



**Caracterização de isolados virais
patogênicos à lagarta
falsa-medideira (*Pseudoplusia
includens*)**

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 230

**Caracterização de isolados virais
patogênicos à lagarta falsa-medideira
(*Pseudoplusia includens*)**

***Saluana Rocha Craveiro
Talita Moretto Alexandre
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Flávio Moscardi
Maria Elita Batista de Castro***

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: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Ligia Sardinha Fortes*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Foto: Lagartas *Pseudoplusia includens* (A) sadia, (B) infectada. Apresentam 3 pares de pernas abdominais e seu deslocamento parece medir palmos, razão pela qual é popularmente chamada lagarta mede-palmo ou falsa-medideira. Coloração verde-clara, com linhas longitudinais esbranquiçadas no dorso.

1ª edição

1ª impressão (2008):

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

E 257 Caracterização de isolados virais patogênicos à lagarta falsa-medideira (*Pseudoplusia includens*). / Saluana Rocha Craveiro ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 230).

1. *Pseudoplusia includens* – Controle biológico 2. *Pseudoplusia includens* – Caracterização. I. Craveiro, Saluana Rocha II. Série.

633.34 – CDD 21

©Embrapa 2008

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Materiais e métodos.....	9
Resultados e Discussão	12
Referências	15

Caracterização de isolados virais patogênicos à lagarta falsa-medideira (*Pseudoplusia includens*)

Saluana Rocha Craveiro¹
Talita Moretto Alexandre²
Zilda Maria de Araújo Ribeiro³
Flávio Moscardi⁴
Maria Elita Batista de Castro⁵

Resumo

A lagarta *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera, Noctuidae), conhecida como lagarta falsa-medideira, é uma praga que recentemente tem assumido uma maior importância na cultura de soja no Brasil. A ocorrência de lagartas mortas por infecção viral têm sido verificada na cultura da soja, principalmente no estado do Paraná, constituindo uma interessante perspectiva de potencial uso de inseticida viral no manejo integrado de pragas. Com o objetivo de contribuir com os estudos de caracterização do vírus, análises morfológica e molecular de isolados virais (I-A, I-B, I-C, I-D, I-E) provenientes de lagartas (*P. includens*) com infecção em campo foram realizadas. Amostras virais, purificadas a partir de macerados de lagartas infectadas, processadas e analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, apresentaram partículas com morfologia típica de vírus da família *Baculoviridae*, gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) mostrando vírions com apenas um nucleocapsídeo por envelope, *Single* (SNPV), imersos em uma matriz protéica, formando corpos de oclusão (OB). Essas partículas exibiram uma intensa banda de tamanho correspondente a poliedrina, a principal proteína dos NPV, quando analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Dentre os isolados estudados, I-A, I-D e I-E apresentaram diferenças nos perfis de DNA gerados pela clivagem com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I. Essas diferenças sugerem a existência de variantes genotípicos do vírus classificado, neste trabalho, como *Pseudoplusia includens single nucleopolyhedrovirus* (PiSNPV).

Palavras-chave: *Baculoviridae*, NPV, *Pseudoplusia includens*, análise morfológica, análise de DNA.

¹ Graduanda em Biologia, UnB/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Agrônoma, Doutoranda em Entomologia. Universidade Federal do Paraná/Embrapa Soja

³ Bióloga, MSc., Fitopatologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Agrônomo, PhD, Entomologia, Embrapa Soja

⁵ Bióloga, PhD, Virologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Characterization of viral isolates pathogenic to (*Pseudoplusia includens*)

