentre eles, *Telenomus* sp., tem a capacidade de parasitar ovos e alcançar populações com o dobro do seu hospedeiro (Figueiredo *et al.*, 1999; Cave, 2000; Montesbravo, 2001); *E. plathypena*, deve ser liberado quando ocorrerem adultos, e quando

existir a presença de larvas de 3 e 4 ínstaes (Montesbravo, 2001); *C. insularis*, parasita ovo e larva, e com seu alto potencial reprodutivo é considerada a espécie com maior influência natural desta praga (Van Huis, 1981; Montesbravo, 2001); *Trichogramma* spp., parasita ovos de 200 espécies de insetos, com preferência por ovos de lepidópteros, vem sendo utilizado na China, França, USA, Rússia, Nicarágua e Colômbia (Cruz *et al.*, 1999; Gallo *et al.*, 2002); *D. luteipes*, um predador que se alimenta dos ovos e de lagartas pequenas desta praga, sendo que cada indivíduo é capaz de consumir cerca de 496 ovos e 12 lagartas por dia, e desta forma, a tesourinha tem contribuído de maneira substancial no controle biológico da lagarta-do-cartucho-do-milho (Cruz e Oliveira, 1997; Cruz *et al.*, 1999; Ovejero, 2001).

Os bioinseticidas também são utilizados no combate de *S. frugiperda*, tendo como princípio ativo os vários microrganismos entomopatógenos, no entanto, os mais propícios para as condições do Brasil são *B. thuringiensis* Berliner, vírus da poliedrose nuclear (VPN) baculovírus *Spodoptera*, *N. rileyi* (Farlow) Smason e *B. bassiana* (Bals.)Vuillemin. A bactéria *B. thuringiensis* é um agente cujas formulações encontradas no mercado são baseadas nas subespécies *Kurstaki* e *Aizawai*. Esta bactéria causa septicemia, devido à ingestão dos cristais protéicos. Em campo deve-se aplicar o produto de modo que as folhas fiquem cobertas e distribuídas de forma uniforme sobre todas as partes das folhas aonde as lagartas irão se alimentar (Höfte e Whiteley, 1989; Habib e Andrade, 1998; Monnerat e Bravo, 2000; Montesbravo, 2001; Praça *et al.*, 2004). O baculovírus *Spodoptera* tem sido usado no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho como uma medida econômica, eficiente, segura e específica, agindo somente com a lagarta. A aplicação do VPN pode ser realizada via água de irrigação, usando diferentes lâminas de água ou feita pelos equipamentos convencionais (Cruz *et al.*, 1995; Cruz, 2000). O fungo *N. rileyi* se destaca para o controle

de pragas agrícolas por atacar mais de 32 espécies de insetos entre coleópteros, ortópteros e em sua maioria lepidópteros. Os resultados mais expressivos têm sido com *Anticarsia gemmatallis*. Em Cuba, foram realizados experimentos com uma linhagem selecionada deste fungo, onde sua efetividade foi de 90% em todos os casos (Montesbravo, 2001). E o fungo *B. bassiana* é um micoinseticida, já comercializado como pó solúvel de conídios para uso agrícola e doméstico. Muitos estudos têm mostrado que certos isolados de *B. bassiana* são eficazes no controle de lepidópteros, como a lagarta-do-cartucho (Cruz, 1995; Carneiro *et al.*, 2004).

2.2.5. Manejo Integrado de pragas

O Manejo Integrado de Pragas é um sistema de manejo que no contexto associa o ambiente e a dinâmica populacional da espécie, utiliza todas as técnicas apropriadas e métodos de forma tão compatível quanto possível e mantém a população da praga em níveis abaixo daqueles capazes de causar danos econômicos (FAO, 2007). Essa estrutura considera os efeitos negativos que cada método de controle pode ter na sociedade e no meio ambiente, procurando utilizar ao máximo os agentes naturais de controle do meio físico e biológico, manipulando-os, observando as características ecológicas e econômicas das culturas e das pragas, e assim integrar se necessário os diferentes métodos, desde que seja de forma harmoniosa (Gallo *et al.*, 2002). No entanto, não é o uso de vários métodos de controle que caracteriza um sistema de manejo, mas sim a relação dos métodos dentro dos preceitos ecológicos, econômicos e sociais que são a base do MIP (Gallo *et al.*, 2002).

Os fundamentos baseiam-se em quatro elementos: na exploração do controle natural, dos níveis de tolerância das plantas aos danos causados pelas pragas, no

monitoramento das populações para tomadas de decisão e na biologia e ecologia da cultura e de suas pragas (Freire e Morello, 2003; Embrapa Milho e Sorgo, 2005). Estas premissas implicam no conhecimento dos fatores naturais de mortalidade, nas definições das densidades populacionais ou da quantidade de danos causados pelas espécies-alvo equivalentes aos níveis de dano econômico e de controle. Outra variável importante seria a determinação do nível de equilíbrio das espécies que habitam o agroecossistema em questão. Em função da flutuação da densidade da espécie-alvo e de sua posição relativa a esses três níveis ao longo do tempo, as espécies podem ser classificadas em pragas-chave, pragas esporádicas e não-pragas (Embrapa Milho e Sorgo, 2005).

No cerrado o método de controle mais empregado é o controle químico, e dessa forma, torna-se de fundamental importância o conhecimento e uso de técnicas eficazes e sustentáveis, como a utilização de inseticidas seletivos aos inimigos naturais, preferencialmente, produtos de faixa verde ou com menor impacto possível no ambiente (Martinelli *et al.*, 2004; Tomquelski *et al.*, 2006).

A CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral) vem fazendo um trabalho de MIP Milho, cuja praga alvo é a lagarta do cartucho. O controle é feito por meio de monitoramento da cultura, aplicando-se produtos químicos quando a cultura apresenta 20% de plantas com o sintoma de folhas raspadas e as lagartas estão com 7 mm a 8 mm (Merege, 2007).

Sendo assim, para uma boa estratégia de manejo integrado de pragas é preciso integrar os procedimentos disponíveis para a prevenção e combate da praga. Deve-se conhecer o comportamento do inseto-alvo para o correto monitoramento da cultura, avaliar os inimigos naturais, estudar os fatores climáticos que podem afetar a população da praga e seus inimigos naturais, utilizar rotação de culturas e policultivos, preparo do solo,

densidade de plantas com bons níveis de fertilização, destruição das plantas hospedeiras, avaliar a dinâmica da população, determinar os níveis de dano econômico, conhecer o momento oportuno do uso de diferentes métodos de controle biológico, como o uso de parasitóides e bioinseticidas, podendo ainda utilizar inseticidas adequados para o momento (Gallo *et al.*, 2002; Praça, 2003).

2.3. Características da cultura do milho

O milho (Figura 7) é uma planta da família Gramineae e da espécie *Zea mays* L., planta alta, monocotiledônea, nativa da América do Sul, com grãos dispostos em largas espigas e que são ricamente nutritivos (Soares, 1993). É um cereal de altas qualidades nutritivas que permite ser utilizado como alimento humano, ração animal e também nas indústrias farmacêutica, bélica e aérea (Alessi *et al.*, 2003).



Figura 7: a) Plantação de milho (*Zea mays* L.) na vitrine da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. b) Em detalhe, a espiga do milho e o estilo-estigmas (“cabelo do milho”).

A história mostra que é uma planta originária das Américas, tendo indicações que sua origem específica tenha sido no México, América Central ou Sudoeste dos Estados

Unidos. Com as grandes navegações do século XVI e o início do processo de colonização da América, a cultura do milho se expandiu para a Europa, onde era cultivado inicialmente em jardins, até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. É uma das culturas mais antigas do mundo, havendo provas, através de escavações arqueológicas, geológicas e de medições por desintegração radioativa, de que é cultivado há pelo menos 5.000 anos.

Hoje é cultivado e consumido em todos os continentes e sua produção só perde para a do trigo, ocupando assim, o segundo lugar dentre os cereais mais produzidos no mundo e sua importância não se restringe apenas ao fato de ser produzido com facilidade e em larga escala, mas também pelo valor sócio-econômico que a cultura representa. No Brasil, o cultivo do milho vem desde antes da chegada dos europeus, pois os índios, principalmente os guaranis, tinham o cereal como o principal ingrediente de sua dieta. Com a chegada dos portugueses, o consumo aumentou e novos produtos a base de milho foram incorporados aos hábitos alimentares dos brasileiros (Jugenheimer, 1990; Godoy, 2002). Atualmente, o milho é cultivado em diversas regiões do mundo sendo os maiores produtores mundiais os Estados Unidos, a China e o Brasil, totalizando uma produção mundial acima de 600 milhões de toneladas (Duarte, 2000). Apesar do Brasil está entre os três maiores produtores, ele não se destaca entre os países com maior produtividade, ficando em sexto lugar por apresentar uma produtividade abaixo da média mundial que está acima de 4000 kg/ha. No entanto, observa-se um crescimento sistemático, tendo passado de 1.874 kg/ha, em 1990, para 3.352 kg/ha, em 2001 (FAO, 2002). Este crescimento é refletido nos dias atuais, pois em 2005, o Brasil produziu 35,1 milhões de toneladas e em 2006 produziu 42,1 milhões de toneladas em grão de milho nas duas safras.

A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Na

realidade, o uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do uso desse cereal, isto é, cerca de 70% do consumo mundial. Nos Estados Unidos, cerca de 50% é destinado a esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60% a 85%, dependendo da fonte da estimativa e de ano para ano (Embrapa Milho e Sorgo, 2005). Esta gramínea constitui um dos principais insumos para o segmento produtivo de cadeias pecuaristas, e é utilizada com destaque no arraçãoamento de animais, em especial na suinocultura, na bovinocultura de leite e na avicultura, tanto na forma *in natura* como na forma de farelos e silagens. No sul do Brasil, a demanda do estado do Paraná representa 45% do total produzido (Abimilho, 2002; Godoy, 2002).

Devido a versatilidade em seu uso, a produção de milho tem acompanhado o crescimento da produção de suínos e aves, no Brasil e no Mundo. Há uma tendência de crescimento de sua produção nacional, segundo a CONAB (2001) houve um aumento da produção do milho do ano de 1992 (31,5 milhões de toneladas) para o ano de 2001 (41,5 milhões de toneladas) e paralelamente, um aumento da produção destes animais em 1992 de 2,8 milhões de toneladas para 6,1 milhões de toneladas em 2001, devido o uso do milho como um ingrediente importante na composição das rações para esses animais. Na realidade, também fazem parte da demanda por milho para alimentação animal, os bovinos e os pequenos animais. Atualmente, a produção de ração para pequenos animais tem se constituído em um mercado crescente para o uso desse cereal, buscando um alimento de melhor qualidade para esses animais (Embrapa Milho e Sorgo, 2005).

Apesar de não ter uma participação muito grande no uso de milho em grão, a alimentação humana, com derivados de milho, constitui fator importante de uso desse cereal em regiões com baixa renda. Em algumas situações, o milho constitui a ração diária de alimentação, por exemplo, no Nordeste do Brasil, onde o milho é a fonte de energia para

muitas pessoas que vivem no semi-árido; outro exemplo está na população mexicana, que tem no milho o ingrediente básico para a sua culinária.

O milho é um dos alimentos mais nutritivos que existe, puro ou como ingrediente de outros produtos, é uma importante fonte energética para o homem. Ao contrário do trigo e do arroz, que são refinados durante seus processos de industrialização, o milho conserva sua casca, que é rica em fibras, fundamental para a eliminação das toxinas do organismo humano. Além das fibras, o grão de milho é constituído de carboidratos, proteínas, vitaminas (A e complexo B), sais minerais (ferro, fósforo, potássio, cálcio), óleo e grandes quantidades de açúcares, gorduras, celulose e calorias (Abimilho, 2002).

Maior que as qualidades nutricionais do milho, só mesmo sua versatilidade para o aproveitamento na alimentação humana. Ele pode ser consumido diretamente ou como componente para a fabricação de balas, biscoitos, pães, chocolates, geléias, sorvetes, maionese e até cerveja. Apesar de serem usados para fazer pães, o milho não contém a proteína glúten, favorecendo as pessoas que apresentam alguma rejeição a essa proteína.

2.4. Características da cultura do algodão

O algodão (Figura 8), planta do gênero *Gossypium* spp., pertencente a família Malvaceae, planta dicotiledônea, e a raça *Latifolium* Hutch, pertence ao algodoeiro herbáceo e a raça *Marie Galante* Hutch, pertence ao algodoeiro arbóreo; caracteriza-se por ser a fibra têxtil mais antiga e importante, cultivada no mundo e considerada a fibra vegetal mais utilizada pelo homem, cujo comprimento pode atingir 38 mm e, em decorrência das poucas exigências em solo e clima, pode ser produzida e cultivada em todos os continentes (Richetti e Melo-Filho, 2001). As cultivares se diferenciam quanto ao tamanho da fibra,

ciclo curto ou longo, porte alto ou baixo, resistência ou susceptibilidade a doenças, entre outras características.



Figura 8: a) Capulho de algodão aberto (fibra madura). b) Plantação de algodão (*Gossypium hirsutum*) em campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Atualmente é cultivado em regiões tropicais e em algumas regiões subtropicais. Os algodoeiros cultivados no mundo pertencem a quatro espécies distintas: *Gossypium hirsutum*, *G. barbadense*, *G. arboreum* e *G. herbaceum*, sendo que a primeira contribui com 90% da produção mundial do algodão. A planta é subarborescente e, na produção comercial, o ciclo é anual.

A fibra do algodão é constituída de mais de 95% de celulose, polímero de glicose, sendo a principal matéria-prima utilizada na confecção de vários tipos de tecido para a tecelagem e fios, para a confecção de feltro, obtenção de celulose, películas fotográficas e chapas para radiografia (Díaz, 1993).

Além dos benefícios obtidos pela utilização da fibra, pode-se aproveitar, também, as propriedades da semente do algodão, rica em óleo e útil para a alimentação humana e para a fabricação de margarina e sabão. O subproduto da extração do óleo (torta) também pode ser

útil para a alimentação animal (Richetti e Melo-Filho, 2001), logo o aproveitamento do algodoeiro é praticamente total.

A região Nordeste e o Brasil já foram grandes produtoras e exportadoras de algodão, chegando a posição de 5º produtor mundial nas décadas de 1960 e 1970, e de 5º exportador de pluma, colocando no mercado internacional, mais de 420.000 t de pluma, no ano de 1969. Neste período, o nosso país, em especial a região Nordeste, que vivia do chamado “Ouro Branco”, tinha mais de 12% da área plantada com esta malvácea no mundo, mais de 3,6 milhões de hectares e quase metade da população, direta e indiretamente, trabalhava com o algodão e seus subprodutos (Beltrão, 2003).

Pouco se conhece da história passada do algodão no Brasil, porém se sabe que, quando os portugueses aqui chegaram, os índios já conheciam o algodão, e já sabiam fiá-lo e fazer tecido. Para Neves e Junqueira (1965) o algodão teve, no Brasil, várias fases: as primeiras explorações nos Estados da Bahia e do Ceará, no início do século XVI, a fase de subsistência que se iniciou no século XVII, quando o incremento do cultivo da cana-de-açúcar na região litorânea impeliu a pecuária. O algodão acompanhou este processo, pois, além da produção da fibra, alimentava o gado com suas sementes, ramos e folhas, e assim, ele era, durante os séculos XVII e XVIII, cultivado por toda parte em pequenas roças e em todos os Estados da Federação. Com a Revolução Industrial, no século XVIII, cuja mola mestra e propulsora foi o algodão, pois foi com a invenção do escaroçador de serras que a revolução se iniciou, estabelecendo a fase de exportação de algodão. Como exemplo, o estado do Maranhão que chegou a exportar, em 1830, mais de 78.000 sacas de algodão para a Europa. Do Maranhão, essa cultura migrou para Pernambuco e demais estados do Nordeste, com o trinômio, algodão, boi e culturas alimentares, que perdurou até a década de 80 do século passado, quando o algodão perene foi quase extinto, não sendo mais plantado

nos dias atuais. O algodão é um produto que desde a época da colonização até os nossos dias tem desfrutado de uma história extremamente rica no Brasil (Beltrão, 2003).

O parque têxtil do Estado do Ceará, segundo pólo de consumo de algodão do Brasil, consome em média 170.000 toneladas de pluma por ano. Na safra de 1998, por exemplo, consumiu mais de 150.000 toneladas de pluma, das quais 90% foram importadas (Beltrão, 2003). E, nesse mesmo ano, esta fibra respondeu por 60% do consumo total de fibras e filamentos utilizados pela indústria brasileira (Mello *et al.*, 2000). Portanto, a cultura do algodão é de grande expressão socioeconômica para os setores primário e secundário do Brasil.

No início da década de 90, a produção de algodão no Brasil concentrava-se nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Após esse período, aumentou significativamente a participação do algodão produzido nas áreas de cerrado, basicamente da região Centro-Oeste (Freire e Morello, 2003). Esta região que em 1990 cultivava apenas 123.000 ha (8,8% da área de algodão do país) passou para 479.000 ha em 2002, correspondendo a 63,0% do total da área. Em 2005, no Brasil foram produzidos 3.663.453 t de algodão herbáceo em caroço em uma área de 1.254.875 ha (Embrapa Algodão, 2003; IBGE, 2006).

No âmbito mundial, a China é o maior país produtor de algodão, com o equivalente a 23% do total em 2005/06, e também o maior importador, em virtude da insuficiência de sua produção frente a crescente demanda pela fibra. Essa característica foi intensificada no ano de 2006 dada a redução de 9,7% na quantidade produzida, estimada em 5,7 milhões de toneladas (Barbosa, 2006). Na África, em 2002/2003, os produtores da região de Benin plantaram apenas 320 mil hectares de algodão em vez dos 400 mil previstos. Em consequência, a produção caiu 23%, de 415 mil toneladas, em 2001/2002, passou para 320 mil toneladas. Entretanto, os principais exportadores são os Estados Unidos, a zona franca

da África, o Egito, o Uzbequistão e a Austrália; os importadores são, em primeiro lugar, os países do sudeste da Ásia, como a China (Campos, 2003).

2.5. Importância econômica do milho e do algodão

O levantamento de campo realizado pelo Sistema GCEA do IBGE para a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas, em novembro de 2006, aponta uma produção da ordem de 115,9 milhões de toneladas, a qual está 0,2% inferior à prevista em outubro deste mesmo ano (116,2 milhões de toneladas), no entanto, foi 3,0% superior a obtida em 2005 (112,6 milhões de toneladas) (IBGE, 2007).

Em termos absolutos (milhões de toneladas) a produção de cereais, leguminosas e oleaginosas está assim distribuída pelas Grandes Regiões do Brasil: Sul, 48,1; Centro-Oeste, 39,1; Sudeste, 15,8; Nordeste, 9,6 e Norte, 3,3.

O milho (*Zea mays* L.) apresenta cerca de 80% de participação na produção nacional de grãos, em valores absolutos, os maiores ganhos de produção, superando a safra anterior em: milho em grão 1ª safra, 4.260.465 t (15,7%) e milho em grão 2ª safra, 2.695.626 t (33,9%), tendo uma produção total de 42.072.002 t (Tabela1), em uma área total colhida na safra de 2006 de 12.554.623 ha (IBGE, 2006).

O algodão (*Gossypium* spp.) é cultivado em apenas seis estados, os quais perfazem 95,4% do total produzido no país, sendo que a produção nacional de algodão herbáceo, em caroço, no ano de 2005, totalizou 3.663.453 toneladas (Tabela1). A safra de 2006 poderia ter sido melhor, caso não fosse prejudicada pelos problemas climáticos, que provocaram uma queda de cerca de 29,4% no rendimento médio (IBGE, 2006).

