

Boletim de Pesquisa 183

e Desenvolvimento

ISSN 1676 - 340

Dezembro, 2007

Geração e acúmulo de mutantes com poucos poliedros após passagem serial do baculovirus anticarsia (AgMNPV) em cultura de células



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 183

Geração e acúmulo de mutantes com poucos poliedros após passagem serial do baculovirus anticarsia (AgMNPV) em cultura de células

Syomara Hakiko Matusita Soares de Rezende
Maria Elita Batista de Castro
Marlinda Lobo de Souza

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-
3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Lara Pereira Machado*

Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

R 467 Rezende, Syomara Hakiko Matusita Soares de

Geração e acúmulo de mutantes com poucos poliedros após passagem serial do baculovirus anticarsia (AgMNPV) em cultura de células / Syomara Hakiko Matusita Soares de Rezende, Maria Elita Batista de Castro, Marlinda Lobo de Souza. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

17 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 183).

1. *Anticarsia gemmatilis* - baculovirus. 2. *Anticarsia gemmatilis* - mutantes - cultura de células. I. Castro, Maria Elita Batista de. II. Souza, Marlinda Lobo de. III. Título. IV. Série.

579.2436 - CDD 21.

SUMÁRIO

Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	10
Referências Bibliográficas	16

Geração e acúmulo de mutantes com poucos poliedros após passagem serial do baculovirus anticarsia (AgMNPV) em cultura de células

Syomara Hakiko Matusita Soares de Rezende¹
Maria Elita Batista de Castro²
Marlinda Lobo de Souza²

Resumo

O *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), conhecido como baculovirus anticarsia, tem sido largamente empregado para o controle da lagarta da soja no Brasil. Baculovirus são vírus de insetos que possuem um ciclo de infecção singular no qual são produzidas duas formas infecciosas distintas: o *budded virus* e a forma viral oclusa denominada poliedro. A passagem serial de baculovirus em cultura de células leva a indução de alterações genéticas no genoma viral. O tipo mais comum de mutação é a geração e acumulação do fenótipo *Few Polyhedra* (FP) em substituição a forma selvagem *Many Polyhedra* (MP). A baixa formação de poliedros e a redução da virulência, característicos de mutantes FP, são fatores indesejáveis para a produção *in vitro* de baculovirus. Neste trabalho a geração de mutantes FP e a produção de poliedros nas células foram monitorados durante dez passagens seriais do clone viral AgMNPV-2D em células BTI-Tn5B1-4. Inicialmente, a hemolinfa de larvas infectadas com o vírus foi utilizada como inóculo para a infecção de células em cultura permitindo a primeira passagem viral. Passagens subseqüentes foram realizadas utilizando, como inóculo, 1 ml do sobrenadante contendo as partículas virais (BV) produzidas durante a infecção. O número de células infectadas e o número de poliedros formados foram determinados por contagem em câmara de Neubauer. O perfil da produção de poliedros por célula variou consideravelmente durante a passagem serial. Todas as células apresentavam sinais evidentes de infecção, embora nem todas foram capazes de formar poliedros em seu núcleo. A porcentagem de células contendo muitos poliedros manteve-se alta e constante até a quinta passagem (em torno de 60%). A partir desse ponto houve um significativo aumento de células com poucos poliedros (40 %) em paralelo ao decréscimo de células com muitos poliedros (20%). Nas últimas passagens (P9 e P10) o número de células com poucos poliedros manteve-se constante enquanto o número de células com muitos poliedros caiu para níveis basais (5%). Adicionalmente, o título viral de mutantes com poucos poliedros aumentou nas passagens mais altas indicando a predominância desses mutantes na população viral.

