

Identificação e Caracterização de Isolado Brasileiro do Vírus de Poliedrose Nuclear da Lagarta do Cartucho-do-Milho

Andréia O. Gerk¹, Elliot W. Kitajima² e Marlinda L. Souza³

¹UGA, Department of Entomology, 413 BioSciences Bldg., Athens, GA, 30602-2603.

²ESALQ/USP, Microscopia Eletrônica, Avenida Pádua Dias, 11,
Caixa postal 09, 13.418-900, Piracicaba, SP.

³Embrapa/CENARGEN, ACB, Laboratório de Virologia, SAIN Parque Rural,
Caixa postal 02372, 70.730-975, Brasília, DF.

An. Soc. Entomol. Brasil 26(3): 507-515 (1997)

Identification and Characterization of a Brazilian Isolate of Fall Armyworm Nuclear Polyhedrosis Virus

ABSTRACT - A nuclear polyhedrosis virus (NPV) from *Spodoptera frugiperda* (Smith) caterpillars (Lepidoptera: Noctuidae), collected from diseased insects in Sete Lagoas, MG, was confirmed and identified. The pathology of infected caterpillars is characteristic of NPV. The virus showed tropism by ectoderm cells, fat cells, and tracheocytes. Viral particles (polyhedra and alkali released virions - ARVs) were purified through differential centrifugations in sucrose gradient, and the polyhedral band was located in the inferior third part of the tube. Increasing time of polyhedral digestion with alkaline solution resulted in higher dissolution of occluded bodies (polyhedra) consequently releasing virions. Five bands were formed for the alkali released virions. The electrophoretic pattern of *S. frugiperda* NPV was compared to the one of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) NPV for polyhedra as well as ARVs. A peptide of 32,000 dalton was characterized as the polyhedrin of *S. frugiperda* NPV.

KEY WORDS: Insecta, *Spodoptera frugiperda*, baculovirus.

RESUMO - Foi confirmada a identificação de um vírus de poliedrose nuclear (VPN) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), coletado de lagartas infectadas em Sete Lagoas, MG. A patologia de lagartas infectadas é característica de VPN. O vírus apresentou tropismo por células da ectoderme, células adiposas e de traqueócitos. Partículas virais (poliedros e vírions liberados por álcali - ARVs) foram purificadas a partir de centrifugações diferenciais em gradientes de sacarose e a banda de poliedros situou-se no terço inferior do tubo. Quanto maior o tempo de digestão dos poliedros, com solução alcalina, maior a dissolução dos corpos de inclusão (poliedros), com consequente liberação de vírions. Houve a formação de cinco bandas nítidas de vírions liberados por álcali. O perfil eletroforético do VPN de *S. frugiperda* foi comparado ao perfil do VPN de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), tanto para poliedros como para ARVs. Um peptídeo de 32.000 dalton foi caracterizado como a poliedrina do VPN de *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, *Spodoptera frugiperda*, baculovírus.

No Brasil, a ocorrência de vírus de poliedrose nuclear (VPN) em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) foi detectada em 1978 (C.F. Andrade, não publicado). VPNs ocorrendo em lagartas de *S. frugiperda* foram relatados (F. Moscardi & G.H. Kastelic, não publicado) e identificados e purificados por Valicente *et al.* (1989). Garcia (1979) estudou a eficiência de fatores bióticos e abióticos na regulação populacional de *S. frugiperda*, tendo o VPN se mostrado como um agente promissor para programas de controle da praga. A aplicação a campo do VPN, através da água de irrigação, causou mortalidade superior a 50% em *S. frugiperda* possibilitando a ocorrência de parasitoides nas lagartas amostradas (Valicente & Cruz 1991, Valicente & Costa 1995).

