

**Efeito da Adição de Colesterol
e Ecdisona na Produção *in
vitro* do Baculovírus
Spodoptera frugiperda MNPV**

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

Boletim de Pesquisa 299 e Desenvolvimento

Efeito da Adição de Colesterol e Ecdisona na Produção *in vitro* do Baculovírus *Spodoptera frugiperda* MNPV

Graciana Clécia Dantas
Andréa Farias de Almeida
Marlinda Lobo de Souza
Gorete Ribeiro de Macêdo
Márcia Regina da Silva Pedrini

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Efeito da adição de colesterol e ecdisona na produção *in vitro* do baculovírus

Spodoptera frugiperda MNPV. / Graciana Clécia Dantas [et al.] – Brasília,

DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013.

16 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 299).

1. Controle biológico. 2. *Spodoptera frugiperda*. 3. Baculovírus. I. Almeida, Andréa Farias de. II. Souza, Marlinda Lobo de. III. Macêdo, Gorete Ribeiro de. IV. Pedrini, Márcia Regina da Silva. V. Série.

632.96 – CDD 21

© Embrapa 2013

Sumário

Resumo	05
Abstract	06
Introdução	07
Material e métodos	08
Meio de cultura para manutenção e crescimento celular	08
Células	08
Determinação da concentração celular	08
Vírus	08
Quantificação dos corpos de oclusão (OB)	09
Passagem serial	09
Adição de colesterol	09
Adição de 20-Hidroxicdisona	09
Resultados e discussão	10
Conclusões	13
Referências	14

Efeito da Adição de Colesterol e Ecdisona na Produção *in vitro* do Baculovírus *Spodoptera frugiperda* MNPV

Graciana Clécia Dantas¹
Andréa Farias de Almeida²
Marlinda Lobo de Souza³
Gorete Ribeiro de Macêdo⁴
Márcia Regina da Silva Pedrini⁵

Resumo

Contínuas passagens de baculovírus com a utilização de vírus extracelulares (BVs), necessárias para o aumento de escala na produção de bioinseticida viral, ocasionam um fenômeno conhecido como “efeito passagem”. Seu principal efeito é a diminuição da produção de corpos de oclusão (OB), o que torna sua produção pelo processo *in vitro* economicamente inviável. A adição de substâncias e/ou compostos que promovam o aumento na produção de OB, em especial a utilização de colesterol e ecdisona, está sendo analisada em trabalho de colaboração entre a Universidade Federal do Rio Grande do Norte e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Neste trabalho, durante a passagem serial do *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) em células de insetos Sf21, observou-se uma queda de 54% na produção de OB da terceira para a quarta passagem. Portanto, foram adicionados ao processo de infecção 10 µg/mL de colesterol e 6 µg/mL de 20-Hidroxicdisona, a fim de diminuir o efeito passagem e, consequentemente, aumentar a produção de OB.

Termos para indexação: baculovírus SfMNPV, *Spodoptera frugiperda*, ecdisona, colesterol.

¹ Engenheira Química, Doutoranda, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

² Engenheira Química, Professora Doutora, Universidade Federal da Paraíba.

³ Bióloga, PhD, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Engenheira Química, Professora Doutora, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

⁵ Engenheira de Alimentos, Professora Doutora, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Effects of cholesterol and ecdysone addition on the *Spodoptera frugiperda* MNPV baculovirus *in vitro* production

Abstract

Continuous passages of baculovirus extracellular virus (BV) in insect cell cultures is needed for viral biopesticide scale-up production, however these passages cause a phenomenon known as "passage effect". Its main effect is occlusion bodies (OB) production decrease, making the process of virus *in vitro* production economically unfeasible. The addition of substances and/or compounds that promote increased production of OB, especially the use of cholesterol and ecdysone, is being analyzed by collaborative research between the Federal University of Rio Grande do Norte and Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. In this current work, during serial passage of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyedrovirus (SfMNPV) in the Sf21 insect cell line, a decrease of 54 % in the production of OB was observed from the third to the fourth virus passage. Therefore, 10 mg/mL of cholesterol and 6 µg/mL of 20-hydroxyecdysone was added to the infection process in order to reduce the passage effect and thereby increase the OB production.