Abstract

The caterpillar *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera, Noctuidae), known as false-medideira caterpillar is a pest that has recently assumed greater importance in the cultivation of soybeans in Brazil. The occurrence of caterpillars killed by viral infection have been found in the soybean crop, mainly in the state of Parana, providing an interesting perspective of potential use of viral insecticide in integrated pest management. With the objective to contribute to the characterization studies of this virus, morphological and molecular analysis of viral isolates (I-A, I-B, I-C, I-D, I-E) from caterpillars (*P. includens*) with infection in the field had been carried. Viral samples, purified from macerated in infected larvae, processed and analyzed by transmission electron microscopy, showed particles with typical morphology of virus *Baculoviridae* family, genus *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) showing virions with only a nucleocapsid per envelope, *Single* (SNPV), immersed in a protein matrix, forming bodies of occlusion (OB). These particles showed an intense band of corresponding size to polyhedrin, the main protein of NPV, when analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Among the isolates studied, I-A, I-D and I-E showed differences in DNA profiles generated by cleavage with enzymes *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III and *Pst*I. These differences suggest the existence of genotypic variants of the virus classified in this work, as *Pseudoplusia includens single Nucleopolyhedrovirus* (PiSNPV).

Keywords: *Baculoviridae*, NPV, *Pseudoplusia includens*, morphological analysis, DNA analysis

Introdução

A lagarta *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) é uma espécie de Lepidoptera, pertencente à família Noctuidae e subfamília Plusiinae. Sua distribuição é restrita ao hemisfério ocidental, ocorrendo desde o norte dos Estados Unidos (EUA) até o sul da América do Sul (Alford e Hammond, 1982). Essa lagarta tem grande número de hospedeiros, que pode chegar a 73 espécies de plantas de 29 diferentes famílias, incluindo culturas de importância econômica, como a soja, o algodoeiro, o feijoeiro, o fumo, o girassol e diversas hortaliças (BUENO et. al., 2007).

No Brasil, surtos da lagarta *P. includens* foram observados recentemente nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (PAPA e CELOTO, 2007). Diante do aumento da população da praga e dos sérios danos que vêm causando à cultura da soja, tornou-se necessário o uso de um controle diferente daquele normalmente mantido por inimigos naturais (parasitóides e fungos entomopatogênicos).

A lagarta *P. includens* apresenta coloração verde claro com linhas longitudinais esbranquiçadas no dorso. Possui três pares de pernas abdominais e seu deslocamento parece medir palmos, característica pela qual é popularmente conhecida como lagarta-medede-palmo ou falsa-medideira (Fig. 1). Outra característica marcante é que a lagarta consome grandes áreas das folhas, mantendo, porém, íntegras as nervuras principais, o que confere um aspecto rendilhado às folhas atacadas (PAPA e CELOTO, 2007).

A Embrapa Soja (Londrina-PR) tem verificado nas diversas safras da cultura da soja, principalmente no estado do Paraná, a ocorrência natural de lagartas *P. includens* mortas por infecção viral, o que abre perspectivas de uso de baculovirus no controle biológico da praga (*P. includens*).



Fig. 1- Lagartas *Pseudoplusia includens* (A) sadia, (B) infectada. Apresentam 3 pares de pernas abdominais e seu deslocamento parece medir palmos, razão pela qual é popularmente chamada lagarta mede-palmo ou falsa-medideira. Coloração verde-clara, com linhas longitudinais esbranquiçadas no dorso.

Baculovirus: um agente de controle biológico

Os baculovirus constituem o maior grupo de vírus que ataca insetos, predominantemente da ordem Lepidoptera (THEILMANN et al., 2005)

De acordo com o VIII Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (FAUQUET et al., 2005), a família *Baculoviridae*, a qual os baculovirus pertencem, se divide em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV).

Os vírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus*, que possuem corpos de oclusão poliédrica (OB) contendo vários vírions por poliedro, podem conter apenas um nucleocapsídeo por vírion (*Single* - SNPV) ou vários nucleocapsídeos por vírion (*Multiple* - MNPV). E os *Granulovirus* caracterizados pela forma ovicilíndrica do corpo de oclusão contendo um ou, raramente, dois a três vírions por grânulo (THEILMANN et al., 2005).

O genoma dos baculovirus é composto por um DNA circular de fita dupla, variando de 80-180kb envolto por um capsídeo protéico em forma de bastonete formando os nucleocapsídeo. Esses nucleocapsídeos constituem a unidade infectiva, os vírions, que estão imersos em uma matriz protéica composta, principalmente, por granulina nos vírus do gênero *Granulovirus* e por poliedrina nos *Nucleopolyhedrovirus*. Essas proteínas estruturais correspondem cerca de 95% do conteúdo protéico dos corpos de oclusão e possuem peso molecular variando de 29 a 33kDa.