O grupo dos VPNs está incluído na família Baculoviridae e isolados têm sido obtidos de Neuroptera, Trichoptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera (Tinsley & Kelly 1985), além de Thysanura e Homoptera (Federici 1986). Nos Estados Unidos, entre os VPNs que têm sido registrados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA - Environmental Protection Agency) encontram-se aqueles isolados de espécies de *Heliothis* e de *Helicoverpa*, *Lymantria dispar* (L.), *Orgyia pseudotsugata* (McDunnough) e *Neodiprion sertifer* (Geoffroy). No entanto, mesmo os VPNs registrados não estão comercialmente disponíveis. As razões são complexas, mas basicamente incluem a contínua disponibilidade de produtos químicos sintéticos, mais baratos e de largo espectro para controle de pragas, mercado limitado e, portanto, lucro reduzido e, questionável eficiência. Em países onde o procedimento para registro é menos complexo e mais barato e o custo da mão-de-obra é baixo, VPNs são frequentemente utilizados para o controle de lepidópteros-praga de hortaliças e de outras culturas. Exemplos incluem o uso do VPN de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) em soja (*Glycine max*) no Brasil, VPN de *Spodoptera exigua* (Hübner) em hortaliças no Sudeste Asiático, especialmente na Tailândia, outros

VPNs de *Spodoptera* em várias culturas na América Central e no Meio-Oeste dos EUA, e VPN de *Heliothis armigera* (Hübner) em algodão (*Gossypium hirsutum*) na China (Federici 1993).

Contudo, duas das mais significantes limitações do emprego de inseticidas virais convencionais são a relativamente lenta velocidade para causar a morte do hospedeiro e a estreita faixa de hospedeiros desses agentes. Com a tecnologia do DNA recombinante, novas perspectivas têm surgido para aumentar a eficiência dos inseticidas virais. Almeja-se desenvolver vírus de atuação em um largo espectro de hospedeiros e que provocarão a cessação da alimentação larval dentro de 24 a 48 h após a infecção. Isto tem sido obtido através da engenharia genética de vírus para aumentar a patogênese e a virulência através da expressão de proteínas, tais como enzimas ou hormônios que suprimem o metabolismo larval, neurotoxinas que paralizam ou matam o inseto diretamente, ou através da eliminação de genes virais que atrasam a morte do hospedeiro (Federici 1993, Vlak 1993, Cory *et al.* 1994, Wood *et al.* 1994, Gopalakrishnan *et al.* 1995, Miller 1995, Lee *et al.* 1997).

Este trabalho visou a caracterização morfológica e a análise bioquímica de um baculovírus encontrado no campo, infectando lagartas de *S. frugiperda* no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (Embrapa), em Sete Lagoas, MG.

Material e Métodos

As lagartas de *S. frugiperda* foram provenientes do laboratório de Criação de Insetos do CENARGEN/Embrapa, onde eram mantidas em dieta artificial a 26°C, com fotofase de 14 h. O inóculo inicial do isolado de vírus utilizado foi originalmente obtido, a campo, de lagartas de *S. frugiperda*, em Sete Lagoas, MG, pelo Dr. F. H. Valicente (Embrapa). Lagartas com sintoma de infecção foram maceradas com água destilada e o líquido resultante coado em gaze. A purificação do vírus foi feita através de

centrifugações diferenciais, em gradientes de sacarose.

Lagartas de 3º e 4º ínstar foram mantidas em copos de plástico (50ml) vedados com tampas de acrílico, após pulverização de uma suspensão viral, contendo aproximadamente 2×10^6 a 8×10^6 poliedros/ml, diretamente na dieta artificial. A medida em que as lagartas iam morrendo, foram colocadas em congelador, por 24h, para facilitar a coleta, pois, normalmente, o corpo da lagarta se liquefaz em pouco tempo, havendo muita perda de material. O acondicionamento posterior foi feito a -20°C , até o uso nos estudos propostos.

Análise Ultraestrutural da Infecção.

