



ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 24***

**Análise fenotípica de dois  
variantes de *Anticarsia  
gemmatalis* MNPV multiplicados  
durante passagem seriada em  
cultura de células**

Maria Elita Batista de Castro  
Soraia Araújo  
Zilda Maria de Araújo Ribeiro  
William Sihler  
Marlinda Lobo de Souza

Brasília, DF  
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W5 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 da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias  
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual  
Membros: Antônio Costa Allem  
          Marcos Rodrigues de Faria  
          Marta Aguiar Sabo Mendes  
          Sueli Correa Marques de Mello  
          Vera Tavares Campos Carneiro  
Suplentes: Edson Junqueira Leite  
          José Roberto de Alencar Moreira  
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual  
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual  
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi  
Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva  
Edição eletrônica: Alysson Messias da Silva

**1ª edição**

1ª impressão (2002): tiragem 150 exemplares.

**Todos os direitos reservados.**

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

---

Análise fenotípica de dois variantes de *Anticarsia gemmatilis* MNPV multiplicados durante passagem seriada em cultura de células / Maria Elita Batista de Castro... [et al.]. -- Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

17 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; n. 24).

1. *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus. 2. Vírus de inseto. 3. Passagem seriada. 4. Células de insetos. I. Castro, Maria Elita Batista de. II. Série.

---

579.2 CDD 21

© Embrapa 2002

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Introdução</b> .....	9
<b>Materiais e Métodos</b> .....	10
Linhagem celular e isolados virais .....	10
Infecção de lagartas de <i>A. gemmatalis</i> e obtenção de hemolinfa .....	10
Inóculo viral .....	11
Passagem seriada de AgMNPV <i>in vitro</i> .....	11
Microscopia eletrônica de transmissão .....	11
<b>Resultados e Discussão</b> .....	12
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	15

# Análise fenotípica de dois variantes de *Anticarsia gemmatalis* MNPV multiplicados durante passagem seriada em cultura de células

---

*Maria Elita Batista de Castro*<sup>1</sup>

*Soraia Araújo*<sup>2</sup>

*Zilda Maria de Araújo Ribeiro*<sup>2</sup>

*William Sihler*<sup>2</sup>

*Marlinda Lobo de Souza*<sup>1</sup>

## Resumo

A principal limitação para produção de baculovirus em cultura de células tem sido a geração de mutantes FP (“few polyhedra”). Para verificar se mudanças fenotípicas similares ocorrem com *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), dez passagens sucessivas de dois isolados desse vírus foram feitas em cultura de células UFL-AG-286. Um isolado, AgMNPV-79, é do tipo selvagem, obtido de larvas infectadas provenientes do campo e o outro, AgMNPV-2D, é um clone viral isolado pela técnica “plaque assay” em cultura de células. Os efeitos resultantes das passagens sucessivas dos vírus foram observados por microscopia de luz e eletrônica para avaliação da produção de corpos de oclusão e análise da morfologia das células infectadas. Inicialmente, células foram incubadas com hemolinfa de larvas infectadas, que foram previamente alimentadas com dieta suplementada com suspensão viral. O sobrenadante, contendo vírus extracelulares (BV), foi então usado continuamente como inóculo. Em baixas passagens de ambos os vírus, a infecção foi altamente produtiva com presença de vários poliedros nos núcleos das células. Efeitos citopáticos típicos tais como, hipertrofia nuclear e celular, presença de estroma virogênico com intensa replicação viral, montagem do vírion, oclusão viral e por último formação de vários poliedros contendo vários

<sup>1</sup> Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogos, M.Sc. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

vírions foram observados nas células. Por outro lado, células infectadas com vírus produzidos em altas passagens apresentaram poliedros, estroma virogênico condensado dentro de uma estrutura densa, com uma grande quantidade de nucleocapsídeos, ao invés de vários poliedros, especialmente quando se tratava da infecção com o clone viral AgMNPV-2D. Além disso, a maioria desses poliedros ocluíram poucos vírions em suas matrizes, indicando a geração de mutantes FP ("few-polyhedra"). Quando uma comparação entre os dois isolados foi estabelecida quanto à produção de poliedros, o vírus AgMNPV-79 mostrou maior estabilidade do que o clone viral AgMNPV-2D. Da primeira (P1) até a décima passagem (P10), acima de 80% das células UFL-AG-286 apresentavam poliedros em seus núcleos, em 96 h p.i., sob passagem seriada de AgMNPV-79. Contudo, no mesmo tempo pós-infecção com AgMNPV-2D, a linhagem celular hospedeira mostrou um forte decréscimo na formação de poliedros, principalmente após a sexta passagem (P6), quando um aumento no número de células foi evidenciado com intenso estroma virogênico em seus núcleos, mas sem oclusão viral. Neste último caso sinais de infecção tenderam a desaparecer na décima passagem (P10) quando as células mostraram a mesma morfologia das células controle.