¹ Bióloga, doutoranda, Universidade de Brasília – UnB

² Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abstract

The *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), known as baculovirus anticarsia, is widely used to the control of the velvetbean caterpillar in Brazil. Baculovirus are insect viruses which have a unique infection cycle in that they produce two infectious morphological forms: the budded virus and the occluded viral form named polyhedra. Serial passage of baculoviruses in cell culture leads to induction of genetic changes in the viral genome. The most common mutation is the generation and accumulation the Few Polyhedra phenotype (FP) replacing the Many Polyhedra (MP) wild type phenotype. The low polyhedra formation and the reduction on virulence, features of FP mutants, are undesired events for baculovirus *in vitro* production. In the present work the generation of FP mutants and the production of polyhedra per cell were monitored during ten serial passages of the viral clone AgMNPV-2D in BTI-Tn5B1-4 cells. Initially, hemolymph of infected caterpillars was used as inoculum to infect cultured cells allowing the first viral passage. Subsequent passages were done with 1 ml of the supernatant, as inoculum, which contain the viral particles (BV) produced during infection. The number of infected cells and the number of polyhedra were counted using a Neubauer chamber. The kinetics of polyhedra production, per cell, changed considerably during serial passage. All cells showed typical signals of infection, although not every cell was able to form polyhedra in the nuclei. The percentage of cells containing many polyhedra was high and constant until fifth passage (around 60%). After that, there was a significant increase of cells containing few polyhedra (40%) in parallel to the decrease of cells with many polyhedra (20%). In late passages (9 e 10) the number of cells with few polyhedra was constant while the number of the cells with many polyhedra decreased to basal levels (5%). In addition, the viral title of the mutants with few polyhedra increased in higher passages indicating the predominance of these mutants in the viral population.

Introdução

Baculovírus são vírus patógenos naturais de insetos e têm sido usados como agentes de controle biológico (MOSCARDI, 1983). São vírus envelopados, em forma de bastão, inclusos em uma matriz protéica que os protege de condições ambientais adversas e possuem DNA dupla fita circular, variando de tamanho entre 80 a 180 kilobases (CASTRO e SOUZA, 2006). Compreendem o maior grupo de vírus de insetos e têm sido amplamente estudados devido ao seu potencial como agentes de controle biológico de insetos-praga em agricultura e áreas florestais.

A família *Baculoviridae* está dividida em 2 gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus* (FAUQUET et al., 2005). Os *Nucleopolyhedrovirus* se caracterizam pela formação de corpos de oclusão poliédricos, constituídos predominantemente da proteína poliedrina, que podem variar em tamanho entre 0,15 e 15 μm . Os *Granulovirus* são menores, possuem forma ovalar, variando de 0.3 a 0.5 μm , sendo a granulina o principal componente do seu corpo de oclusão.

Durante o ciclo de replicação dos baculovírus são produzidas duas formas infectivas distintas: os *Budded Virus* (BV) e os vírus derivados de corpos de oclusão (*ODV-Occlusion Derived Virus*). Esses últimos são imersos dentro de um corpo de oclusão (*OB-Occlusion Body*), também chamado de poliedro ou grânulo de acordo com o gênero. As partículas virais se replicam e são empacotadas no núcleo da célula infectada (CASTRO e SOUZA, 2006).

A produção de baculovírus, para sua utilização como inseticida biológico, tem sido feita no próprio inseto hospedeiro devido a sua alta especificidade e sua elevada capacidade de multiplicação no corpo do inseto. Entretanto, existem limitações como contaminação com outros microrganismos de lagartas coletadas no campo e dificuldades em se estabelecer a criação de determinadas espécies de insetos. Dessa forma, a produção desses vírus em cultivos de células de inseto é de grande interesse como forma alternativa de produção viral. Por outro lado, nesse processo o vírus pode sofrer alterações genéticas levando a geração de mutantes ou partículas virais defectivas.

A produção de baculovírus com base na multiplicação em cultivos celulares em biorreatores não tem sido viável comercialmente. Uma das principais causas é a perda de virulência durante passagens seriais necessárias ao processo de escalonamento da produção (*scaling up*) do patógeno. Esse fenômeno é denominado "Efeito Passagem" (SLAVICEK et al., 1995; MOSCARDI e SOUZA, 2002). Nestas condições aparecem mutações que podem se

tornar predominantes, principalmente a geração de um tipo específico de mutantes denominado FP (*Few Polyhedra*).

A mutação FP confere um fenótipo dominante ao vírus sob condições de propagação em cultura de células (FRASER e HINK, 1982; POTTER et al., 1976; KUMAR e MILLER, 1987; CARY et al., 1989). O fenótipo mutante é caracterizado por um aumento no número de partículas infectivas *Budded Virus* (BV) e um decréscimo na formação de corpos de oclusão (OB). O resultado de passagem prolongada (sem diluição) do baculovírus *in vitro*, foi inicialmente demonstrado por MacKinnon et al. (1974) para o vírus *Trichoplusia ni* NPV em células TN-368. Em altas passagens foram observados poucos poliedros desse vírus por célula e esses tornaram-se menos virulentos. Além disso, os poliedros formados eram morfológicamente alterados, sendo baixo o número de vírions oclusos por partícula viral (OB).