Lagartas infectadas foram dissecadas sob lupa, cinco dias após a inoculação, removendo-se parte do tubo digestivo, além da ectoderma e dos tecidos muscular e adiposo adjacentes. Os tecidos foram fixados (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2), lavados com tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2 e pós-fixados em tampão cacodilato 0,1M, contendo 1% de tetróxido de ósmio, por duas horas. Após lavagem com água destilada, o material foi imerso em solução de acetato de uranila 0,5% por, aproximadamente, 14h. A desidratação foi feita por passagem em acetona (50, 70, 90 e 100%), por 15min para cada etapa e quatro vezes com acetona 100%. O material foi colocado em cápsulas para emblocar com acetona/*Spurr* (1:1) por, aproximadamente, 2 a 4h e, em seguida, colocado *Spurr* por, aproximadamente, 14h. Após esse período, o *Spurr* foi trocado e o material colocado em estufa a $70-75^\circ\text{C}$, durante 72h, para polimerizar. Secções ultrafinas foram obtidas em ultramicrótomo (LKB Ultratome I I I), equipado com navalha de diamante e examinadas ao microscópio eletrônico (JEOL JEM 100C), após contraste com acetato de uranila 3,5% e citrato de chumbo de Reynold.

Purificação de Poliedros e Víriões Liberados por Álcali (ARVs). Utilizou-se o

método descrito por Maruniak (1986), com pequenas modificações. Lagartas infectadas, mortas, coletadas entre o 7º e o 8º dias após a infecção, foram colocadas num homogeneizador (Du Pont Sorvall Omni-Mixer 17105), sendo adicionados 100ml de tampão de homogeneização (1% ácido ascórbico; 2% SDS; 0,01M Tris, pH 7,8; 0,001M EDTA), agitadas por 5min e depois filtradas em gaze contendo lã de vidro. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 15min (Ultracentrífuga Sorvall-RC-5B, Rotor SS-34). O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 10ml de Tris-EDTA (0,01M Tris, pH 7,8; 0,0001M EDTA), sendo sonicado (Ultrassom Virsonic - Cell Disrupter-Model 16-850 - intensidade 35) por 30s, com interrupção de 30s e novamente sonicado. Fez-se uma segunda centrifugação a 12.000 rpm, por 10min (Rotor Sorvall SS-34), sendo o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em Tris-EDTA. Seguiu-se à aplicação do material no topo do gradiente linear de sacarose de 1,17-1,30g/ml na relação de, aproximadamente, 150mg do extrato por gradiente (volume do gradiente = 30ml). Efetuou-se, então, uma centrifugação a 27.000 rpm por 30min (Ultracentrífuga Sorvall, Rotor AH 627), resultando na formação de uma nítida banda de poliedros, que foi coletada com pipeta Pasteur. Os poliedros foram diluídos com Tris-EDTA (relação 1:4) e centrifugados a 12.000 rpm, por 10min (Rotor Sorvall SS-34). O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo os poliedros, foi suspenso em 2 a 5ml de água destilada e estocado a -20°C .

Na purificação de víriões liberados por álcali, para efeitos de comparação, metade da amostra foi inativada a $70-77^\circ\text{C}$, por 1h e a outra metade deixada à temperatura ambiente. Os poliedros foram então solubilizados após adição, do correspondente à metade do seu volume, de solução alcalina 3X, pH 10,9 (0,3M carbonato de sódio; 0,5M NaCl; 0,03M EDTA), durante 30min à temperatura ambiente. Procedeu-se à aplicação no topo do gradiente linear de sacarose de 1,17-1,26 g/ml, seguida por centrifugação a 24.000 rpm,

por 1h a 4°C (Ultracentrífuga Sorvall - Rotor AH 627). As bandas contendo os ARVs (vírions liberados por álcali) foram coletadas com pipeta Pasteur e diluídas com Tris-EDTA (0,01M Tris, pH 7,8; 0,001M EDTA). Essas bandas de ARVs foram centrifugadas a 24.000 rpm por 30min (Rotor Sorvall AH 627), com o sobrenadante sendo descartado e o precipitado suspenso em 100ml de Tris-EDTA, para estocagem a 4°C.

