

SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Diversidade Genética de *Tibraca limbativentris* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, Usando Marcadores RAPDFÁTIMA T. RAMPELOTTI¹, ANDERSON FERREIRA², FERNANDO A. TCACENCO³, JOSÉ F. DA S. MARTINS⁴, ANDERSON D. GRÜTZMACHER⁵ E HONÓRIO F. PRANDO³

¹Lab. Resistência de Plantas, Depto. Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Esalq/USP, C. postal 9, 13.418-900 Piracicaba, SP; ²Depto. Genética e Melhoramento de Plantas, Esalq/USP, C. postal 11, 13.400-970, Piracicaba, SP
³Epagri – Estação Experimental de Itajaí, C. postal 277, 88.301-970, Itajaí, SC; ⁴Embrapa Clima Temperado C. postal 403, 96.001-970, Pelotas, RS; ⁵Depto. Fitossanidade, FAEM, UFPel, C. postal 354, 96.010-900, Pelotas, RS

Neotropical Entomology 37(1):020-029 (2008)

Genetic Diversity of *Tibraca limbativentris* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil, Using RAPD

ABSTRACT - The work was carried out to test DNA extraction protocols and to characterize populations of *Tibraca limbativentris* Stål, an important rice insect-pest. Insects were collected in Joinville, Rio do Oeste and Turvo, in Santa Catarina State, and Agudo, Uruguaiiana, Pelotas and Palmares do Sul, in Rio Grande do Sul State, and six literature-referenced protocols, besides a new one, were tested. DNA from ten individuals of each population was extracted using the best protocol and RAPD reactions were carried out with ten initiators. The new protocol showed the best results and was used in the PCR reactions, that generated 151 polymorphic bands, allowing to access genetic differences among all the populations; no individuals from one population were clustered with individuals from another. The largest intrapopulacional similarity was found in Uruguaiiana (22%), and the smallest in Palmares do Sul (50%), which was also the most divergent population in relation to the others. The *Gst* was 0.5215, and the *Nm* was 0.4588; these values reflect the low similarity between the populations. The smallest genic flow was obtained when Palmares do Sul and Pelotas were included in the comparisons, in accordance with the largest divergence of these two populations in relation to the others. There was no significant relation between geographic distance and genetic similarity, which can reflect unknown model of dispersion of *T. limbativentris*. New studies exploring the species dispersion strategies may help to understand the insect distribution and to unveil the main factors linked to the genetic variability within and between populations.

KEY WORDS: Insecta, rice stem bug, irrigated rice, molecular marker

RESUMO - O trabalho objetivou testar protocolos de extração de DNA e caracterizar populações de *Tibraca limbativentris*, Stål, importante inseto-praga do arroz. Os insetos foram coletados em Joinville, Rio do Oeste e Turvo, em Santa Catarina, e Agudo, Uruguaiiana, Pelotas e Palmares do Sul, no Rio Grande do Sul. Testaram-se seis protocolos de extração de DNA citados na literatura, e um novo protocolo adequado à espécie em questão. DNA de dez indivíduos de cada população foi extraído usando o melhor protocolo e reações de RAPD foram realizadas com dez iniciadores. O novo protocolo mostrou os melhores resultados e foi utilizado nas reações de PCR, que geraram 151 bandas polimórficas, permitindo acessar diferenças genéticas entre todas as populações; não ocorreram indivíduos de uma população agrupados com os de outra. A maior similaridade intrapopulacional foi encontrada em Uruguaiiana (22%), e a menor em Palmares do Sul (50%), também a população mais divergente das demais. O valor *Gst* foi 0,5215, e de *Nm* 0,4588; esses valores refletem a pouca similaridade entre as populações. O menor *Nm* foi apresentado quando Palmares do Sul e Pelotas foram incluídos nas comparações, em consonância com a maior divergência apresentada por essas populações em relação às outras. Não se observou relação entre a distância geográfica e a similaridade genética das populações, o que refletirá o modelo de dispersão de *T. limbativentris*, ainda desconhecido. Estudos explorando as estratégias de dispersão da espécie poderiam ajudar no entendimento da distribuição do inseto, evidenciando qual a principal fonte de variabilidade genética.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, percevejo-do-colmo, arroz irrigado, marcador molecular

Dentre os insetos-praga incidentes nas lavouras de arroz (*Oryza sativa* L.), o hemíptero *Tibraca limbativentris* Stål, popularmente conhecido como percevejo-do-colmo do arroz, ocorre em todas as regiões orizícolas da América Latina, causando sérios prejuízos para os orizicultores. O ataque do inseto ocorre tanto durante o ciclo vegetativo quanto o reprodutivo da cultura, sendo registradas perdas expressivas para ataques durante as fases de pré-floração e enchimento dos grãos (Silva *et al.* 2004). Estudos biológicos, comportamentais e de nível de dano, entre outros aspectos, têm sido realizados, demonstrando a importância das infestações desse inseto para a cultura do arroz (Prando *et al.* 1993, Botton *et al.* 1996, Ferreira *et al.* 1997).

O controle de *T. limbativentris* é realizado atualmente através de pulverizações com inseticidas químicos. No entanto, novas técnicas e metodologias de controle são necessárias para reduzir os riscos negativos ao ambiente e, principalmente, evitar o surgimento de populações resistentes aos inseticidas presentes no mercado hoje. Estratégias integradas para o manejo desse inseto-praga poderiam ser definidas utilizando-se o controle biológico. A ocorrência de fungos entomopatogênicos (Martins *et al.* 2004b) e parasitóides de ovos (Ferreira *et al.* 1997) sobre *T. limbativentris* tem sido relatada em lavouras e sítios de hibernação, caracterizando-os como potenciais agentes de controle.

No Sul do Brasil, onde o arroz irrigado é o principal sistema de cultivo, aumentos populacionais expressivos do percevejo-do-colmo foram constatados nas últimas safras, favorecidos pelas condições de clima e pela localização das lavouras em terrenos inclinados (Martins *et al.* 2004a). O uso de marcadores moleculares tem possibilitado descobertas nas diferentes áreas da biologia, através da caracterização e identificação de populações, raças e/ou espécies crípticas como, por exemplo, trabalhos para a caracterização de arroz (Tcacenco *et al.* 2005), fungos entomopatogênicos (Wang *et al.* 2002) e insetos (Sosa-Gómez 2004). Estudos moleculares permitem entender a movimentação de biótipos ou genótipos dos insetos, sua estratégia e sucesso reprodutivo e qual o padrão de dispersão geográfica ocorrente nas espécies de insetos-praga (Chandrasekhar *et al.* 2005).