Um exemplo bem sucedido do uso de baculovirus como agente de controle biológico é o bioinseticida formulado a partir de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*

(AgMNPV) para o controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), uma das principais pragas do complexo de lagartas de ocorrência natural na cultura da soja (MOSCARDI, 1999; MOSCARDI et. al., 2002).

Sabendo da importância da utilização de baculovirus no controle biológico de pragas e com o surto da lagarta falsa-medideira avançando nas lavouras de soja de todo o País, estudos estão sendo feitos para avaliar a potencialidade do uso de baculovirus no controle desta lagarta.

Assim o presente trabalho apresenta, essencialmente, resultados de análises morfológica e molecular de cinco isolados virais, provenientes de lagartas *P. includens* infectadas, visando contribuir com a caracterização do vírus.

Materiais e métodos

Lagartas e Vírus – Foram utilizadas lagartas de *Pseudoplusia includens* infectadas de diferentes regiões de coletas realizadas pela Embrapa Soja. Cinco isolados virais foram purificados a partir dessas lagartas: I-A, I-B, I-C, I-D e I-E (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados virais obtidos de lagartas *Pseudoplusia includens* infectadas.

Isolados Virais	Inseto Hospedeiro	Data de Coleta	Local de Coleta	Instituição	Cultura
I-A	<i>Pseudoplusia includens</i>	1972	Guatemala/ América Central	University of Arkansas/USA	Algodão
I-B	<i>Pseudoplusia includens</i>	Jan./2006	Londrina, PR	Embrapa Soja	Soja
I-C	<i>Pseudoplusia includens</i>	Jan./2006	Maringá, PR	Embrapa Soja	Soja
I-D	<i>Pseudoplusia includens</i>	Fev./2006	Iguaraçu, PR	Embrapa Soja	Soja
I-E	<i>Pseudoplusia includens</i>	Fev./2007	Iguaraçu, PR	Embrapa Soja	Soja

Purificação de partículas virais – A purificação parcial das partículas virais (OB) procedeu de acordo com Maruniak (1986) com algumas adaptações. As larvas infectadas foram maceradas em tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%; SDS 2%; Tris-HCl 0,01M, pH 7,8 e EDTA 0,001M) – 1ml de tampão para 1g de lagarta infectada. O macerado foi filtrado em 6 camadas de gaze e centrifugado a 10.000rpm (Sorvall RC-5B, rotor SS-34) por 15min. O pellet foi ressuspensão em tampão TE (Tris 0,01M, pH 7,8 e EDTA 0,001M) e o material centrifugado a 12.000rpm por 12min. O pellet foi ressuspensão em NaCl 0,1M, SDS 0,1% e tampão TE, seguido novamente de uma centrifugação a 12.000rpm por 12min. A ressuspensão final foi feita com água Milli-Q autoclavada e armazenada a -20°C. A estimativa da concentração de partículas OB nessa suspensão foi obtida a partir de contagem em Câmara de Neubauer usando a seguinte equação:

$$n^{\circ} \text{ de poliedros/ ml} = \Sigma 5 \text{ campos} \times 50.000 \times \text{fator de diluição.}$$

Processamento de material para microscopia eletrônica de transmissão (MET): As amostras virais foram tratadas com 500 μ l de fixador (4% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído e tampão cacodilato de sódio 0,1 M) por 4h, em temperatura ambiente, e então lavadas 3 vezes durante 15min com tampão cacodilato de sódio 0,1M. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas, utilizando tetróxido de ósmio 2%, por 2h no escuro, e lavadas 3 vezes com água, por 15min, cada troca. Depois foram desidratadas sob agitação em série crescente de solução aquosa de etanol 10%, 30%, duas vezes em 50%, 70% (overnight a 4°C), 80%, 2 vezes em 90% e 3 vezes em 100%, cada banho foi de 40min, exceto o de 70%. A infiltração foi feita sob agitação em etapas, utilizando soluções de etanol 100% : resina *Spurr* (SPURR, 1969), nas seguintes proporções, respectivamente, 3:1 (overnight); depois 3:2; 1:1; 1:2 e finalmente resina pura (duas trocas), em tempos de exposição de 4h para cada troca. Em seguida, as amostras foram incluídas em *Spurr* puro e deixadas por 24 a 48h, em estufa a 75°C. Após secagem, foram feitos cortes semi-finos e ultrafinos (500 η m e 70 η m, respectivamente), para observação ao microscópio. Após a ultramicrotomia, as seções ultrafinas foram colocadas em telinhas de cobre e coradas com acetato de uranila 2% por 1h no escuro, secas por 24h e lavadas com água Milli-Q.