Tabela 1 - Confronto das Safras de 2005 e 2006 - Brasil - Novembro 2006.

Produtos	Produção (t)			Área (ha)			
	Agrícolas	Safra 2005	Safra 2006	Variação%	Safra 2005	Safra 2006	Variação%
Algodão herbáceo (em caroço)		3 663 453	2 796 916	-23,7	1 254 875	886 509	-29,4
Milho (em grão) Total		35 115 911	42 072 002	19,8	11 548 912	12 554 623	8,7
Milho (em grão) 1ª safra		27 154 025	31 414 490	15,7	8 579 847	9 283 542	8,2
Milho (em grão) 2ª safra		7 961 886	10 657 512	33,9	2 969 065	3 271 081	10,2

FONTE - Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Novembro 2006.

A produção mundial de milho em 2004 foi de 705.293 mil toneladas, sendo que os maiores produtores são os Estados Unidos com 42,3% e a China com 18,7%. O Brasil é o terceiro maior produtor de milho e sua produção corresponde a 5,9% da produção mundial.

O principal exportador de milho do mundo são os Estados Unidos. Em 2006, o país vendeu mais de 40 milhões de toneladas para o Japão, México, Coreia do Sul, Egito e União Européia. A redução nos estoques norte-americanos abre espaço para a entrada de outros exportadores, pois de 2005 para 2006, as exportações do milho brasileiro aumentaram de 1 milhão de toneladas para 3,9 milhões de toneladas e a previsão para 2007 é de 5 milhões de toneladas (Guimarães, 2007).

Esta redução deixou os agricultores que plantaram milho na safra de 2006 satisfeitos, pois ela acontece devido ao aumento do consumo dos grãos para produzir álcool nos Estados Unidos e os preços do produto dispararam no mercado internacional. Em

janeiro de 2006, a tonelada do milho chegou a ser vendida por US\$ 153,29 (USDA, 2007), o que correspondeu a uma alta de 61% em relação a setembro do ano passado. Com isso, as vendas de sementes cresceram 30% em relação ao ano de 2005.

Essa oportunidade para aumentar a produção de milho surgiu em solo estrangeiro. Os Estados Unidos da América pretendem reduzir em 20% o consumo de gasolina no país nos próximos dez anos e estimular o uso de combustíveis “limpos” que causam menos danos ao meio ambiente do que o petróleo, como o álcool, que naquele país, é feito de milho (Guimarães, 2007).

A oferta mundial de algodão em pluma alcançou 36,6 milhões de toneladas em 2005/06, com acréscimo de 2,5% em comparação com a anterior. Embora seja a maior quantidade das últimas temporadas, a redução de 5,9% na produção, prevista em 24,7 milhões de toneladas, impede o crescimento mais acentuado na disponibilidade do produto, em virtude do estoque inicial relativamente elevado de 11,8 milhões de toneladas (Tabela 2) (Barbosa, 2006).

Tabela 2 - Suprimento Mundial de Algodão em Pluma, 2003/04 a 2005/06¹

Item	2003/04	2004/05	2005/06
Estoque inicial	9,6	9,4	11,8
Produção	20,7	26,2	24,7
Oferta	30,4	35,6	36,5
Consumo	21,3	23,7	25,5
Importações	7,4	7,2	9,6
Exportações	7,2	7,6	9,5
Estoque final	9,4	11,8	11,4

¹ Ano comercial de agosto a julho.

Os valores foram calculados para 1000 t.

Fonte: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

O consumo de algodão é estimado em 25,5 milhões de toneladas, superior em 7,6%, o que vem reforçar a crescente demanda iniciada em 2004/05. Apesar da intensificação do uso de algodão no mundo, a temporada atual teve um estoque final de 11,4 milhões de toneladas (-3,4%) (Tabela 2), conforme o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

A China vem sendo o maior produtor e importador de algodão devido a insuficiência de sua produção frente a crescente demanda pela fibra, que é caracterizada no ano de 2006 pela a redução de 9,7% na quantidade produzida. O consumo de algodão neste país cresceu ininterruptamente nos três últimos anos até culminar em 10,1 milhões de toneladas na safra 2005/06, um acréscimo de 20,8% em comparação com a safra passada, então este resultado elevou a participação do país de 33% para 40% do consumo mundial no período (Barbosa, 2007).

As exportações brasileiras de algodão para a China evoluíram de US\$18,8 milhões em 2003 para US\$90,15 milhões em 2005, com o equivalente em relação ao total exportado alcançando 20%. Isto tornou o mercado chinês o principal destino das exportações da fibra do Brasil no último ano, segundo a Secretaria de Comércio Exterior – SECEX (CONAB, 2001).

2.6. Principais Pragas Agrícolas de ambas culturas

2.6.1. Aspectos Gerais

Insetos estão por toda parte, podendo ser encontrados com facilidade em todos os principais tipos de habitats terrestres e aquáticos, com exceção apenas dos marinhos, onde

esses artrópodes são raros (Mitter *et al.*, 1988). Apenas 10% do total de insetos que ocorrem na superfície da Terra são pragas que atacam a agricultura ou ao ser humano de alguma maneira. Esses insetos-pragas causam um grande prejuízo econômico ao homem.

De acordo com a FAO (2007), praga é qualquer espécie, raça ou biótipo de vegetais, animais ou agentes patogênicos, nocivos aos vegetais ou produtos vegetais para consumo humano ou animal.

Na natureza, os insetos, geralmente, têm suas populações controladas por predadores, parasitóides e doenças, caso condições adequadas ocorram. Porém, devido ao desequilíbrio ecológico, a globalização de pragas e o progresso descontrolado, vêm causando um grande impacto ambiental, permitindo o aumento das populações destas pragas no meio ambiente.

2.6.2. Pragas presentes na cultura do milho

Vários insetos atacam as sementes, raízes e plântulas do milho após a semeadura, e o tipo de ataque reduz o número de plantas na área cultivada e o potencial produtivo da lavoura. Esses insetos são de hábito subterrâneo ou superficial e, na maioria das vezes, passam despercebidos pelo agricultor, dificultando o emprego de medidas para o seu controle. A importância desses insetos varia de acordo com o local, ano e sistema de cultivo. Como principais espécies, temos: Larva alfinete (*Diabrotica* spp.); Larva-aramé (*Conoderus* spp., *Melanotus* spp); Bicho-bolo, coró ou pão de galinha (*Diloboderus abderus*, *Eutheola humilis*, *Dyscinetus dubius*, *Stenocrates* sp, *Liogenys* sp.); Percevejo castanho (*Scaptocoris castanea* e *Atarsocoris brachiariae*); Larva Angorá (*Astylus variegatus*) essa praga ataca várias espécies de plantas cultivadas e é considerada uma

praga secundária da cultura do milho; Lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*); Tripes (*Frankliniella williamsi*) os danos causados pelos tripes têm sido verificados nos períodos de estiagem logo após a emergência das plântulas podendo, sob altas infestações, causar até morte das plantas com perdas econômicas significativas; Percevejos: barriga-verde (*Dichelops furcatus*, *D. melacanthus*), verde (*Nezara viridula*) os percevejos são pragas tipicamente da soja, mas com o plantio do milho em sucessão ou mesmo em rotação passaram a causar danos na fase de emergência do milho; Cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*); Pulgão-do-milho (*Rhopalosiphum maidis*) esta é a espécie de inseto de ocorrência mais endêmica no milho, mas raramente constitui problema para a cultura pela ação eficiente dos inimigos naturais (predadores e parasitóides); Lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) predomina em áreas de solos pesados, mal cultivados, ou seja, áreas sujas e as larvas atacam a região do coleto, cortando as plantas na base o que provoca morte ou perfilhamento; Lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) é a principal praga da cultura do milho no Brasil pois inicia o ataque em plântulas levando a sua morte, especialmente quando a cultura é instalada após a dessecação no sistema de plantio direto, pois a população de lagartas se estabelece na lavoura. E, ainda, esta espécie ataca tipicamente o cartucho da planta (Figura 9), o que pode ocorrer desde a emergência até o pendoamento. Todavia, quando o ataque ocorre no início de desenvolvimento da cultura, a lagarta pode perfurar a base da planta, atingindo o ponto de crescimento e provocar o sintoma de "coração morto", típico da elasma. Os danos são muitas vezes incalculáveis pois quando a mesma se encontra no cartucho não se tem um controle adequado, levando à perda da lavoura (Embrapa Milho e Sorgo, 2005). Essa espécie é freqüente também em todas as regiões algodoeiras, mas ocorre principalmente em áreas com rotação ou próximas a cultura de milho, sorgo, arroz, trigo e outras (Santos, 1997; Degrande, 1998; Delano *et al.*, 1999).



Figura 9: *S. frugiperda* atacando o cartucho do milho.

2.6.3. Pragas presentes na cultura do Algodão

As pragas constituem-se um dos fatores limitantes para a exploração do algodão, pois atacam desde a emergência até a colheita, caso não sejam tomadas medidas eficientes de controle. Dentre as pragas que atacam o algodão cultivado no cerrado, destacam-se: as brocas (*Eutinobothrus brasiliensis* e *Conotrachelus denieri*), a lagarta rosca (*Agrotis spp.*), os pulgões (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*), o trips (*Frankliniella spp.*), o percevejo de renda (*Gargaphia torresi*), o curuquerê (*Alabama argillacea*), o bicudo (*Anthonomus grandis*), a lagarta-das-maçãs (*Heliothis virescens*), as lagartas do gênero *Spodoptera* (*S.frugiperda* e *S. eridania*), a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), os ácaros (*Tetranychus urticae*, *Polyphagotarsonemus latus*), os percevejos (*Horcias nobilellus* e *Dysdercus spp.*) e a mosca branca (*Bemisia tabaci*) (Embrapa Algodão, 2003; Freire e Morello, 2003).

Sendo que as pragas que têm crescido em importância no algodoeiro são as lagartas que atacam de maneiras diferentes, podendo ocorrer o ataque a partir dos 30 a 40 dias após a germinação, mas a grande maioria delas tem seu ataque concentrado do meio para o final do ciclo de crescimento da cultura. Enquanto algumas espécies são capazes de atacar as folhas da cultura (*A. argillacea*, *S. frugiperda* e *S. eridania*), outras (*H. virescens*, *S. frugiperda*, *S. eridania*, *P. gossypiella*) concentram seu ataque nos botões e maçãs das plantas (Embrapa Algodão, 2007).

No entanto, a principal praga de importância para a cotonicultura mundial é o bicudo (*A. grandis*). Em algumas áreas do Cerrado, normalmente o inseto concentra o início do seu ataque na época de colheita do plantio regular (safra). Todavia, em outras áreas sua presença começa a ser verificada nas lavouras por ocasião da emissão dos primeiros capulhos (Figura 10), local preferido para seu ataque, causando assim, grandes danos. Destacam-se também a lagarta *S. frugiperda* que tem migrado para essa cultura e se alimentado das folhas no estágio larval, penetrando nas maçãs e nos botões florais, o que dificulta o seu controle e comprometendo a qualidade e quantidade de fibras produzidas (Da Silva *et al.*, 2005). As outras pragas são de menor importância, pois tem sua ocorrência restrita a alguns locais e condições específicas. Também ocorrem na região os ácaros, os percevejos, os pulgões, o tripses, a mosca branca e as brocas do algodoeiro (Embrapa Algodão, 2007).



Figura 10: Lagarta *S. frugiperda* coletada atacando os primeiros capulhos de algodão.

2.6.4. Danos Econômicos provocados por pragas

Os danos causados pelos insetos às plantas são variáveis, podendo ser observados em todos os órgãos vegetais, dependendo da espécie e da densidade populacional da praga, do estágio de desenvolvimento, da estrutura vegetal atacada e da duração do ataque. É válido considerar também o país em questão, características climáticas, técnicas agronômicas empregadas e características socioeconômicas. A partir desses fatores, poderá então haver maior ou menor prejuízo quantitativo e qualitativo.

Os insetos podem causar danos diretos quando atacam o produto a ser comercializado, ou indireto quando atacam estruturas vegetais que não serão comercializadas, mas que alteram os processos fisiológicos, provocando reflexos na produção. E também, podem atuar indiretamente, transmitindo patógenos em geral ou injetando substâncias toxicogênicas durante o processo alimentar (Gallo *et al.*, 2002).

Em termos mundiais, os prejuízos causados por pragas e doenças são bastante elevados e, juntamente com as plantas daninhas, chegam a causar perdas da ordem de 38%. No Brasil, as pragas podem ser responsáveis por perdas da ordem de 2,2 bilhões de dólares

para as principais culturas brasileiras (Bento, 1999). E no caso da lagarta-do-cartucho o prejuízo é da ordem dos 400 milhões de dólares (Duarte, 2000). Portanto, é necessário o controle desta praga com as várias táticas de controles existentes, e não somente com o uso do agrotóxico, pois o seu emprego indiscriminado vem selecionando resistência dos insetos aos inseticidas e a redução ou eliminação da população de inimigos naturais de pragas, a contaminação ambiental, além do aumento de custo de produção (Valicente e Cruz, 1991). Sendo assim, a detecção e caracterização de diferenças genéticas entre as populações de insetos é uma questão importante para melhorar as práticas de gerenciamento desta praga (Martinelli *et al.*, 2006).

2.7. Caracterização Molecular

Uma importante ferramenta para desenhar estratégias de manejo e controle de insetos-praga é conhecer o perfil genético dos mesmos, objetivando identificar marcadores moleculares que indiquem a caracterização e a identificação de populações naturais de insetos-pragas, bem como a variabilidade genética e, ainda, ser usado como ferramenta para conhecer a dinâmica da população desta praga no Brasil e no mundo.

A caracterização de um organismo é possível devido ao levantamento qualitativo e quantitativo de seus caracteres. Dessa forma, com a caracterização podem-se discriminar as diversas espécies de insetos por meio do conhecimento de seus padrões fisiológicos, morfológicos e genéticos e, assim, também auxilia no processo de identificação da espécie (Frutos *et al.*, 1994). A análise dessas várias características fornece suporte para resolver questões geradas na identificação de espécies, assim como permite a separação filogenética de gêneros e espécies relacionadas (Sosa-Gómez *et al.*, 1998).

Na década de 60 os marcadores utilizados na genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral, fenótipos de fácil identificação visual. Os marcadores morfológicos contribuíram para o desenvolvimento teórico da análise gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. No entanto, foram identificados poucos marcadores ligados a genes de importância econômica. Com isso, limitava o seu emprego e assim, a disponibilidade era essencialmente restrita às poucas espécies. A revolução neste aspecto iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, que ampliou o número de marcadores genéticos e a aplicabilidade incluiu todas as espécies. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético de DNA, como a utilização de enzimas de restrição que permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (RFLP). Na década de 80, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR) (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Griffiths *et al.*, 1998).

A técnica de PCR foi desenvolvida por Kary Mullis no início da década de 1980 (Mullis e Fallona, 1987), tendo-lhe sido posteriormente atribuído o Prêmio Nobel da Química, pois foi um dos passos revolucionários na genética molecular onde, tornou-se possível a produção de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA (Alberts *et al.*, 1994). Em 1989, a Hoffman La Roche e Perkin-Elmer Corporation patentearam este processo. O método PCR é usado habitualmente nos laboratórios de investigação médica e biológica para uma variedade de tarefas, como a detecção de doenças hereditárias, a identificação de "impressões digitais" genéticas, a construção de árvores filogenéticas, a clonagem de genes, a identificação de genes específicos e testes de paternidade.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método *in vitro* no qual seqüências de DNA ou RNA são rapidamente amplificados com alta especificidade e fidelidade usando oligonucleotídeos iniciadores em suas extremidades 3' onde há seqüências complementares que direcionam a polimerase na síntese, e também são necessários o tampão 10X com cofator Cloreto de magnésio, os dNTPs (G, C, A, T) livres para a complementação da fita de DNA e a enzima *Taq*DNA polimerase em uma simples reação automatizada que permite a formação de duas fitas de DNA (Alberts *et al.*, 1994; Ferreira, 1996). O método PCR pode ter início com uma quantidade muito pequena de DNA original, ou seja, nanogramas ou mesmo picogramas de amostra.

A PCR é hoje empregada em diversas áreas, desde a biologia molecular básica à estudos da medicina forense, fitopatologia, microbiologia, entomologia e outras. Esta técnica envolve três etapas essenciais: (a) desnaturação do DNA alvo; (b) anelamento de dois oligonucleotídeos iniciadores às fitas de DNA; e (c) extensão dos iniciadores por ação da enzima termoestável *Taq* DNA polimerase. Novas fitas de DNA são sintetizadas e servem como moldes para amplificações subsequentes às três etapas que se repetem sucessivamente até o fim do programa. O processo é possível devido à disponibilidade de termocicladores, onde programa-se tempo e temperatura para os determinados ciclos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

De acordo com White *et al.* (1989) citado por Ferreira (2003) a sensibilidade, rapidez e versatilidade da técnica de PCR tem apresentado um grande impacto sobre a biologia molecular, expandindo diversas áreas que antigamente eram inatingíveis, devido a carência de um método com as vantagens do PCR. Estes pesquisadores acrescentam que em virtude da capacidade de adicionar, deletar ou alterar as informações dos iniciadores feitos

na PCR, este método é ideal para introduzir mutações específicas em posições escolhidas em um fragmento de DNA, facilitando o estudo das interações entre proteínas e DNA.

A especificidade do método é conferida pela seqüência dos iniciadores que se anelam às regiões específicas no genoma e definem a região alvo a ser amplificada. A grande vantagem dessa técnica é a pequena quantidade de DNA necessária para a reação (dezenas de nanogramas). A parte limitante da técnica é que não pode haver contaminação no DNA pois a técnica é muito sensível e há necessidade de se conhecer a seqüência que flanqueia determinado segmento a ser amplificado para que os iniciadores possam ser construídos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Então, para resolver essa problemática desenvolveu-se o marcador molecular RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) que utiliza iniciadores curtos de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação.

Além do RAPD, existem outros marcadores baseados em PCR com diferentes estratégias, tais como: amplificações e comparações entre seqüências de regiões dos genes de rRNA (Amako *et al.*, 1996); análise de restrição dos produtos gerados por PCR (Matioli e Brito, 1995) e, geração de iniciadores específicos a partir de seqüências de regiões do rDNA (Pashley e Ke, 1992), MtDNA (Levy *et al.*, 2002), elementos repetitivos ou fragmentos gerados por RAPD (Léry *et al.*, 2003).

2.7.1. Marcador Molecular

Marcadores moleculares são fragmentos de DNA que podem ser usados para diferenciar um indivíduo do outro, ou seja, todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, correspondente a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira e

Grattapaglia, 1995). Isto é devido à variação genética natural e a existência de várias seqüências de DNA polimórficas entre os indivíduos. Os marcadores procuram explorar esta variação para identificação com bases nessas diferenças (Buso, 2006).

A formação genética dos organismos contém milhares de genes e regiões entre genes, com função desconhecida. As variações, ou polimorfismos, na seqüência do DNA, nos genes ou na região intergênica, podem ser detectadas usando-se uma variedade de técnicas. Para que as técnicas sejam utilizadas apropriadamente na resolução de problemas genéticos, as duas áreas têm que ser abrangidas e conhecidas (Griffiths *et al.*, 1998).