Trabalhos recentes têm demonstrado a existência de biótipos de insetos associados a plantas hospedeiras. Busato *et al.* (2004) utilizaram marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e identificaram biótipos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) ocorrendo em lavouras de milho e arroz. Sosa-Gómez *et al.* (2004) caracterizaram populações de *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae), utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), demonstrando que as populações estudadas diferem entre si e são geograficamente isoladas. De acordo com os autores, a identificação desse isolamento geográfico e dos polimorfismos existentes entre cada população permite associar genes de resistência a inseticidas, subsidiando programas de manejo da resistência de *E. heros* na cultura da soja (*Glycine max*).

Dentre as técnicas moleculares disponíveis, o RAPD foi escolhido para a realização do presente trabalho. Esta se baseia na identificação do polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente, através da utilização de um único iniciador

de seqüência arbitrária, o qual é capaz de amplificar as seqüências de DNA incluídas entre dois sítios de anelamento (Welsh & McClelland 1990, Williams *et al.* 1990). Apesar de ser uma técnica que usa seqüências aleatórias, muitos trabalhos têm demonstrado sua eficiência na identificação de populações de insetos (Carvalho & Vieira 2001, Oliveira *et al.* 2002 e Lopes-da-Silva *et al.* 2004).

Considerando que *T. limbativentris* é um inseto incidente em condições climáticas e geográficas bastantes distintas, surge a necessidade de analisar alguns aspectos interpopulacionais desse inseto-praga, o que permitiria definir melhores estratégias para o manejo integrado. Buscando obter subsídios para compreender os padrões de distribuição, dispersão, suscetibilidade aos métodos de controle e as relações de adaptabilidade de *T. limbativentris* nas distintas regiões orizícolas do Sul do Brasil, testaram-se protocolos de extração de DNA e utilizaram-se marcadores RAPD para caracterizar populações desse inseto, coletadas em diferentes regiões orizícolas de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, visando analisar a diversidade genética dessas populações e auxiliar as práticas de manejo integrado desse inseto-praga da cultura do arroz irrigado.

Material e Métodos

Amostragem dos insetos. Foram realizadas coletas em regiões orizícolas de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, de acordo com significância de cada região para cultura do arroz irrigado (Epagri 1998, Azambuja *et al.* 2004); assim, selecionou-se uma lavoura para cada região, realizando-se a coleta nesse local. Os dados de amostragem encontram-se na Tabela 1.

A coleta constou de captura manual e aleatória (sem considerar o sexo do inseto) de aproximadamente 50 adultos de *T. limbativentris*. Os insetos eram levados ao laboratório, onde se realizava uma lavagem: cinco segundos em etanol 70%, seguidos da lavagem em água destilada e secagem em papel de filtro, sendo, posteriormente, indexados, sexados e armazenados em microtubos individuais a -20°C. A espécie *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) foi utilizada como controle de diferenciação para as reações de amplificação, sendo que as condições de coleta e armazenagem foram as mesmas descritas para *T. limbativentris*.

Extração do DNA. Sete protocolos de extração de DNA foram testados para *T. limbativentris*, no intuito de determinar o mais eficiente e seguro na realização de todas as extrações previstas. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Epagri de Itajaí, SC. Cada amostra foi composta por um inseto inteiro ou uma cabeça de adulto de *T. limbativentris*, sendo que para cada protocolo foram utilizadas três amostras e um controle (sem inseto). Os insetos utilizados para os testes de protocolo eram provenientes de Rio do Oeste, SC. Ao término de cada protocolo o *pellet* era diluído em 50 µl de tampão TE pH 8,0 (Invitrogen). Os protocolos encontram-se descritos abaixo.

Protocolo 1 – modificado a partir de Olerup & Zetterquist (1994): Insetos inteiros foram macerados em N líquido, com

Tabela 1. Dados de coleta e amostragem de *T. limbativentris* em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul.

Região/município	Estado	Latitude	Longitude
Alto Vale do Itajaí/Rio do Oeste	SC	27°11'56,0" Sul	49°47'43,0" Oeste
Litoral Norte/ Joinville	SC	26°18'55,0" Sul	48°55'42,0" Oeste
Região Sul/ Turvo	SC	28°53'43,0" Sul	49°41'69,0" Oeste
Fronteira Oeste/Uruguaiana	RS	30°10'40,8" Sul	57°09'09,1" Oeste
Depressão Central/Agudo	RS	29°38'54,3" Sul	53°18'27,3" Oeste
Zona Sul/Pelotas	RS	31°38'13,9" Sul	52°10'51,0" Oeste
Planície Costeira Externa à Lagoa dos Patos/ Palmares do Sul	RS	30°16'38,1" Sul	50°28'40,7" Oeste

posterior adição de 500 µl de tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS). Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 2h. Posteriormente, centrifugaram-se as mesmas por 6 min a 12484 g (rotor F 40-6-38, centrifuga Eppendorf 5804R). Ao sobrenadante adicionaram-se 260 µl de TE e 240 µl de NaCl 5M, centrifugando por 15 min a 12484 g. Após isso, dois volumes de isopropanol 100% gelado foram adicionados ao sobrenadante e posteriormente centrifugado nas condições anteriores. O *pellet* foi lavado com 200 µl de etanol 70% gelado e secado à temperatura ambiente.

Protocolo 2 – modificado a partir de Saghai-Marooof *et al.* (1984): Insetos inteiros foram macerados em N líquido, com posterior adição de 500 µl de uma solução de CTAB 2% e incubação por 30 min a 60°C. Em seguida, acrescentou-se um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e agitaram-se as amostras por inversão durante 15 min. Após, estas foram centrifugadas por 7 min a 12484 g e o sobrenadante transferido para novos tubos contendo 0,8 volume de isopropanol 100% gelado. Posteriormente, centrifugou-se por 7 min a 12484 g e desprezou-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado duas vezes: i) adição de 500 µl de acetato de sódio 0,2 M em etanol 76% (20 min), centrifugação por 2 min a 12484 g e descarte do sobrenadante; ii) adição de 500 µl de acetato de amônio 0,01 M em etanol 76% (20 min), centrifugação por 2 min a 12484 g e secagem à temperatura ambiente.

Protocolo 3 – modificado a partir de Sambrook & Fritsch (1989): Insetos inteiros foram macerados em N líquido, com posterior adição de 700 µl da solução de extração (125 mM EDTA; 500 mM Tris-HCl pH 8,0; 2,3% SDS) e incubação por 1h a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 1 volume de fenol, agitou-se por inversão (15 min) e centrifugou-se a 12484 g por 7 min. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e acrescido do mesmo volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1). As amostras foram homogeneizadas por 15 min e centrifugadas por 7 min a 12484 g. Posteriormente repetiram-se os passos a partir do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico. Ao *pellet* adicionaram-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e dois volumes de isopropanol 100% gelado, incubando as amostras durante a noite a -20°C. No dia seguinte centrifugou-se por 7 min a 12484 g e o sobrenadante foi descartado, ao *pellet* foram adicionados 500 µl de isopropanol 100% com posterior centrifugação por 7 min a 12484 g. O *pellet* foi secado à temperatura ambiente.

