

## BIOLOGIA MOLECULAR DE BACULOVÍRUS E SEU USO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS NO BRASIL<sup>1</sup>

MARIA ELITA BATISTA DE CASTRO<sup>2</sup>, MARLINDA LOBO DE SOUZA,  
WILLIAM SIHLER<sup>3</sup>, JÚLIO CARLYLE MACEDO RODRIGUES<sup>3</sup>  
e BERGMANN MORAIS RIBEIRO<sup>4</sup>

RESUMO - Os baculovírus são vírus patogênicos a insetos, encontrados principalmente na ordem Lepidoptera. A família Baculoviridae é taxonomicamente dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus*, que diferem pela morfologia do corpo de oclusão. Os nucleopoliedrovírus (NPV) possuem corpos de inclusão poliédrica (PIB), contendo múltiplas partículas virais, enquanto os granulovírus (GV) contêm, em geral, partículas únicas, ocluídas em corpos protéicos de forma ovóide. Durante o ciclo de vida são produzidos dois tipos de progênies virais: BV ("Budded Virus") e PDV ("Polyhedra Derived Virus"), que são essenciais para o processo de infecção e propagação do vírus. Os baculovírus têm sido empregados no controle de pragas e, por serem específicos e restritos a invertebrados, são considerados agentes seguros de controle biológico. Recentemente têm sido amplamente utilizados como vetor de expressão de genes heterólogos por produzirem e processarem, em grande quantidade, proteínas de procariotos e eucariotos. Além disso, técnicas de DNA recombinante têm permitido a produção de inseticidas virais geneticamente modificados. Este trabalho constitui uma revisão sobre a taxonomia, estrutura, replicação e biologia molecular de baculovírus e sobre seu uso como bioinseticida no Brasil.

Termos para indexação: *Nucleopolyhedrovirus*, AgNPV, *Anticarsia gemmatalis*, replicação de baculovírus, expressão gênica, inseticida viral.

### MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUS AND ITS USE IN BIOLOGICAL CONTROL IN BRAZIL

ABSTRACT - Baculoviruses are insect viruses found mainly in Lepidoptera. The family Baculoviridae is taxonomically divided in two genera, *Nucleopolyhedrovirus* and *Granulovirus*, which differ by occlusion body morphology. NPVs (Nucleopolyhedroviruses) have polyhedral inclusion bodies (PIBs) containing multiple viral particles, while GVs (Granuloviruses) appear to be generally single particles occluded in oval shaped occlusion bodies. During the life cycle, two different viral progenies are produced: BV (Budded Virus) and PDV (Polyhedra Derived Virus), which are essential for the infectious

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 27 de outubro de 1998.

<sup>2</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), SAIN Parque Rural, Caixa Postal 02372, CEP 70770-900 Brasília, DF. E-mail: elita@cenargen.embrapa.br

<sup>3</sup> Biólogo, M.Sc., Embrapa-Cenargen.

<sup>4</sup> Biólogo, Ph.D., Universidade de Brasília, CEP 70910-900 Brasília, DF.

process and virus propagation in host cells. Baculoviruses are being used for pest control and they are especially safe due to their specificity and invertebrate-restricted host range. Baculoviruses have been used as vectors for high level protein expression of heterologous genes from prokaryotic and eukaryotic organisms. Also, recombinant DNA techniques have allowed the production of genetically modified viral insecticides. This study is a review on the taxonomy, structure, replication and molecular biology of baculoviruses, as well as their use as bioinsecticides in Brazil.

Index terms: *Nucleopolyhedrovirus*, AgNPV, *Anticarsia gemmatalis*, baculovirus replication, gene expression, viral insecticide.

## INTRODUÇÃO

Os baculovírus compreendem o maior grupo de vírus de insetos. Esses vírus têm grande potencial como agentes de controle biológico de insetos-pragas em agricultura e áreas florestais (Martignoni, 1984; Payne, 1986; Moscardi & Sosa-Gómez, 1992, 1993; Moscardi, 1998). São específicos a uma ou poucas espécies relacionadas (Gröner, 1986), e sua proteção em cristais protéicos permite a formulação de biopesticidas com fácil tecnologia de aplicação, representando economia e biossegurança em relação aos inseticidas químicos.

O estabelecimento de culturas de células de insetos permitiu o estudo detalhado *in vitro* do ciclo infeccioso de vários baculovírus. A observação de que alguns genes são hiperexpressos no decorrer do processo infeccioso resultou na aplicação desse sistema na expressão de genes heterólogos, que, além dos altos níveis de expressão, permite o processamento pós-traducional característico de proteínas de células eucarióticas.

Mais recentemente, têm sido largamente usados como vetores de expressão, proporcionando um amplo uso na medicina como agentes terapêuticos, profiláticos (vacinas) e para diagnose (O'Reilly et al., 1992; Richardson, 1995; Bonning & Hammock, 1996). Também, têm contribuído para produção de inseticidas virais geneticamente modificados (Wood & Granados, 1991; Maeda, 1995; Bonning & Hammock, 1996), o que possibilita o melhoramento das características patogênicas de baculovírus como agentes de controle biológico (Cory et al., 1994; Miller, 1995) e a ampliação do seu espectro de hospedeiros (Kamita & Maeda, 1993; Maeda et al., 1993; Chen et al., 1998).

Os baculovírus têm sido estudados como agentes de controle biológico desde a década de 60 (Payne, 1986). Devido a sua alta especificidade e ocorrência natural, os baculovírus são ótimos candidatos a serem usados em programas de manejo integrado de pragas (Moscardi, 1990; Funderburk et al., 1992; Tanada & Kaya, 1993), pois em diversos testes de segurança foi estabelecido que o vírus é inofensivo a microrganismos, outros invertebrados (exceto alguns insetos), vertebrados e plantas (Payne, 1986; Gröner, 1989).

Os baculovírus têm-se tornado um modelo em virologia animal, pois os insetos possuem um ciclo de vida curto, que permite sua multiplicação massal em laboratório. Na natureza, esses vírus ocorrem em populações de insetos

e persistem no meio ambiente, podendo causar epizootias, com morte de um grande número de larvas (Benz, 1986; Evans, 1986).

Esta revisão inclui informações sobre a biologia molecular dos baculovírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus*, que representa o principal grupo de vírus de insetos, e descreve sua taxonomia e estrutura, processo de infecção *in vivo* e *in vitro*, especificidade, replicação, organização genômica, regulação da expressão gênica e uso como vetor de expressão gênica.

Outra abordagem trata da expansão do seu uso como inseticida biológico no Brasil e das contribuições recentes da biologia molecular neste contexto.

### TAXONOMIA E ESTRUTURA DE BACULOVÍRUS

A literatura relata mais de 700 espécies de artrópodes infectados naturalmente por baculovírus (Bilimoria, 1986; O'Reilly et al., 1992; Tanada & Kaya, 1993). A maioria dos baculovírus foram isolados da ordem Lepidoptera, e podem ser encontrados ainda em Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera, Neuroptera, Trichoptera, bem como nas classes Crustacea e Arachnida (Bilimoria, 1986, 1991; Martignoni & Iwai, 1986; Adams & McClintock, 1991; O'Reilly et al., 1992). O baculovírus mais estudado até o momento é o Nucleopoliedrovírus de *Autographa californica* Speyer (AcNPV), o qual apresenta uma grande amplitude de hospedeiros, e infectou mais de 25 espécies de insetos (Adams & McClintock, 1991).

Os baculovírus pertencem à família Baculoviridae. Até 1995, essa família era taxonomicamente dividida em duas subfamílias: Eubaculovirinae, que incluía os vírus oclusos (NPV - vírus de poliedrose nuclear, e GV - vírus de granulose) e Nudibaculovirinae, os vírus não-occlusos (NOV) (Francki et al., 1991). A classificação atual do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus divide a família Baculoviridae em apenas dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus*, composto pelos NPV, e *Granulovirus*, compreendendo os GV (Murphy et al., 1995).

O genoma dos baculovírus é composto por um DNA circular de fita dupla, variando de 80-200 kb (Arif, 1986), e é envolto por um capsídeo protéico em forma de bastonete, constituindo a unidade infectiva do vírus (nucleocapsídeo).

Durante o ciclo de vida dos baculovírus, os vírions podem assumir duas formas fenotipicamente distintas: uma, brota da membrana citoplasmática da célula hospedeira para o meio extracelular de forma polarizada, com a presença de estruturas denominadas peplômeros, sendo envelopados individualmente ("budded virus" - BV ou "extracellular virus" - ECV); e a outra, adquire a membrana sintetizada *de novo* no núcleo da célula infectada, podendo ser encontrado mais de um nucleocapsídeo por vírion e são oclusos em cristais protéicos denominados corpos de oclusão ("polyhedra-derived virus" - PDV) (Granados & Williams, 1986). Embora esses vírions, BV e PDV, sejam considerados genotipicamente idênticos, eles desempenham papéis distintos no ciclo infectivo do vírus. Diferem quanto à morfologia e composição protéica, origem dos envelopes virais, modo de penetração na célula hospedeira e

infectividade (Blissard & Rohrmann, 1990; Rohrmann, 1992; Braunagel & Summers, 1994).

Os vírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* possuem corpos de inclusão poliédrica (PIB), também chamados de poliedros, variam de 0,15 a 15  $\mu\text{m}$  (Bilimoria, 1991) e contêm vários vírions por poliedro. Sua principal proteína é denominada poliedrina, com peso molecular em torno de 30.000 daltons (Summers et al., 1980), e corresponde a cerca de 95% do seu conteúdo protéico (Maruniak, 1986). Os vírus desse gênero podem conter apenas um nucleocapsídeo por vírion ("Single Nuclear Polyhedrosis Virus" - SNPV) ou vários nucleocapsídeos por vírion ("Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus" - MNPV) (Bilimoria, 1991), enquanto os do gênero *Granulovirus* são caracterizados pela forma ovicilíndrica do corpo de inclusão, denominado grânulo, com cerca de 0,3 x 0,5  $\mu\text{m}$  (Crook, 1991) e geralmente possuem um, ou raramente dois a três vírions por grânulo. Assim como a poliedrina, a granulina é o principal componente protéico do grânulo.