Index terms: SfMNPV baculovirus, *Spodoptera frugiperda*, ecdysone, cholesterol.

Introdução

Os métodos naturais de controle de pragas vêm sendo um avanço na agricultura mundial. Para este controle de pragas são utilizados organismos específicos e que não causam danos a outros animais benéficos, ao meio ambiente e ao homem. Em particular, os vírus do tipo baculovírus são importantes agentes de controle biológico devido à especificidade oferecida aos seus organismos-alvo (hospedeiros) e a sua forma de propagação (FEDERICI, 2002). Tradicionalmente, a produção de baculovírus é feita na própria lagarta (cultivo *in vivo*) seguindo exatamente o ciclo natural do vírus (KING; POSSEE, 1992). Os insetos podem ser criados em laboratório e alimentados com dieta artificial o que resulta num custo final elevado (MOSCARDI; SOUZA, 2002). A produção *in vitro* de baculovírus em cultivo de células é realizada regularmente com o vírus extracelular da hemolinfa de insetos infectados ou com o sobrenadante das células infectadas, por meio da liberação das partículas virais produzidas (BV- *Budded Virus*) (CHAN et al., 1998).

A produção *in vitro* de baculovírus é um desenvolvimento desejável, porém apresenta algumas dificuldades técnicas e econômicas que se baseiam principalmente na instabilidade genética do vírus, o que dificulta a ampliação da escala de produção (*scale up*) e a aceitação pelos usuários de tecnologias caras. No entanto, a produção *in vitro* surge como um dos mais importantes desenvolvimentos a serem realizados nos próximos anos.

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), também conhecida por lagarta do milharal ou lagarta militar, é a principal praga da cultura do milho e responsável por grandes prejuízos. Devido à alta produção nacional da lavoura de milho e ao elevado custo com agrotóxicos, é necessário investir em seu manejo por meio de agentes de controle biológico. Além disso, esta praga ataca várias culturas, como arroz, sorgo, tomate, etc. Atualmente, no Brasil, o baculovírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* - SfMNPV) é utilizado em algumas regiões como bioinseticida no controle desta praga.

Estudos mostram a influência de substâncias ou componentes na produção de corpos de oclusão (OB – *occlusion bodies*) obtidos em sistemas *in vitro* de produção. Em especial, o efeito do colesterol sobre a replicação dos *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) foi estudado visando otimizar a produção *in vitro* de baculovírus em culturas em suspensão de células Sf9 (*S. frugiperda*). Estes estudos demonstraram que a adição de colesterol permitiu corrigir irregularidades morfológicas nas membranas dos *virions* oclusos em OBs produzidos durante a replicação de *Galleria mellonella nucleopolyhedrovirus* (GmNPV) em células de inseto. Além disso, o colesterol estimula o crescimento celular permitindo uma alta concentração de células favorável à replicação de baculovírus (BELLONCIK et al., 1997).

Outros estudos também mostram que o crescimento e o desenvolvimento adequados dos insetos dependem da concentração de 20-hidroxiecdisona em vários estágios de diferenciação (CHAPMAN, 1998). Segundo Chan et al. (2002) a adição do hormônio de inseto, 20-Hidroxiecdisona, proporciona um aumento na produção da proteína recombinante, demonstrando um aumento cinco vezes maior do que nas culturas em batelada.

Objetivando-se a otimização da produção de bioinseticida viral obtido a partir de infecções com o vírus selvagem *Spodoptera frugiperda* MNPV em células de *Spodoptera frugiperda*

(linhagem IPLB-SF21) adaptadas aos cultivos em suspensão, foi analisada a adição de colesterol e de ecdisona ao meio de cultivo durante a produção *in vitro* deste baculovírus.