Mutantes FP têm sido identificados em estudos dos vírus de *Autographa californica* (AcMNPV), *Trichoplusia ni* (TnMNPV), *Galleria mellonella* (GmMNPV), *Lymantria dispar* (LdMNPV), *Bombix mori* (BmNPV) e *Helicoverpa armigera* (HaSNPV) (HINK e STRAUSS, 1976; MACKINNON et al., 1974; POTTER et al., 1976; FRASER e HINK, 1982; SLAVICEK et al., 1992; KATSUMA et al., 1999; PEDRINI et al., 2004).

O Baculovirus anticarsia (*Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus - AgMNPV) é aplicado, desde 1984, para o controle da lagarta da soja no Brasil. Ele vem sendo produzido *in vivo*, em condições de campo ou de criação massal do inseto em laboratório (MOSCARDI e SOUZA, 2002). Devido a alta demanda no uso desse vírus como bioinseticida é de grande interesse o estabelecimento das condições para sua multiplicação em cultura de células. Além disso, ele poderia servir de modelo, para outros baculovirus, nos estudos de produção *in vitro*. Recentemente, a seqüência completa do genoma desse vírus foi determinada (OLIVEIRA et al., 2006).

Nesse trabalho, o clone viral AgMNPV-2D foi propagado em 10 passagens sucessivas em células Tn5B1-4, para avaliação da flutuação de fenótipos de muitos poliedros (MP) para poucos poliedros (FP) na população viral. Em todas as passagens foram medidos os o número total de poliedros por células, bem como as porcentagens de células contendo muitos poliedros no núcleo (células com MP) e contendo poucos poliedros (células com FP). Finalmente, o título viral produzido durante as passagens foi determinado.

Material e Métodos

Linhagem celular – Células de *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4), também conhecidas como células High Five, mantidas à 27°C em meio TNMFH suplementado com 10% de soro bovino fetal.

Vírus – Clone viral AgMNPV-2D, fornecido pelo Dr. James Maruniak (University of Florida-USA) obtido a partir do vírus selvagem AgMNPV-79, pela técnica de *plaque assay*

Insetos – Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) provenientes do Laboratório de Criação de Insetos do CENARGEN/EMBRAPA e cultivadas com dieta artificial.

Obtenção do inóculo viral inicial (hemolinfa) – Lagartas sadias (de 3^o e 4^o ínstars) foram infectadas, através de dieta contendo o inóculo viral em sua superfície (1×10^6 poliedros/dieta). No 4^o dia após a infecção a hemolinfa foi removida, cortando-se o último par de patas, e coletada em tubo *ependorf* com 450µl de meio TNMFH sem soro e 50µl de cisteína (concentração final de 0,01 M). A mistura foi homogenizada e centrifugada à 3000rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante filtrado em filtro Millipore 0,45µm e diluído no mesmo volume de meio sem soro.

Infecção em cultura de células – Células Tn5B1-4 foram previamente sedimentadas em frascos de 25 cm³. (2×10^6 células/frasco), por cerca de 10h. Em seguida, o meio de cultura foi removido e então adicionado 1 ml do inóculo viral (hemolinfa – P0) ao frasco. O período de adsorção do vírus foi de 1 hora com agitação lenta a cada 10 minutos. Finalmente, as células foram lavadas com 2ml de meio sem soro e mantidas em estufa a 27°C, com meio TNMFH completo.

Passagem serial – O sobrenadante contendo *budded virus* (1 ml), coletado 72h após a infecção com hemolinfa, foi utilizado como inóculo viral (P1) para uma nova passagem. Da mesma forma, passagens subseqüentes foram realizadas sempre utilizando 1ml do sobrenadante da passagem anterior. A cada passagem eram feitas triplicatas contendo 2×10^6 células por frasco T-25.

Microtitulação – Células Tn5B1-4 na concentração de 1×10^5 , semeadas em placas de 96 poços, foram infectadas com diferentes diluições em série do vírus (10^{-1} a 10^{-8}) e incubadas a 27°C, conforme O'Reilly et al., 1992. Após 5 dias de infecção cada poço foi examinado e os poços onde apareciam células com poliedros, ou com sinais típicos de infecção, foram contados como positivos. O cálculo do título viral foi estabelecido pelo método de Reed e Muench (1938).

Análise morfológica – A infecção das células, formação de poliedros e demais efeitos citopáticos foram observados e monitorados por microscopia de contraste de fase, em microscópio de inversão modelo OLYMPUS CK2. Células características de cada passagem serial foram fotografadas utilizando microscópio Axiovert 135M Zeiss.