Protocolo 4 – modificado a partir de Doyle & Doyle (1990): Insetos inteiros foram macerados em 500 µl do

tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0) e incubados a 60°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e homogeneizado em vórtex. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12484 g e o sobrenadante transferido para novo tubo com dois volumes de isopropanol 100% gelado. Após centrifugação de 10 min a 12484 g o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado por 20 min com 500 µl da solução 0,2 M acetato de amônio em etanol 76%. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12484 g e o *pellet* foi secado à temperatura ambiente.

Protocolo 5 – modificado a partir de Belshaw & Quicke (1997): Insetos inteiros foram macerados em 700 µl de NaCl 5 M. Em seguida adicionou-se 1 µl de proteinase K (20 mg ml⁻¹) e incubou-se as amostras por 18h a 37°C. Posteriormente, estas foram centrifugadas por 7 min a 12484 g e o *pellet* foi lavado com 500 µl de acetato de sódio 0,2 M em etanol 76%. Em seguida, centrifugou-se por 10 min a 12484 g e secou-se o *pellet* à temperatura ambiente. Realizou-se esse protocolo, com e sem maceração em N líquido antes do primeiro passo descrito acima.

Protocolo 6 – CTAB com modificações: Insetos inteiros foram macerados em N líquido, com posterior adição de 750 µl de um tampão (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl; pH 8,0) e incubação por 30 min a 65°C. Em seguida, adicionou-se um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitou-se por inversão durante 15 min e centrifugou-se por 7 min a 12484 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo com 800 µl de isopropanol 100% gelado e incubado a -20°C por 30 min. Posteriormente, centrifugou-se por 7 min a 12484 g e desprezou-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado duas vezes: i) adição de 500 µl de acetato de sódio 0,2 M em etanol 76% (20 min), centrifugação por 2 min a 12484 g e descarte do sobrenadante; ii) adição de 500 µl de acetato de amônio 0,01 M em etanol 76% (20 min), centrifugação por 2 min a 12484 g e secagem à temperatura ambiente.

Protocolo 7 – desenvolvido a partir dos resultados anteriores especificamente para *T. limbativentris*: Cabeças sem antenas e peças bucais foram maceradas em 500 µl de tampão (5 M NaCl; 250 mM EDTA). Em seguida adicionou-se 1 µl de proteinase K (20 mg ml⁻¹) e incubou-se por 18h a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 7 min a 12484 g e o *pellet* foi lavado com 400 µl de acetato de sódio 0,2 M em etanol 76%. Após isso, centrifugou-se por 10

min a 12484 g e secou-se o *pellet* na temperatura ambiente, sendo o mesmo diluído em tampão TE pH 8,0.

A visualização do DNA para cada protocolo foi realizada através de corridas eletroforéticas em géis de agarose 0,8% com 10 mg ml⁻¹ de brometo de etídio. Um transiluminador com lâmpada ultravioleta (UV) foi utilizado para visualização dos géis, os quais foram fotodocumentados em um aparelho Vilbert-Loumart acoplado a uma câmera CCD e impressos em papel termosensível em impressora Sony. Após análise dos resultados para cada protocolo, selecionou-se, para a etapa seguinte do projeto, aquele com maior consistência, considerando como critérios a quantidade e qualidade do DNA obtido, a ausência de moléculas degradadas e a repetibilidade entre as amostras testadas.

Caracterização populacional. Posteriormente, utilizando o protocolo sete, extraiu-se DNA de 10 indivíduos de *T. limbativentris* para os sete locais de amostragem, mais *O. poecilus*. Cinco machos e cinco fêmeas foram selecionados aleatoriamente dentre os insetos coletados; após a extração realizou-se a visualização nas mesmas condições descritas acima nos testes de protocolos. Fez-se o tratamento das amostras com proteinase e RNase; para isso adicionaram-se 1 µl de proteinase K (20 mg ml⁻¹) e 1 µl de RNase A (20 mg ml⁻¹) ambas da Invitrogen, incubando as amostras por 1h a 50°C. Posteriormente adicionaram-se 800 µl de isopropanol 100% gelado, levando a -20°C por 30 min, e centrifugando por 5 min a 12484 g. O *pellet* foi lavado com 500 µl de acetato do sódio 0,2 M em etanol 76%. Após a centrifugação de 5 min a 12484 g o *pellet* foi diluído em 40 µl de tampão TE e as amostras armazenadas a -20°C.

Reações de PCR-RAPD – Para cada amostra fez-se uma diluição 1:10 em água esterilizada, utilizando-se de 1 µl a 1,5 µl por reação, dependendo da quantidade de DNA na amostra original. O volume final de cada reação foi de 25 µl com 10 ng de DNA, 1,5 µl do tampão 10X, 5 µM de iniciador (Tabela 2), 5 mM de cada dNTP e 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), sendo o restante do volume completado com água ultra pura esterilizada. Reações controle sem DNA foram realizadas para cada PCR.

Tabela 2. Número de bandas polimórficas produzidas pelos iniciadores utilizados para caracterização de populações de *T. limbativentris*.

Iniciador ¹	Seqüência	Número de bandas
OPA-04	5'-AAT CGG GCT G-3'	21
OPC-09	5'-CTC ACC GTC C-3'	16
OPC-15	5'-GAC GGA TCA G-3'	11
OPC-16	5'-CAC ACT CCA G-3'	17
OPG-18	5'-GGC TCA TGT G-3'	13
OPK-17	5'-CCC AGC TGT G-3'	12
OPL-13	5'-ACC GCC TGC T-3'	15
OPN-01	5'-CTC ACG TTG G-3'	17
OPO-15	5'-TGG CGT CCT T-3'	17
OPY-20	5'-AGC CGT GGA A-3'	16

¹Iniciadores da Operon Technology

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador PTC-100 da M. J. Research, utilizando programa de ciclagem baseado em Carvalho & Vieira (2001): 1 ciclo a 94°C por 2 min, 36°C por 1 min e 72°C por 2 min; posteriormente 40 ciclos de 94°C por 1 min, 36°C por 1 min e 72°C por 2 min; e uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de cada PCR foram visualizados em corridas de eletroforese em gel de agarose 1,5% corados com 10 mg ml⁻¹ de brometo de etídio. Os resultados foram observados em um transiluminador com lâmpada ultravioleta (UV) e fotodocumentados conforme descrito acima.