Material e métodos

Meio de cultura para manutenção e crescimento celular

O meio de cultura utilizado na manutenção das células e nos experimentos de infecção em suspensão foi o meio Sf-900II® SFM (SerumFreeMedium) (GIBCO), ao qual foi adicionado 1% (v/v) de antibiótico (Antibiotic - Antimycotic) (Invitrogen Corporation) e conservado em geladeira a 4°C para posterior utilização.

Células

A linhagem de célula utilizada foi a IPLB-SF21, cultivada em *shaker* (Tecnal – TE421), com agitação controlada de 120 rpm e 28°C, utilizando-se o meio de cultura Sf-900II® SFM (*Serum Free Medium*) (GIBCO).

Determinação da concentração celular

A concentração celular foi estimada com a utilização de um microscópio fase-contraste (Olympus, Japão) e um hemocitômetro modelo *Neubauer* (Bright-LineHemacytometer Sigma). A contagem foi realizada diariamente, em triplicata, obtendo um desvio de 15%, com aproximadamente 200 células contadas em ambos os lados do hemocitômetro (NIELSEN et al., 1991).

Por meio da técnica de exclusão pela coloração com Azul de Tripán (Sigma-Aldrich), a uma concentração final de 0,1% (v/v), foram determinadas a concentração de células viáveis e a viabilidade celular. As células que se tornaram azuladas devido à entrada do corante foram consideradas não viáveis, enquanto que as células transparentes foram consideradas viáveis. A concentração celular é expressa em células por mL (células/mL). A viabilidade foi definida como a relação entre a quantidade total de células viáveis e não viáveis (KING; POSSEE, 1992).

Vírus

O vírus de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) isolado-18, foi cedido pelo Dr. Fernando Hercos Valicente da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas, MG.

O inóculo viral de SfMNPV, na forma de ODV (*Occluded Derived Virus*) foi obtido segundo o método de Lynn (1994). Um volume de 530 µL de suspensão de baculovírus, possuindo concentração de $1,88 \times 10^9$ OB/mL, foi utilizado para a liberação do ODV por meio de solução alcalina, solução de sais ácidos e solução de tripsina. Com este procedimento, foram utilizados ODVs derivados de aproximadamente 100 OBs para infectar cada célula.

Quantificação dos corpos de oclusão (OB)

A concentração de corpos de oclusão também foi determinada utilizando-se contagem em hemocitômetro, em que as células foram rompidas com uma solução de 1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) por 2 horas para provocar total dissolução da membrana celular e, conseqüentemente, a liberação dos corpos de oclusão. A contagem dos corpos de oclusão foi realizada em triplicata.

O cálculo da concentração de corpos de oclusão é dado pela seguinte Equação (1):

$$C_{OB} \left(\frac{OB}{mL} \right) = \frac{D \times 5 \times M_{OB}}{1 \times 10^{-4}} \quad (1)$$

Onde:

C_{OB} – Concentração de OB.

D – Fator de diluição.

M_{OB} – Média da contagem de OB.

5 – Número de quadrantes do hemocitômetro a serem contados em cada lado.

Passagem serial

Foram realizadas cinco passagens consecutivas do baculovírus SfMNPV na linhagem Sf21. Os experimentos foram realizados em *Erlenmeyer* de 125 mL (*Schott*) com volume de suspensão de 50 mL operados em *shaker* orbital a 120 rpm e temperatura controlada a 28°C. Todas as passagens foram feitas em duplicata.

Na passagem 1, as células Sf21 com viabilidade média de 97%, com 4 dias de cultivo, foram inoculadas com 10% (v/v) do inóculo, contendo partículas BV do vírus SfMNPV, obtido da infecção inicial com o ODV. Esta mesma metodologia foi utilizada por Pedrini et al. (2006), em que 10% (v/v) de inóculo viral foram adicionados a uma nova cultura para a realização da passagem serial durante a produção do vírus *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus em células de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae). Após o estabelecimento da infecção, 30 mL da suspensão infectada foram coletados, centrifugados a 210 g por 10 minutos, e o sobrenadante contendo vírus extracelulares foi utilizado para inocular a passagem 2. As demais passagens seguiram o mesmo procedimento, e o sobrenadante de cada passagem (BVs) serviu de inóculo para a passagem subsequente.