Determinação da porcentagem de células com poliedros – Uma alíquota da suspensão celular de cada frasco foi coletada e utilizada para visualização das células por microscopia ótica, após 72h de infecção. Dessa forma foi feita a determinação da porcentagem de células com muitos poliedros no núcleo (células com MP), células com poucos poliedros no núcleo (células com FP) e células infectadas embora sem formação de poliedros, após contagem em câmara de Neubauer.

Determinação do número de poliedros por células – O número total de células com poliedros (soma de células com MP e células com FP) e o número de poliedros por mililitro (ml) foram utilizados para cálculo do número de poliedros por célula de cada amostra. O número de poliedros por ml foi determinado 1 hora após adição de 1% de SDS a suspensão de células infectadas

Resultados e Discussão

Analisando os efeitos citopáticos resultantes da infecção de células observou-se aproximadamente 100% de infecção em todas as passagens, pois, mesmo as células que não continham poliedros em seu núcleo apresentavam formato maior, arredondado, núcleo hipertrofiado e presença de estroma virogênico ou protusão.

Células não infectadas são mostradas na figura 1 (Controle). Na figura 2 são apresentadas células de passagem inicial P1, onde pode-se notar um número elevado de células com muitos poliedros no núcleo.

A figura 3 que apresenta células infectadas na passagem P6, e a figura 4 referente a passagem P10, demonstram o declínio de células com muitos poliedros em paralelo o aumento de células com poucos poliedros. Esse perfil, em que há um declínio do número de poliedros por célula associado a diminuição de células com MP e aumento de células FP, é característico da mutação FP comum em prolongadas infecções virais em cultura de células.

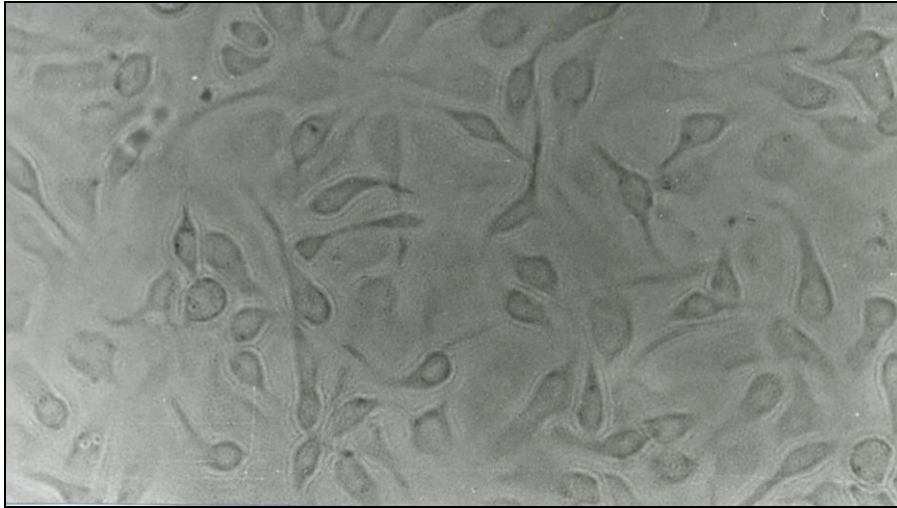


Figura 1- Células Tn5B1-4 não infectadas (controle)