Análise dos dados – Analisou-se a variabilidade intra e interpopulacional para as populações estudadas. Os géis, depois de fotografados, foram analisados pelo critério visual de presença (1) e ausência (0) de bandas (marcas de DNA) para cada tamanho de fragmento encontrado nos distintos iniciadores, gerando uma matriz binária; somente bandas fortes e consistentes foram consideradas. O padrão de bandas permitiu calcular o índice de similaridade de Jaccard ($J = n_{11} / (n - n_{00})$), sendo n_{11} = número de bandas presentes em ambos indivíduos analisados; n_{00} = número de bandas ausentes em ambos; e, n = número total de bandas observadas). Essa matriz foi submetida à análise de conglomerados pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA). Os procedimentos foram realizados através do programa NTSYS-pc versão 2.1 (Rohlf 2000).

O programa PopGene (Yeh & Boyle 1997) foi usado para determinar a diversidade genética ou heterozigosidade, o número de locos polimórficos e os índices de *Gst* e *Nm*. As distâncias geográficas entre as populações coletadas foram calculadas com base nas coordenadas de cada ponto de coleta, sendo expressas em quilômetros.

Resultados e Discussão

Extração de DNA. Resultados satisfatórios foram obtidos com os protocolos 4 e 5, no entanto observou-se grande quantidade de DNA degradado, o que pode comprometer trabalhos com marcadores moleculares. Utilizando o protocolo 6, obteve-se DNA de boa qualidade para apenas uma das amostras, indicando baixa reprodutibilidade do método para *T. limbativentris*, enquanto para os protocolos 1, 2 e 3 não se obteve DNA de alto peso molecular em nenhuma das amostras analisadas (Fig. 1A-G).

Carvalho e Vieira (2001) testaram o protocolo 4 para extração de DNA de *Atta*, não obtendo resultados positivos. Segundo os autores, o insucesso resultou da presença de CTAB (brometo trimetilamônio) na reação. No entanto, considerando os resultados do presente trabalho, essa justificativa não se aplica para extrações de DNA de *T. limbativentris*. Ao utilizar o protocolo 5 com uma prévia maceração das amostras em N líquido, os resultados não foram tão bons quanto aqueles observados para o protocolo na íntegra (protocolo 5, sem maceração em N líquido). Cabe ressaltar que a extração de DNA de insetos é dificultada pela presença de um exoesqueleto quitinoso, o qual é dificilmente macerado; a utilização de N líquido, componente que facilita o rompimento mecânico das células, não foi eficiente, sendo desnecessário nesse protocolo.

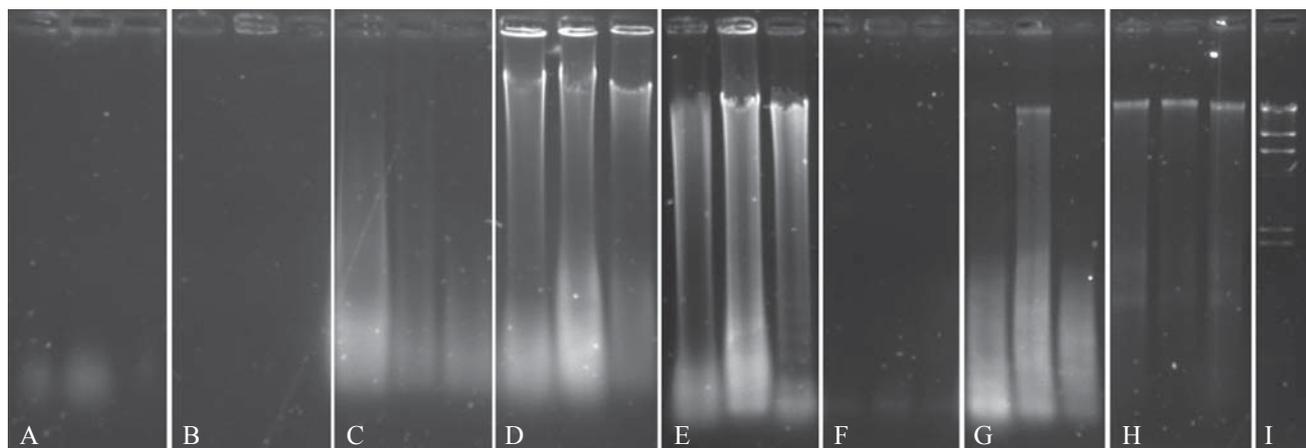


Fig. 1. Foto ilustrativa de gel de agarose 0,8% demonstrando a eficiência dos sete protocolos de extração de DNA testados. A: protocolo 1; B: Protocolo 2; C: protocolo 3; D: protocolo 4; E: protocolo 5 sem N líquido; F: protocolo 5 com N líquido; G: protocolo 6; H: protocolo 7; I: marcador molecular λ Hind III (Invitrogen®).

Os protocolos 1, 2, 3 e 5 foram testados para extração de DNA de *Acromyrmex* por Grützmacher (2003). De acordo com o autor, os melhores resultados para extração de DNA de formigas desse gênero foram obtidos com o protocolo 1, por apresentar baixo custo; no entanto, com os demais protocolos também foi possível obter DNA para as reações de PCR.

O novo protocolo (7) proposto neste trabalho foi baseado principalmente nas informações dos protocolos anteriores, e, após testes metodológicos, mostrou-se o mais eficiente para extração de DNA de *T. limbativentris* (Fig. 1H); o DNA obtido nas amostras submetidas a esse protocolo foi de boa qualidade e quantidade, além de não haver moléculas degradadas, características importantes para a realização de análises moleculares. A adição de EDTA e o uso de cabeças sem as antenas e as peças bucais como amostra foram as principais alterações nesse protocolo. O EDTA age como quelante de cátions divalentes, como Mg^{2+} e Ca^{2+} , que são essenciais para o funcionamento de DNases e outras enzimas; assim, a presença desse composto impede ou dificulta a degradação das moléculas de DNA. A não utilização do inseto inteiro visou à redução da quantidade de impurezas presentes no processo de extração, como o exoesqueleto, trato digestivo e as antenas.

Os protocolos 4 e 5 com as modificações sugeridas e o novo protocolo descrito neste trabalho permitiram obter DNA em quantidade suficiente para futuras aplicações. No entanto, a possível presença de material genético de machos por ocasião da fertilização, bem como a presença de DNA degradado, poderiam influenciar quando da aplicação de técnicas baseadas em marcadores moleculares de DNA, comprometendo os resultados obtidos a partir de extrações usando insetos inteiros como amostras e favorecendo, portanto, a aplicação do protocolo aqui descrito (7) para extração de DNA do percevejo *T. limbativentris*.