Extração de DNA a partir de partículas OB – Esse procedimento foi baseado no protocolo descrito por O'Reilly et al. (1994). Foram solubilizados 500 μ l de OB purificados (concentração de 1×10^9 OB/ml) em 250 μ l solução alcalina 3x, pH 10,9 (Na₂CO₃ 0,3M; NaCl 0,51M e EDTA 0,03M) e incubados a 37°C por 30min. Após a verificação da solubilização, foram adicionados 25 μ l de SDS 20% retornando a incubação por 10min. Em seguida, foram adicionados 12,5 μ l de proteinase K (20mg/ml) e incubados *overnight*. O material foi então centrifugado em microcentrifuga a 12.000rpm (Eppendorf 5410), por 2min, sendo o pellet descartado. Para a extração do DNA viral, foi adicionado ao

sobrenadante o mesmo volume de fenol saturado com tampão TE. As fases foram homogeneizadas invertendo-se delicadamente os tubos por 3-5min e o material centrifugado a 12.000rpm (Eppendorf 5410), por 2min. A fase aquosa foi transferida para outro eppendorf e então o mesmo procedimento foi realizado para a extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto e 10% do volume inicial de acetato de sódio 3M pH 5,2 e colocado a -20°C, overnight. O DNA precipitado foi centrifugado a 12.000rpm (Eppendorf 5410) por 30min, lavado com etanol 70% e centrifugado a 12.000rpm por mais 10min. RNase (10µg/ml) foi adicionada ao DNA e e incubados a 37°C por 30min. Todas as amostras de DNA purificadas foram armazenadas a 4°C.

Clivagem do DNA por endonucleases de restrição – Os DNAs purificados foram clivados com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I. Cada reação de digestão consistiu da clivagem de 0,7-1,0µg de DNA pela enzima de restrição de interesse com seu respectivo tampão 10x conforme instruções do fabricante. As digestões foram submetidas a temperatura de 37°C, *overnight*.

Eletroforese em gel de agarose – Para a análise de DNA foi preparado gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1x (TAE 50x – Tris-base 2M, ácido acético glacial 2M e EDTA 0,05M, pH 8,0) e brometo de etídio (0,5µg/ml). As amostras foram preparadas com tampão de amostra 1X (loading buffer 5X: 0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol; 15% de ficol), aplicadas no gel e submetidas a uma eletroforese com voltagem de 40V. Após a corrida, os fragmentos de DNA foram visualizados em luz ultravioleta.

Eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE-SDS – Para análise de proteínas estruturais, foi utilizado o método de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS descrito por Laemmli (1970). As amostras de OB foram preparadas em tampão de amostra (2X: 125mM de Tris-HCl pH 6,7; 30% de glicerol; 4% de SDS; 0,002% de bromophenol blue e 10% de β-mercaptoetanol), fervidas por 5min, resfriadas em gelo por 15min, e aplicadas em um gel de poliacrilamida-SDS 16%. A eletroforese ocorreu em tampão de corrida 1X (4X: 25mM de Tris-base; 192mM de glicina e 0,1% SDS), sob uma voltagem de 40V, *overnight*. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* (Coomassie blue R-250 0,05%, metanol 40%, ácido acético 7,5% e água destilada), por 2h, e em seguida descorado em uma solução descorante (metanol 40%, ácido acético 7,5% e água destilada) por 1h e 30min.