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade no DNA e, assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetição. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, hibridação e amplificação, conforme a metodologia utilizada para identificá-los (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A demanda por desenvolvimento e utilização dos marcadores moleculares é crescente e as técnicas são dinâmicas. No entanto, a escolha do método mais adequado depende principalmente da definição do problema a ser resolvido, pois para cada tipo de informação desejada existe uma técnica.

2.7.2. Métodos Moleculares de Caracterização

O poder da reação de cadeia da polimerase (PCR) em estudos de insetos é reconhecido a partir da análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (RFLP), pois em oposição a esse, necessita somente de uma pequena quantidade

de DNA o qual pode parcialmente, ser degradado, e ainda, as pequenas partes de um inseto são suficientes para produção de um diagnóstico de fragmentos padrão (Kambhampati *et al.*, 1992).

As análises de RAPD apresentam algumas vantagens sobre a escolha das técnicas de DNA mitocondrial ou microssatélites que usam iniciadores específicos (Harry *et al.*, 1998). Devido ao uso de iniciadores curtos e de basear-se na amplificação de DNA, as análises de RAPD não requerem um conhecimento prévio do genoma, trabalham com DNA de diferentes espécies e geralmente, amplificam multilocus que aparecem como um código de barras após eletroforese em gel. Na prática, não apresentam limites de números de diferentes iniciadores arbitrários que podem ser usados e são facilmente obtidos. Segundo o trabalho de Charpentier *et al.* (2002) no qual foram usados iniciadores de RAPD para caracterizar 11 linhagens de insetos de várias espécies e para autenticar 4 independentes linhagens do besouro da batata do Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, que foram antes desenvolvidos em laboratório.

As principais vantagens do uso dos marcadores moleculares baseados em DNA são as análises de um grande número de *locus*, a neutralidade em relação a efeitos fenotípicos, a co-dominância com maior quantidade de informação genética por *locus* e a caracterização do genótipo de um indivíduo a partir de amostras de células ou tecidos.

2.7.2.1. RAPD

O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foi desenvolvido independentemente por Williams *et al.* (1990), que patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso e descreveram a

técnica no contexto da análise mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento; e por Welsh e McClelland (1990), que propuseram a denominação de AP-PCR (Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction), sendo este interessante, pois o oligonucleotídeo possui seqüência arbitrária, mas a amplificação não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos no genoma.

O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) utiliza iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade de conhecimento prévio da seqüência, como no caso do PCR. O resultado dessa amplificação é essencialmente a geração de impressões digitais genômicas simples e reprodutíveis para a identificação de linhagens por eletroforese em gel (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Ferreira, 2003).

A análise direta do polimorfismo permite avaliar a variação entre e dentre espécies. Os iniciadores oligonucleotídeos deste marcador têm geralmente 10 nucleotídeos com mais de 50% de G ou C, envolve a amplificação simultânea de vários *loci* anônimos no genoma utilizando diversos princípios de seqüência arbitrária, sendo usado por reação um único iniciador (Ferreira, 1996; Ferreira, 2003). É um marcador molecular sensível, rápido, relativamente simples, onde polimorfismo genético tem natureza binária, portanto, é evidenciado quando há presença ou ausência de bandas após amplificação e eletroforese em gel, porém não é possível saber se o indivíduo é heterozigoto ou homozigoto (Grattapaglia e Ferreira, 1995; Matioli *et al.*, 2001).

O RAPD apesar de usar uma pequena quantidade (dezenas de nanogramas) de DNA, exige um DNA íntegro e também apresenta como grande vantagem, ser usado para qualquer organismo, diferente de outras técnicas baseadas na PCR que produzam resultados satisfatórios utilizando-se DNA em pequenas quantidades e com algum grau de degradação

(Reis *et al.*, 1995). Este marcador, por se uma variação da técnica de PCR, a seqüência única reconhece o DNA alvo, sendo então flanqueado por duas cópias da seqüência do oligonucleotídeo. No entanto, no RAPD, ao contrário do PCR, utiliza-se um único iniciador, ao invés de um par. Este fragmento pode ser visualizado, na forma de banda em um gel de eletroforese, com brometo de etídio, e normalmente de agarose podendo também, de forma alternativa, ser em gel de poliacrilamida sendo visualizado por meio de coloração com nitrato de prata. O resultado é um conjunto de fragmentos amplificados de tamanhos diferentes de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Griffiths *et al.*, 1998).

As informações obtidas com o RAPD permitem estimar o grau de similaridade entre os indivíduos analisados, possibilitando a indicação de cruzamentos entre pares mais ou menos divergentes, conforme o objetivo desejado e também, a determinação das relações filogenéticas entre populações ou espécies. Também é possível detectar-se marcadores específicos para raça ou espécies, de uma maneira simples e rápida, permitindo o desenvolvimento de protocolos para identificação da procedência de amostras e indivíduos (Grattapaglia *et al.*, 1992).

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato de que estes se comportam como marcadores genéticos dominantes, isto é, uma interpretação relativa entre genótipo e fenótipo de um indivíduo, pois o poder de detecção de polimorfismo deste marcador é uma vantagem para a análise da variabilidade genética. E o mapeamento genético em diversas espécies indica que os *loci* de marcadores RAPD estão distribuídos ao acaso ao longo do genoma, sem evidências de agrupamento de marcadores em regiões específicas (Grattapaglia e Ferreira, 1995).

Entre outras vantagens, a técnica de RAPD não requer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse. Um conjunto de

oligonucleotídeos arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo e usa-se um número bem menor de reagentes. Portanto, é eliminada a necessidade de isótopos radioativos ou marcação não-radioativa. Sendo assim, o custo desta técnica é mais baixo do que outras, tais como, RFLP (Anamalai *et al.*, 1995; Grattapaglia e Ferreira, 1998). A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por *loci*, pois apenas um alelo é detectado, no segmento que é amplificado.

Utilizando a técnica de RAPD, por exemplo, Martinelli *et al.* (2006) avaliaram a variabilidade genética de *S. frugiperda* em culturas de milho e algodão de uma mesma região no Brasil; Monnerat *et al.* (2006) analisaram a variabilidade genética de populações de *S. frugiperda* da América Latina e demonstraram que aquela está associada com variações em suscetibilidade de toxinas Cry de *B. thuringiensis*; Sosa-Gómez (2004) analisou a variação intraespecífica e a estrutura da população da *Anticarsia gemmatalis* em populações do Sul e Centro-Oeste do Brasil, Flórida-USA e La Virginia-Argentina; Léry *et al.* (2003), usando essa técnica caracterizaram 11 linhagens celulares de insetos sendo seis lepidóptera, um díptera e quatro coleoptera e viram que os perfis eletroforéticos apresentaram diferenças entre as espécies; Tsai *et al.* (2003) caracterizaram microsporos isolados de cinco insetos pragas lepidóptera comuns em Taiwan usando as técnicas Western-blot e RAPD; Lima *et al.* (2002) avaliaram a diversidade genética de *Bemisia tabaci* em populações do Brasil revelado por marcadores RAPD; Abe *et al.* (1998) investigaram a associação genética entre cinco marcadores RAPD e o gene *nsd-1* no bicho da seda (*Bombyx mori*).

O RAPD reúne a simplicidade técnica da visualização direta dos marcadores isoenzimáticos com o poder de resolução dos marcadores de DNA. Experimentos típicos de programas de melhoramento, análises de diversidade genética em populações naturais e

caracterização de bancos germoplasma envolvem tipicamente centenas de indivíduos. Assim, a técnica de RAPD é uma das poucas ferramentas disponíveis que efetivamente permite a análise da variabilidade genética detalhada para um grande número de marcadores (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

2.7.2.2. DNA mitocondrial

A técnica utilizando marcadores moleculares baseados no DNA mitocondrial (MtDNA) pode ser utilizada no estudo de filogenia e de diversidade, tendo como vantagem a pouca variação e a baixa taxa de mutação em algumas de suas seqüências e a capacidade de resistir a degradação por agentes externos. Essa técnica tem sido muito usada como marcadores moleculares para caracterização e estudos de diversidade genética em diversos organismos, tais como, fungos, ácaros, protozoários e alguns insetos.

O DNA mitocondrial é uma região conservada que não faz parte do genoma nuclear, tem um formato circular, cópia única, contém adenina e Timina (A+T) em abundância, sendo Timina em maior quantidade e apresenta regiões gênicas conhecidas, tais como, Citocromo oxidase I (COI), Citocromo oxidase II (COII), Citocromo oxidase III (COIII), NADH e outras. A região NADH-DH é uma região muito conservada e responsável pela síntese de ATP, foi seqüenciada por Ke e Pashley (1992), mas não foi desenvolvido um marcador usando essa região. O tamanho do mtDNA de *S. frugiperda* foi estimado em 16,3 kb por Ke e Pashley (1992). No entanto, Lu e Adang (1996) estimaram um tamanho um pouco menor de 14,8 kb para a mesma espécie.

Goddard e Wolstenholme (1978) estudaram a origem e a direção da replicação de moléculas de mtDNA de *Drosophila melanogaster*. Lansman *et al.* (1983) fizeram um teste

experimental crítico da possibilidade de vazamentos paternos de DNA mitocondrial em duas espécies de insetos lepidópteros do gênero *Heliothis*; Lu e Adang (1996) distinguiram as raças da lagarta-militar (Lepidoptera:Noctuidae) usando como diagnóstico o marcador DNA mitocondrial; Ferreira *et al.*(1996) avaliaram o isolamento de uma sequência específica do MtDNA de cinco isolados de *Tilletia indica* para identificação deste fungo; Levy *et al.* (2002) avaliaram a identificação de raças de *S. frugiperda* usando COI PCR-RFLP como teste de diagnóstico; Prowell *et al.*(2004) avaliaram a análise genética multilocus das raças da lagarta militar em diferentes plantas-hospedeiras de gramíneas utilizando mtDNA e AFLP; Navia *et al.*(2005) avaliaram a fonte da origem e da invasão do ácaro do coco (*Aceria guerreronis*) deduzida pela região 16S do MtDNA; De Barro *et al.*(2005) compararam as relações filogenéticas entre os genótipos de *B. tabaci* utilizando dados de sequências das regiões ITS1 e COI.

De acordo com os autores Lu e Adang (1996), Levy *et al.* (2002), Prowell *et al.*(2004) o marcador MtDNA pode ser utilizado como ferramenta de diagnóstico para identificação das raças da lagarta *S. frugiperda* em diferentes plantas-hospedeiras.

2.7.3. Marcador Molecular x Controle Biológico

As técnicas moleculares tornaram-se ferramentas importantes no estudo genético de populações naturais de vários organismos, visando à caracterização e a identificação destes, e, portanto, sendo possível a análise da deriva genética, o efeito gargalo na população e a dinâmica da população no meio onde se encontra. Sendo assim, os marcadores moleculares só tendem a somar aos estudos do controle biológico de diversos insetos-pragas fornecendo maiores informações para uma melhor eficiência no controle das pragas.

HIPÓTESE

Marcadores moleculares baseados em DNA podem ser usados na separação das populações de *S. frugiperda* do biótipo milho de diferentes culturas e localidades.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar a variabilidade genética entre populações de *S. frugiperda* de ocorrência em diferentes regiões do Brasil nas culturas de milho e algodão por meio de marcadores moleculares.

Objetivos específicos

1. Analisar a variabilidade genética de populações de *S. frugiperda* na cultura do milho e do algodão por meio de marcadores RAPD.
2. Diferenciar as populações de *S. frugiperda* coletadas em milho e algodão por meio de marcador de mtDNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, H.; Harada, T; Kanehara, M.; Shimada, T; Ohbayashi, F.; Oshiki, T. Genetic mapping of RAPD markers linked to the denonucleosis refractoriness gene, *nsd-1*, in the silkworm, *Bombyx mori*. **Genes Genet. Syst.**, v. 73, p. 237-242, 1998.

Abimilho – Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de Milho. **Milho: o cereal que enriquece a alimentação humana**. Publicado em: dezembro/2002. Disponível em: <http://www.ABIMILHO.com.br>, acesso em: 13/04/2005.

Aguillera, L. A.; Bottan, A. J. **Avaliação de inseticidas para o controle da lagarta-*Spodoptera (Spodoptera spp.) no algodoeiro***. Cooperfibra – Cooperativa dos cotonicultores de Campo Verde, Departamento Técnico, Campo Verde, MT, Setembro, 2005.

Agusti, N.; de Vicente, M. C.; Gabarra, R. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. **Insect Mol. Biol.**, Barcelona, Jun., v. 9, n. 3, p. 263-268, 2000.

Alberts, B. D.; Bray, J.; Lewis, M.; Ralf, K. R. e Watson, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3ed. New York, Garland Publishing, 1294 p. 1994.

Alessi, M. O.; Raupp, D. S.; Gardingo, J. R. **Caracterização do processamento da farinha de milho biju para o aproveitamento dos subprodutos.** Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa, 9 (2): 31-39, ago. 2003.

Alves, S. B.; Zucchi, R. A.; Vendramim, J. D. **Pragas do milho, arroz, trigo e sorgo. In: Curso de entomologia aplicada à agricultura.** Piracicaba: FEALQ, p.273-310, 1992.

Amako, D.; Kwon, O. Y.; Ishikawa, H. Nucleotide sequence and presumed secondary structure of the 28S rRNA of pea aphid: implication for diversification of insect rRNA. **J. Mol. Evol.**, V. 43, p. 489-475, 1996.

Anamalai, P.; Ishii, H.; Lalithakumari, D.; Revathi. R. Polymerase chain reaction and its applications in fungal disease diagnosis. **J. Plant Dis. And Protect.** 102 (1): 91-104, 1995.

Annebelli, M. B. Necessidade de alertar e educar aos agricultores sobre os impactos dos agrotóxicos no meio ambiente. sugestões de medidas mitigadoras a serem adotadas. **III Simpósio Nacional de Geografia Agrária – II Simpósio Internacional de Geografia Agrária – UFPR**, Jornada Ariovaldo Umbelino de Oliveira – Presidente Prudente, novembro, 2005.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br, acesso em 10/03/2007.

Barbosa, M. Z. Análises e Indicadores do Agronegócio. V.1, n.5, maio/2006 Instituto de Economia Agrícola. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br>, acesso em 30/01/07.

Barros, R. G.; Albernaz, K. C.; Takatsuka, F. S.; Czepak, C.; Fernandes, P. M.; Tofoli, G. R. Eficiência de inseticidas no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, n.35 (3): 179-182, 2005.

Beltrão, N. E. de M. **Breve História do Algodão no Nordeste do Brasil**. Documento 117, ISSN 0103-0205, n.117, 22p. Campina Grande, PB: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, 2003.

Bento, J. M. S. Perdas por insetos na agricultura. **Ação Ambiental II**, v. 4, p. 19-21, 1999.

Busato, G. R., Grützmacher, A. D., Garcia, M. S., Giolo, F. P., Martins, A. F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, nas culturas do milho e arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.31, p.525-529, 2002.

Busato, G. R.; Grützmacher, A. D.; Oliveira, A.C.; Vieira, E.A.; Zimmer, P.D.; Kopp, M. M.; Bandeira, J.M.; Magalhães, T. R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas as culturas de milho e arroz do Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.33, p.709-716, 2004 (a).

Busato, G. R.; Grützmacher, A. D.; Garcia, M. S.; Giolo, F. B.; Nörnberg, S. D. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda*(J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas temperaturas **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1278-1283, nov./dez., 2004 (b).

Busato, G. R., Grützmacher, A. D., Garcia, M. S., Giolo, F. P., Zotti, M. J.; Stefanello-Júnior, G. J. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, Pelotas, RS, v.34, n.5, p.743-750, 2005.

Buso, G. S. C. Marcadores moleculares: segurança e precisão para o melhoramento genético de plantas. **GeneBio – Informativo da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, anoVIII, n.13, p. 3, Brasília, ago/nov., 2006.

Campos, R. S. Le monde Diplomatique setembro 2003. Disponível em: <http://diplo.uol.com.br/2003-09,a730>, acesso em 30/01/07.

Caprio, M. A.; Tabashnik, B. E. Genes flow accelerates local adaptation amongs finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p.611-620, 1992.

Carneiro, A. A.; Gomes, E. A.; Nonato, L. F. V.; Britto, W. M. A.; Fernandes, F. T.; Carneiro, N. P.; Guimarães, C. T.; Cruz, I. **Caracterização Molecular de Fungos**

Entomopatogênicos Utilizados no Controle Biológico de Pragas do Milho – *Beauveria bassiana* versus *Spodoptera frugiperda*. Mapa - Embrapa, Comunicado Técnico 93, ISSN 0101-5605, Sete Lagoas, MG, Novembro, 2004.

Cave, R. D. Biology, ecology e use in pest management of *Telenomus remus*. **Bioc. News and inform.**, v.21, n.1, p.21-26, 2000.

Charpentier, G., Tian, L., Cossette, J., Léry, X., Belloncik, S.Characterization of cell lines developed from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). **In Vitro Cell. Develop. Biol. Animal** 38, p. 73–78, 2002.

CONAB Secretaria de Comércio Exterior (SECEX). Disponível em: www.conab.gov.br, acesso em 10/01/2001.

Cruz, I.; Turpin, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. **Pesq. Agrop. Bras.** Brasília, v.17, n.3, p.355-359, 1982.

Cruz, I. **Pragas da cultura do milho em condições de campo: métodos de controle e manuseio de defensivos.** Circular n. 10, Sete Lagoas - MG: Embrapa - CNPMS. 75p. 1986.

Cruz, I; Waquil, J. M.; Viana, P. A.; Valicente, F. H. **Pragas: diagnóstico e controle. In: Seja o doutor do seu milho.** Coelho, A. M. e França, G. E. de Arquivo do Agrônomo n.2 (2ª edição ampliada e totalmente modificada), Piracicaba: POTAFOS. p.10-14, 1995.

Cruz, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa.CNPMS, 45 p., Circular Técnica 21, 1995.

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, 71p., 1997.

Cruz, I.; Oliveira, A. C. Flutuação populacional do predador *Doru luteipes* Scudder em plantas de milho. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília, v.32, n. 4, p.363-368, 1997.

Cruz, I., Vianna, P. A., Waquil, J. M. **Manejo das pragas iniciais de milho: o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos**. Embrapa/CNPMS. Circular Técnica 31, p. 39. Sete Lagoas, 1999.

Cruz, I.; Figueiredo, M. de L. C.; Matoso, M. J. **Controle Biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 40p. 1999.

Cruz, I., A Lagarta do cartucho: enfrente o principal inimigo do milho. **Revista Cultivar**. n. 21, 68p 1999.

Cruz, I.; Viana, P. A. e Waquil, J. M. Embrapa milho e sorgo – Sistema de produção 1, 2000. <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/prvegetativa.htm>, acesso em 02/04/2005.

Cruz I.; Waquil, J. M.; Viiana, P. A.; Valicente, F.H. Pragas: diagnóstico e controle. **In: Seja o doutor do seu milho.** Coelho, A. M. e França, G. E. de Arquivo do Agrônomo n.2, 2 ed. ampliada e totalmente modificada, Piracicaba – SP: POTAFÓS, p.10-14, 1995.

Cruz, I. Utilização do baculovírus no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*. **In: Controle Biológico**, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v.3, p. 201-230, 2000.