Caracterização populacional. Os marcadores RAPD permitiram acessar diferenças genéticas entre todas as populações de *T. limbativentris* estudadas, e, além disso, agruparam os indivíduos da espécie *O. poecilus*, que havia sido utilizada como controle para as reações de amplificação,

em um clado distinto (dados não mostrados). Sosa-Gómez (2004) utilizou um *outgroup* para estudos de diferenciação entre populações de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), observando a distinção das populações dessa espécie no agrupamento para *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) utilizada como *outgroup*. A distinção da espécie em estudo do *outgroup* garante a eficiência dos iniciadores utilizados na diferenciação populacional da espécie de interesse. Não se observou agrupamento dos indivíduos de cada população de *T. limbativentris* em relação ao sexo como o encontrado por Sosa-Gómez et al. (2004), que constataram essa diferenciação para o percevejo *E. heros*.

Os dez iniciadores utilizados geraram 154 bandas de DNA, sendo 151 (98%) polimórficas, caracterizando o alto nível de polimorfismo para *T. limbativentris* (Tabela 2). Cada um desses iniciadores produziu de 11 a 21 bandas, com tamanho variando de 150 a 1.600 pb, sendo eficientes na detecção da variabilidade genética presente nas populações estudadas (Fig. 2). Todas as bandas monomórficas foram obtidas pelo iniciador OPC-15. O iniciador mais polimórfico foi OPA-04, que produziu o maior número de bandas polimórficas (21 bandas), e tem sido utilizado em trabalhos de RAPD para formigas, cigarrinhas, entre outros. Os iniciadores utilizados neste trabalho, exceto OPA-04, foram selecionados a partir de Sosa-Gómez et al. (2004), que caracterizaram o pentatomídeo *E. heros* e obtiveram 153 bandas entre as populações estudadas. O iniciadores OPC-09 e OPC-15 foram utilizados para diferenciação de populações de *N. viridula*, obtendo-se 15 e 13 bandas polimórficas respectivamente (Sosa-Gómez et al. 2005). Os mesmos iniciadores, quando utilizados para *T. limbativentris*, permitiram amplificar 16 (OPC-09) e 11 (OPC-15) bandas, demonstrando que esses iniciadores podem ser abrangentes dentro do genoma dos pentatomídeos.

Houve diferença entre todas as populações de *T. limbativentris* estudadas, não ocorrendo indivíduos de uma população agrupados com indivíduos de outra (Fig. 3); o mesmo foi observado no trabalho com *E. heros* anteriormente citado (Sosa-Gómez et al. 2004). A maior similaridade

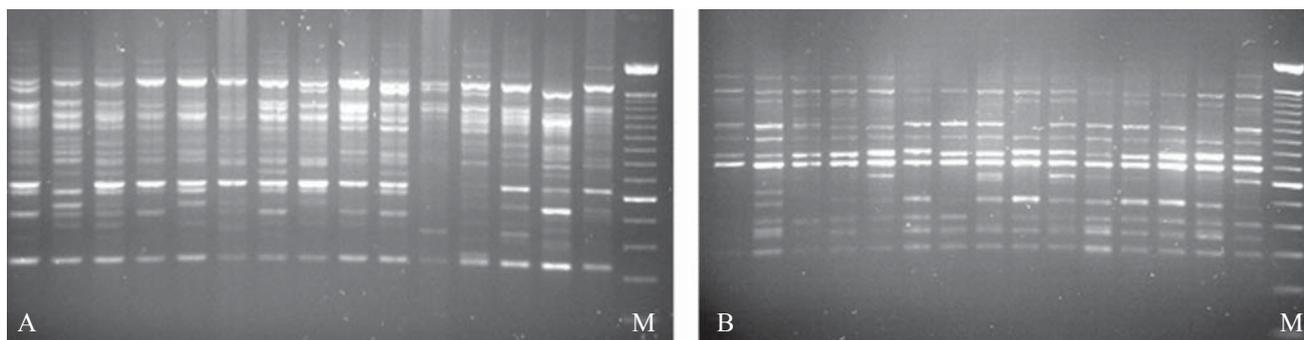


Fig. 2. Fotos ilustrativas de gel de agarose 1,5% demonstrando os padrões de bandas obtidos da amplificação com iniciadores para espécimes de *T. limbativentris*. A: iniciador OPC-09, B: OPN-01, M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®).