Análise das Proteínas Estruturais das Partículas Virais, Através de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS. Cem ml de cada amostra (poliedros estocados em água e ARVs suspensos em Tris-EDTA) foram diluídos, numa relação 1:1, com tampão de amostra 2X (0,01M Tris, pH 7,8; 0,001M EDTA; SDS 8%; Glicerol 40%; b-Mercaptoetanol 20% e azul de bromofenol 0,01%) e aquecidos em água fervente por 2 a 3min. Para análise comparativa das proteínas virais, foram utilizados poliedros e ARVs de *Baculovirus anticarsia* (VPN de *A. gemmatalis*) cedidos pelo CENARGEN/Embrapa. A eletroforese processou-se em placas de vidro, em gel de poliacrilamida-SDS, utilizando-se um gel concentrador 5% e gel de corrida 15% (Laemmli 1970). A corrida foi feita em tampão de eletroforese, pH 8,3 à temperatura ambiente, a 80V durante a migração das amostras no gel concentrador e a 120V até que a frente de migração estivesse a 3cm do final da placa. O gel foi fixado e corado com uma solução de metanol 40%; ácido acético 7,5%; "Coomassie Brilliant Blue R-250" 0,05%, durante aproximadamente 14h e descorado, em seguida, com metanol 40% e ácido acético 7,5%. Para coloração com Prata, seguiu-se o procedimento de Boulikas & Hancock (1981).

Resultados e Discussão

Multiplificação do Vírus. As lagartas de *S. frugiperda* infectadas pelo baculovírus caracterizaram-se por apresentar manchas amarelas no corpo, lenta perda de apetite e oleosidade na epiderme. Num estágio mais

avanzado da doença, a epiderme torna-se frágil, rompendo-se com facilidade e havendo liberação de um fluido leitoso, com milhares de poliedros do VPN e tendência de lagartas infectadas procurarem o ponto mais alto disponível, um fenômeno comum a vários VPNs (Tanada & Kaya 1993).

Análise Ultraestrutural da Infecção. Grande número de massas densas, intranucleares, de perfil poligonal (0,5 a 2mm de diâmetro), foram consistentemente encontradas nas células da ectoderme, células adiposas e de traqueócitos. Contudo, raramente foram observadas em tecido muscular e no tubo digestivo. Essas massas densas, identificadas como poliedros do VPN, exibiam um padrão paracristalino e apresentavam, nelas ocluídas, partículas baciliformes envolvidas por uma membrana comum, caracterizando este vírus como um vírus de poliedrose múltipla nuclear (VPMN). Além dos poliedros, os núcleos continham, frequentemente, uma matriz amorfa, similar ao referido como estroma virogênico, partículas livres e, eventualmente, massas alongadas, densas e paracristalinas, provavelmente p10 (van Oers et al. 1993, 1994). Estas ocasionalmente apareciam no citoplasma. A proteína p10 tem papel na lise celular, interferindo na liberação do poliedro por células infectadas. Em algumas células, foram notadas partículas baciliformes não ocluídas, associadas à membrana basal ou a dobras da membrana plasmática, possivelmente em processo de penetração (Figs. 1a,b,c,d; 2a,b). As características apresentadas pelas células infectadas e os tecidos onde ocorreu a proliferação das partículas virais estão de acordo com o padrão de infecção e com os tropismos por tecidos apresentados pelos VPNs (Federici 1993, Tanada & Kaya 1993).

Purificação de Poliedros e Vírions Liberados por Álcali (ARVs). A banda de poliedros formada, após centrifugação em gradiente linear de sacarose (1,17-1,30g/ml), situou-se no terço inferior do tubo. A