Da Silva, M. C. M.; Brunetta, P.S. F.; Figueira, E. L. Z.; Magalhães, M. T. Q.; Oliveira, G. R.; Ramos, H. B.; Del Sarto, R. P.; Cruz, C. M.; Oliveira, R. S.; Cavalcanti, K. L.; Craveiro, K.; Barbosa, A. E. A. D.; Paes, N. S.; Rocha, L. T.; Teixeira, F.R.; Coutinho, M. V.; Grossi-de-sá, M. F. **Evolução *in vitro* : seleção de moléculas inseticidas para insetos-praga do algodoeiro.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1676-1340, n. 99, 22 p. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

Das, M.; Bhattacharya, S.; Pal, A. Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: a strategy for species-specific marker development in bamboo. **Ann. Bot.**, Londres, Abril, v. 95, n. 5, p. 835-841, 2005.

De Barro, P. J., Trueman, J. W. H. e Frtohlich, D. R. *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): the molecular genetic differentiation of *b. tabaci* populations around the world. **Bulletin of entomological research**, 95, 193-203, 2005.

Delano, M., C. Gondim, J. L. Belot, P. Silvie e N. Petit. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil**. Boletim Técnico 33, 3. ed. Coodetec/Cirad, Cascavel, PR. 120 p., 1999.

Degrande, P. E. **Guia prático de controle das pragas do algodoeiro**. Dourados, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 60 p. 1998.

Díaz, N.A.A. **El cultivo del algodón: apuntes basicos**. Nicaragua: UNA, 1993. 136 p.

Diez-Rodriguez, G. I. e Omoto, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotrop. Entomol**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

Duarte, J. O. Embrapa milho e sorgo – Sistema de Produção 1, 2000. <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>, acesso em 02/04/2005.

Edwards, M. L.; Mendoza, J. L. H.; Rubio, A. P.; Ochoa, J. M.; Gutiérrez, R. L.; Hamm, J. J. e Wiseman, B. R. Biological differences between Five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in México. **Fla. Entomol**. 82: 254-262.1999.

Embrapa Algodão – Sistema de Produção 2, 2003. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoCerrado/importancia.htm>, acesso em 01/09/2005.

Embrapa Algodão – Produtos/ Algodão/ Controle de Pragas e Plantas Daninhas, Schetino, C. B. 2007. Disponível em: www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/control_e_pragas.html, acesso em 01/02/2007.

Embrapa Milho e Sorgo – Sistema de Produção 1, Viana, P. A.; Cruz, I.; Waquil, J. M. Disponível em: www.cnpms.embrapa.br, acesso em 06/07/2005.

Farias, P. R. S.; Barbosa, J. C.; Busoli, A. C. Spatial Distribution of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), on Corn Crop ISSN 1519-566X, **Neotrop. Entomol.** v.30, n.4, Londrina, dez., 2001.

Ferreira, M. E e Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ª ed. Brasília: Embrapa – Cenargen, Documento 20, 220p. 1998.

Ferreira, M. A. S. V.; Tooley, P. W.; Hatziloukas, E.; Castro, C.; Schaad, N.W. Isolation of species-specific mitochondrial DNA sequence for identification of *Tilletia indica*, the karnal bunt of wheat fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.1, p.87-93, Jan., 1996.

Ferreira, M. A. S. V. **Desenvolvimento de um marcador molecular de DNA mitocondrial para identificação de *Tilletia indica* (Mitra).** Tese de Doutorado do Departamento de Biologia Celular, UnB – publicada 1996. Orientadores: Norman W. Schaad – USDA-ARS, Paul W. Tooley – USDA-ARS, Carlos Castro – CENARGEN/Embrapa.

Ferreira, M. A. J. da F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas.** Documentos, 1. ISSN: 0101-9805, Boa Vista: Embrapa Roraima, 63p., 2003.

Figueiredo, M. de L. C.; Cruz, I.; Della Lucia, T. M. C. Controle integrado de *Spodoptera frugiperda* (Smith e Abbott) utilizando-se o parasitóide *Telenomus remus* Nixon. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.34, n.11, p. 1975-82, 1999.

Food and Agriculture Organization (FAO) Glossary of Phytosanitary Terms: Reference Standard. Rome: Secretariat of the International Plant Protection Convention, 2007. Disponível em: www.fao.org, acesso em 20/01/2007.

Freire, E. C.; Morello, C. L. **Cultura do Algodoeiro no Goiás.** Circular Técnica 68, ISSN 0100-6460, n. 68, 29 p. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, Setembro, 2003.

Frutos, R.; Federici, B. A.; Revet, B. e Bergoin, M. Taxonomic studies of *Rickettsiella*, *Rickettsia*, and *Chlamydia* using genomic DNA. **J. Invertebr. Pathol.**, 63, p. 294-300, 1994.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R. P. L., Batista, G. C., Berti Filho, E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S.B., Vendramim, J.D. **Manual de entomologia agrícola.** 2.ed., p.649. São Paulo: Ceres, 1988.

Gallo, D. (*in memoriam*); Nakano, O.; Neto, S.S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C.; Filho, E. B.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B.; Vendramim, J. D.; Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S.; Omoto, C. **Entomologia Agrícola**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v.10, Piracicaba: FEALQ, 920p. 2002.

Garcia, L. A.; Werlang, R. C.; Santos, J. G. M. dos. Avaliação de eficiência de inseticidas para o controle de *Spodoptera eridania* na cultura do algodoeiro. **In: Anais do Congresso Brasileiro de Algodão**, 5, Salvador, 2005.

Grattapaglia, D. e Ferreira, M. E. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análises genéticas**. Ed. Embrapa, p.38-53, Brasília: DF, 1995.

Grattapaglia, D. e Sederoff, R. R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*, using a pseudo-testcross strategy and markers RAPD. **Genetics**, v.137, p.1121-1137, 1994.

Grattapaglia, D.; O'malley, D.; Sederoff, R. Multiple applications of RAPD markers to genetic analysis in *Eucalyptus* sp. **Proc. Of the IUFRO Conference "Breeding Tropical Trees"**, Section 2.02-08, Cartagena and Cali, Colombia, 1992.

Griffiths, A. J. F.; Miller, J. H. ; Suzuki, D. T.; Lewontin, R. C. e Gelbart, W. M. **Introdução à Genética**. Guanabara, 6^a.ed., p.503.Rio de Janeiro – RJ, 1998.

Goddard, J. M. and Wolstenholme, D. R. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 8, p. 3886-3890, Ago., 1978.

Godoy, R.C.B. Milho: contexto mundial. Publicado em: 06/setembro/2002. Disponível em: <http://www.pr.gov.br/seab/servico.html>, acesso em: 01/05/2005.

Guimarães, L. Produção de etanol nos EUA. Disponível em: <http://g1.globo.com/Noticias/0,,MUL3660-5600,00.html>, acesso em: 10/02/2007.

Grützmacher, A. D.; Nakano, O.; Martins, J. F. da S.; Loeck, A. E.; Grützmacher, D. D. Consumo foliar de cultivares de arroz irrigado por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 28, n.3, p.519-525, Set., 1999.

Habib, M. E. M.; Andrade, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. **In: Controle Microbiano de insetos**. Ed. Alves, S. B., FEALQ, Piracicaba, SP, p.383-446, 1998.

Harry, M., Robin, S., Lachaise, D., L'utilisation de marqueurs génetiques polymorphes (RAPDs) en entomologie évolutive et appliquée. **Ann. Soc. Entomol. Fr.** 34, 9-32, 1998.

Höfte, H.; Whiteley, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, 53 (2): 242-255, 1989.

IBGE - produção agrícola de 2006. Disponível em <http://www.ibge.org.br>, acesso em 03/01/2007.

Jugenheimer R W. **Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivos y producción de Semillas**. Ed. LIMUSA. p. 489 – 50, 1990.

Karam, D.; Melhorança, A. L. Embrapa Milho e Sorgo, Sistema de Produção 1, Plantas Daninhas, 2005. Disponível em: www.cnpms.embrapa.br , acesso em 06/07/2005.

Kambhampati, S., Black, W.C. IV, Rai, K.S. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. **J. Med. Entomol.** 29, p. 939–945, 1992.

Ke, L.D and Pashley, D. P. Characterization of fall armyworm mitochondrial DNA (Lepidoptera: Noctuidae). **Arch. Insect. Bio. Phisil.** 21, p. 263-269, 1992.

Kethidi, D. R.; Roden, D. B.; Ladd, T. R.; Krell, P. J.; Retnakaran, A.; Feng, Q. Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the Asian long-horned beetle, *Anoplophors glabripennis* (Motschulsky). **Arch Insect Biochem Physiol.**, Ontario, Canada, v. 52, n.4, p.193-204, Abr., 2003.

Lansman, R. A.; Avise, J. C.; Huettel, M. D. Critical experimental test of the possibility of “paternal leakage” of mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 1969-1971, Abr., 1983.

Levy, H. C.; Garcia-Maruniak, A.; Maruniak, J. E. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I gene. **Florida Entomologist**, v.85, n.1, p. 186- 190, Mar.2002.

Léry, X.; Larue, B.; Cossette, J.; Charpentier, G. Characterization and authentication of insect cell lines using RAPD markers. **Insect Bioc. And Mol. Bio.** v. 33, p. 1035-1041, 2003.

Lima, L. H. C.; Campos, L.; Moretzsohn, M. C.; Návia, D.; Oliveira, M. R. V. de. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. **Genet. Mol. Biol.**, v. 25, n. 2, p. 1415-1421, São Paulo, 2002.

Lu, Y. and Adang, M. J. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. **Florida Entomologist**, v. 79, n.1, p. 48-55, Mar.1996.

Lu, Y. J.; Kochert, G.D.; Isenhour, D.J. and Adang, M. J. Molecular characterization of a strain specific repeated DNA sequence in fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Molecular Biology**, n. 3. 123-130., 1994.

Matioli, S. R.; Brito, R. A. Obtaining genetic markers by using double stringency PCR with microsatellite and arbitrary primers. **BioTechniques**, v.19, p. 752-755, 1995.

Martinelli, S. e Omoto, C. **Resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas.** CORREIO, Bayer CropScience, Jan/Jun, 2004.

Martinelli, S.; Barata, R. M.; Zucchi, M. I.; Silva-Filho, M. C. e Omoto, C. Molecular Variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations Associated to Maize and Cotton Crops in Brazil. **J. Econ. Entomol. Entomological Society of America**, 99, n.2, p. 519-526, Abr., 2006.

Mello, I. S. e Azevedo, J. L. **Controle biológico.** V.3. 1 edição. São Paulo: Embrapa Meio Ambiente, 388p., 2000.

Merege, W. H. Milho (*Zea mays* L.) Disponível em: <http://www.agrobyte.com.br/milho.htm>, acesso em: 02/02/2007.

Méndez, W. A.; Valle, J.; Ibarra, J. E.; Cisneros, J.; Penagos, D. I.; Willians, T. Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. **Biological Control**, Orlando, v. 25, p.195-206, 2002.

Mitter, C.; Farrell, B. e Wiegmann, B. The phylogenetic study of adaptive zones: has phytophagy promoted insect diversification. **American Naturalist**.132: 107-128, 1988.

Mitchell, E.R e J.R. Mclaughlin. Supression of mating and oviposition by fall armyworm and mating by corn earworm in corn, using the air permeation technique. **J. Econ. Entomol.** 75: 270-274, 1982.

Monnerat, R. G.; Bravo, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. **In: Controle Biológico**, eds. Melo, I. S. e Azevedo, J. L., Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p.163-200, 2000.

Monnerat, R. G.; Martins, E.; Queiroz, P.; Ordúz, S.; Jaramillo, G.; Benintende, G.; Gozzi, J.; Real, M. D.; Martinez-Ramirez, A.; Rausell, C.; Cerón, J.; Ibarra, J. E.; Rincon-Castro, C. D.; Espinoza, A. M.; Meza-Basso, L.; Gabrera, L.; Sánchez, J.; Soberon, M.; Bravo, A. Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. **Applied and Environmental microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7029-7035, Nov., 2006.

Montesbravo, E. P. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith em milho. 2001 Disponível em: <http://www.codegea.edoags.gov.mx/~produce/spodopte.htm> , acesso em 26/01/05.

Mullis, K. B. e Fallona, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** 55: 335-350, 1987.

Navia, D.; Moraes, G. J. de; Roderick, G.; Navajas, M. The invasive coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. **Bulletin of Entomological Research**, 95, DOI: 10.1079/BER2005382, p.505-516, 2005.

Neves, O.da S; Junqueira, A.A.B. O algodão no Brasil. In: Neves, O. da S. et al. **Cultura e adubação do algodoeiro**. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, p. 55-116, 1965.

Ovejero, R. F. L. Diferentes métodos de controle da lagarta-do-cartucho-do-milho. Disponível em: www.portaldocampo.com.br/culturas/milho/panoramaartigos04.htm. Acesso em: 28/05/2001.

Papa, G. F. J. Silveira e G. Tomquelski. Efeito de novo inseticida (Avaunt 150), no controle da lagarta *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae), na cultura do algodão. p. 282-283. **In Anais Congresso Brasileiro de Algodão**, 2. Ribeirão Preto, SP. 719 p. 1999.

Pashley, D. P.; Johnson, S. J.; Sparks, A. N. Genetic populations structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Ann. Entomol. Society of America**, Columbus, v. 78, p. 756-762, 1985.

Pashley, D. P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): A sibling species complex? **Ann. Entomol. Soc. America** 79: 898-904. 1986.

Pashley, D. P. Quantitative genetics, development and physiological adaptation in host strains of the fall armyworm. **Evolution**, Lancaster, v. 42, p.93-102, 1988.

Pashley, D. P.; Hammond, A. M.; Hardy, T. N. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 85, p. 400-405, 1992.

Pashley, D. P.; Ke, L. D. Sequence evolution in mitochondrial ribosomal and nds-1 genes in Lepidoptera: implications for phylogenetic analyses. **Mol. Biol. Evol.**, v. 9, n.6, p.1061-1075, 1992.

Pashley, D. P. Causes of host-associated variation in insect herbivores: Na example from fall armyworm, p. 351-359. In K. C. Kim e B. A. McPheron (Eds.), **Evolution of insect pests: Patterns of variation**. John Wiley e Sons, 496 p., 1993.

Paula, J. M.; Batista Neto, O. A.; Peixoto, E. M.; Jacoby, G. L.; Fernandes, P. M. Avaliação de diferentes inseticidas e doses no controle de *Spodoptera frugiperda* em algodoeiro na região do Cerrado. **In: Anais do Congresso Brasileiro de Algodão**, 5, Salvador, 2005.

Praça, L. B. **Prospecção de estirpes brasileira de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera**. Dissertação de Mestrado da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB – publicada 118/2003. Orientadora: Rose Gomes Monnerat.

Praça, L. B.; Batista, A. C.; Martins, E. S.; Siqueira, C. B.; Dias, D. G. S.; Gomes, A. C. M. M.; Falcão, R.; Monnerat, R. G. Estirpes de *bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos

das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.39, n.1, p. 11-16, Brasília, jan., 2004.

Prowell, D. P.; McMichael, M.; Silvain, J.F. Multilocus Genetic Analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 5, p. 1034-1044, Set., 2004.

Queiroz, P. R.; Martins, E. S.; Monnerat, R. G.; Lima, L. H. C. **Análise da variabilidade genética de população de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 75, ISSN 1676-1340, n. 75, 18 p. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Abr., 2004.

Reis, R. A.; Schwert, D. P. e Ashworth, A.C._Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. **Environ. Entomol.** 24: 716-719, 1995.

Richetti, A.; Melo Filho, G.A. **Aspectos econômicos do algodoeiro. In: Algodão: tecnologia de produção.** Campo Grande: Embrapa Agropecuária Oeste; Campina Grande: Embrapa Algodão, p.13-34, 2001.

Rüegg, E. F. **Impacto dos agrotóxicos sobre meio ambiente, a saúde e a sociedade.** 2^a ed. São Paulo: Cone, p.51, 1991.

Santos, W. J. **Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro.** p. 181-226. In Algodão – Tecnologia de produção. Embrapa Agropecuária Oeste / Embrapa Algodão, Dourados, MT. 296 p., 2001.

Santos W. J. **Manejo integrado de pragas do algodoeiro.** p. 48-71. In Mato Grosso Autoeficiência – O algodão a caminho do sucesso. Boletim de Pesquisa 01, Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária do Mato Grosso, Rondonópolis, MT, p.107, 1997.

Schmidt, F. B. **Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura de milho.** Dissertação de Mestrado em Ciências – Área de concentração: Entomologia, ESALQ, Piracicaba, SP, maio, 2002.

Soares, J. L. **Dicionário etimológico e circunstanciado de Biologia.** Ed.Scipione, p.292, 1993.

Sosa-Gómez, D. R.; Tigano, M. S.; Arantes, O. M. N. Caracterização de entomopatógenos. **In: Controle Microbiano de Insetos**, ed. Alves, S. B., Piracicaba, SP, FEALQ, p. 731-763, 1998.

Sosa-Gómez, D. R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetic and Molecular Biology**, v. 27, n.3, p.378-384, 2004.

Sosa-Gomez, D. R.; Delpin, K. T.; Alvaro, M. R.; Almeida, A. M. R.; Hirose, E. Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euchistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, Londrina, V.33, p.179-187, 2004.

Sujii, E. R.; Pires, C. S. S.; Fontes, E.; Onoyama, F. F.; Pinheiro, E. M.; Portilho, T.; Schmidt, F. G. V. e Faria, M. R. **Metodologia para avaliação de impacto de inseticidas químicos e biológicos sobre a ocorrência de insetos pragas e inimigos naturais em plantas de algodão no Distrito Federal**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1676 – 1340, n. 45, 22 p. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

Tomquelski, G. V.; Martins, G. M. *Spodoptera frugiperda* a principal oponente do milho no Cerrado. **AGROLINKFITO**, Fundação Chapadão, nov., 2006.

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**, v. 83, p.51-59, 2003.

USDA. Disponível em: www.fas.usda.gov, acesso em 10/02/07.

Valicente, F. H.; Cruz, I. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus**. Sete Lagoas: Embrapa - CNPMS, 23p. Circular Técnica, 15, 1991.

Vans Huis, A. Integrated pest management in the small farmers maize crop in Nicaragua. Meded Landbou Whoge School Wageningen. P.1-6, **The Netherlands**. 221 pp., 1981.

Welsh, J.; McClelland, M. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.

Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. e Tingey, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, V.18, n.22, p.6531 - 6535, 1990.

Whitford, F.; Quinseberry, S. S.; Moelenbeck, D.J. Nutritional response by rice and corn fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains to dietary component substitution in artificial diets. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p.1491-1496, 1992.

White, T.J.; Arnheim, N.; Erlich, H.A. The polymerase chain reaction. Trends in Genetics, v.5, n.6, p.185-189, 1989. **In: Ferreira, M. A. J. da F. Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas.** Boa Vista: Embrapa Roraima, 63p. Documentos, 1. ISSN: 0101-9805, 2003.

Yu, S. J. Insecticide resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, p.84-91, 1991.

Yu, S. J. Detection and Biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n.3, p.675-682, 1992.

Yu, S. J.; Nguyen, S. N.; Abo-Elghar, G. E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.77, p.1-11, 2003.

Yu, S. J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p.135–142, 2006.