A oclusão dos vírus em uma matriz protéica é um processo importante para garantir proteção às partículas infectivas na transmissão do vírus de inseto para inseto (Blissard & Rohrmann, 1990). Assim como os esporos de bactérias ou fungos, as oclusões virais permitem aos baculovírus resistirem a condições ambientais fora do hospedeiro. Os genes que codificam as proteínas de oclusão são bastante conservados entre os baculovírus do mesmo gênero. Através do alinhamento de seqüências de genes de oclusão, obtidas de vários baculovírus, tem sido possível estabelecer a filogenia molecular deste grupo (Rohrmann, 1986; Zanotto et al., 1993).

## CICLO DE INFEÇÃO E CITOPATOLOGIA

### Infecção no inseto

O ciclo de vida dos baculovírus é bastante peculiar e se diferencia de outros vírus, por produzir dois tipos de progênes infectiosas com funções diferentes (Granados & Federici, 1986), mas essenciais para a sua propagação natural. A forma ocluída do vírus (PDV) é responsável pela transmissão de inseto para inseto, enquanto a forma não ocluída (BV) é responsável pela transmissão de célula para célula, em um mesmo indivíduo (infecção sistêmica).

O ciclo se inicia com a ingestão de poliedros do vírus presentes na superfície das folhas pelo inseto. Estes atingem partes da planta hospedeira de insetos, principalmente por meio de chuvas e movimentos de artrópodes do solo para as plantas. Ao chegar ao intestino médio do inseto, o vírus é submetido a pH alcalino (aproximadamente 11) que dissolve a poliedrina, liberando os vírions no lúmen digestivo. As partículas infectivas penetram nas células epiteliais do intestino médio via fusão de membrana, mediada por receptores específicos (Horton & Burand, 1993). Os nucleocapsídeos são transportados ao núcleo, onde são desnudados, liberando o DNA, durante o período de uma hora após a infecção. Em larvas de *Spodoptera exigua* Hübner, paralelamente à infecção de células colunares por AcNPV, alguns nucleocapsídeos podem passar direto por estas, infectando as células regenerativas subjacentes (Flipsen et al., 1995). A replicação do vírus em ambas as células resulta na

produção de BV, responsável pela infecção de outros tecidos. Para atravessar a lâmina basal, matriz fibrosa extracelular que envolve os tecidos do inseto, o vírus se utiliza do sistema traqueal, que tem contato direto com as células epiteliais e outros tecidos do inseto, permitindo ao vírus atingir outros tecidos e provocar infecção sistêmica, conforme demonstrado com o AcNPV (Engelhard et al., 1994).

Em estudos com larvas de lepidópteros infectadas com NPV, observou-se que, em geral, a infecção se inicia logo após a ingestão de poliedros pela larva, levando a uma série de mudanças comportamentais e morfológicas que culminam na morte da larva após alguns dias. Essas alterações começam entre 48 e 78 horas após a infecção, quando se inicia uma redução na alimentação e retardamento do crescimento do inseto, muitas vezes não havendo mudança de ínstar (Granados & Williams, 1986; Volkman & Keddie, 1990). Após 80 a 100 horas da infecção, em vários hospedeiros ocorre descoloração do tegumento do inseto. Ao morrer, geralmente o inseto rompe-se facilmente, liberando grande quantidade de poliedros no ambiente, servindo de inóculo para infectar populações subseqüentes de larvas do inseto hospedeiro (Granados & Williams, 1986; Volkman & Keddie, 1990). Sabe-se, atualmente, que os baculovírus produzem algumas proteínas que auxiliam no processo infectivo. A quitinase (Hawtin et al., 1995) e uma cisteína-protease (Ohkawa et al., 1994), por exemplo, são proteínas que são secretadas na fase tardia da infecção celular e acumulam-se na larva hospedeira à medida que a infecção progride. Elas agem, provavelmente, na dissolução dos tecidos do inseto, e em particular da cutícula larval, que se rompe após a morte do hospedeiro, liberando os poliedros (Hawtin et al., 1997).

### **Infecção em cultura de células**

Com os avanços da tecnologia de cultura de células de insetos e análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica, tornou-se possível um estudo mais detalhado do processo de infecção *in vitro* e o desenvolvimento de uma série de investigações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na replicação dos baculovírus, principalmente do NPV de *A. californica* (AcNPV). Neste sentido, outra importante contribuição são as análises qualitativas e quantitativas dos vírions BV e PDV quanto a proteínas estruturais, glicoproteínas e componentes fosfoprotéicos e fosfolipídicos (Maruniak & Summers, 1981; Stiles & Wood, 1983; Rohrmann, 1992; Russell & Rohrmann, 1993; Braunagel & Summers, 1994; Hong et al., 1994; Braunagel et al., 1996a, 1996b). As glicoproteínas participam em uma série de funções virais, tais como ligação do vírion na superfície celular (Bachi et al., 1977), penetração (Huang et al., 1980; Little et al., 1981), descapsidação (Lenard & Miller, 1982) e aquisição do envelope viral (Simons & Garoff, 1980; Payne & Kristensson, 1982). Algumas proteínas estruturais são essenciais para entrada do vírus nas células. Infecções com AcNPV e OpNPV (NPV de *Orgyia pseudotsugata* McDunnough) mostraram que existem diferenças entre glicoproteínas associadas aos fenótipos infecciosos, BV e PDV. Os vírions provenientes da membrana plasmática, BV, entram nas células via endocitose

adsortiva (Volkman & Goldsmith, 1985; Volkman, 1986; Charlton & Volkman, 1993). Esses vírions possuem peplômeros, que têm como principal componente a fosfoglicoproteína GP64 (ou GP67), que é essencial na infectividade dos vírus. Esta proteína apresenta atividade fusogênica pH-dependente e está presente apenas nos BV (Volkman, 1986; Blissard & Rohrmann, 1990; Blissard & Wenz, 1992; Chernomordik et al., 1995). Recentemente, foi demonstrado que essa proteína é essencial para a transmissão do vírus de célula para célula (Monsma et al., 1996).

Os PDV exibem composição protéica diferente dos BV. Várias proteínas têm sido identificadas como específicas de PDV (ou ODV: "occlusion-derived virus"): uma proteína do envelope encontrada em estudos com AcNPV e OpNPV, 25-kDa (ODV-E25) (Russell & Rohrmann, 1993); uma proteína O-glicosilada, identificada como a principal glicoproteína de PDV, GP41 ou P40 (Whitford & Faulkner, 1992a, 1992b; Ma et al., 1993); e, mais recentemente, as proteínas ODV-E66 (Hong et al., 1994), ODV-E56 (Braunagel et al., 1996a), ODV-E18, ODV-E35 e ODV-EC27 (Braunagel et al., 1996b). A proteína P74 também foi identificada como essencial para a infectividade de PDV, mas ainda não está esclarecido se essa proteína está realmente associada ao PDV ou é um componente dos CIP (Kuzio et al., 1989; Hill et al., 1993). Em contraste aos BV, o mecanismo de entrada do PDV nas células hospedeiras não é bem conhecido. Horton & Burand (1993) forneceram a primeira evidência de ligação específica de PDV do Nucleopoliedrovírus de *Lymantria dispar* L. (LdNPV) a células hospedeiras e a vesículas do intestino médio (BBMV - "brush border membrane vesicles"), e demonstraram que a entrada do PDV nessas células ocorre por fusão direta da membrana, via não-endocitótica.

As etapas seguintes à entrada do vírus na célula podem ocorrer dentro de cinco a dez minutos, no caso de adsorção (Himuri et al., 1975; Dougherty et al., 1981), e dentro de três horas pós-infecção, para a descapsidação do vírus (Knudson & Harrap, 1976; Granados, 1980). A GP64, glicoproteína mediadora no processo de penetração do vírus na célula, promove a fusão da membrana endossomal com o envelope viral, liberando nucleocapsídeos no citoplasma da célula hospedeira. A presença do BV no citoplasma dispara o mecanismo celular de polimerização de fibras de actina, formando cabos que se associam aos nucleocapsídeos (Charlton & Volkman, 1993). Lanier et al. (1996) identificaram proteínas associadas ao BV de AcNPV com diferentes atividades dirigidas à actina. O nucleocapsídeo possui uma atividade de se ligar à actina e outra de degradá-la. Esta está relacionada a uma protease, identificada como V-CATH. Esse mecanismo parece ser responsável pelo transporte do nucleocapsídeo ao núcleo, onde vai ser descapsidado para liberar o DNA. A transcrição do DNA viral inicia imediatamente, podendo-se detectar a presença de RNA viral 30 minutos após a infecção (Crisholm & Henner, 1988). Durante as próximas seis horas, período que caracteriza a fase inicial de infecção e precede a replicação do DNA viral, os primeiros efeitos citopáticos podem ser observados ao microscópio eletrônico. Ocorrem alterações no arranjo do citoesqueleto, e a cromatina celular começa a se dispersar no núcleo, que aumenta em volume (hipertrofia) (O'Reilly et al., 1992).

A próxima fase de infecção (tardia), compreende o período de 6 a 24 horas após a infecção, quando uma estrutura elétron-densa (estroma virogênico) é formada e ocorre intensa produção de BV e replicação de DNA viral (Bilimoria, 1991). Os nucleocapsídeos, com pleplômeros, migram do núcleo até a membrana citoplasmática, de onde brotam individualmente (Whitford et al., 1989). A produção de BV é logarítmica de 12 a 20 horas após a infecção, quando decai e cessa (Lee & Miller, 1979), iniciando a terceira fase de infecção (muito tardia), quando ocorre a produção de poliedros (O'Reilly et al., 1992). Durante essa fase, há a síntese *de novo* de membranas que vão interagir com os nucleocapsídeos para formação do envelope viral e posterior oclusão de vírions no cristal protéico, no núcleo da célula. A partir da 24<sup>a</sup> hora, pode-se detectar a presença de poliedros no núcleo da célula infectada, e, à medida que a infecção progride, estes se acumulam no núcleo, comprimindo o citoplasma. Estruturas fibrilares, formadas pela proteína viral P10, surgem tanto no núcleo como no citoplasma (Van Der Wilk et al., 1987), podendo estar relacionadas à desintegração celular (Williams et al., 1989). Estudos da cinética de síntese protéica mostram que a partir dessa fase há um bloqueio na síntese de proteínas celulares. As proteínas virais P10 e poliedrina são predominantemente sintetizadas até 72 horas após a infecção (O'Reilly et al., 1992).