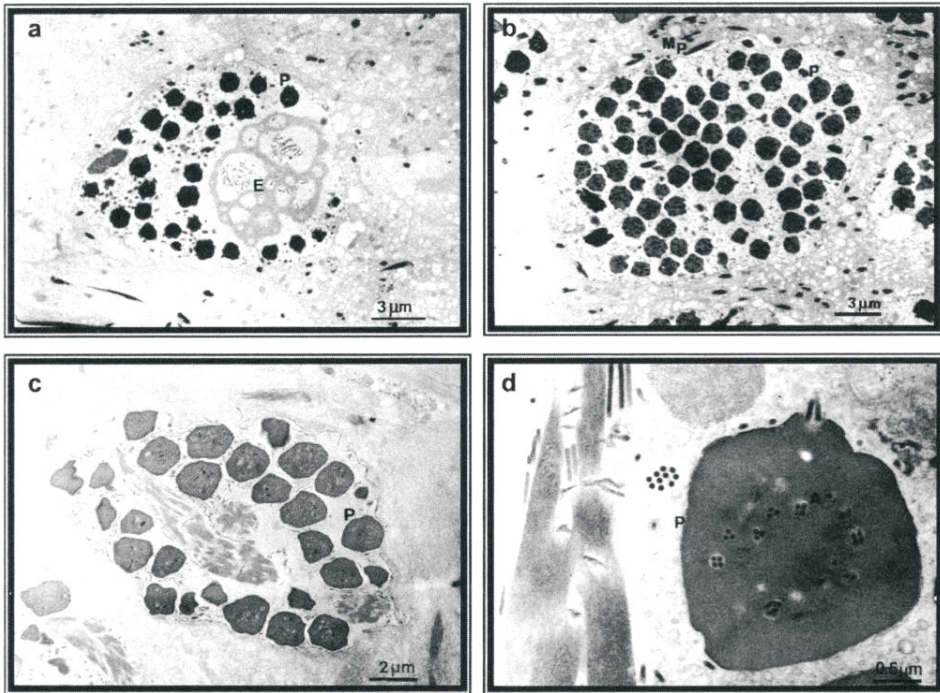


Figura 1. Análise ultraestrutural da infecção de lagartas de *Spodoptera frugiperda* por seu VPN. a, b, c - Detalhe de núcleos na ectoderme contendo poliedros. Em a, além dos poliedros, o núcleo apresenta um estroma virogênico bastante desenvolvido. d - Detalhe de um poliedro contendo várias partículas baciliformes. A membrana envoltória dessas partículas pode conter vários nucleocapsídeos, caracterizando este VPN como do tipo: “multiple-enveloped” (MENPV). P = poliedro; E = estroma virogênico; Mp = massa paracristalina; A = vários nucleocapsídeos por envelope. (Fotos: E.W. Kitajima).

purificação de poliedros resultou num alto grau de pureza, que pode ser comprovado através da análise de micrografia eletrônica (Fig. 2c). Os poliedros aparecem como partículas densas e escuras, devido à técnica empregada (contraste negativo). Os corpos de inclusão obtidos por purificação são muito estáveis, resistentes ao calor e a muitos agentes químicos, incluindo baixo pH. São insolúveis em água, mas dissolvidos prontamente em soluções aquosas de NaOH, KOH, H₂SO₄ e CH₃COOH (Smith 1976). Durante a solubilização dos poliedros com solução alcalina, observou-se que à medida

em que aumentava o tempo de digestão dos poliedros, com solução alcalina, houve uma maior dissolução dos corpos de inclusão (poliedros), com consequente liberação de vírions (ARVs). Após centrifugação em gradiente linear de sacarose (1,17-1,26g/ml), para a purificação de ARVs, detectou-se a presença de cinco bandas nítidas, cuja distribuição está relacionada com o número de nucleocapsídeos por envelope. A etapa de 70°C na purificação de ARVs é importante para a inativação de proteases alcalinas, provenientes das lagartas infectadas, responsáveis pela degradação da poliedrina.