Resultados e Discussão

Análise morfológica de partículas virais purificadas a partir de lagartas *P. includens* infectadas

P.

Cortes ultrafinos resultantes de partículas virais purificadas, processadas e observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram corpos de oclusão (OB) com formas hexagonais irregulares, predominando as estruturas arredondadas (Fig. 2). No interior dessas partículas foram observados várias estruturas, os vírions, que exibem nitidamente a presença de um único nucleocapsídeo por envelope (cortes transversal e longitudinal), podendo assim ser referido como um *S (single) Nucleopolyhedrovirus*, SNPV, conforme a atual classificação dos baculovirus (THEILMANN et al., 2005). Também observou-se que os vírions estão imersos em uma matriz protéica formando o corpo de oclusão, confirmando assim a presença da principal proteína estrutural dos NPV, a poliedrina, detectada pela análise das partículas OB em gel de poliacrilamida desnaturante (PAGE-SDS) (Fig. 3).

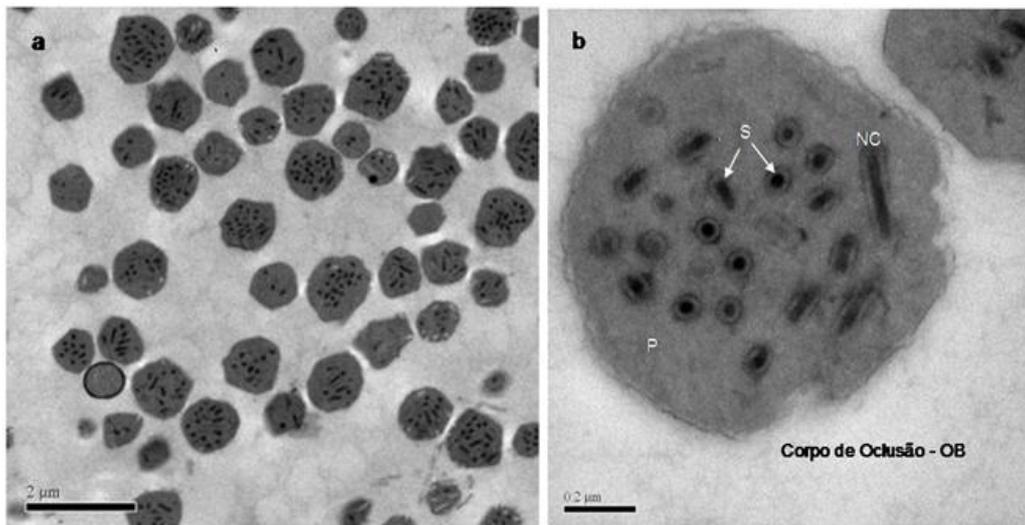


Fig. 2. Micrografia eletrônica de transmissão de corpos de oclusão (OB) do baculovirus *Pseudoplusia includens single nucleopolyhedrovirus* (PiSNPV). Barra representa 2µm (a). Corpo de oclusão mostrando vírions contendo um único nucleocapsídeo (NC) por envelope (S - single) (cortes transversal e longitudinal) oclusos em uma matriz protéica cristalina (P - poliedrina). Barra representa 0,2µm (b).