CAPÍTULO ÚNICO

**Análise da variabilidade genética por meio de marcadores RAPD e mtDNA de
populações de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)
em culturas de milho e algodão no Brasil**

RESUMO

A lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga e voraz que ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países. Uma importante ferramenta para melhorar as práticas de gerenciamento da praga e seu controle é a caracterização de diferenças genéticas entre populações. O objetivo desse trabalho foi analisar a variabilidade genética entre cinco populações de *S. frugiperda* de ocorrência em diferentes regiões do Brasil nas culturas de milho e algodão por meio de marcadores RAPD e diferenciar essas populações por meio de marcador do DNA mitocondrial. As amplificações do DNA das amostras de *S. frugiperda* utilizando 20 oligonucleotídeos nas cinco populações produziram um total de 752 loci de RAPD. O dendrograma UPGMA permitiu definir dois agrupamentos principais, o grupo das três populações de *S. frugiperda* na cultura do milho e o grupo das duas populações deste inseto-praga na cultura do algodão. Detectou-se um ramo separado da população de *S. frugiperda* na cultura de milho do México em relação ao milho do Brasil e um baixo grau de similaridade entre estes (6%). A análise por AMOVA revelou que a maior variabilidade genética (76,34%) foi originária de variações dentro das populações e que entre as populações foi de 23,66%. Mais de 35 fragmentos de DNA foram monomórficos para uma ou mais populações, e podem ser utilizados para diferenciação deste inseto-praga na cultura do milho e do algodão. A similaridade genética média entre as populações de *S. frugiperda* pelo índice de Jaccard foi de 0,375. A análise dos perfis eletroforéticos do DNA mitocondrial apresentou na região NADH-DH a presença de um fragmento de 600 pb para as populações de *S. frugiperda* na cultura do milho do Brasil e do México. No entanto nas populações oriundas das culturas do algodão do Sul e do Mato Grosso do Brasil não houve amplificação desse fragmento. Os resultados obtidos mostraram que há variabilidade genética entre as populações de *S. frugiperda* coletadas nas culturas do milho e do algodão de diferentes regiões do Brasil a partir dos marcadores RAPD, como também, foi possível diferenciar as populações desta praga nessas duas culturas por meio de marcadores de RAPD e mtDNA.

Palavras-chave: RAPD, mtDNA, variabilidade genética, *Spodoptera frugiperda*

CHAPTER SUMMARY

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous and voracious species that attacks several economically important cultures in many countries. An important tool to improve the pest management practices and its control is the characterization of genetic differences among populations. The objective of this work was to analyze the genetic variability among five populations of *S. frugiperda* that occurred in different regions of Brazil on the corn and cotton crops by RAPD markers and to differentiate these populations through the marker of mtDNA. The amplifications of the DNA from the *S. frugiperda* samples using 20 primers in 5 populations produced a total of 752 RAPD loci. The dendrogram UPGMA allowed the definition of two main groupings, the group of 3 populations of *S. frugiperda* on the corn culture and the group of 2 populations of this pest on the cotton culture. Notice, also, that a separate branch of the population of *S. frugiperda* is detected on the corn culture in Mexico compared to Brazil and a low level of similarity among this group (6%). The analysis by AMOVA revealed that the greatest genetic variability (76.34%) was derived from variations inside the populations and that among the populations it was 23.66%. More than 35 fragments were monomorphic to one or more populations, and they can be used to differentiate this pest on the corn and cotton culture. The regular genetic similarity among the populations of *S. frugiperda* by the index of Jaccard was 0.375. The analysis of the profiles of the mitochondrial DNA showed in the region NADH-DH the presence of a fragment of 600 bp for the populations of *S. frugiperda* on the corn culture in Brazil and Mexico. However, in the populations derived from cotton crops in the South and in Mato Grosso in Brazil there was no amplification in this fragment. The results obtained showed that there is genetic variability among the populations of *S. frugiperda* collected on the corn and cotton crops from different regions of Brazil by the RAPD markers, and it was also possible to differentiate the populations of this pest in these two cultures by the RAPD and mtDNA markers.

Key words: RAPD, mtDNA, genetic variability, *Spodoptera frugiperda*.

INTRODUÇÃO

A lagarta *Spodoptera. frugiperda* (J. E. Smith) é uma praga de elevada importância econômica em diversas culturas agrícolas em vários países do mundo (Gallo *et al.*, 2002; Méndez *et al.*, 2002). Por ser uma espécie polífaga que ataca severamente diversas culturas importantes (Gallo *et al.*, 2002), o que lhe permite uma variedade em sua dieta e, portanto, a grande capacidade de dispersão do adulto e a migração para outras culturas resultando uma alta taxa de movimento. Devido ao comportamento alimentar de polifagia, essa espécie vem atacando de forma voraz as culturas de milho, algodão e arroz, principalmente (Yu *et al.*, 2003). No entanto, há existência de duas raças deste inseto, a raça C que se alimenta de milho, sorgo e algodão e a raça R que foi encontrada alimentando-se de arroz, grama-seda (*Cynodon dactylon*) e outras gramíneas forrageiras (Pashley, 1993; Lu *et al.*, 1994). Essas raças de *S. frugiperda* já foram caracterizadas nos Estados Unidos da América, no Brasil e no México (Pashley, 1986; Pashley, 1993; Edwards *et al.*, 1999; Busato *et al.*, 2005).

A existência de raças de *S. frugiperda* tem fundamental importância, pois pode haver um comportamento diferenciado na suscetibilidade a inseticidas e na resistência de plantas aos biótipos (Busato *et al.*, 2005). As raças desta praga são morfologicamente idênticas, mas há diferenças significativas fisiológicas em cada um destes grupos de inseto com relação às taxas de desenvolvimento e ao peso de lagartas e pupas (Pashley, 1988; Whitford *et al.*, 1992).

O uso de inseticidas tem sido o principal método de controle empregado pelos agricultores no combate a lagarta-militar. Com o uso indiscriminado dos químicos, as

diferentes populações de *S. frugiperda* têm sofrido constantes pressões de seleção por inseticidas nos distintos sistemas agrícolas, o que possivelmente tem contribuído e acarretado o estabelecimento de populações resistentes a várias classes de inseticidas (Diez-Rodriguez e Omoto, 2001; Schmidt, 2002; Martinelli *et al.*, 2004; Yu, 2006).

Dentre os fatores que auxiliam no entendimento da evolução da resistência, estão os conhecimentos da estrutura genética e do fluxo gênico entre as populações desta praga. Deste modo, estudos que visam o entendimento da estrutura genética e do nível intra-específico de fluxo gênico entre populações de uma praga são essenciais para o delineamento de práticas de manejo com o objetivo de retardar a evolução da resistência a qualquer tática de controle de insetos (Caprio e Tabashnik, 1992).

Deste modo, a utilização indistinta dos pesticidas desequilibra todo o meio ambiente, as pragas, o homem, os animais domésticos e silvestres, a água, o solo, os alimentos, uma vez que podem deixar resíduos (Annebelli, 2005). Portanto, para evitar os problemas acarretados pelos agrotóxicos, torna-se imperativa a busca de medidas alternativas para o controle de pragas (Valicente e Cruz, 1991).

Atualmente, como agentes de controle biológico da lagarta *S. frugiperda* destacam-se os parasitóides: *Telenomus* sp. (Figueiredo *et al.*, 1999; Cave, 2000; Montesbravo, 2001), *Euplectrus plathypena* (Montesbravo, 2001), *Chelonus insularis* (Van Huis, 1981; Montesbravo, 2001), *Trichogramma* spp. (Cruz *et al.*, 1999; Gallo *et al.*, 2002), e o predador *Dorus luteipes* (Cruz e Oliveira, 1997; Cruz *et al.*, 1999; Ovejero, 2001). Os bioinseticidas também são utilizados no combate de *S. frugiperda*, tendo como princípio ativo os vários microrganismos entomopatógenos, no entanto, os mais propícios para as condições do Brasil são *Bacillus thuringiensis* Berliner, o vírus da poliedrose nuclear (VPN), *Nomurae rileyi* (Farlow) Smason e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. A

bactéria *B. thuringiensis* é comercializada em formulações encontradas no mercado são subespécie *Kurstaki* e *Aizawai* (Praça *et al.*, 2004).

Uma importante ferramenta para auxiliar as práticas de gerenciamento da praga e seu controle é conhecer o seu perfil genético, através da identificação de marcadores moleculares úteis na caracterização de populações naturais de insetos-pragas, bem como, de sua variabilidade genética e ainda, que possam ser usados para conhecer a dinâmica da população da praga no Brasil e no mundo.

Nos últimos anos, os avanços alcançados nesta área possibilitaram o emprego de um conjunto de técnicas que aumentaram significativamente o grau de resolução de estudos de taxonomia e ecologia de insetos. A caracterização de um organismo é possível através de um levantamento qualitativo e quantitativo de seus caracteres. Dessa forma, com a caracterização podem-se discriminar as diversas espécies de insetos por meio do conhecimento de seus padrões fisiológicos, morfológicos e genéticos e, ao mesmo tempo auxiliar no processo de identificação da espécie (Frutos *et al.*, 1994).

O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) utiliza iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade de conhecimento prévio de seqüências do organismo-alvo, como no caso da PCR. O resultado dessa amplificação é essencialmente a geração de impressões digitais genômicas simples e reprodutíveis por eletroforese em gel para a identificação de linhagens (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Ferreira, 2003). As informações obtidas com RAPD permitem estimar o grau de similaridade entre os indivíduos analisados, possibilitando a indicação de cruzamentos entre pares mais ou menos divergentes conforme o objetivo desejado e, também, a determinação das relações filogenéticas entre populações ou espécies. Além disso, é possível detectar-se marcadores específicos para raças ou espécies,

de uma maneira simples e rápida, permitindo o desenvolvimento de protocolos para identificação da procedência de amostras e indivíduos (Grattapaglia *et al.*, 1992).

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato de que estes se comportam como marcadores genéticos dominantes, isto é, uma interpretação relativa entre genótipo e fenótipo de um indivíduo, pois o poder de detecção de polimorfismo deste marcador é uma vantagem para a análise da variabilidade genética. O mapeamento genético em diversas espécies indica que os *loci* de marcadores RAPD estão distribuídos ao acaso ao longo do genoma, sem evidências de agrupamento de marcadores em regiões específicas (Grattapaglia e Ferreira, 1995).

A técnica utilizando marcadores moleculares baseados no DNA mitocondrial pode ser utilizada no estudo de filogenia e de diversidade, tendo como vantagem a pouca variação, a baixa taxa de mutação em algumas de suas seqüências e a capacidade de resistir a degradação por agentes externos. Essa técnica tem sido muito usada como marcadores moleculares para caracterização e estudos de diversidade genética em diversos organismos tais como fungos, ácaros, protozoários e alguns insetos.

De acordo com as observações de Lu e Adang (1996), Levy *et al.* (2002), Prowell *et al.* (2004) o marcador mtDNA pode ser utilizado como ferramenta de diagnóstico para identificação das raças da lagarta *S. frugiperda* em diferentes plantas-hospedeiras.

No presente trabalho, a técnica de RAPD foi utilizada com o objetivo de analisar a variabilidade genética entre populações de *S. frugiperda* por meio de RAPD e os marcadores baseados no mtDNA foram usados para a diferenciação de populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes culturas de milho e algodão no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas, do Controle Biológico, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, durante o período de março de 2005 a dezembro de 2006.

1. Obtenção dos insetos

Lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar foram coletados aleatoriamente de uma colônia mantida no laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Além disso, amostras de populações dessa lagarta em diferentes ínstares foram coletadas de diversas regiões produtoras de milho ou algodão no Brasil, sendo cedida uma população de *S. frugiperda* da cidade de Cuernavaca no México oriunda da plantação de milho (Tabela 3). Todos os trinta indivíduos de uma mesma população foram coletados em uma única data.

Tabela 3 - Populações de *S. frugiperda* utilizadas nos estudos com marcadores moleculares para avaliação de variabilidade genética.

Origem	Data de coleta	Planta Hospedeira
Cuernavaca-México*	2004	Milho
Criação de Insetos Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Brasília-DF	17/02/2005	Milho
Plantação em Planaltina-DF**	23/03/2005	Milho
Porto Alegre do Norte – MT	2005	Algodão
Londrina-PR	10/04/2006	Algodão

* Universidade Nacional Autónoma do México – UNAM

** Denominada: PADF

Após a coleta, todos os indivíduos foram mantidos em etanol 100% a -20 °C até o momento do uso.

2. Obtenção de DNA genômico

Para os estudos de caracterização molecular, 10 indivíduos de cada população, em diferentes ínstaes, foram utilizados. Empregou-se o protocolo de extração de DNA elaborado especificamente para essa finalidade (Queiroz *et al.*, 2004).

Submeteu-se um inseto inteiro à maceração com auxílio de bastão de vidro adaptado 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 mg.mL⁻¹), incubou-se por 30 min a 65 °C. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10000 xg 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 5 min a 10000 xg e a 4 °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 10000 xg por 10 min a 10 °C, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% e deixado sobre a bancada para secagem. O DNA foi então ressuspenso em TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) e armazenado a -20 °C. Então, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Hitachi U-2000, com três repetições no comprimento de onda de 260

nm. Para as análises de RAPD e mtDNA utilizou-se, portanto, o DNA diluído em 5X, 10X ou 20X em TE 0,1 X até obter-se a concentração de DNA de 20 ng. μL^{-1} .

3. Análise de RAPD

3.1. Reação de amplificação de RAPD

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 30 μL , contendo 5 μL de DNA genômico (20 ng). As condições de amplificação por reação RAPD foram as seguintes: 24,9 μL de água miliQ autoclavada, 3 μL de tampão 10 X (Tris-HCl 60 mM pH 8,8, KCl 500 mM e MgCl_2 20 mM, Amersham, Califórnia, EUA), 1,2 μL de oligonucleotídeo 10 μM de uma seqüência aleatória da Operon Technologies (Alameda, EUA) (Tabela 4), 0,6 μL de dNTP 10 mM, e 0,3 μL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Carlsbad – Califórnia, EUA) na concentração de 1 U/ μL . Além disso, para prevenir a evaporação foram acrescentadas duas gotas de óleo mineral ao final de cada reação. Todas as reações tiveram o controle negativo usando água miliQ autoclavada no lugar do DNA.

3.2. Iniciadores de RAPD usados nas análises moleculares

Para obtenção dos perfis eletroforéticos de marcadores moleculares das populações de insetos analisados nesse trabalho, foram utilizados vários oligonucleotídeos (Operon Technologies, Inc.) decâmeros de composição aleatória de nucleotídeos (Tabela 4).

Tabela 4 – Iniciadores de RAPD utilizados na determinação dos perfis eletroforéticos das diversas populações de insetos submetidas à análise molecular.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' → 3'
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-20	GTTGCGATCC
OPE-01	CCCAAGGTCC
OPE-03	CCAGATGCAC
OPE-07	AGATGCAGCC
OPE-08	TCACCACGGT
OPE-14	TGCGGCTGAG
OPE-15	ACGCACAACC
OPR-01	TGCGGGTCCT
OPR-02	CACAGCTGCC
OPR-03	ACACAGAGGG
OPR-04	CCCGTAGCAC
OPR-05	GACCTAGTGG
OPR-07	ACTGGCCTGA
OPR-10	CCATTCCCCA
OPR-14	CAGGATTCCC

3.3. Condições de amplificação

As ampliações de RAPD foram efetuadas em termociclador (PTC 100 MJ Research) programado para 45 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 95 °C. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1 min a 95 °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 e retornando para 4 °C.

4. Análise do mtDNA

4.1. Reação de amplificação do mtDNA

Aleatoriamente, algumas amostras de DNA de cada população, já extraídas e testadas nas reações de RAPD, foram usadas para a amplificação de uma região do mtDNA. Cada reação foi preparada em um volume final de 25 µL, contendo 18,6 µL de água miliQ autoclavada, 2,5 µL de tampão 10 X (Tris-HCl 60 mM pH 8,8, KCl 500 mM e MgCl₂ 20 mM, Amersham, Califórnia, EUA), 1,5 µL de cada iniciador 10 µM desenhado e testado (Tabela 5), 0,5 µL de dNTP's 10mM, e 0,4 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Carlsbad – Califórnia, EUA) na concentração de 1 U/µL. Para cada reação foram adicionados duas gotas de óleo mineral ao final. Todas as reações tiveram o controle negativo usando água miliQ autoclavada no lugar do DNA.

4.2. Iniciadores usados para amplificação do mtDNA

Para a obtenção do perfil eletroforético baseado no mtDNA dos diferentes indivíduos das cinco populações do inseto em estudo, foram desenhados manualmente e utilizados os oligonucleotídeos (F e R) para a amplificação esperada de 600 pb de uma região do gene NADH - desidrogenase do DNA mitocondrial (Tabela 5), conforme o seqüenciamento deste gene no trabalho de Pashley e Ke (1992).

Tabela 5 – Iniciadores utilizados para a amplificação da região do DNA mitocondrial que codifica o gene NADH - desidrogenase.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' → 3'
F (Foward)	CCCTCTTCTATACTCAATAT
R (Reverse)	CTTTATTGGAGCGTAAGGTTT

4.3. Condições de amplificação

As amplificações do mtDNA foram efetuadas em termociclador (PTC 100 MJ Research) programado para 35 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C e cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1 min a 92 °C, anelamento por 1 min a 47 °C e extensão por 1 min a 72 °C. Ao término dos ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C e retornando para 4 °C.

5. Obtenção de perfis eletroforéticos

Os produtos das ampliações de RAPD e mtDNA foram visualizados em géis de agarose a 1,5%, submetidos a eletroforese em tampão TBE 1X (Tris-borato 9 mM e EDTA 1 mM) por 4 horas a 150 V, posteriormente corado por 20 minutos em brometo de etídio ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), descorado por 30 minutos em água destilada, visualizados por um fotodocumentador (Stratagene Eagle Eye II – Still Vídeo System) sob luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 300 nm, fotografados e arquivados no mesmo sistema. Em todos os géis, marcadores de massa molecular (100 pb -DNA-Ladder – GIBCO, BPL) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados pela duas técnicas.

6. Análise dos dados de RAPD

As fotografias dos perfis de amplificação com os vários oligonucleotídeos foram usadas para a análise do polimorfismo dos indivíduos da população. Foi gerada, uma matriz de similaridade levando-se em consideração a relação entre indivíduo, iniciador e massas moleculares das bandas obtidas com um dado iniciador.

Utilizou-se como padrão o valor 1 para a presença de um marcador. Na ausência de marcador, atribuiu-se o valor 0. No caso de dúvida, o número 9 foi usado como padrão. Em seguida, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para a determinação das similaridades genéticas entre os indivíduos, utilizando-se o

programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 2.10 pc (Rohlf, 1993). A matriz de similaridade foi obtida por meio do coeficiente de Jaccard (Sneath e Sokal, 1973) e o agrupamento destes dados foi feito por UPGMA (Unweighted PairGroup Method Analysis) agrupando os indivíduos par a par e formando um dendrograma, utilizando-se o programa NTSYS versão 2.10 pc (Rohlf, 1993).

Em seguida, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação estatística da variabilidade genética nos diferentes níveis entre os indivíduos de cada população pela aplicação de algoritmos específicos pelo programa Arlequin versão 2000 (Schneider *et al.*, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise da Variabilidade Genética por meio do RAPD

Os iniciadores com potencial de uso para a análise da variabilidade genética das cinco populações de *S. frugiperda* foram escolhidos a partir dos perfis gerados com 27 oligonucleotídeos, sendo que 7 desses (OPA-05, OPA-15, OPA-17, OPA-20, OPE-01, OPE-15, OPR-05) não geraram perfis com marcadores polimórficos ou monomórficos para as populações deste inseto-praga.