### ESPECIFICIDADE AO HOSPEDEIRO

Estudos de especificidade e espectro de hospedeiros têm sido realizados em linhagens de células de insetos. Para tanto, são utilizados vírions não oclusos (BV), obtidos a partir do sobrenadante de células ou da hemolinfa de insetos infectados (Knudson & Tinsley, 1974; Volkman & Summers, 1977). Essas linhagens apresentam susceptibilidades diferentes quanto à permissividade para replicação viral (Vaughn & Dougherty, 1985). Uma linhagem é permissiva quando há replicação e todas as etapas do ciclo viral são executadas, culminando na produção de corpos de oclusão e na lise da maioria das células infectadas. Linhagens semipermissivas permitem a replicação parcial do vírus nas células, possivelmente devido a restrições em diferentes estágios do ciclo (Bilimoria et al., 1992). Linhagens abortivas são aquelas em que o vírus pode, ou não, induzir efeitos citopáticos, mas não há produção de partículas infectivas (Carpenter & Bilimoria, 1983; Liu, 1987). A suscetibilidade de linhagens celulares ao AcNPV tem sido descrita (Gröner et al., 1984; Bilimoria et al., 1986, 1992; McClintock et al., 1986; Rice & Miller, 1986; Miller, 1988; Reinisch, 1989; Bilimoria & Demirbag, 1993; Morris & Miller, 1993). Porém, os estudos com esse vírus têm sido realizados, na maioria, com células de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Vaughn et al., 1977) e *Trichoplusia ni* Hübner (Hink, 1970). Outras linhagens celulares que permitem a replicação de diversos NPV já foram obtidas. Para *Granulovirus* (GV), apenas um sistema eficiente de replicação *in vitro* foi descrito até o momento (Winstanley & Crook, 1993).

Morris & Miller (1992) investigaram a influência de diferentes promotores virais na expressão de gene heterólogo em várias linhagens celulares de insetos (*S. frugiperda* IPLB-SF21, *Choristoneura fumiferana* Clemens

IPRL-CF-1, *Mamestra brassicae* L. SES-MaBr-3, *Bombyx mori* L. BmN-4, *L. dispar* IPLB-Ld652Y, *Helicoverpa zea* Boddie Hz1b3 e *Drosophila melanogaster* Schneider), para a replicação de AcNPV. Estes autores sugeriram que as diferenças específicas que impedem infecções produtivas são particulares de cada linhagem celular. Morris & Miller (1993) examinaram a utilização de promotores representativos das diferentes fases de expressão (inicial, tardia e muito tardia), a replicação de DNA viral e a produção de BV e PIB em diferentes linhagens. Utilizando-se de vírus recombinantes, contendo o gene marcador CAT (cloranfenicol acetiltransferase), investigaram o comportamento do vírus pelo método FACS ("fluorescence-activated cell sorting") e verificaram que a infecção produtiva de células de *S. frugiperda* IPLB-SF21 envolveu 100% das células, enquanto em linhagens menos produtivas (células de *C. fumiferana* IPRL-CF-1 e de *M. brassicae* SES-MaBr-3) sugeriu que o AcNPV iniciou e completou o processo de replicação somente em uma subpopulação de células. A análise de infecções não produtivas (em células de *B. mori* BmN-4, *L. dispar* IPLB-Ld652Y, *H. zea* Hz1b3, *D. melanogaster*) revelou diferenças na replicação do DNA viral e no padrão de utilização do promotor, em cada linhagem celular, o que indica uma variedade de obstáculos que impedem a infecção.

Estudos recentes identificaram a ocorrência de um tipo de morte programada de células, causada pela ausência do produto do gene *p35*. Esse fenômeno, denominado de apoptose, foi demonstrado por Clem et al. (1991) e Hershberger et al. (1992), quando, em infecção com mutantes de AcNPV, faltando o gene *p35*, houve citólise prematura, redução na produção de vírus extracelular (BV) e eliminação praticamente total da produção de PIB. Mostrou-se que o gene *p35* é necessário para o bloqueio do processo de lise celular durante infecção de algumas linhagens de células de insetos. Células de *S. frugiperda* (SF-21) foram suscetíveis à lise, enquanto que células de *T. ni* TN368 não foram. Há evidências de que o gene *p35* é um regulador transdominante que facilita a replicação de AcNPV e fornece uma vantagem seletiva em células suscetíveis à apoptose (Clem et al., 1991; Hershberger et al., 1992; Clem & Miller, 1993; Lerch & Friesen, 1993). Também, os genes *p35*, *Op-iap*, *Cp-iap*, localizados nos genomas do NPV de *B. mori* (BmNPV) (Kamita et al., 1993), GV de *Cydia pomonella* L. (CpGV) (Crook et al., 1993) e NPV de *O. pseudotsugata* (OpNPV) (Birnbaum et al., 1994), respectivamente, foram identificados como inibidores de apoptose. Recentemente, Bump et al. (1995) observaram que a proteína P35 de AcNPV inibe a atividade proteolítica de enzimas da família ICE ("interleukin-1 $\beta$  converting enzyme"), e que a capacidade de P35 bloquear a apoptose induzida por diferentes vias em diferentes organismos sugere que ela atua em um ponto central e filogeneticamente conservado no processo apoptótico.

### REPLICAÇÃO DO DNA VIRAL

A replicação do DNA de baculovírus é essencial para suprimento genômico da progênie viral. Vários genes essenciais à replicação do DNA foram identificados. Dados de seqüenciamento mostraram que um gene aná-

logo ao DNA da polimerase foi identificado em AcNPV, BmNPV e CfNPV (Tomalski et al., 1988; Chaeychomsri et al., 1995; Liu & Carstens, 1995) e um gene análogo à helicase no AcNPV (Lu & Carstens, 1991). Estudos recentes mostraram que os genes *ie-1*, *lef1*, *lef2* e *lef3* também são essenciais à replicação do DNA de AcNPV e OpNPV (Kool et al., 1994; Ahrens et al., 1995; Lu & Miller, 1995). Alguns genes envolvidos na replicação apresentam atividade estimulatória: *ie-2*, *pe38* (*p34* no OpNPV) e *p35* (o OpNPV possui o gene equivalente funcional *iap*) (Guarino & Summers, 1986a; Lu & Carstens, 1993; Gong & Guarino, 1994). Apesar das semelhanças, esses sistemas diferem quanto ao efeito de cada gene na replicação, por exemplo, no caso de AcNPV e OpNPV, os genes *p35* e *ie-2* tiveram maior efeito estimulatório.

As origens de replicação têm sido atribuídas a regiões homólogas (*rh*) do genoma de vários baculovírus. No AcNPV, as *rh* foram identificadas como regiões que variam entre 0,4 e 1,0 kb em tamanho com características em comum: 1) são palíndromes imperfeitos, separados por  $83 \pm 34$  pares de bases (pb); e 2) possuem uma seqüência de 10 a 12 pb em comum, com um sítio de EcoRI no meio do palíndromo (Cochran & Faulkner, 1983; Pearson et al., 1992). Em ensaios de replicação, todas as *rh* identificadas (*rh1a*, *rh1b*, *rh2*, *rh3*, *rh4a*, *rh4b*, *rh4c*, *rh5*) mostraram-se funcionais (Pearson et al., 1992; Kool et al., 1993). As *rh* também podem ser ativadoras de transcrição em *cis*, atuando independentemente de distância e orientação (Guarino & Summers, 1986b; Guarino et al., 1986; Carson et al., 1991b). Apesar de promoverem a replicação de plasmídeos em células infectadas, as *rh* não são essenciais à replicação do DNA viral. Genomas defectivos, gerados pela passagem seriada do AcNPV em cultura de células, em que as *rh* estão ausentes, são capazes de manter função replicativa (Lee & Krell, 1994). A análise da estrutura de alguns desses mutantes mostrou que o genoma do vírus foi reduzido a 50 kb e que o fragmento Hind III-K, já relacionado à origem de replicação (Kool et al., 1993), formava 70% desse genoma. O fragmento Hind III-N, do OpNPV, também foi identificado como origem de replicação; no entanto, não foi evidenciada homologia com seqüências no AcNPV (Pearson et al., 1993). É possível que essas regiões sejam essenciais à replicação, e que a função das *rh* na replicação seja aumentar a freqüência de iniciação, aumentando a velocidade com que o DNA viral se replica.

### REGULAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA

Apesar de não ter uma organização genômica, com genes agrupados de acordo com sua função ou tempo de expressão, a estruturação do genoma dos baculovírus pode ter uma importância regulatória (Cochran et al., 1986; Friesen & Miller, 1986). A análise computacional da seqüência completa do genoma do AcNPV mostrou que mais de 300 quadros de leitura (ORF - "open reading frame") podem ser expressos (Ayres et al., 1994). A disposição desses ORF no genoma permitiria a expressão gênica coordenada durante o ciclo infeccioso. Uma vez iniciado o processo de infecção, a expressão gênica ocorre, ordenadamente, em cascata (O'Reilly et al., 1992), cujo

controle parece ser transcricional, em que os genes expressos em uma classe temporal regulam a expressão de genes das fases seguintes (Blissard & Rohrmann, 1990). A expressão temporal pode ser dividida em duas fases: a) E (“early”), que precede a replicação do DNA viral; e b) L (“late”), que se inicia a partir da replicação do DNA viral (Blissard & Rohrmann, 1990).

### Fase E (“early”)

Os genes expressos nessa fase independem da replicação do DNA viral. Experimentos com cicloheximida, um bloqueador de síntese protéica, mostraram que alguns produtos foram expressos imediatamente após a liberação de um bloqueio de oito horas, enquanto outros somente foram expressos algumas horas depois (Kelly & Lescott, 1981). Ensaio transientes são usados para determinar o tempo de expressão de um gene viral. Nesses ensaios, plasmídeos contendo promotores virais ligados a um gene marcador (cloranfenicol acetil transferase – CAT) são introduzidos, e a expressão da enzima CAT, analisada. Esses ensaios foram realizados, e os resultados mostraram que alguns promotores virais foram ativos em células não infectadas, enquanto outros não mostraram atividade (Guarino & Summers, 1986a, 1986b). Essas observações resultaram na subdivisão dos genes da fase E em duas classes: IE (“immediate early”) e DE (“delayed early”).