# Phenotypic analysis of two variants of *Anticarsia gemmatalis* MNPV replicated during serial passage in cell culture

---

## Abstract

A major limitation to successful production of baculoviruses in cell culture has been the generation of few-polyhedra (FP) mutants. To verify whether similar phenotypic changes occur with the *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) we performed ten successive passages of two AgMNPV isolates in UFL-AG-286 cells. One isolate, named AgMNPV-79, is a wild type obtained from infected larvae collected in soybean fields and another one, named AgMNPV 2D, is a viral clone isolated by plaque assay in cell culture. The resulting effects were observed by evaluation of the occlusion bodies production, at light microscopy level, and by analysis of the morphology of infected cells by electron microscopy. Initially, cells were incubated with hemolymph of infected larvae that were previously fed with diet supplied with the virus suspension. The supernatant, containing budded virus (BV), was then used continuously as an inoculum for serial passage of the virus in cell culture. At lower passages, for both viruses, the infection process exhibited very productive infection with the presence of several polyhedra in the nuclei. Cellular and nuclear hypertrophy, presence of virogenic stroma with intense viral replication, virion assembly, viral occlusion and later formation of several polyhedra containing many virions were typical cytopathic effects observed in those cells. On the other hand, infected cells from higher passages presented mostly the virogenic stroma condensed into a dense structure, with a large quantity of nucleocapsids, instead of many polyhedra, specially upon infection with the viral clone AgMNPV 2D. Besides, the majority of those polyhedra

occluded few virions in their matrix indicating the generation of few-polyhedra mutants. When a comparison between the two isolates was established, the virus AgMNPV-79 showed a greater stability concerning the polyhedra production than the viral clone AgMNPV 2D. From the first passage (P1) to the tenth passage (P10) above 80% of the UFL-AG-286 cells presented polyhedra in their nuclei, at 96hp.i., upon AgMNPV-79 serial passage. However at the same post-infection time with AgMNPV 2D, the host cell line showed a very strong decrease in polyhedra formation, mainly after the sixth passage (P6), leading to an increase in the number of cells showing a intense virogenic stroma in their nuclei but no viral occlusion. In this last case signs of infection tended to disappear at the tenth passage (P10) when the cells showed the same morphology of the control cells.

## Introdução

Os vírus pertencentes ao grupo Baculovirus possuem grande potencial e têm sido usados com sucesso como inseticidas biológicos. Esse grupo de vírus pertence a família Baculoviridae, que está dividida taxonomicamente em dois gêneros, *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (van Regenmortel et al., 2000). Os *Nucleopolyhedrovirus* podem apresentar somente um nucleocapsídeo (SNPV) ou vários nucleocapsídeos empacotados por envelope (MNPVs). Os vírions são oclusos em uma matriz protéica formando os corpos oclusos (OBs), que têm como principal proteína a poliedrina, no caso de NPVs, e a granulina para os GVs. Essas partículas medem 0,5 a 15 microns, são altamente refringentes sob microscopia óptica (Summers, 1977). O ciclo replicativo dos baculovirus é bifásico, gerando dois fenótipos distintos, o BV ("budded virus"), necessário para a disseminação da infecção dentro dos tecidos do inseto, e o ODV ("occlusion-derived virus"), necessário para transmissão da infecção para outras larvas susceptíveis.

O *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) vem sendo largamente utilizado no Brasil em um Programa Nacional de Combate da Lagarta da Soja. Este programa teve início em 1979 e vem sendo desenvolvido com grande sucesso pela Embrapa Soja, Londrina, PR.

O emprego intensivo de baculovirus no controle de pragas tem incentivado o estudo sobre o mecanismo de interação patógeno-hospedeiro, o que requer cada vez mais a utilização de técnicas de biologia celular e molecular. Dessa forma, o uso de cultura de células de insetos é extremamente importante para compreensão desses eventos.

Na literatura vários trabalhos demonstram que a passagem seriada de NPVs em cultura de células podem levar à perda da virulência do vírus, resultante de frequente produção de mutantes FP ("few polyhedra") (revisado por Fraser et al. 1986, 1987). Mutantes FP exibem placas de morfologia alterada, produção reduzida de vírus oclusos, produção de oclusões que não contêm vírions ou contêm vírions com uma aparência anormal, envelopamento intranuclear defectivo de nucleocapsídeos, e liberação aumentada de vírus infeccioso (Hink & Vail, 1973; Ramoska & Hink, 1974; MacHinoon et al., 1974; Knudson & Harrap, 1976; Potter et al., 1976; Fraser & Hink, 1982, Slavicek et al., 1992; Harrison & Summers, 1995). Os mutantes FP frequentemente contêm



deleções ou inserções em diferentes regiões do genoma (Miller & Miller, 1982, Fraser et al., 1983; Kumar & Miller, 1987).