As amplificações do DNA das amostras de *S. frugiperda* com os 20 oligonucleotídeos utilizados neste trabalho produziram um total de 752 *loci* de RAPD. Estes iniciadores foram selecionados, pois forneceram padrões de fragmentos consistentes e intensos. Os perfis eletroforéticos dos iniciadores das Figuras 11, 12, 13 e 14 mostraram

diferenças para cada população e, assim como os outros iniciadores, geraram fragmentos que variaram de 200 pb a 2100 pb.

O oligonucleotídeo OPA-04 (Figura 11) amplificou um fragmento específico para a população de *S. frugiperda* no milho do México (300 pb) e dois para as populações na cultura do milho do Brasil (480 pb e 830 pb), enquanto não houve um fragmento específico para as populações no algodão.

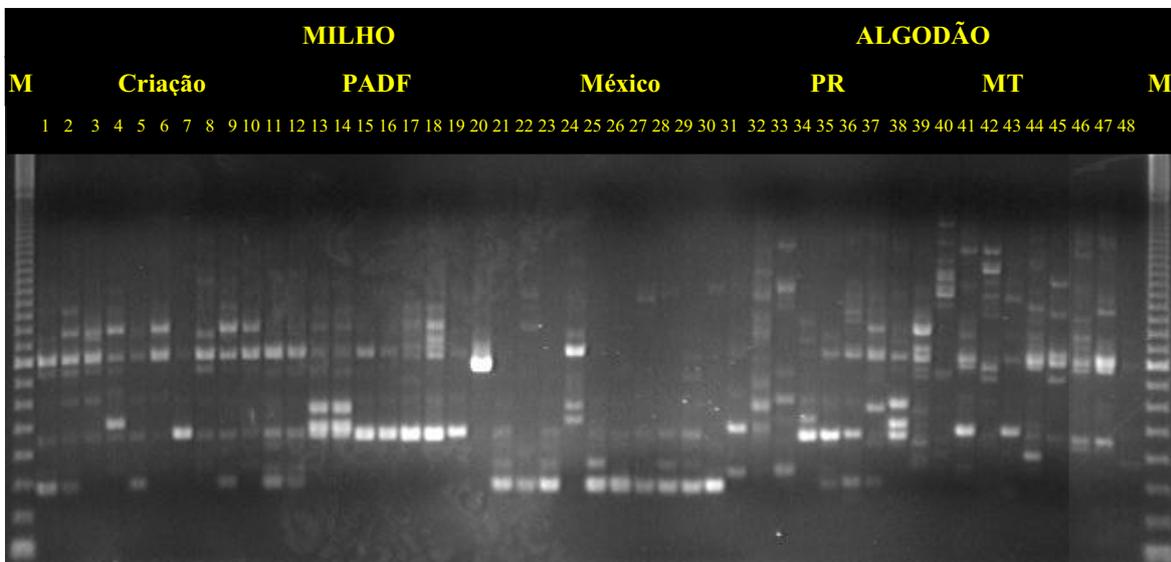


Figura 11: Perfil eletroforético de RAPD com o oligonucleotídeo OPA-04 em gel de agarose 1,5% das populações de *S. frugiperda* nas culturas do milho e algodão. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: números de 1 a 10 – Criação; 11 a 20 – PADF; 21 a 30 – México; 31 a 39 – Paraná e 40 a 48 – Mato Grosso.

Na figura 12, pode-se observar uma diferença entre os perfis eletroforéticos para cada uma das populações com o iniciador OPA-13, sendo que para as populações da lagarta-militar na cultura do milho tem-se o fragmento comum de 580 pb e para as populações brasileiras do milho, o fragmento de 750 pb.

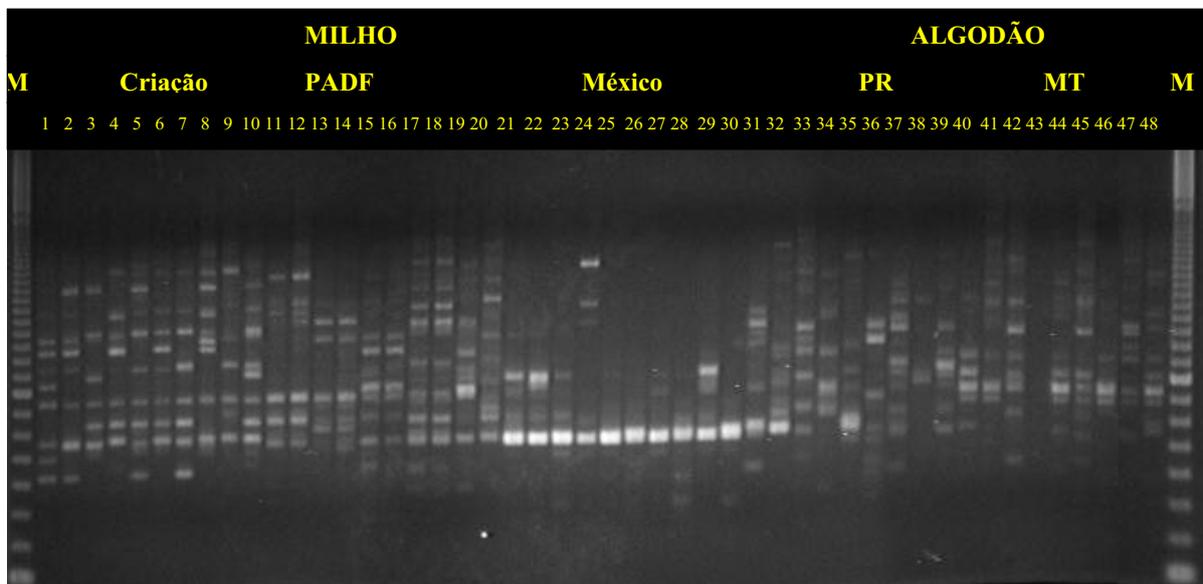


Figura 12: Perfil eletroforético do RAPD com o oligonucleotídeo OPA-13 em gel de agarose 1,5% em populações de *S. frugiperda* nas culturas do milho e algodão. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: números de 1 a 10 – Criação; 11 a 20 – PADF; 21 a 30 – México; 31 a 39 – Paraná e 40 a 48 – Mato Grosso.

Nos perfis de amplificação de RAPD com o oligonucleotídeo OPE-08 (Figura 13) observou-se um fragmento 630 pb comum para as populações de *S. frugiperda* no milho do Brasil mas não presente em todos os indivíduos e para alguns indivíduos das populações desta lagarta no algodão do PR e MT.

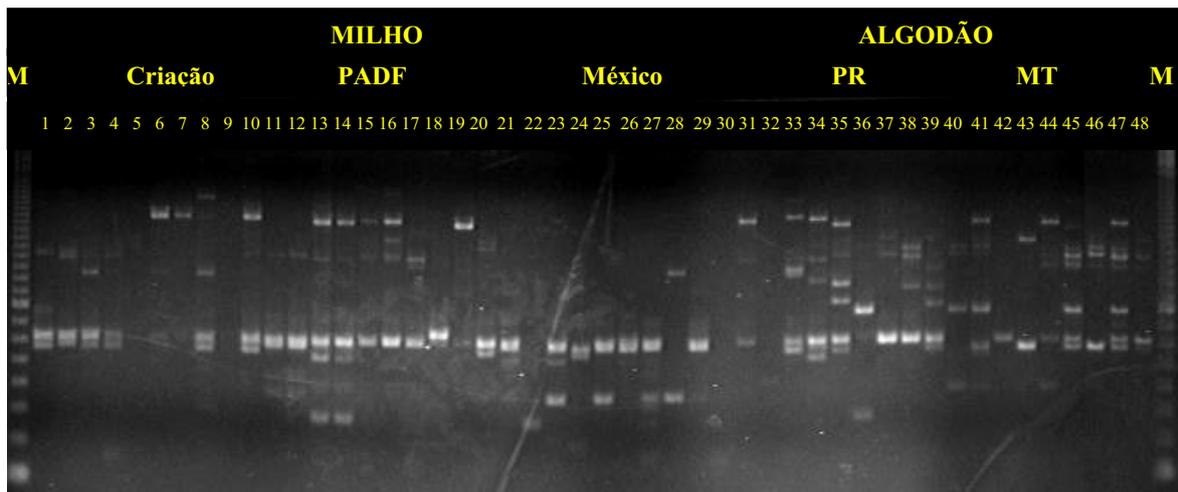


Figura 13: Perfil eletroforético do RAPD com o oligonucleotídeo OPE-08 em gel de agarose 1,5% em populações de *S. frugiperda* nas culturas do milho e algodão. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: números de 1 a 10 – Criação; 11 a 20 – PADF; 21 a 30 – México; 31 a 39 – Paraná e 40 a 48 – Mato Grosso.

Os perfis de amplificação de RAPD com o oligonucleotídeo OPR-04 (Figura 14) indicaram um fragmento de 680 pb comum para as populações de *S. frugiperda* no milho do PADF, México e algodão do PR, e ainda para os indivíduos 9 e 10 da população da Criação e os indivíduos 40 e 41 da população do MT.

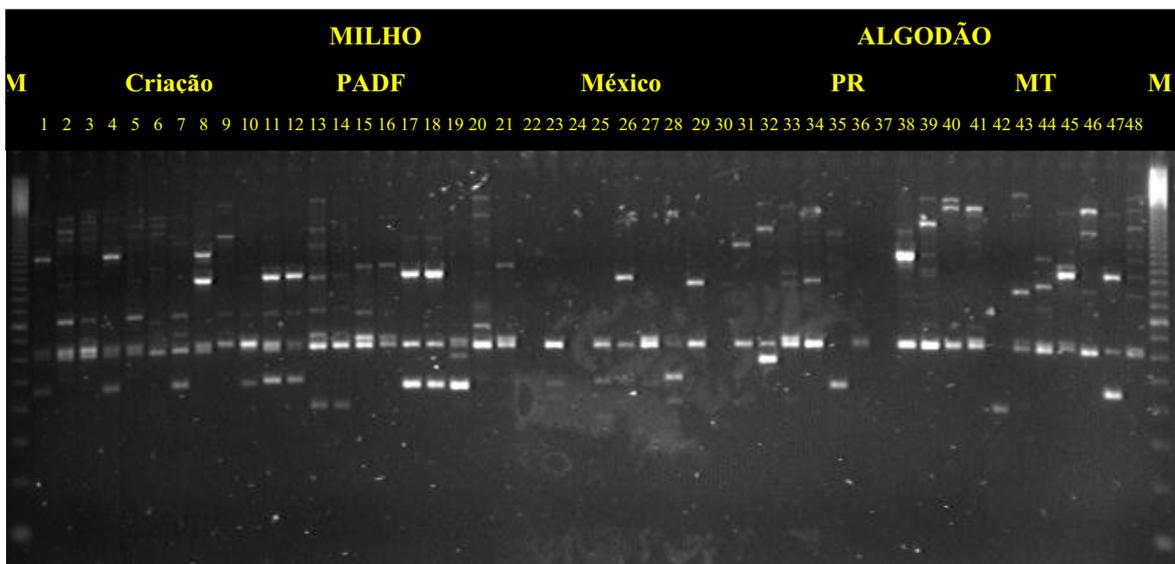


Figura 14: Perfil eletroforético do RAPD com o oligonucleotídeo OPR-04 em gel de agarose 1,5% em populações de *S. frugiperda* nas culturas do milho e algodão. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: números de 1 a 10 – Criação; 11 a 20 – PADF; 21 a 30 – México; 31 a 39 – Paraná e 40 a 48 – Mato Grosso.

Os oligonucleotídeos que forneceram os maiores números de *loci* totais e polimórficos foram OPR-01 e OPR-02, enquanto OPE-08 gerou o menor número (Tabela 6). Dentre os fragmentos de DNA amplificados houve polimorfismo em 100% dos fragmentos comparando-se as cinco populações independentes da cultura.

Tabela 6: Número de fragmentos de DNA polimórficos gerados pelo emprego dos oligonucleotídeos de RAPD.

Oligonucleotídeo	Quantidade de <i>loci</i> polimórficos
OPA – 01	35
OPA – 02	31
OPA – 03	45
OPA – 04	29
OPA – 07	35
OPA – 10	28
OPA – 11	30
OPA – 13	29
OPA – 14	31
OPE – 03	30
OPE – 07	52
OPE – 08	18
OPE – 14	40
OPR – 01	54
OPR – 02	58
OPR – 03	40
OPR – 04	44
OPR – 07	51
OPR – 10	47
OPR – 14	25
TOTAL	752

Analisando-se as populações separadamente é possível observar a presença de fragmentos de DNA (Tabela 7) que são monomórficos apenas para uma ou mais populações que foram estudadas. No entanto, não foi detectado nenhum marcador de RAPD comum a todas as populações utilizando esses vinte iniciadores. O OPA - 07 foi o

único oligonucleotídeo que não apresentou banda monomórfica para nenhuma das populações de *S. frugiperda*.

Tabela 7: Fragmentos de DNA monomórficos com potencial para a identificação de determinadas populações de *S. frugiperda* expresso por cada iniciador decâmico.

Iniciadores de RAPD	Tamanho do fragmento de DNA (pb)	População que pode ser identificada
OPA-01	820, 1150	milho PADF
	880, 1200	algodão MT e PR
OPA-02	480	milho Brasil (Criação e PADF)
	580	milho México
OPA-03	350, 550	milho México
	500	milho Criação
	400, 530, 1050	milho PADF
	450	milho PADF e México
	1000	milho Criação e Algodão PR
	1100	milho Criação
	580	Algodão MT
OPA-04	300	milho México
	480, 830	milho Brasil
	800	milho Criação e Algodão PR
OPA-10	480	milho PADF
	600	algodão PR
	750	milho Criação
OPA-11	440	milho México
OPA-13	580, 750	milho Brasil e México
OPA-14	550,1200	milho PADF
	600,	algodão MT
	750, 1150	milho Criação
	1250	algodão MT e PR
OPE-03	680, 1050	algodão PR
OPE-07	780	milho Brasil
OPE-08	630	milho PADF
OPR-02	430	milho México
OPR-03	450	milho Brasil

A importância do emprego da técnica de RAPD na análise molecular de espécies de insetos de interesse agrícola está relacionado com a identificação de fragmentos de RAPD que sejam específicos a uma população de um inseto. Uma vez identificados esses fragmentos, novos marcadores podem ser desenvolvidos e podem servir como marcadores para outras finalidades, como no trabalho de Agusti *et al.* (1999) que descreveram o desenvolvimento de marcadores SCAR para a detecção de *Helicoverpa armigera* (Hübner) no intestino de possíveis predadores como o *Dicyphus tamaninii* (Wagner). Observou-se que, mesmo após 4 h da ingestão dos ovos de *H. armigera*, foi possível detectar os vestígios desses insetos devido aos oligonucleotídeos desenhados a partir de um fragmento de 1200 pb resultante da amplificação por RAPD.

De acordo com os resultados da Tabela 7, as amplificações com o iniciador OPA-01 geraram fragmentos monomórficos de 820 pb e 1150 pb presentes em todos os indivíduos das populações de *S. frugiperda* no milho de Planaltina-DF (PADF), e 880 pb e 1200 pb para as populações de algodão do MT e PR. Com o oligonucleotídeo OPA-02 tem-se os fragmentos monomórficos 480 pb para as populações de milho do Brasil e 580 pb para a população de milho do México. Assim, analisando os fragmentos de DNA monomórficos para determinadas populações da Tabela 7 seria possível desenvolver marcadores do tipo SCAR, a partir de novos testes com essas bandas monomórficas, poderão ser feitos mais testes. As amplificações, nesse caso, seriam menos sensíveis às variações da PCR e ainda poderiam ser empregadas em outros estudos semelhantes aos de Agusti *et al.*(2000), Kethidi *et al.*(2003) e Das *et al.*(2005). Como observado a partir dos marcadores moleculares obtidos por RAPD, poderão ser desenvolvidos marcadores SCAR que poderão ser úteis para a identificação de determinadas populações de *S. frugiperda* em culturas do

milho e do algodão e assim acompanhar a dinâmica das populações desta praga ao longo do tempo.

O dendrograma UPGMA (Figura 15) obtido foi elaborado com os 752 marcadores gerados pelos vinte iniciadores, mas foram feitos outros três dendrogramas, com 5, 10 e 15 oligonucleotídeos, onde se verifica que a partir de dez iniciadores não houve variação entre os indivíduos dentro das populações de milho e algodão. A obtenção do dendrograma permitiu definir dois agrupamentos principais: no grupo A, estão as três populações de *S. frugiperda* na cultura do milho e, no grupo B, as duas populações na cultura do algodão, com apenas 5% de similaridade genética entre os grupos (Figura 15). Observou-se, portanto, uma clara separação entre as populações das duas culturas, do milho e do algodão.

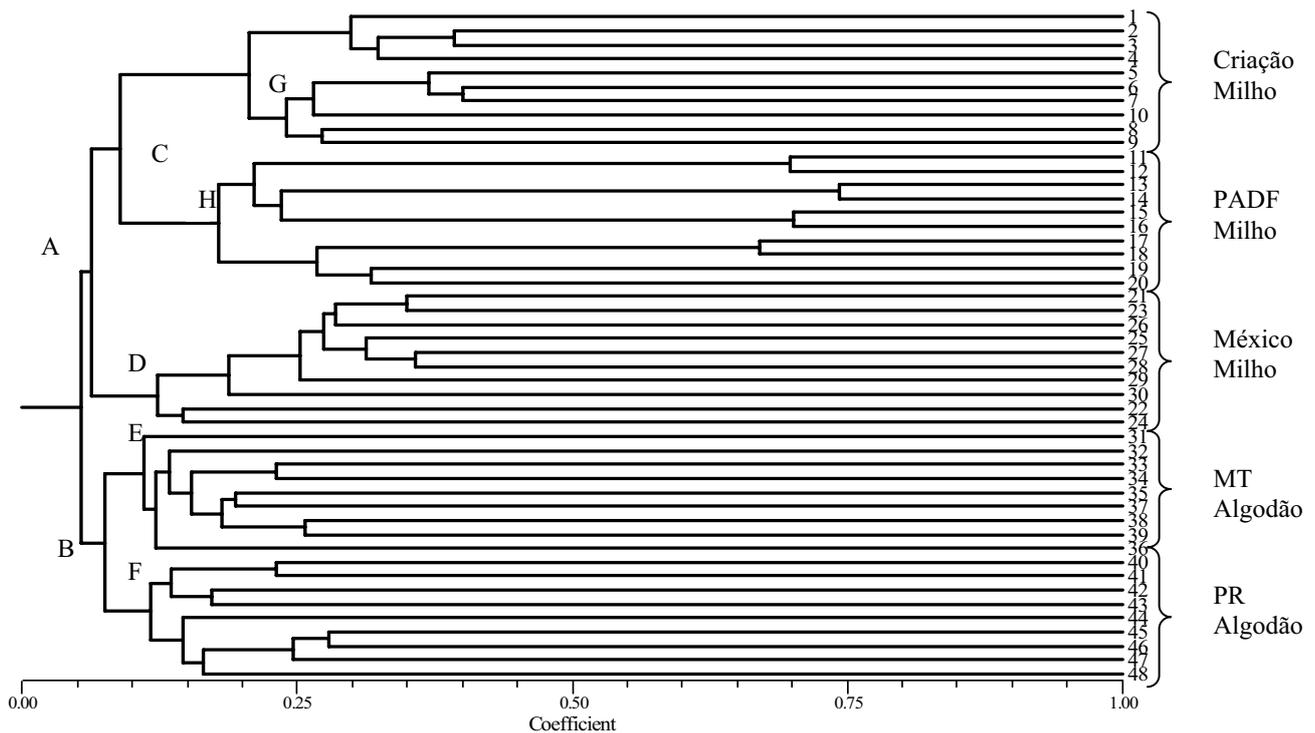


Figura 15 – Dendrograma indicando o padrão de similaridade genética entre as cinco populações de *S. frugiperda* nas culturas de milho e algodão a partir do emprego de 752 marcadores de RAPD submetidos ao método UPGMA.