Adição de colesterol

A concentração de colesterol (P.A.) (CRQ) adicionada aos experimentos foi de 10 µg/mL, tendo como base os estudos de Belloncik et al. (1997).

Adição de 20-Hidroxicdisona

A concentração do hormônio 20-Hidroxicdisona adicionada aos experimentos foi de 6 µg/mL, tendo como base os estudos de Chan et al. (2002).

Resultados e discussão

Na passagem serial realizada com o cultivo *in vitro* do baculovírus SfMNPV (I-18) em células Sf21, verificou-se um declínio de 54% na produção de OB na quarta passagem, que pode ser observado na Figura 1.

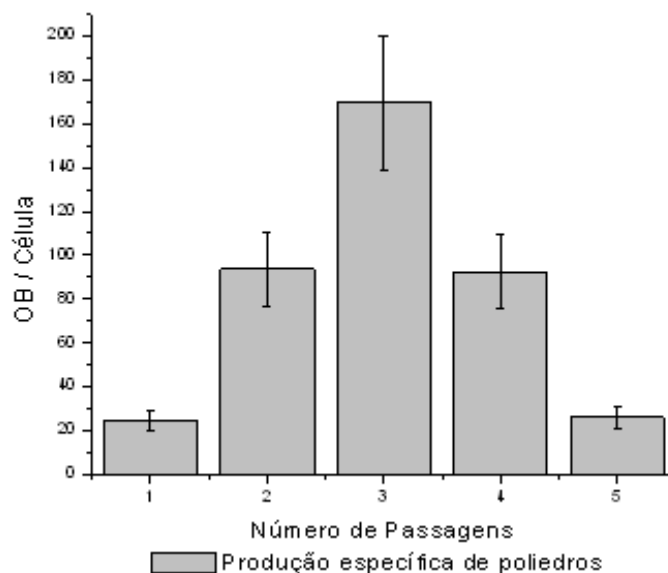


Figura 1. Produção específica de corpos de oclusão em células Sf21.

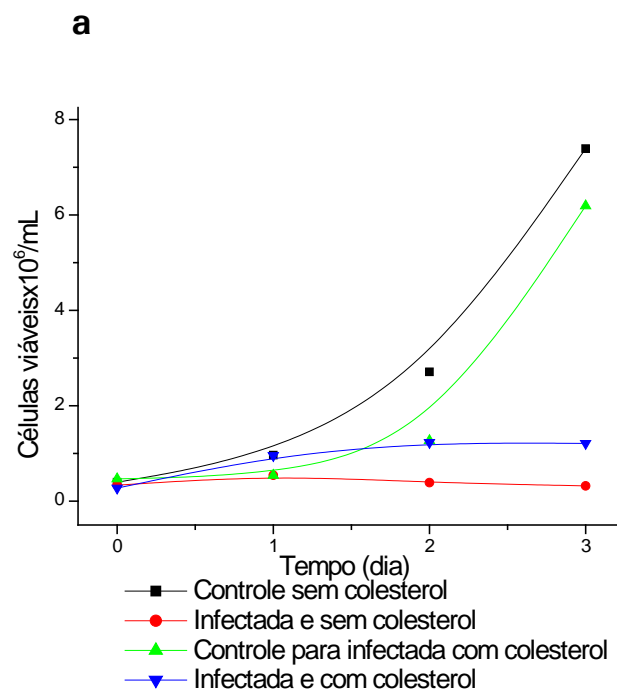
A redução na produção de OB de 170 para 92 da terceira para quarta passagem é indicativo da ocorrência do efeito de passagem, fenômeno este também já relatado em outros sistemas. Em células Ld652Y infectadas com o vírus *Lymantria dispar* MNPV foi observado uma redução de até sete vezes no número de poliedros durante cinco passagens consecutivas (SLAVICEK et al., 1995). Da mesma forma, em células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com *Anticarsia gemmatilis* MNPV verificou-se um declínio abrupto de 200 para 45 OB/célula da quinta para sexta passagem (REZENDE, 2008; REZENDE et al., 2009). Similarmente, em estudos anteriores com a linhagem Sf9 de *S. frugiperda* (ALMEIDA, 2005; ALMEIDA et al., 2010), observou-se uma redução de 399 para 109 OB/célula durante sete passagens em células infectadas com *Spodoptera frugiperda* MNPV.