A classe IE independe da síntese de proteínas virais, sendo os genes expressos na presença de cicloheximida. Vários genes pertencentes a essa classe foram identificados, tendo a maioria dos seus produtos mostrado atividade transregulatória em ensaios transientes de expressão ou mostraram, em sua seqüência, domínios que permitiriam a ligação ao DNA (Thiem & Miller, 1989; Carson et al., 1991a, 1991b). A classe DE se caracteriza pela dependência de produtos virais para expressão dos genes. Os genes pertencentes a essa classe geralmente são relacionados à replicação do DNA viral: DNA polimerase (Tomalski et al., 1988) e helicase (Lu & Carstens, 1991). O gene *39K* tem sido considerado típico da classe DE, e a fusão do seu promotor com o gene repórter CAT tem sido muito utilizada para identificar proteínas regulatórias (Guarino & Summers, 1986a; Passarelli & Miller, 1993a, 1993b). A análise de atividade de vários promotores virais, tanto da classe IE como da classe DE, em extrato de células não infectadas, mostrou que níveis basais de transcrição requerem apenas a RNA polimerase II do hospedeiro e os fatores transcricionais a ela associados (Hoopes Junior & Rohrmann, 1991; Glocker et al., 1992; Krappa et al., 1992).

Os promotores da classe E se assemelham a promotores eucarióticos e utilizam a RNA polimerase II do hospedeiro, uma vez que são sensíveis a alfa-amanitina (Huh & Weaver, 1990). A seqüência de nucleotídeos TATA, localizada numa posição anterior ao ponto de início de transcrição, é conservada em muitos promotores E (Blissard & Rohrmann, 1990) e essencial para a transcrição nessa fase (Guarino & Summers, 1988; Blissard & Rohrmann, 1991; Dickson & Friesen, 1991). Vários genes E também possuem uma região conservada de iniciação de transcrição, típica de promotores eucarióticos: CAGT (Crisholm & Henner, 1988; Blissard & Rohrmann, 1989; Carson et al., 1991a,

1991b). No entanto, alguns promotores não apresentam essa região, o que indica que o vírus pode utilizar-se de diferentes mecanismos para expressão desses promotores (Crawford & Miller, 1988; Nissen & Friesen, 1989).

### Fase L (“late”)

Esta fase é dependente da expressão de genes da classe E e da replicação do DNA viral (Friesen & Miller, 1986; Huh & Weaver, 1990; Lu & Carstens, 1991). Os genes desta classe são, geralmente, relacionados à montagem e oclusão das partículas virais (O’Reilly et al., 1992). Dezoito genes, denominados *lef* (“late expression factors”), foram descritos como importantes para a regulação da expressão dos genes “late” (Todd et al., 1995). Esses fatores parecem modular a transcrição de promotores L (Passarelli & Miller, 1993a, 1993b). Genes expressos durante todo o ciclo viral possuem elementos tanto de promotores E como de L (Guarino & Summers, 1986a, 1986b; Blissard & Rohrmann, 1989; Thiem & Miller, 1989). Os promotores L são de estrutura simples, com o tetranucleotídeo TAAG conservado, de onde se inicia a transcrição (O’Reilly et al., 1992). A fase L é subdividida em L (“late”; 6 a 18 horas após a infecção) e VL (“very late”; 18 horas após a infecção em diante) (Blissard & Rohrmann, 1990). A distinção entre esses dois promotores se dá pela atividade apresentada em cada fase. Os mRNA de genes L decaem em estágios avançados de infecção, enquanto os promotores VL são hiperexpressos a partir de 18 horas após a infecção, com dois produtos principais: poliedrina e P10 (Blissard & Rohrmann, 1990; O’Reilly et al., 1992). A poliedrina é a proteína principal do poliedro e é codificada por um gene não essencial para replicação viral, pois a inativação do gene por deleção ou inserção de uma seqüência de DNA, produz um vírus que é capaz de se replicar em células de inseto. A P10 é uma proteína com massa molecular de 10 kDa, que está envolvida no processo de oclusão das partículas virais e provavelmente na lise celular no final da infecção (Van Oers et al., 1994). Também em estudos com a construção de vírus recombinantes sem o gene p10 foi demonstrado que essa proteína é importante para manter a integridade do poliedro (Vlak et al., 1988; Williams et al., 1989; Gross et al., 1994).

Uma característica marcante da expressão de genes da classe L é a resistência à alfa-amanitina, um inibidor de RNA polimerase II (Huh & Weaver, 1990). Essa resistência indica a presença de uma RNA polimerase modificada, seja pela adição de uma subunidade codificada pelo vírus, ou mesmo uma nova RNA polimerase viral. Na busca em banco de dados GCG (Devereux et al., 1984) não foi identificada na seqüência do AcNPV homologia com RNA polimerases ou domínios relacionados (Ayres et al., 1994), no entanto, o *lef8* mostrou uma região conservada de RNA polimerase (Passarelli et al., 1994).

## BACULOVÍRUS COMO VETOR DE EXPRESSÃO

O maior conhecimento do genoma de baculovírus permitiu sua manipulação genética. Os primeiros relatos do uso de baculovírus como vetor de expressão foram publicados por Smith et al. (1983) e Pennock et al. (1984), que

usaram o AcNPV para produzir  $\beta$ -interferon e  $\beta$ -galactosidase em células de *S. frugiperda* (IPLB SF-21 AE). Dentre as vantagens para utilização desses vetores estão: a) potencial para expressão de proteínas heterólogas em altos níveis; b) existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção (não interferindo no ciclo viral); c) diferentes fases na regulação gênica do ciclo viral, oferecendo oportunidade de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições celulares; d) capacidade para clonagem de grandes inserções; e) eficiência na expressão de genes de eucariotos contendo região codificantes e não codificantes, exons e introns, respectivamente; e f) simplicidade de manipulação.

O sistema de expressão de baculovírus em células de insetos é apropriado para a síntese de proteínas eucarióticas. Permite o dobramento da estrutura da proteína, formação de pontes dissulfídicas, oligomerização, modificações pós-traducionais (incluindo clivagem de peptídeo sinal, clivagem proteolítica, N-glicosilação, O-glicosilação, acilação, amidação, fosforilação e carboximetilação), similares às produzidas em células de mamíferos. Pelo fato de o nucleocapsídeo ser capaz de comportar, teoricamente, até 100.000 pares de base de DNA adicionais, tem sido possível a clonagem de fragmentos de DNA de até 15.000 pares de base (O'Reilly et al., 1992). A tecnologia para construção de vetores de baculovírus é feita com base em plasmídeos de transferência. Estes são unidades replicativas que contêm regiões flanqueadoras do gene que se pretende substituir no genoma viral, incluindo ou não a seqüência codificante, seu promotor e um sítio de clonagem. A origem de replicação e genes de seleção são derivados de plasmídeos bacterianos, como os da série pUC (Miller et al., 1986). Após a construção do plasmídeo, é feita a co-transfecção da célula do inseto, utilizando-se o DNA do vírus parental e o DNA do plasmídeo. Durante a infecção viral, por recombinação homóloga, o gene original no vírus é substituído pelo gene de interesse contido no plasmídeo. O vírus recombinante formado é, então, selecionado por plaqueamento em células infectadas.

Inicialmente, os vírus recombinantes eram construídos com deleção do gene da poliedrina, permitindo sua seleção através de placas ocluso-negativas. Para facilitar a identificação, outros vírus, com parte do genoma do AcNPV codificando a  $\beta$ -galactosidase, foram desenvolvidos (Summers & Smith, 1987; O'Reilly & Miller, 1990). Dessa forma, a seleção de um clone recombinante é facilitada em presença do substrato sintético (X-Gal). Neste caso, células infectadas com o vírus parental apresentam coloração azul, enquanto as infectadas com o vírus que recebeu o inserto (gene da  $\beta$ -galactosidase interrompido) apresentam a coloração branca.

## **BACULOVÍRUS USADOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS NO BRASIL**

### **Nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatilis* (AgNPV)**

*Anticarsia gemmatilis* Hübner é uma praga que causa sérios danos à cultura da soja na América Latina e sudeste dos Estados Unidos (Funderburk et al., 1992; Moscardi & Sosa-Gómez, 1992, 1993; Tanada & Kaya, 1993). A

ocorrência de um NPV nesta espécie foi notificada pela primeira vez em insetos coletados em alfafa, no Peru (Steinhaus & Marsh, 1962). No Brasil, em 1972, um baculovírus deste inseto foi encontrado em larvas coletadas em soja, na região de Campinas, SP (Allen & Knell, 1977). Outros isolados foram encontrados em diversas partes do País (Carner & Turnipseed, 1977; Corso et al., 1977; Moscardi, 1977).

O Nucleopoliedrovírus de *A. gemmatalis* (AgNPV) tem sido utilizado para o controle da lagarta-da-soja, com significativos benefícios econômicos e ecológicos ao País (Moscardi & Sosa-Gómez, 1992, 1996). Diferentemente de vários inseticidas químicos, o uso do AgNPV no controle da praga *A. gemmatalis* é vantajoso, pela possibilidade de produção do vírus no campo, em larga escala, a custos inferiores aos inseticidas químicos disponíveis no mercado; pela grande capacidade de recuperação da soja à desfolha; pela não-ocorrência simultânea de outras pragas importantes na cultura, o que permite o uso de um inseticida biológico muito específico, como o AgNPV; e pelas estratégias de difusão da tecnologia aos agricultores (Moscardi, 1989; Moscardi & Sosa-Gómez, 1992, 1996; Moscardi, 1998).