Analisando as populações do grupo A observou-se que ele se dividiu em outros dois subgrupos distintos, o C que corresponde às populações da lagarta-militar do milho do Brasil e o D que formou um clado distinto, que corresponde a população deste inseto coletada na cultura do milho do México, com grau de similaridade de 6% entre elas. O grupo C, por sua vez, formou dois cladogramas com as populações de *S. frugiperda* do milho em Planaltina – DF (subgrupo H) e da Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília – DF (subgrupo G), com 9% de similaridade entre os seus indivíduos. Em relação às populações do grupo B observou-se que ele se dividiu em dois subgrupos diferentes, o E que equivale à população da lagarta *S. frugiperda* na cultura do algodão de Porto Alegre do Norte – MT e o F corresponde à população desta praga na cultura do algodão de Londrina – PR, com 7,5% de similaridade entre os subgrupos E e F.

No dendrograma obtido detectou-se um ramo separado da população de *S. frugiperda* na cultura de milho do México em relação ao milho do Brasil e um baixo grau de similaridade entre este grupo (6%). Monnerat *et al.* (2006), usando a técnica de RAPD, mostraram que o nível de variabilidade de *S. frugiperda* dentro do grupo foi menor que entre duas populações de diferentes regiões geográficas, onde o grupo do Brasil teve apenas 22% de similaridade com os grupos do México e Colômbia e, ainda, observou-se claramente, no dendrograma a separação de um clado da população do Brasil em relação às outras da América Latina.

Os indivíduos 13 e 14 do subgrupo H, da população de lagarta-militar da cultura do milho de Planaltina – DF, foram os que apresentaram maior grau de similaridade em torno de 74,8%. Nenhum par de indivíduos teve 100% de similaridade (Figura 15).

A similaridade genética média (Figura 16) entre as populações de *S. frugiperda* pelo coeficiente de Jaccard foi de 0,375. Os indivíduos 13 e 14 eles guardam entre si a maior

similaridade genética que foi de 74,26% e, 25,74% de distância genética. E os indivíduos 05 e 32 guardam 0,74% de similaridade genética entre eles. Portanto, eles apresentam a maior distância genética que foi de 99,26%. Analisando apenas as populações de *S. frugiperda* dentro da cultura do algodão, apresentam uma variação de 3,05% a 27,84% de similaridade genética. Enquanto, entre as populações desta praga na cultura do milho do Brasil e do México tem-se uma variação de 1,74% a 74,26%.

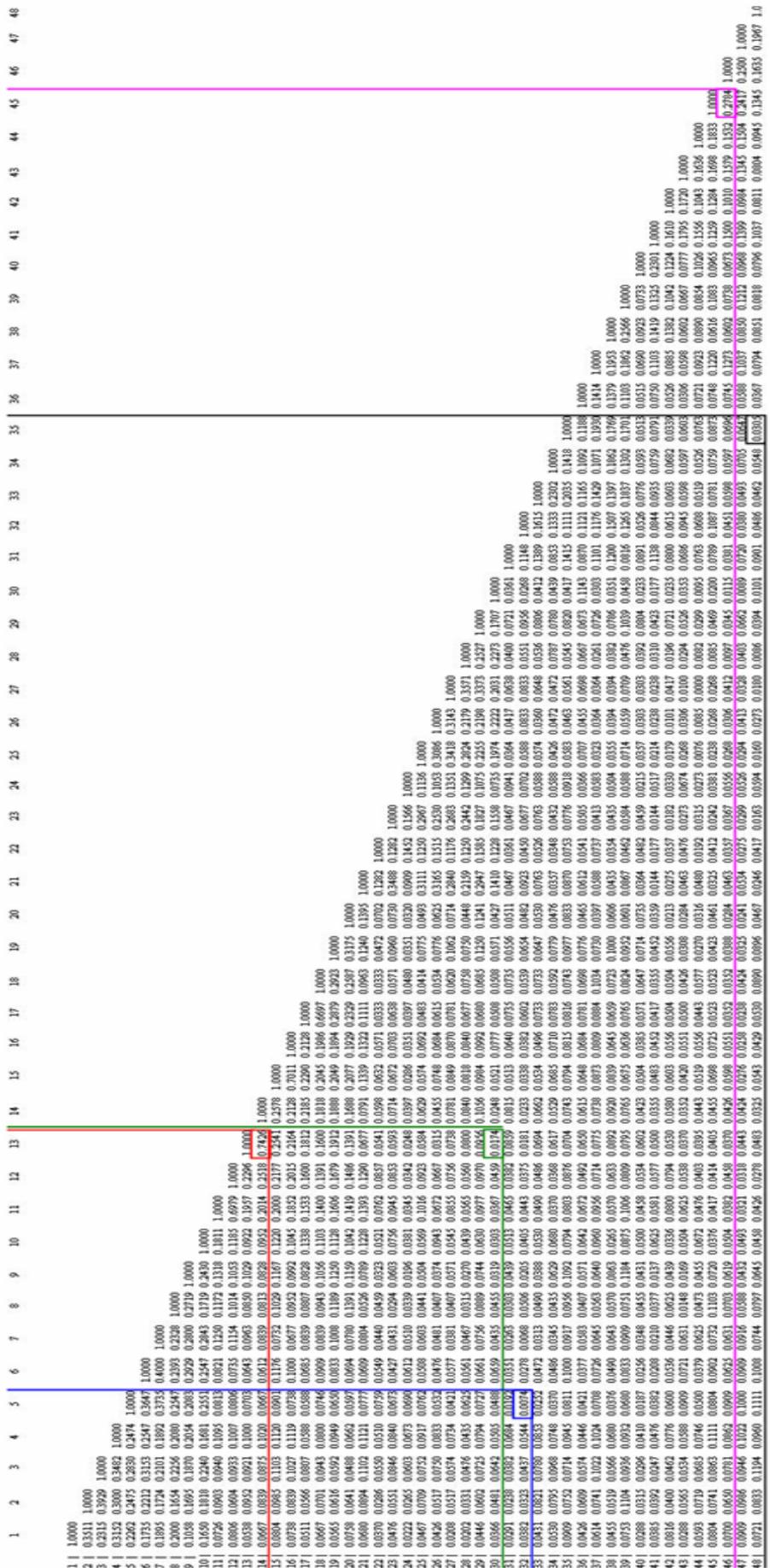


Figura 16: Matriz de similaridade genética entre as populações de *S. frugiperda* obtida por meio de marcadores RAPD após aplicação do índice Jaccard

(Sneath e Sokal, 1973).

Examinando a amplitude de variabilidade genética encontrada dentro de cada população de *S. frugiperda*, observou-se que: a) a população da criação de inseto que foi coletada em milho e depois cultivada em dieta artificial apresentou amplitude variando de 20,8 a 40,5%; b) a população da plantação de milho do PADF com variação de 17,8 a 74,8%; c) a população do milho do México teve uma amplitude de 13 a 36%; d) a população de algodão do MT variou de 11,5 a 26,5%, e e) a população de algodão do PR variando de 12,5 a 28%. De todas as análises observou-se que a população da plantação de milho do PADF foi a que apresentou maior amplitude de similaridade genética, variando em torno de 57%. Observou-se também que as populações de algodão do MT e do PR obtiveram a amplitude de similaridade genética com uma variação muito próxima de 15% e 15,5%, respectivamente.

Em relação à organização dentro de cada população da lagarta-do-cartucho, observou-se (Figura 15) que alguns indivíduos apresentaram perfis de similaridade genética diferentes em relação aos demais indivíduos da mesma população, tais como: a) na população da Criação, os indivíduos 1, 2, 3, 4 apresentaram 21% de similaridade genética e os indivíduos 5, 6, 7 com 37,5% de similaridade; b) na população do PADF os indivíduos 11 e 12 tiveram 70% de similaridade enquanto os indivíduos 13 e 14 apresentaram 74,8%; c) na população do México os indivíduos 25, 27, 28 tiveram 36% de similaridade; d) na população do algodão do MT os indivíduos 38 e 39 apresentaram 26,5%; e e) na população do algodão do PR os indivíduos 45, 46, 47 tiveram 25% de similaridade. A partir desses resultados, podemos observar que há um maior grau de similaridade genética nos indivíduos da população de *S. frugiperda* do PADF, o que possivelmente possa ser efeito de endocruzamento.

Utilizando-se os mesmos dados binários que foram aplicados na geração do dendrograma, a análise de variância molecular (AMOVA) de todas as populações de *S. frugiperda* deste trabalho permitiu identificar que a maior variabilidade genética (76,34%) foi originária de variações dentro das populações e que 23,66% foi originária das variações entre as populações. E analisando a fonte de variabilidade (Tabela 8) entre o grupo de milho e algodão, tem-se que 2,77% da fonte de variação foi localizada nas variações entre as populações, 75,47% era proveniente de variações dentro das populações e que 21,77% provém de variações entre as populações e dentro de cada grupo. Examinando-se a variabilidade dos três grupos, milho Brasil, milho México e algodão Brasil, observou-se que 2,91% da fonte de variação era originária de variações entre as populações, que 75,9% era proveniente de variações dentro das populações e que entre as populações e dentro de cada grupo teve 21,19%. E, também, analisando-se a variabilidade das populações de milho do Brasil e de algodão do Brasil, observou-se que 4,63% da fonte de variação provém das variações entre as populações, 76,27% da variação origina de variações dentro das populações e que 19,10% de variação vem de variações entre populações e dentro de cada grupo.

Tabela 8: A Análise de variância molecular de todas as populações de *S. frugiperda*.

AMOVA	Algodão x milho	milho Brasil x milho México x algodão Brasil	milho Brasil x algodão Brasil
entre:	2,77 %	2,91 %	4,63 %
dentro:	75,47 %	75,90 %	76,27 %
entre e dentro:	21,77 %	21,19 %	19,10 %

Marttinelli *et al.* (2006) analisaram a variabilidade genética entre dez populações de *S. frugiperda* coletadas em milho e algodão utilizando a técnica de RAPD. A partir de 10 oligonucleotídeos, os autores obtiveram 206 marcadores, onde 15% da variabilidade molecular estava localizada entre os grupos e 85% dentro dos grupos das populações. As populações de milho e algodão eram proximamente relacionadas visto que, não houve separação das populações em relação à cultura de origem. Os resultados obtidos sugeriram a ocorrência de considerável fluxo gênico entre as populações deste inseto estabelecidas nestas culturas localizadas em uma mesma região do Brasil. Por sua vez, os dados de Monnerat *et al.* (2006) mostraram que a diversidade da lagarta *S. frugiperda* está claramente correlacionada com a origem geográfica. No presente estudo, verificou-se pelos dados do dendrograma que as populações estudadas de milho e algodão do Brasil estão separadas geneticamente, devido ao fato de estarem afastadas geograficamente, comprovado pela análise de variância molecular que mostra 76,27% de variação dentro das populações e 4,63% de variação entre as populações do milho e do algodão do Brasil.

As diferenças genéticas de diferentes populações podem evoluir desde que as adaptações fisiológicas de um inseto para um determinado hospedeiro acarretem diminuição de desempenho ou valor adaptativo deste inseto em um dado hospedeiro (Busato *et al.*, 2002). Busato *et al.* (2005) mostraram que a biologia de populações de *S. frugiperda* em folhas de milho e arroz irrigado do Rio Grande do Sul apresentaram, independente do local de coleta, necessidades fisiológicas intrínsecas e que são evidenciadas nos diferentes parâmetros biológicos. Diante dos resultados concluíram-se que ambos os biótipos “milho” e “arroz” de lagarta-militar ocorrem no Rio Grande do Sul do Brasil.

A existência de raças de *S. frugiperda* associadas a plantas hospedeiras foi inicialmente identificada por Pashley *et al.* (1985) por meio da técnica de isoenzimas, onde

mostrou-se que a raça arroz está associada à plantas de arroz e grama-seda (*Cynodon dactylon*), enquanto a raça milho ocorre em plantas de milho e algodão do Hemisfério Norte. McMichael *et al.*(1999) separaram molecularmente as raças “milho” e “arroz” utilizando marcadores AFLP.

De acordo com Léry *et al.*(2003) que caracterizaram 11 linhagens de células insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, mantidas em cultura, usando a técnica de RAPD, concluíram que é possível o emprego de marcadores gerados por RAPD para a identificação de linhagens específicas a partir de uma dada amostra de uma espécie de inseto em particular e confirmaram que os marcadores de RAPD representam um método aplicável para a caracterização de linhagens de células de insetos. No presente estudo, os dados gerados pelo dendrograma permitiram concluir que o número de marcadores de RAPD utilizados neste estudo foram suficientes para as análises das cinco populações de *S. frugiperda* coletadas nas culturas de milho e algodão do Brasil e de milho do México. De modo geral, o dendrograma classificou as populações da lagarta-militar de acordo com as plantas hospedeiras, formando dois grandes grupos: o milho e o algodão.

O cultivo de algodão no Brasil Central tem crescido consideravelmente e, essas lavouras são estabelecidas em localidades adjacentes ou em seqüência à cultura do milho, permitindo assim um fluxo gênico entre populações de *S. frugiperda* nas duas culturas, como mostra Martinelli *et al.* (2006). Essas evidências são extremamente importantes devido às características deste inseto-praga, tais como, polifagia, infestações críticas e a voracidade foliar (Grützmacher *et al.*, 1999), causando sérios danos em diferentes agroecossistemas.

Dentro das cinco populações do presente estudo identificou-se uma variabilidade genética de 76,34% e as variações entre as populações foi de 23,66%. Essa variação entre

grupos de *S. frugiperda* geograficamente separados sugere a existência de fatores que favorecem a permanência destes lepidópteros em ambas as culturas no Brasil. Assim, essa porcentagem afirma a existência da dinâmica entre as diferentes populações da lagarta-militar em diferentes culturas. No entanto, segundo Sosa-Gomez *et al.* (2004) para validação dos resultados com marcadores moleculares tornam-se necessárias as observações ecológicas referentes ao comportamento de vôo e à capacidade de dispersão da espécie.

As populações deste estudo foram de uma mesma raça, a raça “milho”, conforme descrito por Pashley (1993). Os dados obtidos por meio de marcadores de RAPD mostraram que, as populações estão geneticamente separadas, com similaridade de 5% (Figura 15) e apresentaram uma maior variabilidade genética dentro das populações (76,34%), portanto permite a sugestão de uma maior permanência dessas populações de *S. frugiperda* na cultura em que foram coletadas. As variações originárias entre as populações foram de 23,66%, no entanto para esse estudo não foi possível observar se houve fluxo gênico entre essas populações, por estarem geograficamente distantes e por não serem analisadas as culturas de milho e algodão em uma mesma região como mostra o trabalho de Marttinelli *et al.* (2006). Para estudos de fluxo gênico das populações de *S. frugiperda*, há a necessidade de se analisar outros marcadores moleculares, tais como, mtDNA e microssatélites, e essas informações poderão elucidar como se deu a dinâmica na formação dessas populações. Isso é importante devido à grande capacidade de desfolhamento que *S. frugiperda* causa na parte aérea das plantações, ocasionando perdas na produção de 15 a 37% (Cruz *et al.*, 1995), sendo estimada em mais de 400 milhões de dólares (Busato *et al.*, 2005) de decréscimo econômico no Brasil. Essa praga tem atacado frequentemente as

diferentes culturas agrícolas e ornamentais nas diversas regiões do nosso país e do México, por ter uma característica polífaga.

O presente estudo demonstrou a variabilidade genética existente dentro e entre algumas das populações deste inseto-praga de interesse agrônômico, portanto são importantes na seleção de fragmentos de RAPD potenciais para o desenvolvimento de marcadores SCAR que sejam sensíveis e eficientes para a detecção e identificação das populações de *S. frugiperda*, e úteis, como ferramenta nas práticas de controle das populações desta praga no Brasil. A partir dessas informações poderão ser desenvolvidas estratégias moleculares para o monitoramento da deriva genética e o controle da dispersão desse inseto, como também, para a associação com outras características, tais como, a resistência a inseticidas químicos e a susceptibilidade à ação de bactérias entomopatogênicas.

2. Análise do DNA mitocondrial

Analisando-se os perfis eletroforéticos obtidos com a amplificação do gene da NADH - DH do DNA mitocondrial, observou-se a presença de um fragmento de 600 pb para as populações de *S. frugiperda* na cultura do milho no Brasil e no México (Figura 17). No entanto, na população oriunda da cultura do algodão do Sul do Brasil não houve amplificação desse fragmento (Figura 18). Observou-se também que as amostras da criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que foram coletadas em diferentes regiões com a cultura do milho, também tiveram a presença do mesmo fragmento que as outras populações da lagarta-militar coletadas no milho. As lagartas da criação estiveram sob dieta artificial por dois meses antes do início da extração de DNA, com exceção do indivíduo 10

que permaneceu por um mês nessas condições. Os indivíduos coletados no milho em Cuernavaca, México, também apresentaram o fragmento do mesmo tamanho que as lagartas do milho do Brasil, sendo possível sugerir que este fragmento seja característico de *S. frugiperda* para esta cultura.

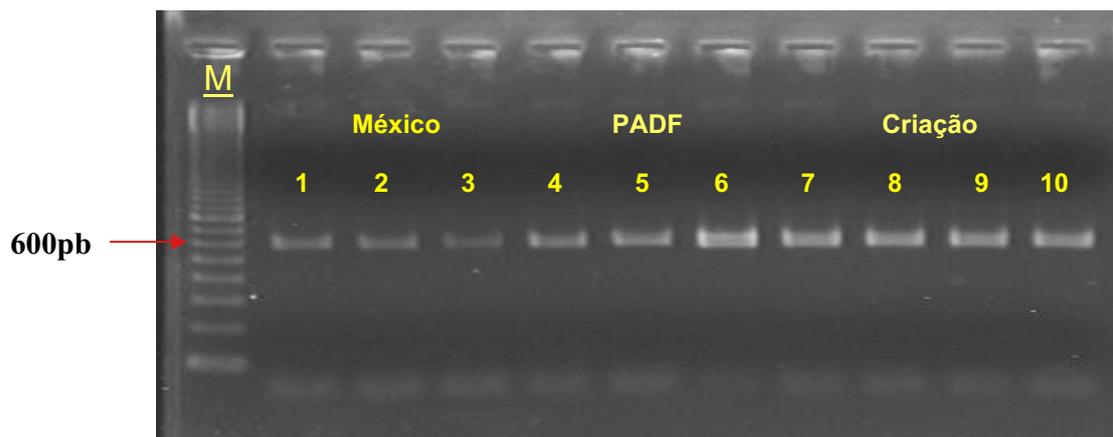


Figura 17: Amplificação de uma região do gene da NADH – desidrogenase do mtDNA de *S. frugiperda* em gel de agarose 1,5%. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: México – 1, 2, 3; PADF – 4, 5, 6; Criação – 7, 8, 9, 10.