Constatou-se, portanto, no sistema deste trabalho um forte declínio na quarta passagem do vírus SfMNPV em células Sf21. Este é um fator considerável na produção *in vitro* de bioinseticidas virais devido à instabilidade genética do vírus, o que dificulta a ampliação da escala de produção (*scale up*). Visando ao aumento de produção viral, seguiram-se testes de adição de colesterol e do hormônio 20-Hidroxiecdisona ao sistema.

A adição de colesterol e de 20-Hidroxiecdisona foi testada na quarta passagem com intuito de aumentar a produção *in vitro* de baculovírus em suspensão de células Sf21, pois em um estudo realizado por Belloncik et al. (1997) foi demonstrado que a adição de 20 g/mL de colesterol ao meio de cultivo permitiu corrigir irregularidades morfológicas nas membranas dos *virions* oclusos em OBs durante a replicação do *Galleria mellonella* nucleopolyedrovirus (GmNPV). Já a adição de 20-Hidroxiecdisona foi testada na quarta passagem tendo como finalidade aumentar a produção *in vitro* de baculovírus em suspensão de células Sf21.

Chan et al. (2002) testaram o processo de batelada alimentada para produzir a glicoproteína recombinante do vírus da dengue NS1, obtendo um aumento de 20 $\mu\text{g/mL}$ da proteína, sendo 5 vezes superior à produção obtida pelo processo de batelada otimizado, quando foram adicionados 4 $\mu\text{g/mL}$ de 20HE ao meio de cultivo.

As Figuras 2a e 2b mostram as curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas quando 6 $\mu\text{g/mL}$ de 20HE e 10 $\mu\text{g/mL}$ de colesterol, respectivamente, foram adicionadas ao meio de cultivo. Observou-se que as células não infectadas e infectadas apresentaram distinção quanto ao crescimento já no primeiro dia, indicando o estabelecimento da infecção. Houve, porém, um crescimento maior de células infectadas. Um maior número de células representa mais células infectadas ao final do processo, o qual pode afetar a concentração volumétrica, quando comparado ao produto obtido com infecções em que o crescimento é mínimo. Todavia, o comportamento encontrado para praticamente todos os processos infectivos testados neste trabalho foi distinto entre as células infectadas e não infectadas já nos primeiros dias de infecção. Este fato demonstra a boa capacidade de infecção do isolado 18 do SfMNPV (BARRETO et al., 2005) às células Sf21.