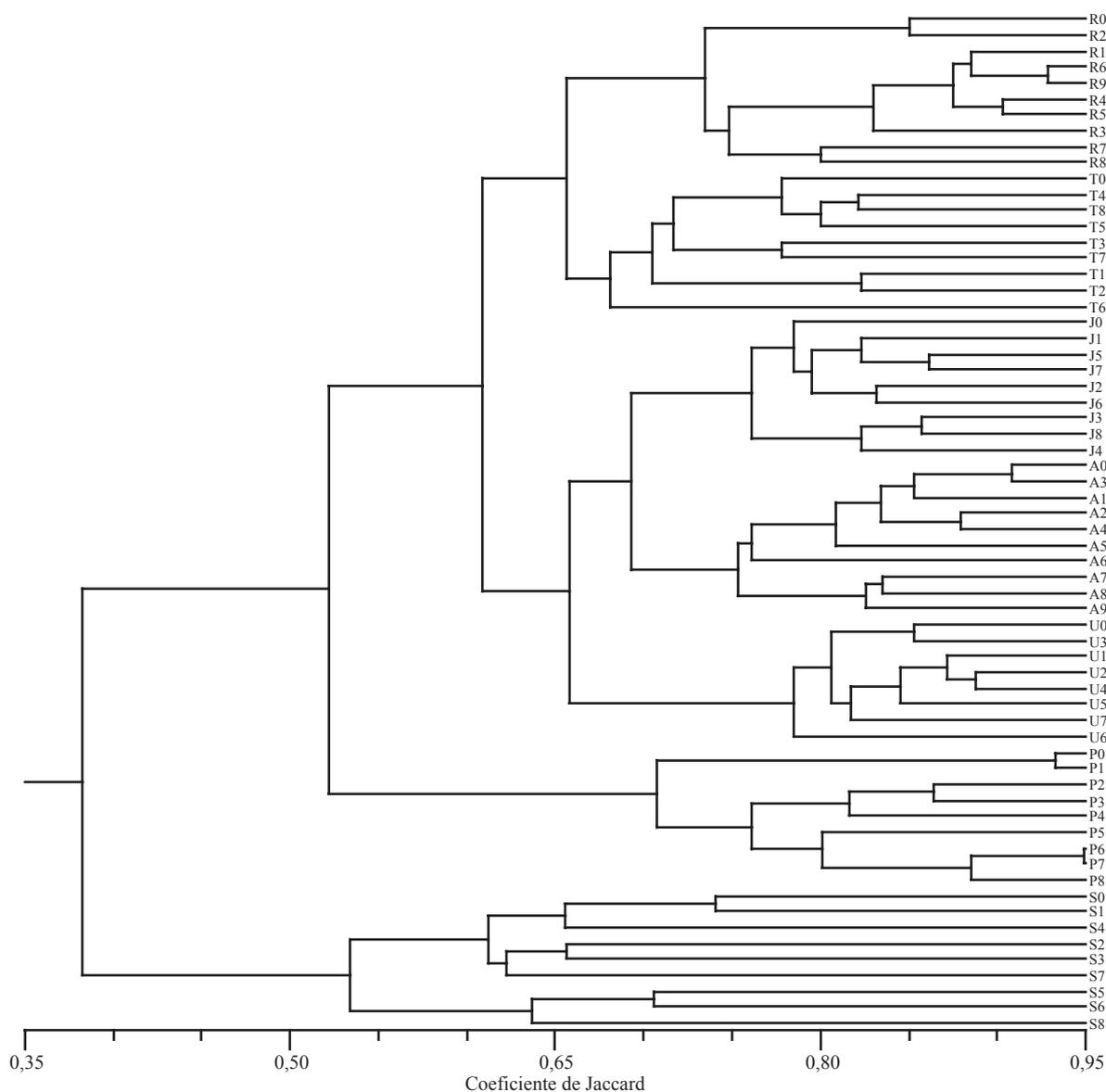


Fig. 3. Dendrograma de 64 indivíduos pertencentes a sete populações de *T. limbativentris* coletadas em lavouras arrozeiras em municípios de Santa Catarina (R - Rio do Oeste; T - Turvo; J - Joinville) e do Rio Grande do Sul (A - Agudo; U - Uruguaiana; P - Pelotas; S - Palmares do Sul). O coeficiente de Jaccard foi calculado usando a frequência alélica de marcadores RAPD, e o dendrograma foi gerado pelo método da média aritmética não-ponderada (UPGMA).

intrapopulacional foi observada entre os indivíduos de Uruguaiana, que diferiram entre si ao nível máximo de 22%, indicando tratar-se da população mais homogênea. A menor similaridade intrapopulacional foi observada entre os indivíduos de Palmares do Sul, que apresentaram similaridade próxima de 50%; além da alta heterogeneidade intrapopulacional, essa população foi a mais divergente quando da análise do clado, apresentando menos de 40% de similaridade com as outras seis populações.

A variação de similaridade intrapopulacional poderia estar relacionada à pressão de seleção a qual a população estaria submetida. Nesse contexto, o uso mais intensivo de inseticidas para o controle do percevejo em Uruguaiana, dada sua maior ocorrência na região da Fronteira Oeste (RS), estaria induzindo à seleção de indivíduos mais resistentes aos produtos mais aplicados, reduzindo a variabilidade da população. Menor pressão de seleção estaria ocorrendo em Palmares do Sul (região da Planície Costeira Externa à Lagoa dos Patos, RS) onde os índices de infestação do inseto são menores e a prática do controle químico tem sido reduzida. Essa situação justificaria a alta diversidade intrapopulacional do inseto nesse local. Pelotas (região da Zona Sul, RS) apresentou similaridade intrapopulacional de 70%. Além da seleção gerada por aplicações sucessivas de agroquímicos outros fatores poderiam estar influenciando a diversidade genética das populações, como a seleção natural, a mutação, a deriva genética e o fluxo genético (migração) (Sosa-Gómez et al. 2005).

A maior similaridade interpopulacional foi detectada entre as populações de *T. limbativentris* de Joinville (Litoral Norte Catarinense) e de Agudo (Depressão Central, RS), as quais se uniram no nível próximo de 70%. Essas populações são freqüentes em pequenas lavouras, com o máximo de 20 ha. Na região de Agudo tem sido adotado o sistema de cultivo de arroz pré-germinado, incluindo cultivares desenvolvidas em Santa Catarina. Nesse sentido, é possível que algum fator associado ao transporte de sementes entre os dois estados tenha promovido o deslocamento de indivíduos de um local a outro, aumentando sua similaridade genética. A população de Uruguaiana apresentou uma similaridade de aproximadamente 65% com essas duas. Igual nível de similaridade foi apresentado entre as populações de Rio do Oeste (região do Alto Vale do Itajaí, SC) e Turvo (região Sul, SC). Pelotas e Palmares do Sul agruparam-se isoladamente das demais populações.

Na Tabela 3 encontram-se os dados de diversidade gênica para cada população de *T. limbativentris* estudada. O polimorfismo entre as populações variou de 31% a 44%. As populações com maior número de locos polimórficos foram Turvo e Palmares do Sul (44%), as menores porcentagens foram observadas para Joinville e Uruguaiana (31%) e Agudo (32%).

A diversidade genética total (*Gst*) entre as populações de *T. limbativentris* estudadas foi de 0,5215. Nas comparações pareadas entre as populações dos diferentes pontos de coleta (Tabela 4) os maiores índices de diversidade genética foram aqueles gerados pelas comparações que incluíram Palmares do Sul e Pelotas, indicando maior diferenciação dessas populações com as demais, conforme demonstrado no cladograma gerado a partir do coeficiente de Jaccard (Fig. 3).

A estimativa média para o fluxo gênico entre as populações, medida através do número de migrantes (*Nm*) foi de 0,4588. O baixo *Nm* indica que em geral houve baixo fluxo gênico e, conseqüentemente, baixa similaridade entre as populações avaliadas.

Os maiores índices de fluxo gênico foram observados entre Turvo e Rio do Oeste (1,7538), Turvo e Agudo (1,5741), Joinville e Agudo (1,4449), Joinville e Turvo (1,4222), e Uruguaiana e Agudo (1,1405) (Tabela 4), indicando maior semelhança entre essas populações, corroborando os dados

Tabela 3. Índices de variabilidade genética (polimorfismo e diversidade genética) para populações de *T. limbativentris* coletadas em lavouras arrozzeiras de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul.

Origem da população	Nº locos polimórficos (%)	Heterozigosidade ± DP ¹
Rio do Oeste	52(34)	0,1488 ± 0,2153
Turvo	68(44)	0,1946 ± 0,2255
Joinville	49(31)	0,1332 ± 0,2017
Agudo	50(32)	0,1417 ± 0,2110
Uruguaiana	47(31)	0,1277 ± 0,2005
Palmares do Sul	68(44)	0,1774 ± 0,2131
Pelotas	53(34)	0,1364 ± 0,1973

¹Diversidade gênica segundo Nei (1973).

Tabela 4. Comparações pareadas entre populações de *T. limbativentris* de diferentes origens através do coeficiente de Nei, para estimativas de fluxo gênico (*Nm*; parte superior da tabela) e diferenciação gênica (*Gst*; parte inferior da tabela).