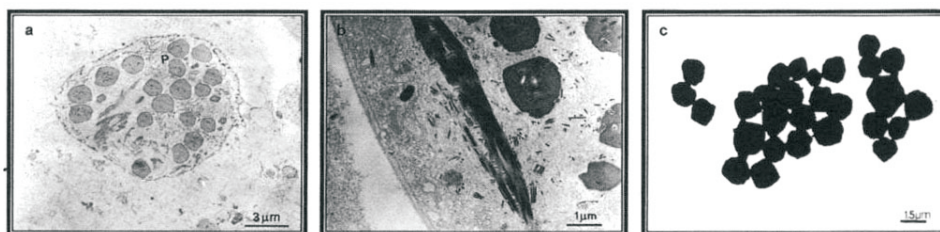


Figura 2. Análise ultraestrutural da infecção. a. Presença de núcleos contendo poliedros nas células adiposas; b. Parte de um traqueócito infectado pelo SfMNPV. Detalhe de uma massa paracristalina alongada e densa e de alguns poliedros; e, c. Poliedros purificados a partir de lagartas de *Spodoptera frugiperda* infectadas por SfMNPV. P = poliedro; Mp = massa paracristalina. (Fotos: E.W. Kitajima).

Yamafuji *et al.* (1958) mostraram que as proteases do vírus e do hospedeiro eram ativadas sob condições alcalinas, com ótima atividade próxima ao pH 10,6 e que temperaturas acima de 70°C inativavam as proteases. Estudos posteriores de Yamafuji *et al.* (1960) revelaram que, aparentemente, maior atividade das proteases era associada com partículas virais do que com a poliedrina e sugeriram que havia a degradação de componentes virais. A presença de uma protease que degradava poliedrina, quando ativada ao pH 10,5-11, durante a solubilização do poliedro, foi documentada (Yamafuji *et al.* 1958, 1960, Summers 1975).

Análise das Proteínas Estruturais das Partículas Virais, Através de Eletroforese em Géis de Poliacrilamida-SDS. O perfil eletroforético das proteínas de poliedros de AgMNPV (baculovírus de *A. gemmatilis*) e SfMNPV (baculovírus de *S. frugiperda*), tratados ou não para inativação da protease, é apresentado na Fig. 3. A coloração com

“Coomassie Blue” (Fig. 3a) revelou uma forte banda presente nas partículas de AgMNPV, com peso molecular de 33.000 e uma banda fraca, um pouco abaixo, com 31.000 dalton (Fig. 3a, colunas 2 e 3). Com relação aos poliedros de SfMNPV, evidenciou-se uma nítida banda de 32.000 dalton (Fig. 3a, colunas 5 e 6). Bandas com pesos moleculares abaixo de 30.000 também foram detectadas, embora se mostrassem pouco nítidas, tanto para poliedros de AgMNPV quanto de SfMNPV. Uma melhor visualização das bandas foi feita após coloração com nitrato de prata (Fig. 3b). Proteínas na região de 15.500 a 24.000 dalton mostraram-se presentes, tanto em poliedros de AgMNPV não inativados (Fig. 3b, coluna 2) quanto nos tratados para inativação da protease (Fig. 3b, coluna 3), bem como as proteínas de 31.000 e 33.000 dalton, descritas anteriormente. Resultado similar foi obtido para poliedros de SfMNPV não tratados (Fig. 3b, coluna 5) ou tratados (Fig. 3b, coluna 6), detectando-se proteínas de peso molecular variando entre 14.500 e 28.000 dalton, bem