Wickham e colaboradores (1991), descreveram partículas interferentes defectivas selecionadas durante passagem seriada de uma linhagem recombinante E-2 de AgMNPV em três linhagens celulares. Essas partículas foram perdendo grande parte do genoma de AgMNPV e causaram fortes reduções na produção de beta-galactosidase de infecção acima de 0,01 pfu/célula.

Para verificar se modificações fenotípicas similares ocorrem com o *A. gemmatalis* MNPV, dois isolados, AgMNPV-79 e AgMNPV 2D, foram multiplicados em 10 passagens sucessivas em células UFL-AG-286, e os efeitos resultantes avaliados pela análise morfológica das células infectadas e pela produção de corpos de oclusão observados por microscopia de luz e microscopia eletrônica.

## Materiais e Métodos

### Linhagem celular e isolados virais

Para realização dos experimentos de passagem seriada foram utilizadas células de *A. gemmatalis* UFL-AG- 286 e dois isolados virais: AgMNPV-79, um vírus tipo selvagem, obtido de larvas infectadas coletadas em culturas de soja, cedido por Dr. Fávio Moscardi (Embrapa Soja), e AgMNPV 2D, um clone viral isolado em cultura de células por "plaque assay", cedido pelo Dr. James Maruniak (Universidade da Flórida, U.S.A.).

### Infecção de lagartas de *A. gemmatalis* e obtenção de hemolinfa

Lagartas sadias de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstars foram infectadas por ingestão de dieta contendo, em sua superfície, inóculo de 100  $\mu$ l de um estoque viral na concentração de  $1 \times 10^6$  PIBs/ml. No quarto dia após a infecção, período em que a quantidade de partícula viral BV é alta, a hemolinfa foi removida de aproximadamente 25 lagartas. A remoção foi feita pela introdução de microseringa na parte central do corpo da lagarta, próximo ao último par de patas. A hemolinfa (500  $\mu$ l) foi coletada e colocada em tubo de microcentrifuga, mantido no gelo, contendo 400  $\mu$ l de meio TC-100 (Gibco) sem soro e 100 ml de cisteína (concentração final de 0,01 M). A mistura foi então centrifugada a 10000 rpm por 15 segundos e o sobrenadante filtrado em filtro Millipore 0,45  $\mu$ m, antes de ser adicionado às células em cultura.

#### **Inóculo viral (“budded virus”, BV)**

O sobrenadante de células infectadas com hemolinfa foi coletado 48 horas após infecção e serviu de inóculo para infecção em novas células, estabelecendo-se assim uma série de passagens de ambos os isolados AgMNPV-79 e AgMNPV-2D.

#### **Passagem seriada de AgMNPV *in vitro*.**

O estudo de passagem do vírus foi iniciado pela infecção de células UFL-AG-286 previamente semeadas e sedimentadas, numa densidade de  $3 \times 10^6$  /frasco de 25cm<sup>2</sup>, utilizando-se 1 ml de sobrenadante contendo BV, proveniente de células infectadas com hemolinfa conforme já descrito neste trabalho. O período de incubação do sistema vírus/células foi de 1 hora, com fraca agitação a cada 10 minutos, para permitir melhor contato do inóculo viral com a superfície das células. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com meio TC-100 sem soro para remoção do inóculo e mantidas em estufa a 28°C com meio TC-100 completo. A formação de corpos de oclusão e demais efeitos citopáticos foram observados e monitorados por microscopia de contraste de fase (microscópio de inversão modelo OLYMPUS CK2) e por microscopia eletrônica (Zeiss modelo EM 109), em diferentes períodos pós-infecção (p.i.). O sobrenadante contendo BV da primeira passagem (P1) foi coletado 7 dias p.i. e usado como inóculo para a passagem seguinte (P2) e assim sucessivamente até a passagem P10. Células de cada frasco foram ressuspensas e alíquotas foram retiradas para determinar o número de células com poliedros, usando uma câmara de Neubauer para a contagem.

#### **Microscopia eletrônica de transmissão**

Células infectadas foram descamadas com bastão de borracha e sedimentadas a 3000 rpm em microcentrífuga por 30 segundos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensos em fixador glutaraldeído (2%)/ paraformaldeído (2%), em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,2 (Karnovsky, 1965) e mantido a 4 °C, por aproximadamente 24 horas. O material foi novamente sedimentado para dar início às etapas de emblocamento para microscopia eletrônica.