<i>Gst</i>	<i>Nm</i>						
	Rio do Oeste	Turvo	Joinville	Agudo	Uruguaiana	Palmares do Sul	Pelotas
Rio do Oeste	x	1,7538	0,8976	0,9162	0,6880	0,5595	0,6749
Turvo	0,2218	x	1,4222	1,5741	0,9035	0,7542	0,8488
Joinville	0,3578	0,2601	x	1,4449	0,7211	0,6112	0,5235
Agudo	0,3531	0,2411	0,2571	x	1,1405	0,7409	0,6094
Uruguaiana	0,4209	0,3562	0,4095	0,3048	x	0,6501	0,6243
Palmares do Sul	0,4719	0,3986	0,4500	0,4029	0,4347	x	0,5446
Pelotas	0,4256	0,3707	0,4885	0,4507	0,4447	0,4786	x

expressos na Fig. 3. Ademais, os valores gerados pelo coeficiente de Jaccard indicam que essas cinco populações apresentaram alta similaridade entre si, maior que a similaridade interna de cada população. Em contraposição, os menores fluxos gênicos foram apresentados entre as populações de Palmares do Sul e Pelotas (0,5446) e Joinville e Pelotas (0,5235) (Tabela 4), ainda em consonância com o apresentado na Fig. 3. Dessa forma, quanto menor o fluxo gênico, maior a diversidade existente entre as populações.

O fluxo gênico ($Nm = 0,8307$) entre as populações de *E. heros* (Sosa-Gómez *et al.* 2004) foi maior que o encontrado para *T. limbativentris* ($Nm = 0,4588$), o que demonstra menor similaridade entre as populações do percevejo-do-colmo e conseqüentemente menor troca de características genéticas entre elas. O Nm para populações de *A. gemmatalis* foi igual a 3,055 e, de acordo com os autores, a grande capacidade de vôo desse lepidóptero explicaria a alta similaridade entre as populações, já que as distâncias geográficas entre as populações eram grandes (Sosa-Gómez 2004). Busato *et al.* (2004) avaliaram a diversidade genética de *S. frugiperda* com marcadores AFLP, constatando que as populações estudadas não diferiram entre si, ocorrendo a sobreposição de indivíduos de diferentes populações na cultura do arroz e/ou milho.

Conhece-se pouco sobre o comportamento de migração dos percevejos em geral. Assim, a origem e frequência de possíveis migrações não são conhecidas para as espécies de insetos-praga ocorrentes nas diversas culturas no Brasil. A ocorrência de *T. limbativentris* concentra-se nas regiões tropicais e subtropicais da América, sendo incidente na maioria das regiões onde a cultura do arroz está presente. Apresenta alta adaptabilidade para diferentes condições de clima e topografia. O contrário pode ser observado para outros pentatomídeos incidentes na cultura da soja, por exemplo, que ocorrem em lavouras por todo mundo.

A capacidade de vôo dos pentatomídeos é reduzida, o que implica em padrões de migração curtos, durante o ciclo da cultura em que o inseto é incidente, considerando que durante a hibernação (presente na maioria das espécies) os insetos permanecem agrupados e não se dispersam (Sosa-Gómez *et al.* 2004).

De acordo com Costa & Link (1992), o percevejo-do-colmo apresenta dois modelos de distribuição nos arrozais: (i) Poisson (ao acaso), no qual os insetos entram nas lavouras logo após a hibernação; e (ii) agregada ou binomial negativa, no qual a população inicial é acrescida dos descendentes; ambos demonstram a permanência dos insetos nas proximidades das lavouras. Considerando a baixa capacidade de deslocamento, caracterizada apenas por vôos curtos para a busca de alimento e abrigo para hibernação, a migração do inseto deve se dar por outros fatores que não biológicos; um desses fatores é provavelmente a interferência antrópica, já que o inseto apresenta alta sobrevivência em condições adversas, inclusive durante o transporte a longas distâncias. Essa suposição poderia explicar a alta similaridade calculada (Fig. 3) entre algumas das populações analisadas neste trabalho, particularmente aquelas que se situam em pontos de coleta geograficamente distantes, como por exemplo, Agudo e Joinville.

De acordo com os resultados obtidos por Sosa-Gómez *et al.* (2004) para *E. heros*, a distância genética entre

as populações foi diretamente relacionada à distância geográfica entre os pontos de coleta. Essa relação não foi observada para os resultados obtidos na diferenciação entre populações de *T. limbativentris*, onde algumas populações que se agruparam com alta similaridade apresentaram grandes distâncias geográficas (Fig. 4) podem ser constatadas entre; por exemplo, Joinville e Uruguaiana, que formaram um clado com similaridade superior a 65% e no entanto a distância geográfica entre esses municípios é a maior. Para estudos com lepidópteros, o agrupamento de populações geograficamente distantes tem sido relatado na literatura, pois esses insetos geralmente apresentam alta capacidade de vôo e realizam migrações que suprem as populações de novos alelos, ampliando a variabilidade genética.

As diferenciações observadas entre as populações de *T. limbativentris* estudadas evidenciam que mesmo com alta similaridade entre algumas populações, não ocorreu sobreposição entre elas, indicando que cada população é única. Todas as regiões avaliadas (Fig. 4), principalmente no Rio Grande do Sul apresentam grandes distâncias geográficas e estão inseridas em regiões de topografia distintas. A população de Palmares do Sul, por exemplo, consta como a mais distinta e heterogênea entre todas as demais utilizadas, estando inserida na região da Planície Costeira Externa à Lagoa dos Patos, isolada, portanto, das demais regiões orizícolas por esse acidente geográfico. Esse isolamento poderia condicionar uma população com grande variabilidade genética interpopulacional.

A pressão de seleção diminui a variabilidade genética das espécies, selecionando os indivíduos mais adaptados aos fatores bióticos e abióticos presentes no ambiente em que estão inseridos. Esse fato foi demonstrado para *S. frugiperda*, que teve a maior similaridade genética entre os indivíduos provenientes de uma mesma planta hospedeira (Drès & Mallet 2002, Busato *et al.* 2004). Assim, a baixa variabilidade genética entre diferentes populações estaria relacionada ao alto fluxo gênico, às mudanças de comportamento e, também, à pressão de seleção exercida sobre a população, que selecionariam indivíduos mais resistentes às variações de clima, fonte alimentar, ação de parasitoides, patógenos e inseticidas químicos, isolando um grupo de indivíduos geneticamente similar e mais adaptado ao ambiente (Takami *et al.* 2004)

Os marcadores RAPD utilizados foram eficientes na diferenciação genética preliminar das populações de *T. limbativentris*, no entanto, estudos adicionais com marcadores moleculares mais específicos são necessários para compreender melhor como se dá a distribuição dessa espécie. A identificação de regiões de importância dentro do genoma através de microssatélites, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e seqüenciamento, permitiriam avaliar diferenças de indivíduos dentro e entre as populações, subsidiando estudos para detecção da origem e quais os padrões de migração e dispersão que a espécie obedece em relação ao ambiente em que está inserida. Estudos comportamentais relacionados aos fatores ecológicos e de dispersão da espécie poderiam caracterizar quais os aspectos ligados à presença do inseto nas diferentes regiões produtoras de arroz, evidenciando qual a principal fonte de variabilidade genética para as populações dessa espécie.