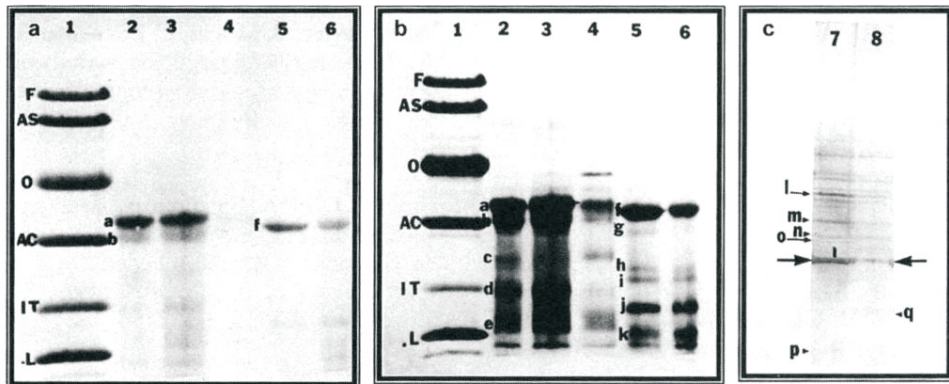


Figura 3. Perfis eletroforéticos. a. Coloração com "Coomassie Blue"; b. e c. Coloração com Nitrato de Prata. 1. Marcadores; 2. Poliedros de AgMNPV não inativados; 3. Poliedros de AgMNPV inativados; 4. ARVs de AgMNPV; 5. Poliedros de SfMNPV não inativados; 6. Poliedros de SfMNPV inativados; 7. ARVs de SfMNPV não inativados; 8. ARVs de SfMNPV inativados. As setas grossas indicam poliedrina como contaminante. Proteínas (Peso Molecular): F - Fosforilase B (94.000); AS - Albumina Sérica Bovina (67.000); O - Ovalbumina (43.000); AC - Anidrase Carbônica (30.000); IT - Inibidor da Tripsina da Soja (20.100); L - μ -Lactoalbumina (14.400); a. 33.000 (poliedrina AgMNPV); b. 31.100; c. 24.800; d. 19.700; e. 15.500; f. 32.000 (poliedrina SfMNPV); g. 28.800; h. 22.000; i. 21.000; j. 17.000; k. 14.500; l. 45.500; m. 39.800; n. 35.900; o. 34.300; p. 18.600; q. 23.600. (Fotos: Eliana Santana - CENARGEN/Embrapa).

como a de 32.000, já descrita. A análise de ARVs de SfMNPV não inativados (Fig. 3c, coluna 7) e inativados (Fig. 3c, coluna 8) revelou a presença de algumas bandas nítidas, com pesos moleculares de 35.900, 39.800 e 45.500, em ambas as frações. Entretanto, uma banda de peso molecular 23.600 esteve presente apenas nos ARVs inativados (Fig. 3c, coluna 8) e bandas de pesos moleculares 18.600 e 34.300 apareceram apenas nos não-inativados (Fig. 3c, coluna 7). O tratamento para inativação da protease, que degrada a poliedrina, não resultou em modificação do perfil eletroforético das proteínas das partículas virais. Sabe-se que a poliedrina de diversos baculovírus varia entre 28.000 e

33.000 dalton (Summers & Smith 1978). A proteína de 33.000 dalton, do AgMNPV, e a proteína de 32.000 dalton, do SfMNPV, são, presumivelmente, poliedrinas, por se encontrarem em maiores concentrações e possuírem peso molecular característico desse grupo de proteínas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Iniciação Científica concedida. Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília e ao Laboratório de Virologia da Área de Controle Biológico do

CENARGEN/Embrapa, pela utilização de seus equipamentos, reagentes e instalações. Ao Prof. Bergman Ribeiro, da Universidade de Brasília, pela apreciação crítica do trabalho.