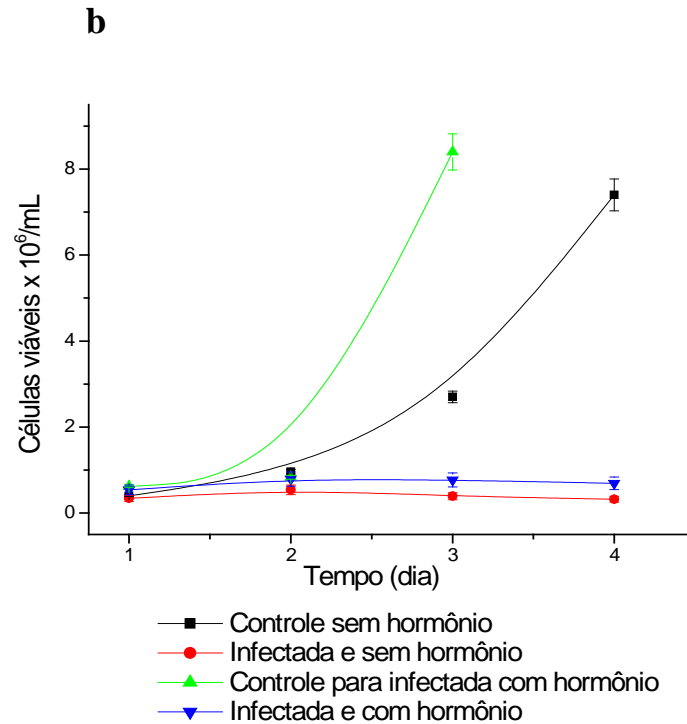


Figura 2. Efeito de adjuvantes no crescimento celular: (a) curvas de crescimento das células controle (não infectadas) e infectadas em meio de cultivo com e sem a adição de 10 $\mu\text{g/mL}$ de colesterol; (b) curvas de crescimento das células controle (não infectadas) e infectadas em meio de cultivo com e sem a adição de 6 $\mu\text{g/mL}$ de 20-Hidroxicdisona.

Observando-se os resultados obtidos em relação à produção específica (OB/célula) e volumétrica (OB/mL) e de OBs (Figuras 3a e 3b), a influência do hormônio foi superior a do colesterol. A adição de somente 6 $\mu\text{g/mL}$ de 20-Hidroxicdisona elevou estas concentrações a $1,83 \times 10^8$ OB/mL e 154,8 OB/célula, respectivamente. Estes resultados confirmam que o hormônio influi positivamente no aumento da produção de OB. No que diz respeito aos resultados obtidos em relação à adição somente de colesterol na concentração estudada (10 $\mu\text{g/mL}$), confirma-se a sua influência negativa ao processo de produção de OB. Enquanto que o resultado da produção sem adição do colesterol (realizado durante a passagem seriada) obteve uma produção específica de 99 OB/célula, esta concentração diminuiu para 60 OB/célula (Figura 3a). Todavia, a produção volumétrica passou de $5,7 \times 10^7$ OB/mL para $1,33 \times 10^8$ OB/mL na passagem seriada e com a adição de somente 10 $\mu\text{g/mL}$ de colesterol, respectivamente. A maior concentração volumétrica foi provavelmente devida à maior concentração de células (Figura 3b).

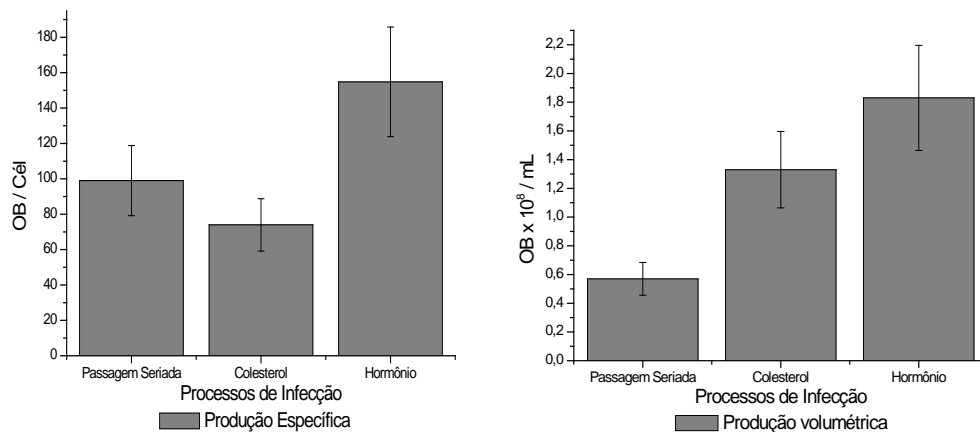


Figura 3. Efeito de adjuvantes na produção de corpos de oclusão: (a) produção específica de OB com adição de colesterol e do hormônio ecdisona; (b) produção volumétrica de OB com a adição de colesterol e do hormônio ecdisona.