Um programa de utilização do AgNPV, em campo, foi desenvolvido pela Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo) Londrina, PR. Este programa tem viabilizado o uso do bioinseticida, denominado "Baculovirus anticarsia", em larga escala (1 milhão de ha por ano), com uma tecnologia de aplicação adotada por empresas privadas, com participação de extensionistas e agricultores (Moscardi & Sosa-Gómez, 1993; Lacey & Goethel, 1996; Moscardi & Sosa-Gómez, 1996). Em vastas plantações de soja, nas regiões central e sul do Brasil, o AgNPV tem-se mostrado eficiente e seguro no controle da praga. A mortalidade das larvas tem sido acima de 80%, e o desfolhamento da soja tem-se mantido abaixo do limiar de dano econômico, quando o bioinseticida é aplicado nas condições recomendadas (Moscardi, 1983, 1989; Moscardi & Correa-Ferreira, 1985; Moscardi & Sosa-Gómez, 1996). Esses resultados levaram ao desenvolvimento de uma formulação do bioinseticida, permitindo sua industrialização e comercialização, tecnologia esta, já repassada pela Embrapa a cinco empresas privadas (Moscardi & Sosa-Gómez, 1996).

Apesar do sucesso do programa, poucas informações são disponíveis referentes à biologia molecular do AgNPV. Linhagens de células de inseto vêm sendo desenvolvidas para o estudo molecular deste baculovírus. Uma linhagem celular, UFLAG 286, foi estabelecida a partir de embriões de *A. gemmatalis* e caracterizada por análise de isoenzimas e padrão de restrição do DNA mitocondrial (Sieburth & Maruniak, 1988a), mostrando-se suscetível ao AgNPV (Sieburth & Maruniak, 1988b).

Estudos foram conduzidos com o AgNPV na identificação e distinção de diferentes genótipos virais, e na construção do mapa físico de seu genoma. Isolados foram purificados por "plaque assay", sendo os DNA virais submetidos à análise de restrição. Inicialmente, foram detectados seis variantes

genotípicos (Maruniak, 1989), a partir de um isolado viral coletado em 1979 no Brasil (AgNPV-79). Em seguida, a partir desses variantes e utilizando a mesma técnica, foram selecionados 45 clones virais. Desses, o DNA do protótipo denominado AgNPV-2D, representando 40% dos isolados obtidos, foi mapeado e um total de 51 sítios de restrição foram determinados (Johnson & Maruniak, 1989). Similaridades também foram detectadas com alguns baculovírus (ex, o AcNPV), como demonstrado em estudos de homologia realizados por Smith & Summers (1982). A região do gene da poliedrina do vírus AgNPV-2D (fragmento HindIII-G) foi seqüenciada, sendo identificada uma ORF (“open reading frame”) com a capacidade de codificar um polipeptídio de 245 aminoácidos (cerca de 735pb), com peso molecular de 28 555 daltons (Zanotto et al., 1992). O seqüenciamento dessa região e posteriores estudos filogenéticos mostraram que o AgNPV apresenta grande homologia com o AcNPV, o OpNPV e o BmNPV (Zanotto et al., 1993). Recentemente, a replicação de AgNPV foi caracterizada em diferentes linhagens celulares de insetos, utilizando-se células de *A. gemmatalis* (UFLAG 286), de *C. fumiferana* (CF124T) e de *B. mori* (BM-5) (Castro et al., 1997). Nos sistemas semipermissivos (CF124T/AgNPV) e abortivos (BM-5/AgNPV), baixos níveis de síntese de DNA foram observados. A nível transcricional, genes representantes das classes “late” e “very late” não foram transcritos no sistema abortivo e foram produzidos em baixos níveis no sistema semipermissivo (Castro, 1995).

A aplicação do AgNPV no campo, por vários anos, poderia favorecer a ocorrência de mudanças no genoma desse baculovírus. Variantes genotípicos estão presentes nas populações naturais e podem ser formados graças a rearranjos do genoma (Garcia-Canedo, 1995). Porém, estudos realizados em laboratório e em campo, com variantes temporais do AgNPV, mostraram que sua virulência não foi alterada após mais de 15 anos de uso como inseticida biológico (Berino, 1995; Batista, 1997).

Por outro lado, em estudos visando verificar o possível desenvolvimento de resistência de populações de *A. gemmatalis* ao AgNPV (Abot, 1993; Fuxa et al., 1993; Abot et al., 1995, 1996; Abot, 1997), foi demonstrado que populações de insetos, após 15 gerações submetidas à pressão de seleção por vírus em laboratório, foram capazes de desenvolver resistência acima de 1.000 vezes, quando comparadas aos insetos suscetíveis (Abot et al., 1996). Também foi mostrado que *A. gemmatalis* apresenta elevado potencial para desenvolver resistência ao seu NPV. Apesar disso, não foi detectada resistência em populações naturais de insetos de regiões submetidas a várias aplicações do vírus quando comparada com populações de insetos de regiões onde nunca ocorreu aplicação do vírus (Abot et al., 1995). Segundo Fuxa et al. (1993), provavelmente esses agentes não estão sendo utilizados em escala e frequência suficientes para permitir a seleção de populações resistentes a vírus. Assim, o monitoramento das populações de campo em termos de suscetibilidade ao vírus, bem como avaliação sob pressão de seleção em laboratório, é extremamente importante uma vez que AgNPV, além de ocorrer naturalmente, tem sido extensivamente empregado como pesticida no Brasil.

### **Nucleopoliedrovírus de *Spodoptera frugiperda* (SfNPV)**

O programa de controle da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) é coordenado pela Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Essa lagarta é a principal praga da cultura do milho, podendo reduzir a produtividade em até 34%, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta (Carvalho, 1970). Estudos sobre a eficiência de fatores bióticos e abióticos na regulação populacional de *S. frugiperda* demonstraram que o NPV é um agente promissor para programas de controle da praga (Garcia, 1979). A partir de uma lagarta-do-campo, um nucleopoliedrovírus foi identificado como SfNPV e purificado (Valicente et al., 1989). Em prosseguimento, metodologias para o controle biológico da lagarta-do-cartucho pelo SfNPV foram estabelecidas (Valicente & Cruz, 1991), e estudos de caracterização biológica e bioquímica foram conduzidos (Gerk et al., 1997). Até o momento, aproximadamente 5.000 hectares de milho foram tratados com esse vírus, o qual é produzido em lagartas criadas em dieta artificial e formulado como pó molhável, para distribuição aos agricultores. A susceptibilidade viral de diferentes populações de *S. frugiperda* tem sido estudada (Fuxa, 1987). Os resultados observados quanto à pesquisa sobre resistência de insetos ao SfNPV demonstraram baixas taxas de resistência e uma rápida reversão da resistência à susceptibilidade, provavelmente devido à seleção contra o gene ou genes resistentes na ausência de NPV (Fuxa et al., 1988, 1993; Fuxa & Richter, 1989, 1991).

### **Outros baculovírus**

Além desses programas, há um programa para o controle do mandarová-da-mandioca, *Erinnyis ello* Linnaeus, principal praga da mandioca, através de um vírus de granulose. Um projeto para aplicação do vírus no campo foi iniciado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina (EPAGRI), em Itajaí, em meados de 80 (Schmitt, 1985). Foi comprovada a alta virulência do patógeno, chegando a provocar 90% de mortalidade após nove dias de infecção. Atualmente, esse vírus também é produzido pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). O produto é obtido na forma de macerado da lagarta infectada. O biopesticida é aplicado em Santa Catarina, Paraná e alguns locais do Nordeste (Schmitt, 1983, 1984).

O *E. ello* é também importante em seringueira no norte do País, e conhecido como mandarová-da-seringueira. O EeGV já foi encontrado naturalmente infectando 50% da população dessa praga.

Outros vírus, também com potencial de uso, têm sido isolados de pragas de culturas como a cana-de-açúcar, algodão, trigo, arroz, frutíferas, hortaliças, pastagens e florestas (Moscardi et al., 1985; Kitajima, 1986; Valicente & Cruz, 1991; Ribeiro et al., 1997).

## **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

O controle da lagarta-da-soja pelo “Baculovirus anticarsia” é o maior programa mundial de uso de vírus para controle de uma praga. Desta forma, o

estudo da biologia molecular de baculovírus em geral e do NPV de *A. gemmatalis* em particular é muito importante para o desenvolvimento de estratégias para aumentar a virulência, redução do tempo entre a infecção e morte do inseto-alvo, aumento do número de hospedeiros e quebra de resistência. Embora o “Baculovirus anticarsia” seja eficiente para controlar a lagarta-da-soja sem nenhuma modificação artificial, não se pode descartar o aparecimento de populações de insetos resistentes.

### REFERÊNCIAS

- ABOT, A.R. **Avaliação da resistência de *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) ao seu vírus de poliedrose nuclear, *Baculovirus anticarsia***. Curitiba: UFPr, 1993. 71p. Tese de Mestrado.
- ABOT, A.R. **Parâmetros para produção do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis*, em laboratório**. Curitiba: UFPr, 1997. 100p. Tese de Doutorado.
- ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; FUXA, J.R.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; RICHTER, A.R. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. **Biological Control**, v.7, p.126-130, 1996.
- ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; FUXA, J.R.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; RICHTER, A.R. Susceptibility of populations of *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Entomology Science**, v.30, p.62-69, 1995.
- ADAMS, J.R.; McCLINTOCK, T.J. Baculoviridae: nuclear polyhedrosis virus. In: ADAMS, J.R.; BONANI, J.R. (Eds.). **Atlas of invertebrate viruses**. Boca Raton: CRC, 1991. p.87-204.
- AHRENS, C.H.; PEARSON, M.N.; ROHRMANN, G.F. Identification and characterization of a second putative origin of DNA replication in a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata*. **Virology**, v.207, p.572-576, 1995.
- ALLEN, G.E.; KNELL, J.D. A nuclear polyhedrosis virus *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity. **The Florida Entomologist**, v.60, p.233-240, 1977.
- ARIF, B.M. The structure of the viral genome. **Current Topics Microbiology and Immunology**, v.131, p.21-29, 1986.
- AYRES, M.D.; HOWARD, S.C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M.; POSSEE, R.D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v.202, p.586-605, 1994.
- BACHI, T.; DEAS, J.E.; HOWE, C. Virus-erythrocyte membrane interactions. In: POSTE, G.; NICOLSON, G.T. (Eds.). **Virus infection and the cells surface**. Amsterdam: Elsevier, 1977. p.83-127.
- BATISTA, T.F.C. **Fatores que limitam a eficiência de *Baculovirus anticarsia* sobre *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)**. Pelotas: UFPEL, 1997. 68p. Tese de Mestrado.