Literatura Citada

- Boulikas, T. & R. Hancock. 1981.** A highly sensitive technique for staining DNA and RNA in polyacrilamide gels using silver. *J. Bioch. Biop. Met.* 5: 219-228.
- Cory, J.S., M.L. Hirst, T. Williams, R.S. Hails, D. Goulson, B.M. Green, T.M. Carty, R.D. Possee, P.J. Cayley & D.H.L. Bishop. 1994.** Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* 370: 138-140.
- Federici, B. A. 1986.** Ultrastructure of baculoviruses, p. 61-88. In: Granados, R.R. & B.A. Federici (eds.). *The biology of Baculoviruses*. vol. 1. Boca Raton, CRC Press, 275p.
- Federici, B. A. 1993.** Viral pathobiology in relation to insect control, p. 81-101. In: Beckage, N.E., S.N. Thompson & B.A. Federici (eds.), *Parasites and Pathogens of Insects*, vol.2. San Diego, CA, Academic Press, 294p.
- Garcia, M.A. 1979.** Potencialidade de alguns fatores bióticos e abióticos na regulação populacional de *Spodoptera frugiperda* (Abbot e Smith, 1797) (Lep. Noctuidae) Tese de mestrado, UNICAMP, Campinas, 96p.
- Gopalakrishnan, B., S. Muthukrishnan & K. Kramer. 1995.** Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene - properties of the recombinant protein. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 255-265.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, S.Y., X. Qu, W. Chen, A. Poloumienko, N. MacAfee, B. Morin, C. Lucarotti & M. Krause. 1997.** Insecticidal activity of a recombinant baculovirus containing an antisense c-myc fragment. *J. Gen. Virol.* 78: 273-281.
- Maruniak, J. 1986.** Baculovirus structure proteins and protein synthesis, p.129-146. In: Granados, R.R. & R.A. Federici (eds.), *The Biology of Baculoviruses*, vol. 1. Boca Raton, CRC Press, 275p.
- Miller, L.K. 1995.** Genetically engineered insect virus pesticides: present and future. *J. Invert. Pathol.* 65: 211-216.
- Smith, K. M. 1976.** Virus-insect relationships. New York, Longman Group Limited. 291p.
- Summers, M. D. 1975.** Biophysical and biochemical properties of baculoviruses, p. 17-29. In: Summers, M.D., R. Engler, L.A. Falcon & P. Vail. *Baculovirus for insect pest control: safety considerations*. Washington. Am. Soc. Microbiol, 186p.
- Summers, M.D. & G.E. Smith. 1978.** Baculovirus structural polypeptides. *Virology* 84: 390-402.
- Tanada, Y. & H.K. Kaya. 1993.** DNA-viral infections: Baculoviridae, Chapter 6, p. 171-244. In: Tanada, Y. & H.K. Kaya (eds.). *Insect Pathology*. San Diego, Academic Press, 666p.
- Tinsley, T. W. & D. C. Kelly. 1985.** Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses, p.3-26. In: Maramorosh, K. & K. E. Sherman (eds.). *Viral insecticides for biological control*. London, Academic Press, 809p.

- Valicente, F.H. & E. F. Costa. 1995.** Control of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with *Baculovirus spodoptera* through irrigation water. An. Soc. Entomol. Bras. 24: 61-67.
- Valicente, F. H. & I. Cruz. 1991.** Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS. 23p. (EMBRAPA/CNPMS, Circular Técnica, 15).
- Valicente, F. H., M. J. de V. D. Peixoto, E. Paiva & E. W. Kitajima. 1989.** Identificação e purificação de um vírus de poliedrose nuclear da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*. An. Soc. Entomol. Bras. 18: 71-82.
- van Oers, M.M., J.T.M. Flipsen, C.B.E.M. Reusken, E. L. Sliwinsky, R. W. Goldbach & J. M. Vlak. 1993.** Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol. 74: 563-574.
- van Oers, M. M., J. T. M. Flipsen, C.B.E.M. Reusken & J. M. Vlak. 1994.** Specificity of baculovirus p10 functions. Virology 200: 513-523.
- Vlak, J.M. 1993.** Genetic engineering of Baculoviruses for insect control, p. 90-127. In: Whitten, M.J. & J. G. Oakeshot (eds.). Molecular Approaches to Pure and Applied Entomology. New York, Springer-Verlag, 498p.
- Wood, H.A., P.R. Hughes & A. Shelton. 1994.** Field studies of the co-occlusion strategy with a genetically altered isolate of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Environ. Entomol. 23: 211-219.
- Yamafuji, K., J. Murai & F. Yoshihara. 1960.** Desoxyribonuclease and protease in polyhedral viral particle. Enzymologia 22: 1-10.
- Yamafuji, K., F. Yoshihara & K. Hirayama. 1958.** Protease and desoxyribonuclease in viral polyhedral crystal. Enzymologia 19: 53-58.

Recebido em 06/01/97. Aceito em 10/10/97.