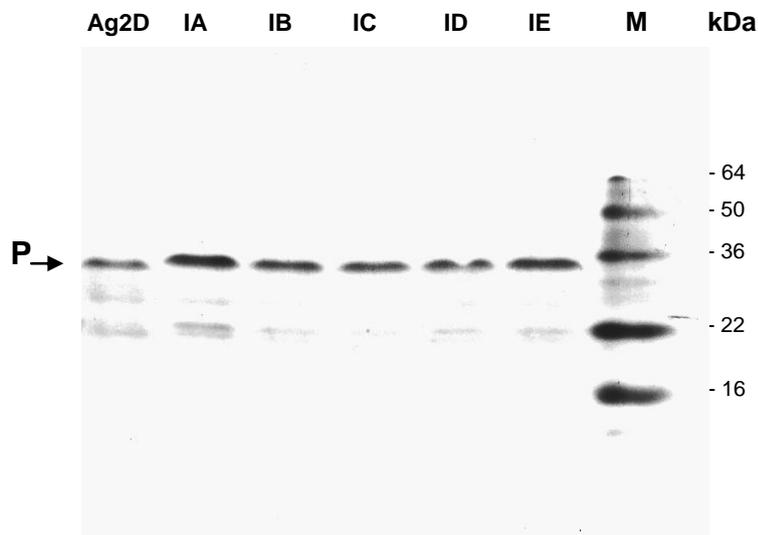


Fig. 3. Análise de proteínas estruturais de cinco isolados do vírus *Pseudoplusia includens* SNPV. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Isolados virais: I-A, I-B, I-C, I-D, I-E. M: marcador *SeeBlue Plus2* (Invitrogen). A banda intensa detectada no perfil de cada isolado corresponde a proteína poliedrina (P), similar a do baculovírus AgMNPV (Ag2D) de aprox. 33kDa.

Análise de restrição de DNA viral

DNA de cinco isolados virais clivados com 4 diferentes enzimas de restrição foram comparados por análises em eletroforese em gel de agarose (Fig. 4). Embora os perfis de restrição apresentem similaridades entre si, algumas diferenças foram detectadas entre os mesmos. Fragmentos de ~2,2kb, ~1,8kb, ~3,7kb e ~5kb presentes nos perfis DNA(I-E)/*Bam*HI, DNA(I-B)/*Eco*RI, DNA(I-E)/*Eco*RI e de DNA(I-E)/*Hind*III, respectivamente, não foram observados nos outros isolados virais. Enquanto, fragmentos de ~9kb, ~2,8kb e ~9kb ausentes nos perfis DNA(I-A)/*Pst*I, DNA(I-D)/*Eco*RI e DNA(I-E)/*Pst*I, respectivamente, estavam presentes no DNA de todos os outros isolados virais analisados. Para melhor visualização desses fragmentos, outros géis de agarose (não mostrados) também foram utilizados. Estes resultados sugerem a existência de variantes genotípicos do vírus *Pseudoplusia includens single nucleopolyhedrovirus* (PiSNPV).