- BENZ, G.A. Introduction: historical perspectives. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, p.1-35.
- BERINO, E.C.S. **Determinação da atividade biológica de isolados geográficos e temporais de VPN de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 65p. Tese de Mestrado.
- BILIMORIA, S.L. Taxonomy and identification of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, p.37-59.
- BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.1-72.
- BILIMORIA, S.L.; DEMIRBAG, Z.; NG, H. Host-specific transcription of baculovirus genes. **SASS Bulletin, Biochemistry and Biotechnology**. v.6, p.1-7, 1993.
- BILIMORIA, S.L.; DEMIRBAG, Z.; NG, H.; REINISCH, A.J. Abortive cell culture infections of nuclear polyhedrosis viruses as model systems for host specificity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, s/n, p.123-141, 1992. Edição Especial.
- BILIMORIA, S.L.; LIU, H.S.; REINISCH, A.J. Gene expression of baculoviruses in semipermissive insect cell lines. In: SAMSON, R.A.; VLAK, J.M.; PETERS, D. (Eds.). **Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology**. Wageningen: ICIP, 1986. p.51-54.
- BIRNBAUM, M.J.; CLEM, R.J.; MILLER, L.K. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with cys/his sequence motifs. **Journal of Virology**, v.68, p.2521-2528, 1994.
- BLISSARD, G.W.; ROHRMANN, G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.127-155, 1990.
- BLISSARD, G.W.; ROHRMANN, G.F. Baculovirus *gp64* gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE-1. **Journal of Virology**, v.65, p.5820-5827, 1991.
- BLISSARD, G.W.; ROHRMANN, G.F. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the *gp64* envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v.170, p.537-555, 1989.
- BLISSARD, G.W.; WENZ, J.R. Baculovirus *gp64* envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. **Journal of Virology**, v.66, p.6829-6835, 1992.
- BONNING, B.C.; HAMMOCK, B.D. Development of recombinant baculovirus for insect control. **Annual Review of Entomology**, v.41, p.191-210, 1996.
- BRAUNAGEL, S.C.; ELTON, D.M.; MA, H.; SUMMERS, M.D. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. **Virology**, v.217, p.97-110, 1996a.
- BRAUNAGEL, S.C.; HE, H.; RAMAMURTHY, P.; SUMMERS, M.D. Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica*

- nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27. **Virology**, v.222, p.100-114, 1996b.
- BRAUNAGEL, S.C.; SUMMERS, M.D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. **Virology**, v.202, p.315-328, 1994.
- BUMP, N.J.; HACKETT, M.; HUGUNIN, M.; SESHAGIRI, S.; BRADY, K.; CHEN, P.; FERENZ, C.; FRANKLIN, S.; GHAYUR, T.; LI, P.; LICARI, P.; MANKOVICH, J.; SHI, L.; GREENBERG, A.H.; MILLER, L.K.; WONG, W.W. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. **Science**, v.269, p.1885-1888, 1995.
- CARNER, G.R.; TURNIPSEED, S.G. Potential of a nuclear polyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. **Journal of Economical Entomology**, v.70, p.608-610, 1977.
- CARPENTER, W.M.; BILIMORIA, S.L. A semipermissive nuclear polyhedrosis virus infection: Characterization of infection kinetics and morphogenesis. **Virology**, v.130, p.222-227, 1983.
- CARSON, D.D.; SUMMERS, M.D.; GUARINO, L.A. Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. **Virology**, v.182, p.279-286, 1991a.
- CARSON, D.D.; SUMMERS, M.D.; GUARINO, L.A. Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early gene, IE-N, is regulated by three viral elements. **Journal of Virology**, v.65, p.945-951, 1991b.
- CARVALHO, R.P.L. **Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo.** Piracicaba: ESALQ, 1970. 170p. Tese de Doutorado.
- CASTRO, M.E.B. **Replicação e transcrição do vírus de poliedrose nuclear *Anticarsia gemmatilis* em linhagens celulares de insetos.** Brasília: UnB, Dep. de Biologia Celular, 1995. 100p. Tese de Doutorado.
- CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.L.; ARAÚJO, S.; BILIMORIA, S.L. Replication of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.40-45, 1997.
- CHAEYCHOMSRI, S.; IKEDA, M.; KOBAYASHI, M. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v.206, p.435-447, 1995.
- CHARLTON, C.A.; VOLKMAN, L.E. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLBSF21 cells induces action cable formation. **Virology**, v.197, p.245-254, 1993.
- CHEN, C.; QUENTIN, M.E.; BRENNAN, L.A.; KUKEL, C.; THIEM, S.M. *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus *hrf-1* expands the larval host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**, v.72, p.2526-2531, 1998.
- CHERNOMORDIK, L.; LEIKINA, E.; CHO, M.-S.; ZIMMERBERG, J. Control of baculovirus gp64-induced syncytium formation by membrane lipid composition. **Journal of Virology**, v.69, p.3049-3058, 1995.
- CLEM, R.J.; FECHHEIMER, M.; MILLER, L.K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. **Science**, v.254, p.1388-1390, 1991.

- CLEM, R.J.; MILLER, L.K. Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. **Journal of Virology**, v.67, p.3730-3738, 1993.
- COCHRAN, M.A.; BROWN, S.E.; KNUDSON, D.L. Organization and expression of the baculovirus genome. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, p.239-258.
- COCHRAN, M.A.; FAULKNER, P. Location of homologous DNA sequences interspersed at five regions in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. **Journal of Virology**, v.45, p.961-970, 1983.
- CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; DE OLIVEIRA E.B.; GATTI, I.M. Ocorrência de poliedrose nuclear em *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, na Região Sul do Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.6, p.312-314, 1977.
- CORY, J.S.; HIST, M.L.; WILLIAMS, T.; HAILS, R.S.; GOULSON, D.; GREEN, B.M.; CARTY, T.M.; POSSEE, R.D.; CAYLAY, P.J.; BISHOP, D.H.L. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. **Nature**, v.370, p.138-140, 1994.
- CRAWFORD, A.M.; MILLER, L.K. Characterization of an early gene accelerating expression of late genes of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.62, p.2773-2781, 1988.
- CRISHOLM, G.E.; HENNER, D.J. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. **Journal of Virology**, v.62, p.3193-3200, 1988.
- CROOK, N.E. Baculoviridae: sub-group B: comparative aspects of granulosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.73-110.
- CROOK, N.E.; CLEM, R.J.; MILLER, L.K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. **Journal of Virology**, v.67, p.2168-2174, 1993.
- DEVEREUX, J.; HAEBERLI, P.; SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.387-395, 1984.
- DICKSON, J.A.; FRIESEN, P.D. Identification of upstream promoter elements mediating early transcription from the 35-molecular-weight protein gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.65, p.4006-4016, 1991.
- DOUGHERTY, E.M.; WEINER, R.M.; VAUGHN, J.L.; REICHELDERFER, C.F. Physical factors that affect in vitro *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, p.1166-1172, 1981.
- ENGELHARD, E.K.; KAMMORGAN, L.N.W.; WASHBURN, J.O.; VOLKMAN, L.E. The insect tracheal system - a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M. nuclear polyhedrosis. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v.91, p.3224-3227, 1994.
- EVANS, H.F. Ecology & epizootiology of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v.2, p.89-132.

- FLIPSEN, J.T.M.; MANS, R.M.W.; KLEEFSMAN, A.W.F.; KNEBEL-MORS DORF, D.; VLAK, J.M. Deletion of the baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene induces early degeneration of Malpighian tubules in infected insects. **Journal of Virology**, v.69, p.4529-4532, 1995.
- FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. (Eds.). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. **Archives of Virology**, v.2, p.117-123, 1991. Supplement.
- FRIESEN, P.D.; MILLER, L.K. The regulation of baculovirus gene expression. In: DERFLER, W.; BOEHM, P. (Eds.). **The molecular biology of baculoviruses**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.31-50.
- FUNDERBURK, J.; MARUNIAK, J.; BOUCIAS, D.; GARCIA-CANEDO, A. Efficacy of baculoviruses and their impact on pest management programs. In: COPPING, L.G.; GREEN, M.; REES, R. (Eds.). **Pest management in soybean**. London: Elsevier, 1992. p.88-97.
- FUXA, J.R. *Spodoptera frugiperda* susceptibility to nuclear polyhedrosis virus isolates with reference to insect migration. **Environmental Entomology**, v.16, p.218-223, 1987.
- FUXA, J.R.; ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; RICHTER, A.R. Selection for *Anticarsia gemmatalis* resistance to NPV, and susceptibility of field populations to the virus. **Resistant Pest Management**, v.5, n.1, p.39-41, 1993.
- FUXA, J.R.; MITCHELL, F.L.; RICHTER, A.R. Resistance of *Spodoptera frugiperda* [Lep.: Noctuidae] to a nuclear polyhedrosis virus in the field and laboratory. **Entomophaga**, v.33, p.55-63, 1988.
- FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Reversion of resistance by *Spodoptera frugiperda* to nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.53, p.52-56, 1989.
- FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Selection for an increased rate of vertical transmission of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, v.20, p.603-609, 1991.
- GARCIA, M.A. **Potencialidade de alguns fatores bióticos e abióticos na regulação populacional de *Spodoptera frugiperda* (Abbot e Smith, 1797) (Lep. Noctuidae)**. Campinas: UNICAMP, 1979. 96p. Tese de Mestrado.
- GARCIA-CANEDO, A.M.G. **Estudo da variabilidade genética do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis***. Campinas: UNICAMP, Instituto de Biologia, 1995. 139p. Tese de Doutorado.
- GERK, A.O.; KITAJIMA, E.W.; SOUZA, M.L. Identificação e caracterização de isolado brasileiro do vírus de poliedrose nuclear da lagarta do cartucho-do-milho. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v.26, p.507-515, 1997.
- GLOCKER, B.; HOOPES JUNIOR, R.R.; ROHRMANN, G.F. In vitro transactivation of baculovirus early genes by nuclear extracts from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. **Journal of Virology**, v.66, p.3476-3484, 1992.
- GONG, M.; GUARINO, L.A. The apoptotic suppressor P35 increases expression of a delayed early gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v.204, p.38-44, 1994.