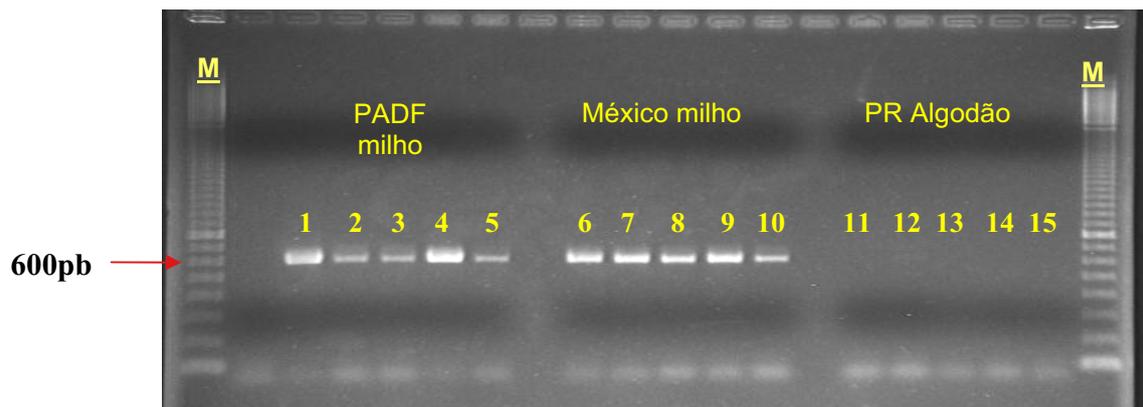


Figura 18: Amplificação de uma região do gene da NADH – desidrogenase do mtDNA de *S. frugiperda* em gel de agarose 1,5%. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: em culturas do milho no PADF – 1, 2, 3, 4 e 5; no México – 6, 7, 8, 9 e 10; e na cultura do algodão PR – 11, 12, 13, 14 e 15.

As amostras de DNA de *S. frugiperda* da cultura de algodão do Mato Grosso do Brasil nessa região não produziram fragmentos amplificados (Figura 19). Portanto, para as populações da lagarta-do-cartucho na cultura do algodão, pode ter havido mutações no sítio do anelamento do oligonucleotídeo e por esse motivo não houve amplificação. Dessa maneira, observa-se a existência de diferenças genéticas nos indivíduos da lagarta-militar na cultura do milho e na cultura do algodão o que confirma os resultados do RAPD onde observou-se a separação bem distinta das duas culturas no dendrograma UPGMA (Figura 15). Portanto, a presença do fragmento de 600 pb pode ser utilizado para a identificação de *S. frugiperda* raça “milho”, após o seqüenciamento e novos testes com mais populações.

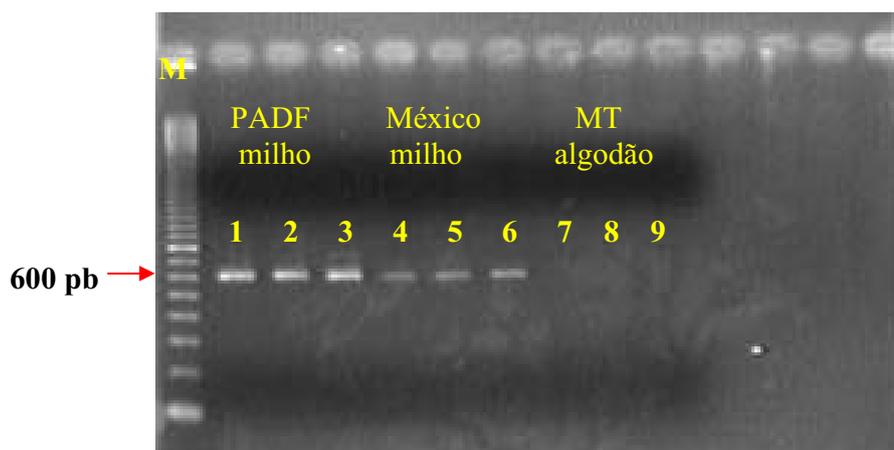


Figura 19: Amplificação de uma região do gene da NADH – desidrogenase do mtDNA de *S. frugiperda* em gel de agarose 1,5%. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (Gibco). Cada amostra corresponde a um indivíduo: em culturas do milho no PADF – 1, 2, 3; no México – 4, 5, 6; e na cultura do algodão MT – 7, 8, 9.

Como exemplos de estudos de mtDNA têm-se: Saito *et al.* (2005) analisaram a origem da replicação do DNA mitocondrial em diferentes insetos das ordens Diptera, Lepidoptera, Coleoptera e Orthoptera, interpretando as regiões onde foram mapeadas em definição de 1-nucleotídeo dentro de uma região rica em A + T usando-se o método de

PCR. Para as quatro espécies de *Drosophila* o gene foi localizado imediatamente seguido pelo nucleotídeo timina. Prowell *et al.* (2004) usando AFLP, analisaram 168 indivíduos da lagarta-militar do Sul dos Estados Unidos, Caribe e América do Sul sendo da raça “milho” hospedeira somente do milho e a raça “arroz” predominantemente hospedeira de gramíneas, de pastagens e arroz, mas ocasionalmente em milho. A análise de regiões do mtDNA do biótipo de *S. frugiperda* do milho revelou que 2% são haplótipos. Segundo esses autores, a forte associação existente entre genótipos de esterase e haplótipos de mtDNA é consistente com as duas raças, “milho” e “arroz”.

Lewter *et al.* (2006) analisaram a variação genética entre e dentro das raças de “milho” e “arroz” em 71 indivíduos de *S. frugiperda*, onde encontram um fragmento de 608 pb das regiões COI e COII e seqüenciaram, resultando três haplótipos da raça “milho” e quatro da raça “arroz”, a divergência genética entre as duas raças variou de 0.66 a 0.99%. Levy *et al.* (2002) analisaram a região COI de *S. frugiperda* das raças “milho” e “arroz” e observaram que para as populações coletadas em 1989 e conservadas a -20 °C foram 98% homólogas apresentando um fragmento de 569 pb. Dentro das diferenças foi encontrado um local reconhecido (CCGG) na seqüência da raça “milho” e ausente na raça “arroz”. Após a digestão com a enzima de restrição *MspI*, os produtos de PCR obtidos de *S. frugiperda* da raça “milho” resultaram em dois fragmentos de 497 pb e 72 pb, desenhando oligonucleotídeos para identificação das raças da lagarta-militar. Dessa forma, Lu e Adang (1996), usaram o marcador mtDNA como diagnóstico para distinguir as raças da lagarta-militar, usando 25 endonucleases de restrição. O padrão polimórfico de mtDNA com as enzimas de restrição foram identificados para *BstNI*, *HinfI* e *MspI*, sendo que o padrão *MspI* foi o mais característico, pois pelo tamanho do fragmento de DNA é possível diferenciar as duas raças. Os dois fragmentos de MtDNA de 10,4 kb e 4,4 kb são para

padrão da raça “arroz” e os 3 fragmentos de 5,4 kb, 4,3 kb, 3,8 kb foram para o padrão da raça “milho” que são facilmente detectados.

Os dados do presente trabalho indicam a possibilidade de se empregar um marcador baseado em mtDNA para distinguir *S. frugiperda* em diferentes culturas, bem como, diagnosticar a dinâmica da população visto que o perfil mostra um fragmento de 600 pb presente apenas para os indivíduos da cultura do milho e ausentes para a cultura do algodão. Segundo Lu e Adang (1996) o uso de marcadores de mtDNA e nuclear DNA são bons mecanismos para diferenciação de raças e para o gerenciamento dos impactos das pragas. Portanto, essas avaliações são importantes no que diz respeito à seleção deste fragmento de mtDNA para o desenvolvimento de *kits* que sejam sensíveis e eficientes à detecção e a identificação de *S. frugiperda* na cultura do milho e do algodão, permitindo assim um acompanhamento da dinâmica da população e da deriva genética, pois essa praga vem causando severos prejuízos em diferentes culturas por serem muito vorazes e polífagas, e segundo Merege (2007) vem resultando perdas de mais de 400 milhões de dólares para o Brasil e no México a redução na produção de milho, devido aos ataques desta praga, alcançou 37,7%. E ainda, considerando que, no Brasil os cultivos de algodão e de milho têm crescido tornam-se úteis essas novas ferramentas no intuito de auxiliar o controle de *S. frugiperda*.

CONCLUSÕES

Considerando o que foi exposto, conclui-se que:

- Há variabilidade genética entre as populações de *S. frugiperda* coletadas nas culturas do milho e do algodão de diferentes regiões geográficas do Brasil e na cultura do milho do México visualizada a partir do emprego de RAPD.
- Existem fragmentos de RAPD que podem ser usados na identificação de populações de *S. frugiperda* na cultura do milho e do algodão.
- É possível diferenciar as populações de *S. frugiperda* coletadas em milho e algodão por meio de um marcador de mtDNA, que corresponde ao gene da NADH – desidrogenase.

PERSPECTIVAS

- Seqüenciar as regiões do mtDNA amplificado buscando marcadores SNP, e ainda desenvolver *kits primers*.
- Construção de marcadores específicos (SCAR) para identificação de biótipos.
- Relacionar populações resistentes e susceptíveis à agrotóxicos e *B. thuringiensis* subspécies *kurstaki* com marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agusti, N.; de Vicente, M. C.; Gabarra, R. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. **Insect Mol. Biol.**, Barcelona, Jun., v. 9, n. 3, p. 263-268, 2000.

Annebelli, M. B. Necessidade de alertar e educar aos agricultores sobre os impactos dos agrotóxicos no meio ambiente. sugestões de medidas mitigadoras a serem adotadas. **III Simpósio Nacional de Geografia Agrária – II Simpósio Internacional de Geografia Agrária – UFPR**, Jornada Ariovaldo Umbelino de Oliveira – Presidente Prudente, Nov., 2005.

Busato, G. R., Grützmacher, A. D., Garcia, M. S., Giolo, F. P., Martins, A. F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, nas culturas do milho e arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.31, p.525-529, 2002.

Busato, G. R., Grützmacher, A. D., Garcia, M. S., Giolo, F. P., Zotti, M. J.; Stefanello-Júnior, G. J. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, Pelotas, RS, v.34, n.5, p.743-750, 2005.

Caprio, M. A.; Tabashnik, B. E. Genes flow accelerates local adaptation amongs finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p.611-620, 1992.

Cave, R. D. Biology, ecology e use in pest management of *Telenomus remus*. **Bioc. News and inform.**, v.21, n.1, p.21-26, 2000.

Cruz, I; Waquil, J. M.; Viana, P. A.; Valicente, F. H. **Pragas: diagnóstico e controle. In: Seja o doutor do seu milho.** Coelho, A. M. e França, G. E. de Arquivo do Agrônomo n.2 (2ª edição ampliada e totalmente modificada), Piracicaba: POTAFOS. p.10-14, 1995.

Cruz, I.; Oliveira, A. C. Flutuação populacional do predador *Doru luteipes* Scudder em plantas de milho. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília, v.32, n. 4, p.363-368, 1997.

Cruz, I., Vianna, P. A., Waquil, J. M. **Manejo das pragas iniciais de milho: o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos.** Embrapa/CNPMS. Circular Técnica 31, p. 39. Sete Lagoas, 1999.

Das, M.; Bhattacharya, S.; Pal, A. Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: a strategy for species-specific marker development in bamboo. **Ann. Bot.**, Londres, Abril, v. 95, n. 5, p. 835-841, 2005.

Diez-Rodriguez, G.I. and Omoto, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotrop. Entomol.**, 30:311-316. 2001.

Edwards, M. L.; Mendoza, J. L. H.; Rubio, A. P.; Ochoa, J. M.; Gutiérrez, R. L.; Hamm, J. J. e Wiseman, B. R. Biological differences between Five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in México. **Fla. Entomol.** V. 82, p.254-262,1999.

Ferreira, M.E e Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3 ed. Brasília: Embrapa – Cenargen, Documento 20, 220p. 1998.

Ferreira, M. A. J. da F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas.** Boa Vista: Embrapa Roraima, 63p. Documentos, 1. ISSN: 0101-9805, 2003.

Figueiredo, M. de L. C.; Cruz, I.; Della Lucia, T. M. C. Controle integrado de *Spodoptera frugiperda* (Smith e Abbott) utilizando-se o parasitóide *Telenomus remus* Nixon. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.34, n.11, p. 1975-82, 1999.

Frutos, R.; Federici, B. A.; Revet, B. e Bergoin, M. Taxonomic studies of Rickettsiella, Rickettsia, and Chlamydia using genomic DNA. **J. Invertebr. Pathol.**, 63, p. 294-300, 1994.

Gallo, D.(*in memoriam*); Nakano, O.; Neto, S.S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C.; Filho, E. B.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B.; Vendramim, J. D.; Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S.; Omoto, C. **Entomologia Agrícola**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v.10, Piracicaba: FEALQ, 920p. 2002.

Grattapaglia, D. e Ferreira, M. E. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análises genéticas**. Ed. Embrapa, p.38-53, Brasília: DF, 1995.

Grattapaglia, D.; O'malley, D.; Sederoff, R. Multiple applications of RAPD markers to genetic analysis in Eucalyptus sp. **Proc. Of the IUFRO Conference "Breeding Tropical Trees"**, Section 2.02-08, Cartagena and Cali, Colombia, 1992.

Grützmacher, A. D.; Nakano, O.; Martins, J. F. da S.; Loeck, A. E.; Grützmacher, D. D. Consumo foliar de cultivares de arroz irrigado por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 28, n.3, p.519-525, Set., 1999.

Kethidi, D. R.; Roden, D. B.; Ladd, T. R.; Krell, P. J.; Retnakaran, A.; Feng, Q. Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the Asian long-horned beetle, *Anoplophors glabripennis* (Motschulsky). **Arch Insect Biochem Physiol**, Ontario, Canada, Abril, v. 52, n.4, p.193-204, 2003.

Léry, X.; Larue, B.; Cossette, J.; Charpentier, G. Characterization and authentication of insect cell lines using RAPD markers. **Insect Bioc. And Mol.Bio**. v. 33, p. 1035-1041, 2003.

Levy, H. C.; Garcia-Maruniak, A.; Maruniak, J. E. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I gene. **Florida Entomologist**, v.85, n.1, p. 186- 190, Mar., 2002.

Lewter, J. A.; Szalanski, A. L.; Nagoshi, R. N.; Meagher Jr., R. L.; Owens, C. B.; Luttrell, R. G. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v.89, n.1, p. 63-68, Mar., 2006.

Lu, Y. and Adang, M. J. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. **Florida Entomologist**, v. 79, n.1, p. 48-55, Mar., 1996.

Lu, Y. J.; Kochert, G.D.; Isenhour, D.J. and Adang, M. J. Molecular characterization of a strain specific repeated DNA sequence in fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Molecular Biology**. N. 3. 123-130., 1994.

Martinelli, S.; Barata, R. M.; Zucchi, M. I.; Silva-Filho, M. C. e Omoto, C. Molecular Variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations Associated to Maize and Cotton Crops in Brazil. **J. Econ. Entomol. Entomological Society of America**, v. 99, n.2, p. 519-526, 2006.

Martinelli, S. e Omoto, C. **Resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas.** CORREIO, Bayer CropScience, Jan/Jun, 2004.

McMichael, M.; e Prowell, D. P. Differences in amplified fragment length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Ann. Entomol. Soc. Am.** V. 92, p. 175-181, 1999.

Méndez, W. A.; Valle, J.; Ibarra, J. E.; Cisneros, J.; Penagos, D. I.; Willians, T. Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. **Biological Control**, Orlando, v. 25, p.195-206, 2002.

Merege, W. H. Milho (*Zea mays* L.) Disponível em: <http://www.agrobyte.com.br/milho.htm>, acesso em: 02/02/2007.

Monnerat, R. G.; Martins, E.; Queiroz, P.; Ordúz, S.; Jaramillo, G.; Benintende, G.; Gozzi, J.; Real, M. D.; Martinez-Ramirez, A.; Rausell, C.; Cerón, J.; Ibarra, J. E.; Rincon-Castro, C. D.; Espinoza, A. M.; Meza-Basso, L.; Gabrera, L.; Sánchez, J.; Soberon, M.; Bravo, A. Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. **Applied and Environmental microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7029-7035, Nov. 2006.

Montesbravo, E. P. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith em milho. 2001
Disponível em: <http://codagea.edoags.gov.mx/~produce/SPODOPTE.htm>, acesso em
26/01/05.

Ovejero, R. F. L. Diferentes métodos de controle da lagarta-do-cartucho-do-milho.
Disponível em: www.portaldocampo.com.br/culturas/milho/panoramaartigos04.htm,
acesso em: 28/05/2001.

Pashley, D. P.; Johnson, S. J.; Sparks, A. N. Genetic populations structure of migratory
moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Ann. Entomol. Society of America**,
Columbus, v. 78, p. 756-762, 1985.

Pashley, D. P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera:
Noctuidae): A sibling species complex? **Ann. Entomol. Soc. America**. v.79, p. 898-904,
1986.

Pashley, D. P. Quantitative genetics, development and physiological adaptation in host
strains of the fall armyworm. **Evolution**, Lancaster, v. 42, p.93-102, 1988.

Pashley, D. P. Causes of host-associated variation in insect herbivores: Na example from
fall armyworm, p. 351-359. **In** K. C. Kim e B. A. McPherson (Eds.), **Evolution of insect
pests: Patterns of variation**. John Wiley e Sons, 496 p., 1993.

Prowell, D. P.; McMichael, M.; Silvain, J.F. Multilocus Genetic Analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 5, p. 1034-1044, Set.,2004.

Praça, L. B.; Batista, A. C.; Martins, E. S.; Siqueira, C. B.; Dias, D. G. S.; Gomes, A. C. M. M.; Falcão, R.; Monnerat, R. G. Estirpes de *bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.39, n.1, p. 11-16, Brasília, jan., 2004.

Queiroz, P. R.; Martins, E. S.; Monnerat, R. G.; Lima, L. H. C. **Análise da variabilidade genética de população de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 75, ISSN 1676-1340, n. 75, 18 p. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Abril, 2004.

Rolf, F. J. NTSYS-pc. Numeral taxonomy and multivariate system. Version 2.02 **Applies Biostatistics Inc.**, New York, 1993.

Saito, S.; Tamura, K.; Aotsuka, T. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. **Genetics Society of America**, Japão, v. 171, n.4, p. 1695 – 1705, Dez., 2005.

Schmidt, F. B. **Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura de milho.** Dissertação de Mestrado em Ciências – Área de concentração: Entomologia, ESALQ, Piracicaba, SP, maio, 2002.

Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. Arlequin versão 2000: A software for populations genetics data analysis. **Genetics and biometry laboratory**. University of Geneva, Switzerland., 2000.

Sneath, P. H. A.; Sokal, R. R. **Numerical Taxonomy**. Freeman: San Francisco. 573 pp. 1973.

Sosa-Gómez, D. R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetic and Molecular Biology**, v. 27, n.3, p.378-384, 2004.

Valicente, F. H.; Cruz, I. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus**. Sete Lagoas: Embrapa - CNPMS, 23p. Circular Técnica, 15, 1991.

Vans Huis, A. Integrated pest management in the small farmers maize crop in Nicaragua. Meded Landbou Whoge School Wageningen. P.1-6, **The Netherlands**. 221 pp., 1981.

Whitford, F.; Quinseberry, S. S.; Moelenbeck, D.J. Nutritional response by rice and corn fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains to dietary component substitution in artificial diets. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p.1491-1496, 1992.

Yu, S.J.; Nguyen, S. N.; Abo-Elghar, G. E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.77, p.1-11, 2003.

Yu, S. J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p.135–142, 2006.