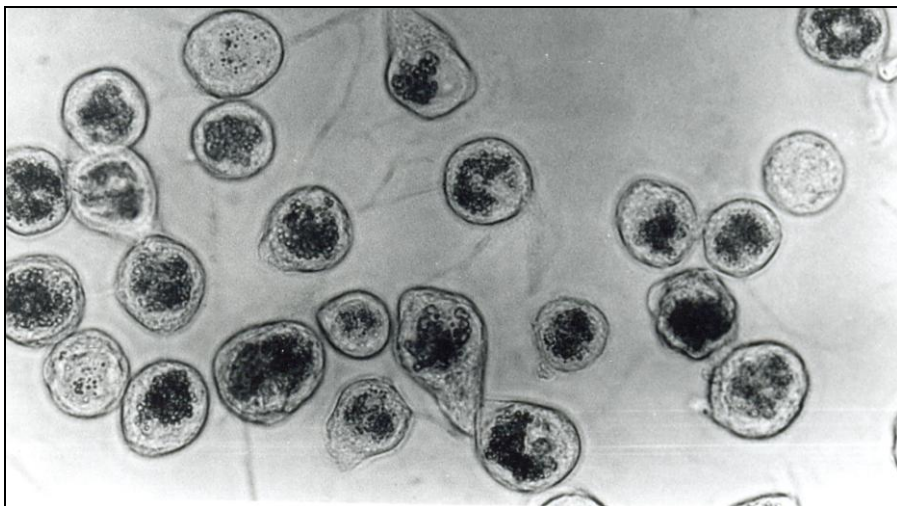


Figura 2- Células Tn5B1-4 infectadas com AgMNPV-2D-Passagem 1



Figura 3- Células Tn5B1-4 infectadas com AgMNPV-2D- Passagem 6

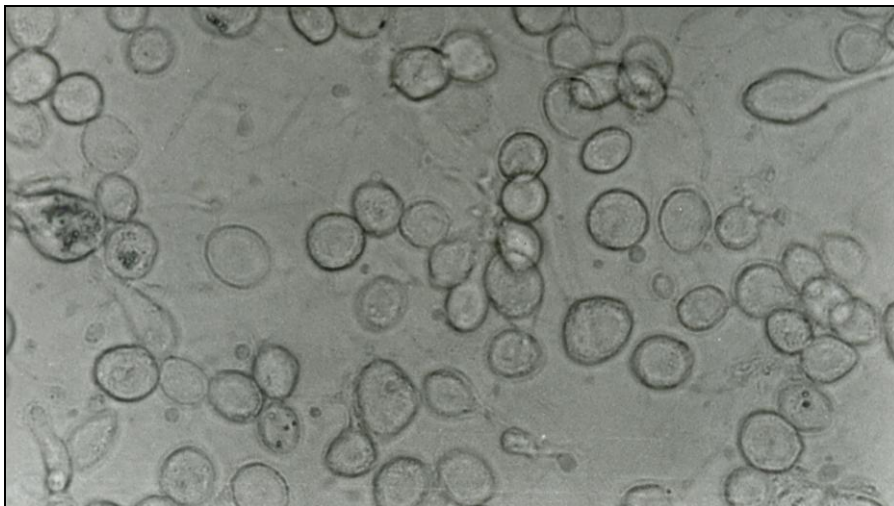


Figura 4- Células Tn5B1-4 infectadas com AgMNPV-2D-Passagem 10

O perfil da produção de poliedros por célula variou bastante durante a passagem serial. Nas passagens iniciais (P1 a P5) houve uma grande número de células com poliedros (variando de 57 a 67%), sendo que destas, a porcentagem de células com MP variou de 49 a 62% e a porcentagem de células com FP variou de 5 a 12%. No entanto, a partir da sexta passagem do vírus (P6) houve uma queda brusca da porcentagem de células com MP (15%) e um significativo aumento de células com FP (25%). Nas passagens P7 e P8, houve um aumento no número de células apresentando poliedros, sendo que a proporção de células com MP e de células com FP se manteve em torno de 36% e 64% respectivamente. Finalmente, nas últimas passagens (P9 e P10) o número de células com FP manteve-se constante, cerca de 30 %, enquanto o número de células com MP caiu para

níveis basais (Gráfico 1). Nos gráficos 2 e 3 são apresentadas as flutuações ocorridas durante a passagem serial relativas a formação de células com muitos poliedros e de células com poucos poliedros.

O número de poliedros por células na passagem inicial P1 é de aproximadamente 150 OB/cel., sendo que na passagem P2 ocorreu um aumento significativo alcançando um valor de 350 OB/cel. Entretanto, a partir dessa passagem ocorreu uma redução na produção, havendo um declínio acentuado na sexta passagem (50 OB/cel.) chegando a atingir um valor de 12 OB/ cel. na ultima passagem (Gráfico 4). Estes dados tendem a confirmar a redução de poliedros por célula o que acarreta uma diminuição da virulência.