- GRANADOS, R.R. Infectivity and mode of action of baculoviruses. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, p.1377-1405, 1980.
- GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). The biology of baculoviruses. Boca Raton: CRC, 1986. v.1.
- GRANADOS, R.R.; WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, p.89-108.
- GRÖNER, A. Safety to nontarget invertebrates of baculoviruses. In: LACEY, L.; DAVISON, E.W. (Eds.). **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton: CRC, 1989. p.135-147.
- GRÖNER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, p.177-202.
- GRÖNER, A.R.; GRANADOS, R.; BURAND, J.P. Interaction of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with two nonpermissive cell lines. **Intervirology**, v.21, p.203-209, 1984.
- GROSS, C.H.; RUSSELL, R.L.Q.; ROHRMANN, G.F. *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. **Journal of General Virology**, v.75, p.1115-1123, 1994.
- GUARINO, L.A.; GONZALEZ, M.A.; SUMMERS, M.D. Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.60, p.224-229, 1986.
- GUARINO, L.A.; SUMMERS, M.D. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. **Journal of Virology**, v.57, p.563-571, 1986a.
- GUARINO, L.A.; SUMMERS, M.D. Functional mapping of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genes required for late gene expression. **Journal of Virology**, v.62, p.463-471, 1988.
- GUARINO, L.A.; SUMMERS, M.D. Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed-early gene expression. **Journal of Virology**, v.60, p.215-223, 1986b.
- HAWTIN, R.E.; ARNOLD, K.; AYRES, M.D.; ZANOTTO, P.M.A.; HOWARD, S.C.; GOODAY, G.W.; CHAPPELL, L.H.; KITTS, P.A.; KING, L.A.; POSSEE, R.D. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. **Virology**, v.69, p.975-982, 1995.
- HAWTIN, R.E.; ZARKOWSKA, T.; ARNOLD, K.; THOMAS, C.J.; GOODAY, G.W.; KING, L.A.; KUZIO, J.A.; POSSEE, R.D. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology**, v.238, p.243-253, 1997.
- HERSHBERGER, P.A.; DICKSON, J.A.; FRIESEN, P.D. Site-specific mutagenesis of the 35-kilodalton protein gene encoded by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Cell line-specific effects on virus replication. **Journal of Virology**, v.66, p.5525-5533, 1992.

- HILL, J.E.; KUZIO, J.; WILSON, J.A.; MACKINNON, E.A.; FAULKNER, P. Nucleotide sequence of the p74 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1172, p.187-189, 1993.
- HIMURI, H.; HIMURI, K.; McINTOSCH, A.H. Morphogenesis of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper in a continuous cabbage looper cell line. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.266, p.302-326, 1975.
- HINK, W.F. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Nature**, v.226, p.466-467, 1970.
- HONG, T.; BRAUNAGEL, S.C.; SUMMERS, M.D. Transcription, translation, and localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v.204, p.210-222, 1994.
- HOOPE JUNIOR, R.R.; ROHRMANN, G.F. In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v.88, p.4513-4517, 1991.
- HORTON, M.H.; BURAND, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, v.67, p.1860-1868, 1993.
- HUANG, R.T.C.; ROTT, R.; WAHN, K.; KLENK, H.D.; KOHAMA, T. The function of the neuroaminidase in membrane fusion induced by myxo viruses. **Virology**, v.107, p.313-319, 1980.
- HUH, N.E.; WEAVER, R.F. Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of General Virology**, v.71, p.195-201, 1990.
- JOHNSON, D.W.; MARUNIAK, J.E. Physical map of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus (AgNPV-2) DNA. **Journal of General Virology**, v.70, p.1877-1883, 1989.
- KAMITA, S.G.; MAEDA, S. Inhibition of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (NPV) replication by the DNA helicase gene of *Autographa californica* NPV. **Journal of Virology**, v.67, p.6239-6245, 1993.
- KAMITA, S.G.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. **Journal of Virology**, v.67, p.455-463, 1993.
- KELLY, D.C.; LESCOTT, T. Baculovirus replication: protein synthesis in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. **Microbiologica**, v.4, p.35-57, 1981.
- KITAJIMA, E.W. Perspectivas de controle biológico de insetos por vírus no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.8, p.65-71, 1986.
- KNUDSON, D.L.; HARRAP, K. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: microscopy study of the sequence of events of the virus infection. **Journal of Virology**, v.17, p.254-268, 1976.

- KNUDSON, D.L.; TINSLEY, T.W. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell line of *Spodoptera frugiperda*: purification, assay of infectivity, and growth characteristics of the virus. **Journal of Virology**, v.14, p.934-944, 1974.
- KOOL, M.; AHRENS, C.; GOLDBACH, R.W.; ROHRMANN, G.F.; VLAK, J.M. Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v.91, p.11212-11216, 1994.
- KOOL, M.; VOETEN, J.T.M.; GOLDBACH, R.W.; TRAMPER, J.; VLAK, J.M. Identification of seven putative origins of *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus DNA replication. **Journal of General Virology**, v.74, p.2661-2668, 1993.
- KRAPPA, R.; BEHN-KRAPPA, A.; JAHNEL, F.; DOERFLER, W.; KNEBEL-MÖRSDORF, D. Differential factor binding at the promoter of early baculovirus gene PE38 during viral infection: GATA motif is recognized by an insect protein. **Journal of Virology**, v.66, p.3494-3503, 1992.
- KUZIO, J.; JACQUES, R.; FAULKNER, P. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. **Virology**, v.173, p.759-763, 1989.
- LACEY, L.A.; GOETHEL, M.S. Current development in microbial control of insect pests and prospects for the early 21<sup>st</sup> century. **Entomophaga**, v.40, p.3-27, 1996.
- LANIER, L.M.; SLACK, J.M.; VOLKMAN, L.E. Actin binding and proteolysis by the baculovirus AcMNPV: the role of virion-associated V-CATH. **Virology**, v.216, p.380-388, 1996.
- LEE, H.; KRELL, P.J. Reiterated DNA fragments in defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus are competent for AcMNPV-dependent DNA replication. **Virology**, v.202, p.418-429, 1994.
- LEE, H.H.; MILLER, L.K. Isolation, complementation, and initial characterization of temperature-sensitive mutants of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.31, p.240-252, 1979.
- LENARD, J.; MILLER, D.K. Uncoating of enveloped viruses. **Cell**, v.28, p.5-6, 1982.
- LERCH, R.A.; FRIESEN, P.D. The 35-kilodalton protein gene (p35) of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the neomycin resistance gene provide dominant selection of recombinant baculoviruses. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.1753-1760, 1993.
- LITTLE, S.P.; JOFRE, J.T.; COURTNEY, R.J.; SCHAFFER, P.A. A virion-associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex virus type 1. **Virology**, v.115, p.149-160, 1981.
- LIU, H.-S. **Host specific expression of baculovirus, *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus, in insect cell lines**. Lubbock, TX: Texas Tech. Univ., 1987. 83p. Ph.D. Thesis.
- LIU, J.J.; CARSTENS, E.B. Identification, localization, transcription, and sequence analysis of the *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase gene. **Virology**, v.209, p.538-549, 1995.

- LU, A.; CARSTENS, E.B. Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v.195, p.710-718, 1993.
- LU, A.; CARSTENS, E.B. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v.181, p.336-347, 1991.
- LU, A.; MILLER, L.K. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. **Journal of Virology**, v.69, p.975-982, 1995.
- MA, S.W.; CORSARO, B.G.; KLEBBA, P.E.; FRASER, M.J. Cloning and sequence analysis of a p40 structural protein gene of *Helicoverpa zea* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v.192, p.224-233, 1993.
- MAEDA, S. Further development of recombinant baculovirus insecticides. **Current Opinion in Biotechnology**, v.6, p.313-319, 1995.
- MAEDA, S.; KAMITA, S.G.; KANODO, A. Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. **Journal of Virology**, v.67, p.6234-6238, 1993.
- MARTIGNONI, M.E. Baculovirus: an attractive biological alternative. In: GARNER, W.Y.; HARVEY JUNIOR, J. (Eds.). **Chemical and biological controls in forestry**. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1984. p.55-67. (ACS Symposium Series, 238).
- MARTIGNONI, M.E.; IWAI, P.J. **A Catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks**. 4.ed. Portland, OR: USDA-Forest Service, 1986. 51p. (USDA. PNW-195).
- MARUNIAK, J.E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, p.129-146.
- MARUNIAK, J.E. Molecular biology of *Anticarsia gemmatalis* baculovirus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.107-111, 1989.
- MARUNIAK, J.E.; SUMMERS, M.D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus phosphoproteins and synthesis of intracellular proteins after virus infection. **Virology**, v.109, p.25-34, 1981.
- McCLINTOCK, J.T.; DOUGHERTY, E.M.; WEINER, R.M. Semipermissive replication a nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* in a gypsy moth cell line. **Journal of Virology**, v.57, p.197-204, 1986.
- MILLER, D.W.; SAFER, P.; MILLER, L.K. An insect baculovirus host-vector for high-level expression of foreign genes. In: SETLOW, J.K.; HOLLAENDER, A. (Eds.). **Genetic engineering**. New York: Plenum, 1986. p.277-298.
- MILLER, L.K. Baculoviruses as gene expression vectors. **Annual Review of Microbiology**, v.42, p.177-199, 1988.
- MILLER, L.K. Genetically engineered insect virus pesticides: present and future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, p.211-216, 1995.