Conclusões

Observou-se uma redução na formação de corpos de oclusão após a terceira passagem serial do vírus SfMNPV em cultivos de células Sf21. Resultados preliminares em relação ao efeito da adição do hormônio ecdisona após a quarta passagem revelaram um aumento na produção de corpos de oclusão do vírus (específica e volumétrica). No entanto, a adição de colesterol não indicou um aumento em relação à produção específica, como seria esperado. Estes ensaios serão repetidos para confirmação destes resultados. Em paralelo, novas concentrações dos dois adjuvantes serão testadas no sistema *in vitro*.

Referências

- ALMEIDA, A. F. **Avaliação preliminar da viabilidade de produção in vitro de um isolado brasileiro de baculovírus *Spodoptera frugiperda* MNPV**. 2005. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.
- ALMEIDA, A. F.; MACEDO, G. R.; CHAN, L. C. L.; PEDRINI, M. R. S. Kinetic Analysis of *in vitro* Production of Wild-Type *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 285-291, 2010.
- BARRETO, M. R.; GUIMARÃES, C. T.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F. H. Effect of baculovirus *spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 067-075, 2005.
- BELLONCIK, S. A.; AKOURY, W. E.; CHEROUTRE, M. Importance of cholesterol for nuclear polyhedrosis virus (NPV) replication in cell cultures adapted to serum-free medium. **Virology Research Center**, p. 141, 1997.
- CHAN, L. C. L.; GREENFIELD, P. F.; REID, S. Optimising fed-batch production of recombinant proteins using the baculovirus expression vector system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n.2, p. 178-188, 1998.
- CHAN, L. C. L.; YOUNG, P. R.; BLETCHLY, C.; REID, S. Production of the baculovirus-expressed dengue virus glycoprotein NS1 can be improved dramatically with optimised regimes for fed-batch cultures and the addition of the insect moulting hormone, 20-Hydroxyecdysone. **Journal of Virology Methods**, v. 105, p. 87-98, 2002.
- CHAPMAN, R. F. **The insect: structure and function**. New York: American Elsevier Publishing Company, 1998. 788p.
- FEDERICI, B. A. Virus controls of pests (Insects and Mites). In: PIMENTEL, D. **Encyclopedia of pest management**, p. 888-891, 2002.
- KING, L. A.; POSSEE, R. D. **The baculovirus expression system: a laboratory guide** London. New York: Chapman & Hall, 1992. 229 p.
- LYNN, D. E. Enhanced infectivity of occluded virions of *Gypsy Moth* nuclear polyhedrosis virus for cell cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 63, p. 268-274, 1994.
- MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. Baculovirus para o controle de pragas: panacéia ou realidade? **Biociência**, v. 24, p. 22-29, 2002.
- NIELSEN, L. K.; SMYTH, G. K.; GREENFIELD, P. F. Hemocytometer cell count distributions: implications of non-poisson behaviour. **Biotechnology Progress**, v. 7, p. 560-563, 1991.

PEDRINI, M. R. S.; CHRISTIAN, P.; NIELSEN, L. K.; REID, S.; CHAN, L. C. L. Importance of virus-medium interactions on the biological activity of wild-type Heliothine nucleopolyhedroviruses propagated via suspension insect cell cultures. **Journal of Virological Methods** 136, 267-272, 2006.

REZENDE, S. H. M. S. **Caracterização molecular de mutantes gerados pela passagem serial do baculovirus *Anticarsia gemmatalis* MNPV em cultura de células.** 2008. 124 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF.

REZENDE, S. H. M. S.; CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L. Accumulation of few-polyhedra mutants upon serial passage of *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* in cell culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 100, p. 153-159, 2009.

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**, v. 5, p.251-261, 1995.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***