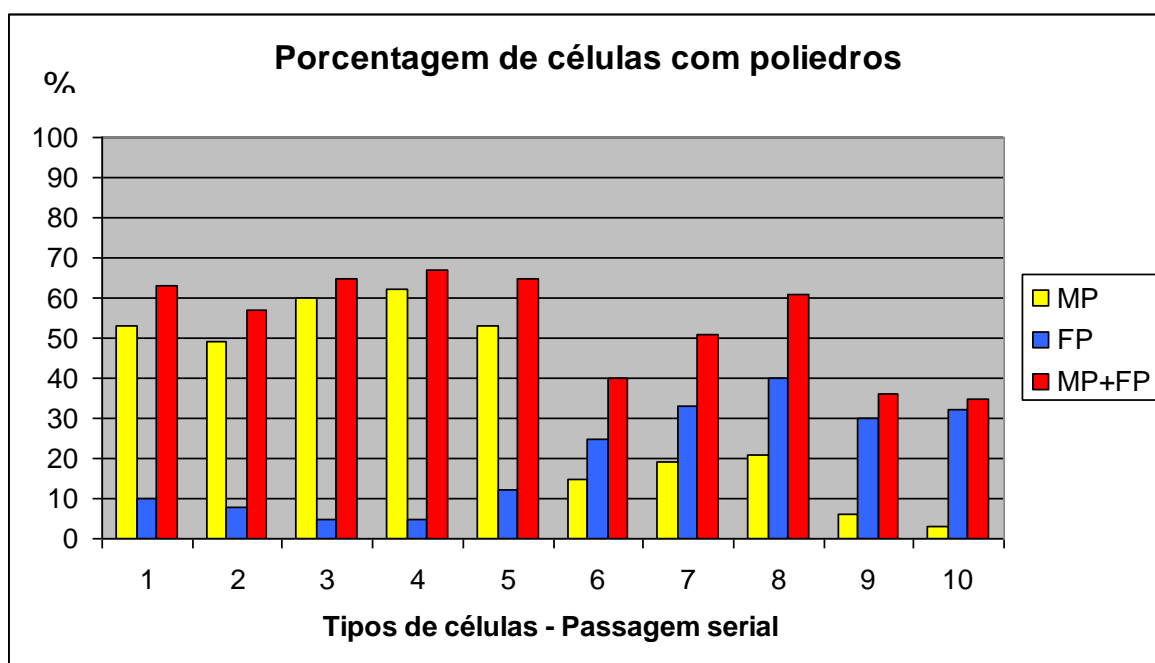


Gráfico 1 – Passagem serial do clone viral AgMNPV-2D em cultura de células Tn5B1-4.

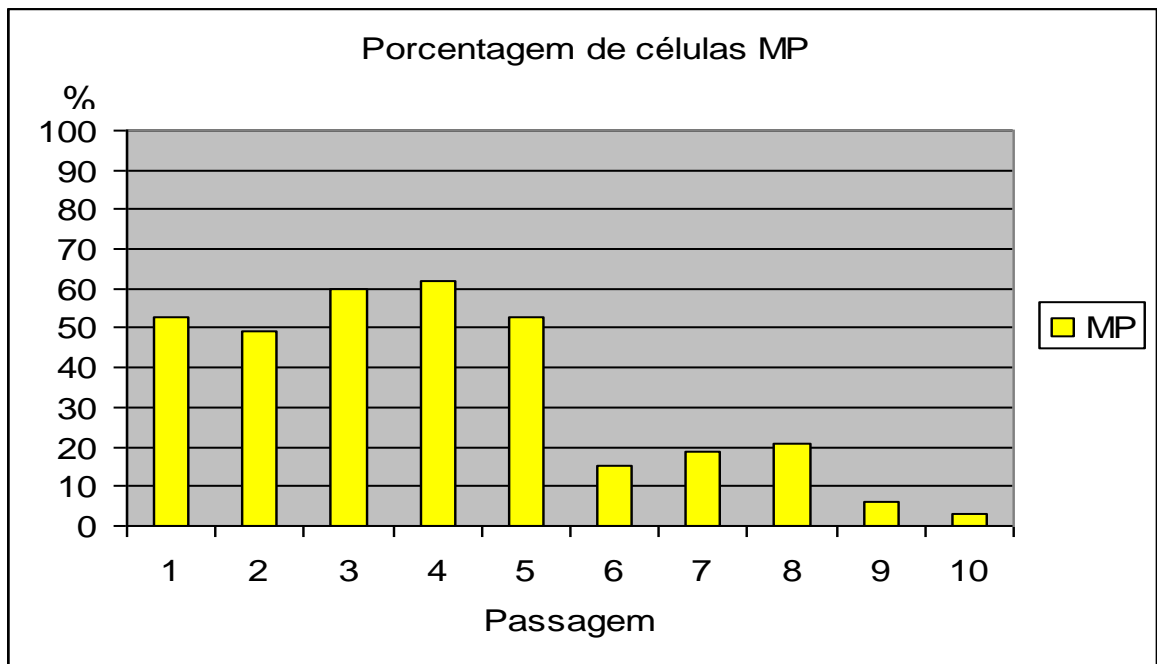


Gráfico 2 – Passagem serial do clone viral AgMNPV-2D em cultura de células Tn5B1-4. Flutuação do número de células com muitos poliedros.