- MONSMA, S.A.; OOMENS, A.G.P.; BLISSARD, G.W. The gp64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. **Journal of Virology**, v.70, p.4607-4616, 1996.
- MORRIS, T.D.; MILLER, L.K. Characterization of productive and non-productive AcMNPV infection in selected insect cell lines. **Virology**, v.197, p.339-348, 1993.
- MORRIS, T.D.; MILLER, L.K. Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. **Journal of Virology**, v.66, p.7397-7405, 1992.
- MOSCARDI, F. **Control of *Anticarsia gemmatilis* Hübner on soybean with a baculovirus and selected insecticides and their effect on natural epizootics of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson.** Gainesville: Univ. of Florida, 1977. 68p. M.Sc. Thesis.
- MOSCARDI, F. The use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.51-56, 1989.
- MOSCARDI, F. Uso de entomopatógenos no manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: FERNANDES, O.A.; CORREIA, A.C.B.; BORTOLI, S.A. (Eds.). **Manejo integrado de pragas e nematóides.** Jaboticabal: FUNEP, 1990. p.207-220.
- MOSCARDI, F. **Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis*.** Londrina: Embrapa-CNPSO, 1983. 13p. (Embrapa-CNPSO. Comunicado técnico, 23).
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998. p.509-539.
- MOSCARDI, F.; CORREA-FERREIRA, B.S. Biological control of soybean caterpillars. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., 1984, Ames. **Proceedings.** Boulder: Westview, 1985. p.703-711.
- MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 1., Ames, Iowa, 1992. **International crop science I.** Madison: Crop Science Society of America, 1993. p.115-119.
- MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: COPPING, I.G.; GREEN, M.B.; REEDS, R.T. (Eds.). **Pest management in soybean.** London: Elsevier Applied Science, 1992. p.98-109.
- MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. Utilización de virus a campo. In: LECUONA, R.E. (Ed.). **Microrganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga.** Buenos Aires: Taller Mariano Mass, 1996. p.261-276.
- MURPHY, F.A.; FAUKQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. (Eds.). **Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses.** New York: Springer-Verlag Wien, 1995. p.104-113. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- NISSEN, M.S.; FRIESEN, P.D. Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. **Journal of Virology**, v.63, p.493-503, 1989.

- OHKAWA, T.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.68, p.6619-6625, 1994.
- O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDPglucosyl transferase gene. **Journal of Virology**, v.64, p.1321-1328, 1990.
- O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. Salt Lake City, UT: W.H. Freeman, 1992. 347p.
- PASSARELLI, A.L.; MILLER, L.K. Identification and characterization of lef-1, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. **Journal of Virology**, v.67, p.3481-3488, 1993a.
- PASSARELLI, A.L.; MILLER, L.K. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2. **Journal of Virology**, v.67, p.2149-2158, 1993b.
- PASSARELLI, A.L.; TODD, J.W.; MILLER, L.K. A baculovirus gene involved in late gene expression predicts a large polypeptide with a conserved motif of RNA polymerases. **Journal of Virology**, v.68, p.4673-4678, 1994.
- PAYNE, C.C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. **Fortschritte der Zoologie**, v.32, p.183-200, 1986.
- PAYNE, L.G.; KRISTENSSON, D. Effect of glycosylation inhibitors on the release of enveloped vaccinia virus. **Journal of Virology**, v.41, p.367-375, 1982.
- PEARSON, M.N.; BJORNSON, R.M.; AHRENS, C.; ROHRMANN, G.F. Identification and characterization of a putative origin of DNA replication in the genome of a baculovirus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. **Virology**, v.197, p.715-725, 1993.
- PEARSON, M.N.; BJORNSON, R.; PEARSON G.D.; ROHRMANN, G.F. The *Autographa californica* baculovirus genome: evidence for multiple replication origins. **Science**, v.257, p.1382-1384, 1992.
- PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L.K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* b-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Molecular and Cellular Biology**, v.4, p.399-406, 1984.
- REINISCH, A.J. **Gene expression in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infections exhibiting host-specific modulation of occlusion body formation**. Lubbock, TX: Texas Tech. Univ., 1989. 85p. Ph.D. Thesis.
- RIBEIRO, B.M.; ZANOTTO, P.M.A.; McDOWELL, S.; SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. Characterization of a baculovirus infecting the passion fruit caterpillar *Dione juno juno*. **Biocell**, v.21, p.71-82, 1997.
- RICE, W.C.; MILLER, L.K. Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive *Drosophila* cells. **Virus Research**, v.6, p.155-172, 1986.
- RICHARDSON, C.D. (Ed.). **Baculovirus expression protocols**. Totowa: Humana, 1995. 418p. (Methods in Molecular Biology, 39).
- ROHRMANN, G.F. Baculovirus structural proteins. **Journal of General Virology**, v.73, p.749-761, 1992.

- ROHRMANN, G.F. Polyhedrin structure. **Journal of General Virology**, v.67, p.1499-1513, 1986.
- RUSSELL, R.L.Q.; ROHRMANN, G.F. A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. **Virology**, v.195, p.532-540, 1993.
- SCHMITT, A.T. **Eficiência da aplicação de *Baculovirus erinnyis* no controle do mandarová-da-mandioca**. Florianópolis: EMPASC, 1985. 7p. (EMPASC. Comunicado técnico, 88).
- SCHMITT, A.T. Inimigos naturais do *Erinnyis ello* da mandioca. In: ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISTAS, 3., 1984, Florianópolis. **Anais**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984. p.201-208.
- SCHMITT, A.T. Ocorrência de inimigos naturais de *Erinnyis ello* (L.) no Estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Mandioca**, v.2, p.59-62, 1983.
- SIEBURTH, P.J.; MARUNIAK, J.E. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.24, p.195-198, 1988a.
- SIEBURTH, P.J.; MARUNIAK, J.E. Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three polyhedrosis viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.453-458, 1988b.
- SIMONS, K.; GAROFF, H. The budding mechanisms of enveloped animal viruses. **Journal of General Virology**, v.50, p.1-21, 1980.
- SMITH, G.E.; FRASER, M.J.; SUMMERS, M.D. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. **Journal of Virology**, v.46, p.584-593, 1983.
- SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D. DNA homology among subgroup A, B and C baculovirus. **Virology**, v.123, p.393-406, 1982.
- STEINHAUS, E.A.; MARSH, G.A. Report of diagnosis of diseased insects, 1951-1961. **Hilgardia**, v.33, p.349-390, 1962.
- STILES, B.; WOOD, H.A. A study of the glycoproteins of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV). **Virology**, v.131, p.230-241, 1983.
- SUMMERS, M.D.; SMITH, G.E. **A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures**. College Station, TX : Department of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station / Texas A&M University, 1987. 56p. (Texas Agricultural Experiment Station. Bulletin, 1555).
- SUMMERS, M.D.; SMITH, G.E.; KNELL, J.D.; BURAND, J.P. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ni* nuclear polyhedrosis virus recombinants. **Journal of Virology**, v.34, p.694-703, 1980.
- TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect pathology**. New York: Academic, 1993. 666p.
- THIEM, S.M.; MILLER, L.K. A baculovirus gene with novel transcription pattern encodes a polypeptide with a zinc finger and leucine zipper. **Journal of Virology**, v.63, p.4489-4497, 1989.
- TODD, J.W.; PASSARELLI, A.L.; MILLER, L.K. Eighteen baculovirus genes, including lef-11, p35, 39K, and p47, support late gene expression. **Journal of Virology**, v.69, p.968-974, 1995.

- TOMALSKI, M.D.; WU, J.; MILLER, L.K. The location, sequence, transcription and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. **Virology**, v.167, p.591-600, 1988.
- VALICENTE, F.H.; CRUZ, I. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1991. 23p. (Embrapa-CNPMS. Circular técnica, 15).
- VALICENTE, F.H.; PEIXOTO, M.J. de V.D.; PAIVA, E.; KITAJIMA, E.W. Identificação e purificação de um vírus de poliedrose nuclear da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v.18, p.71-82, 1989.
- VAN DER WILK, F.; VAN LENT, J.W.M.; VLAK, J.M. Immunogold detection of polyhedrin p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. **Journal of General Virology**, v.68, p.2615-2624, 1987.
- VAN OERS, M.M.; FLIPSEN, J.T.M.; REUSKEN, C.B.E.M.; VLAK, J.M. Specificity of baculovirus p10 functions. **Virology**, v.200, p.513-523, 1994.
- VAUGHN, J.L.; DOUGHERTY, E.M. The replication of baculoviruses. In: MARAMOROSCH, K.; SHERMAN, K.E. (Eds.). **Viral insecticides for biological control**. New York: Academic, 1985. p.569-633.
- VAUGHN, J.L.; GOODWIN, R.H.; TOMPKINS, G.J.; McCAWLEY, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro**, v.13, p.213-217, 1977.
- VLAK, J.M.; KLINKENBERG, F.A.; ZAAL, K.J.M.; USMANY, M.; KLINGER-ROODE, E.C.; GEERVLIET, J.B.F.; ROOSIEN, J.; VAN LENT, J.W.M. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-b-galactosidase fusion gene. **Journal of General Virology**, v.69, p.765-776, 1988.
- VOLKMAN, L.E. The 64-K envelope protein of the budded nuclear polyhedrosis virus. In: DOERFLER, W.; BOEHM, P. (Eds.). **Current topics in microbiology and immunology**. Berlin: Heidelberg/New York: Springer-Verlag, 1986. p.103-118.
- VOLKMAN, L.E.; GOLDSMITH, P.A. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. **Virology**, v.143, p.185-195, 1985.
- VOLKMAN, L.E.; KEDDIE, B.A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, v.1, p.249-256, 1990.
- VOLKMAN, L.E.; SUMMERS, M.D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.30, p.102-103, 1977.
- WHITFORD, M.; FAULKNER, P. A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. **Journal of Virology**, v.66, p.3324-3329, 1992a.
- WHITFORD, M.; FAULKNER, P. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.66, p.4763-4768, 1992b.

- WHITFORD, M.; STEWART, S.; KUZIO, J.; FAULKNER, P. Identification and sequence analysis of gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.63, p.1393-1399, 1989.
- WILLIAMS, G.V.; ROHEL, D.Z.; KUZIO, J.; FAULKNER, P. A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants. **Journal of General Virology**, v.70, p.187-202, 1989.
- WINSTANLEY, D.; CROOK, N.E. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell lines. **Journal of General Virology**, v.74, p.1599-1609, 1993.
- WOOD, A.W.; GRANADOS, R.R. Genetically engineered baculovirus as agents for pest control. **Annual Review of Microbiology**, v.45, p.69-87, 1991.
- ZANOTTO, P.M.A.; KESSING, B.D.; MARUNIAK, J.E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, p.147-164, 1993.
- ZANOTTO, P.M.A.; SAMPAIO, M.J.A.; JOHNSON, D.W.; ROCHA, T.L.; MARUNIAK, J.E. The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. **Journal of General Virology**, v.73, p.1049-1056, 1992.