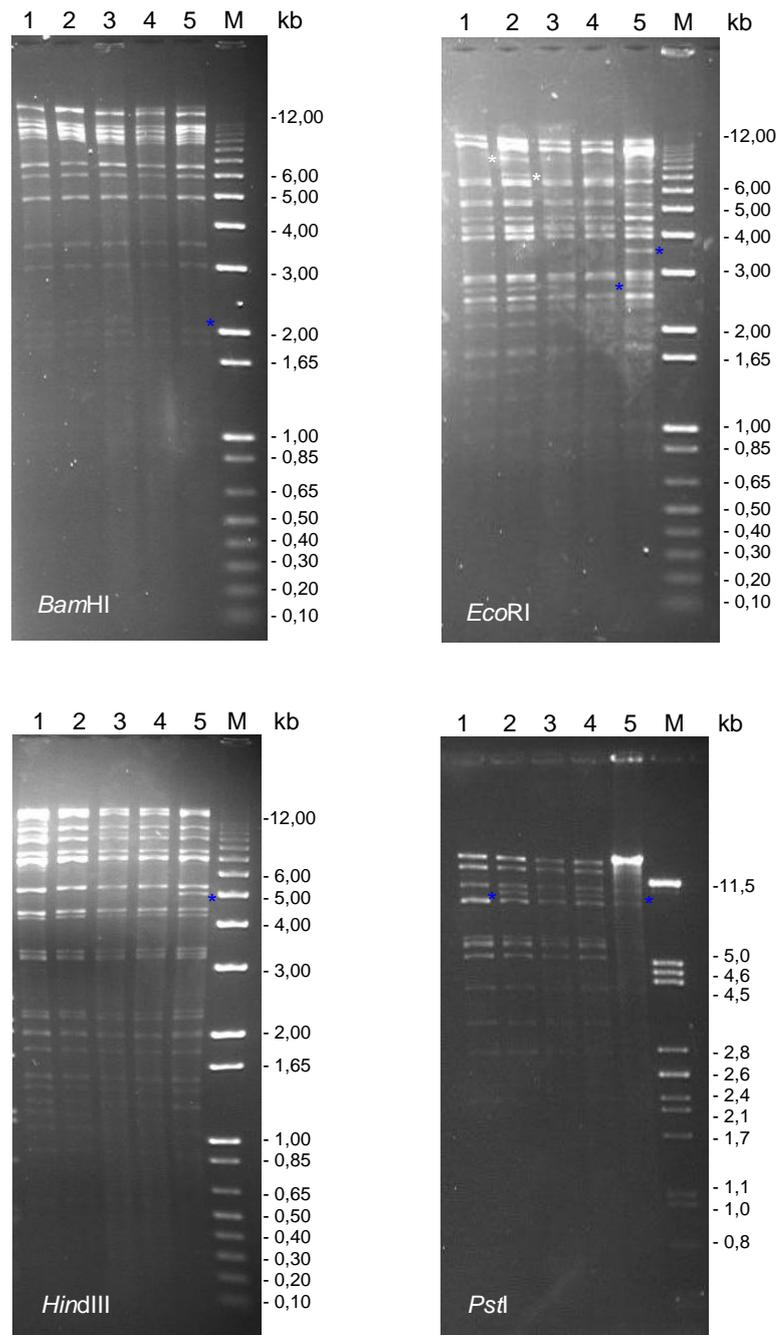


Fig. 4. Análise de DNA de isolados do baculovírus *Pseudoplusia includens* SNPV clivado com enzimas de restrição: *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I. Eletroforese em gel de agarose 1%. Isolados virais: I-A, I-B, I-C, I-D, I-E. M: marcadores – 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen) e DNA λ /*Pst*I (gel *Pst*I). (*) banda extra ou ausência de banda.

O presente trabalho é parte de um estudo de caracterização do vírus PiSNPV, que apresenta potencial para uso no controle da lagarta falsa-medideira, uma praga que vem aumentando a sua ocorrência e causando severos danos à soja, uma cultura de grande importância econômica para o País.

AGRADECIMENTOS

À Ana Cristina M. M. Gomes pelo processamento do material para microscopia eletrônica (CENARGEN) e ao Dr. Bergmann M. Ribeiro pela utilização do microscópio eletrônico (Universidade de Brasília-UnB).

A Universidade Federal do Paraná /CAPES/Embrapa Soja.

Referências

ALFORD, A. R.; HAMMOND JUNIOR, A. M. Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in *Louisiana soybean* ecosystems as determined with loop lure-baited traps [*Pseudoplusia includens*, *Rachiplusia* ou, *Trichoplusia* spp.]. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 75, n. 4, p. 647-650, 1982.

BUENO, R. C. O. F.; PARRA, J. R. P.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F.; DI OLIVEIRA, J. R. G.; CAMILLO, M. F. Sem barreira. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, RS, p. 12-15, 2007.

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.

LAEMMLI, U. K. A. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, GB, v. 227, p. 680-685, 1970.

MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and proteins synthesis. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. R. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. v. 1, p. 129-146.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, US, v. 44, p. 257-289, 1999.

MOSCARDI, F.; MORALES, L.; SANTOS, B. The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, in soybean in Brazil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8.; INTERNATIONAL CONFERENCE ON BACILLUS THURINGIENSIS, 6.; ANNUAL MEETING OF THE SIP, 35., 2002, Foz do Iguassu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 86-91. (Embrapa Soja. Documentos, 184: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 74).

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. New York: Oxford University Press, 1994. 364 p.

PAPA, G.; CELOTO, F. J. **Lagartas na soja**. Ilha Solteira, São Paulo. Disponível em: <www.ilhasolteira.com.br/colunas/index.php?acao=verartigo&idartigo=1189090532>. Acesso em: 2007.

SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal Ultrastructure Research**, New York, US, v. 26, p. 31-43, 1969.

THEILMANN, D. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; JEHLE, J. A.; O'REILLY, D. R.; ROHRMANN, G. F.; THIEM, S.; VLAK, J. M. Baculoviridae. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Eds.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 177-185. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.