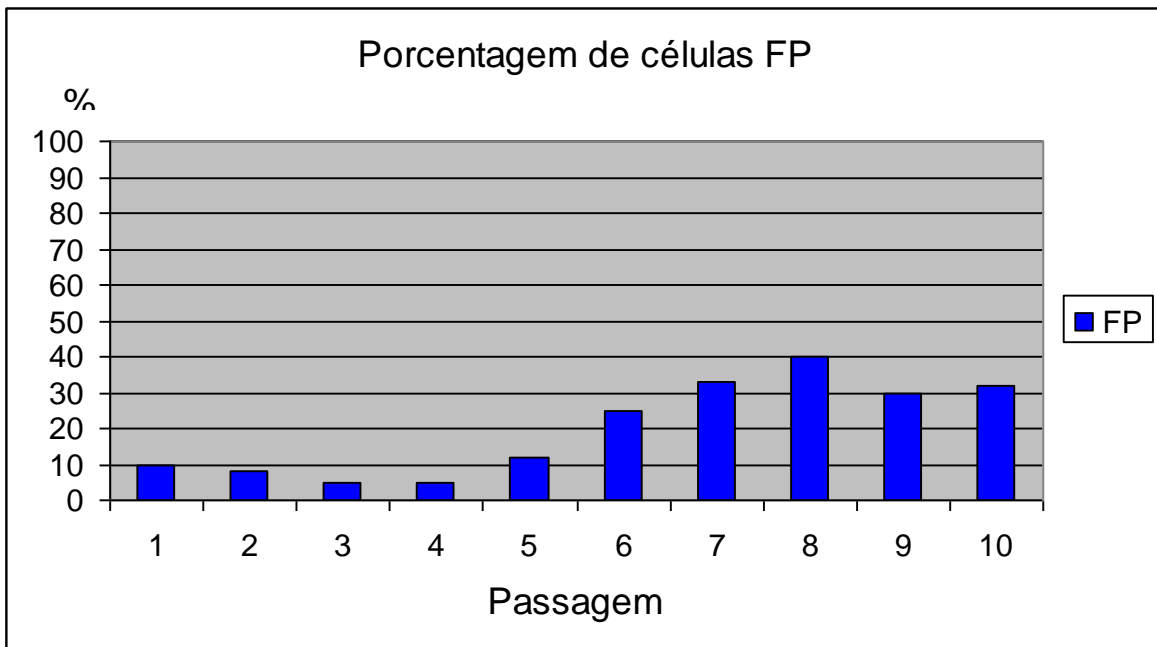


Gráfico 3 – Passagem serial do clone viral AgMNPV-2D em cultura de células Tn5B1-4. Flutuação do número de células com poucos poliedros.