	Rio do Oeste	Turvo	Joinville	Agudo	Uruguaiana	Palmares do Sul	Pelotas
R - Rio do Oeste	x						
T - Turvo	188	x					
J - Joinville	131	296	x				
A - Agudo	438	360	568	x			
U - Uruguaiana	791	736	913	376	x		
S - Palmares do Sul	348	171	465	282	643	x	
P - Pelotas	544	387	670	246	502	222	x

¹Distâncias calculadas pela Epagri/Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de SC.

Fig. 4. Mapa esquemático de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul e distâncias geográficas da localização dos pontos de coleta das populações de *T. limbativentris*.

Agradecimentos

À Epagri e Embrapa Clima Temperado pelas facilidades concedidas quando da realização dessa pesquisa em seus laboratórios. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos à primeira autora.

Referências

- Azambuja, I.H.V., F. de J. Verneti Jr. & A.M. de Magalhães Jr. 2004. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz, p.23-44. In A. da S. Gomes & A.M. de Magalhães Jr. (eds.), Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 899p.
- Belshaw, R. & D.L.J. Quicke. 1997. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Mol. Phylo. Evol.* 7: 281-293.
- Botton, M., J.F. da S. Martins, A.E. Loeck & M.d'Á. Rosenthal. 1996. Biologia de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 em plantas de arroz. *An. Soc. Entomol. Brasil* 25: 21-26.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, A.C. de Oliveira, E.A. Vieira, P.D. Zimmer, M.M. Kopp, J. de M. Bandeira & T.R. Magalhães. 2004. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. *Neotrop. Entomol.* 33: 709-716.
- Carvalho, A.O.R. de & L.G.E. Vieira. 2001. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens*

- rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). Neotrop. Entomol. 30: 593-600.
- Chandrasekhar, N., T.V. Sajeev, V.V. Sudheendrakumar & M. Banerjee. 2005. Population dynamics of the teak defoliator (*Hyblaea puera* Cramer) in Nilambur teak plantations using Randomly amplified gene encoding primers (RAGEP). BMC Ecology. Disponível online: www.biomedcentral.com/1472-6785/5/1.
- Costa, E.C. & D. Link. 1992. Dispersão de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em arroz irrigado. An. Soc. Entomol. Brasil 21: 197-202.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Drès, M. & J. Mallet. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. Phil. Trans. Biol. Sci. 357: 471-492.
- EPAGRI. Sistema de produção de arroz irrigado em Santa Catarina. (Pré-germinado). 1998. Florianópolis, Epagri, 79p. (Sistemas de Produção, 32).
- Ferreira, E., F.J.P. Zimmermann, A.B. Santos & B.P.O. Neves. 1997. O percevejo-do-colmo na cultura do arroz. Goiânia, Embrapa-CNAF, 43p. (Documentos, 75)
- Grützmacher, D.D. 2003. Aspectos morfológicos, moleculares e edafoclimáticos relacionados às formigas cortadeiras no Rio Grande do Sul. Tese de doutorado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas, 161p.
- Lopes-da-Silva, M., G.E.L. Tonet & L.G.E. Vieira. 2004. Characterization and genetic relationships among Brazilian biotypes of *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) using RAPD markers. Neotrop. Entomol. 33: 043-049.
- Martins, J.F. da S., A.D. Grützmacher & U.S. da Cunha. 2004a. Descrição e manejo integrado de insetos-praga em arroz irrigado, p.635- 675. In A. da S. Gomes & A.M. de Magalhães Jr. (eds.), Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 899p.
- Martins, J.F. da S., M. Botton, J.J. Carbonari & E.D. Quintela. 2004b. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. Ciên. Rural 34: 1681-1688.
- Oliveira, C.M., M.H.P. Fungaro, L.E.A. Camargo & J.R.S. Lopes. 2002. Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. Neotrop. Entomol. 31: 225-231.
- Olerup, O. & H. Zetterquist. 1994. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primer (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tis. Antigens 39: 225-235.
- Prado, H.F., H. Kalvelage & R.A. Ferreira. 1993. Ciclo de vida de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. Revta Bras. Ent. 37: 335-339.
- Rholf, F.J. 2000. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2,0 Exeter Software Setauket, New York, 31p.
- Saghai-Marrof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen & R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 8014-8018.
- Sambrook, J. & E.F. Fritsch. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Laboratory, 9.16-9.23.
- Silva, C.C.A., D.M. Cordeiro, R. Laumann, M.C.B. Moraes, J.A. Barrigossi & M. Borges. 2004. Ciclo de vida e metodologia de criação de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Heteroptera: Pentatomidae) para estudos de ecologia química. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 16p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento)
- Sósa-Gómez, D.R. 2004. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Genet. Mol. Biol. 27: 378-384.
- Sosa-Gómez, D.R., J.J. da Silva, F. Costa, E. Binneck, S.R.R. Marin & A.L. Nepomuceno. 2005. Population structure of the Brazilian southern Green stink bug, *Nezara viridula*. J. Insect Sci. Disponível in: <www.insectscience.org> acesso em: 20 de março de 2007.
- Sósa-Gómez, D.R., K.E. Delpin, A.M.R. Almeida & E. Hirose. 2004. Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. Neotrop. Entomol. 33: 179-187
- Takami, Y., C. Koshio, M. Ishii & H. Fujii. 2004. Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. Mol. Ecol. 13: 245-258.
- Tcacenco, F.A., A. Ferreira, L.A.T. de Mattos & A.C. de Oliveira. 2005. Análise da diversidade genética de genótipos e acessos de arroz irrigado do Banco de Germoplasma da Epagri por AFLP. Rev. Agropec. Catarin. 18: 81-85.
- Wang, C., M.A. Typas & T.M. Butt. 2002. Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol. Lett. 213: 251-255.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18: 6531-6535.
- Welsh, J. & M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Res. 18: 7213-7218.
- Yeh, F.C. & T.B.J. Boyle. 1997. POPGENE Microsoft Windows-based software for populations genetic analysis. A joint project development by Francis C. Yeh, University of Alberta and Tim Boyle, Center for international Forestry Research, Bogor, Indonesia, 29p.