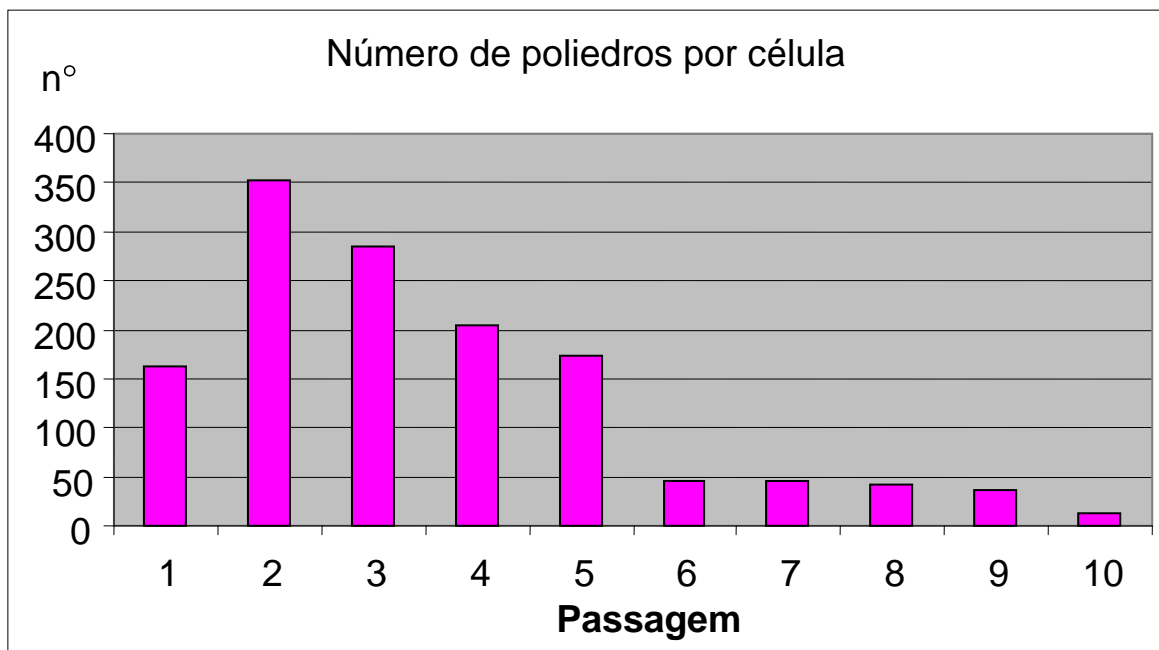


Gráfico 4 - Passagem serial do clone viral AgMNPV-2D em cultura de células Tn5B1-4. Curva da produção de poliedros por células.

Finalmente, o título viral das passagens P1, P3, P5, P7 e P9 foi determinado. Nas passagens mais altas esse título foi significativamente maior do que em passagens iniciais o que confirma a predominância de mutantes FP na população viral (Tabela 1).

Passagem	Título viral (pfu/ml)
P1	$7,1 \times 10^6$
P2	$8,0 \times 10^6$
P3	$1,1 \times 10^{10}$
P4	$1,5 \times 10^{10}$
P5	$3,8 \times 10^8$

Tabela 1- Título viral das passagens P1, P3, P5, P7 e P9.

Os dados obtidos nesse trabalho mostram que a passagem do baculovirus anticarsia em cultura de células leva a geração de mutantes com fenótipo FP, assim como relatado para outros baculovirus. No entanto essa população de mutantes passa a ser predominante por volta da sexta passagem. Estudos estão sendo conduzidos no Laboratório de Virologia de Insetos (LVI-NTCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, para a caracterização

molecular de mutantes FP. No momento, quinze mutantes FP de AgMNPV- 2D foram selecionados e estão sendo analisados.

Referências Bibliográficas

CARY, L. C.; GOEBEL, M.; CORSARO, B. G.; WANG, H.; ROSEN, E.; FRASER, M. J. Transposon mutagenesis of baculovirus: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of Nuclear Polyhedrosis Virus. **Virology**, New York, v. 172, p. 166-169, 1989.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L. Baculovirus: agentes de controle biológico. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G (Ed). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. cap. 8, p. 175-194.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 1259 p. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.

FRASER, M. J.; HINK, W. F. The isolation and characterization of the MP and FP plaque variants of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, New York, v. 117, p. 366- 378, 1982.

HINK, W. F.; STRAUSS, E. Replication and passage of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus plaque variants in cloned cell cultures and larval stages of four host species. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 27, p. 49-55, 1976.

KATSUMA, S.; NOGUCHI, Y.; ZHOU, C. L. E.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, S. Characterization of the 25K FP gene of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: implications for post-mortem host degradation. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 80, p. 783-791, 1999.

KUMAR, S.; MILLER, L. K. Effects of serial passage of *Autographa Californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture. **Virus Research**, Amsterdam, v. 7, p. 335-349, 1987.

MACKINNON, E. A.; HENDERSON, J. F.; STOLTZ, D. B.; FAULKNER, P. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage *in vitro*. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 49, p. 419-435, 1974.

MOSCARDI, F. **Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis***. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1983. 21 p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado técnico, 23).

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. Baculovirus para o Controle de Pragas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 24, p. 22-29, 2002.

OLIVEIRA, J. V. C.; WOLFF, J. L. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. A. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 3233-3250, 2006.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. New York: W. H. Freeman and Company, 1992. 347 p.

PEDRINI, M. R. S.; CHAN, L. C. L.; NIELSEN, L. K.; REID, S. In vitro production of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 197-205, 2004.

POTTER, K. N.; FAULKNER, P.; MACKINNON, E. A. Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 18, p. 1040-1050, 1976.

REED, L.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, US, v. 27, p. 493-497, 1938.

SLAVICEK, J. M.; HAYES-PLAZOLLES, N.; KELLY, M. E. Rapid formation of few polyhedra mutants of *Lymantria dispar* Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus during serial passage in cell culture. **Biological Control**, Orlando, US, v. 5, p. 251-261, 1995.

SLAVICEK, J. M.; PODGWAITE, J.; LANNER-HERRERA, C. Properties of two *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus isolates obtained from the microbial pesticide Gypchek. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 59, p. 142-148, 1992.