O “pellet” foi então lavado 3 vezes no tampão acima, sendo cada lavagem por 15 minutos, e pós fixado em tetróxido de ósmio 1 %, no mesmo tampão, por

pelo menos 2 horas. Após rápida lavagem em água destilada, o "pellet" foi contrastado em solução aquosa de acetato de uranila 0,5 % "overnight" e posteriormente desidratado em uma série crescente de acetona a 50, 70, 90 %, por 15 minutos cada, e 3 vezes em acetona 100 %, pelo mesmo tempo. Após a desidratação, o material foi colocado em uma mistura de resina ("Spurr/acetona 1:1") (Spurr, 1969) "overnight" e depois em resina pura ("spurr") pelo mesmo período. A polimerização foi feita em moldes de silicone com "spurr" e mantidos em estufa à 70°C por 72 horas. Secções ultrafinas foram obtidas através cortes em ultramicrotomo Sorvall MT2-B, equipado com navalha de diamante, e montadas sobre telinhas de cobre. As secções foram contrastadas com acetato de uranila 3 % por 20 minutos, observadas ao microscópio eletrônico e fotografadas.

## Resultados e Discussão

A alteração mais comum observada durante a passagem seriada de um vírus em cultura de células é a mudança do fenótipo MP, muitos poliedros por célula, para o fenótipo FP, poucos poliedros por célula.

Neste estudo, o vírus tipo selvagem AgMNPV-79 apresentou maior estabilidade quanto à produção de poliedros durante as passagens seriadas em cultura de células UFL-AG-286 do que o clone viral AgMNPV-2D. Provavelmente este fato esteja relacionado à variedade de genótipos virais presentes na população de campo, implicando uma melhor adaptação do vírus aos sistemas celulares. Por outro lado, a rápida perda, na formação de poliedros do clone viral AgMNPV-2D em passagem seriada provavelmente esteja relacionada à ocorrência de mutantes FP ("few polyhedra"). Essas reduções quanto à produção de poliedros podem ser observadas nas figuras 1 e 2. Da primeira (P1) até a décima passagem (P10), mais de 80% das células UFL-AG-286 infectadas com AgMNPV-79 apresentaram poliedros em seus núcleos (Fig. 1). Contudo, no mesmo tempo pós-infecção com AgMNPV-2D, a linhagem celular hospedeira mostrou um forte decréscimo na formação de poliedros, principalmente após a sexta passagem (P6) (Fig.2).

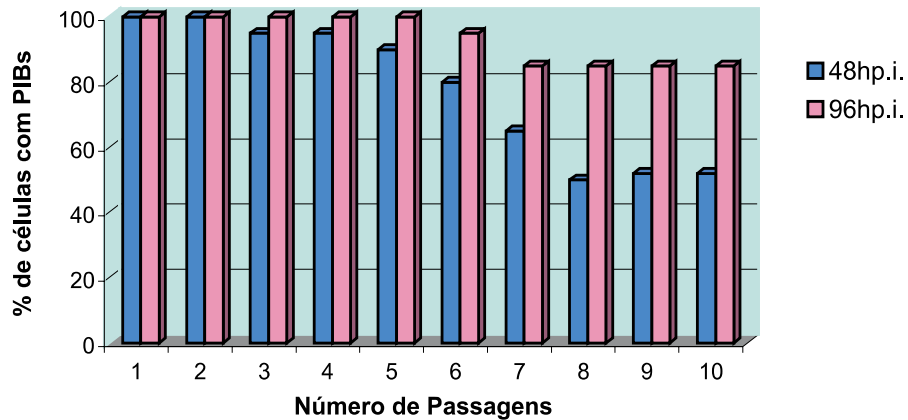


Fig. 1. Passagem seriada do vírus tipo selvagem AgMNPV-79 em cultura de células *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286).

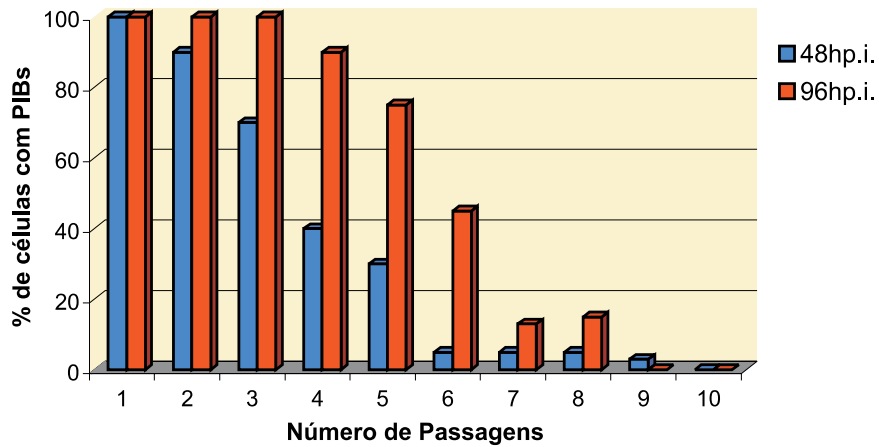
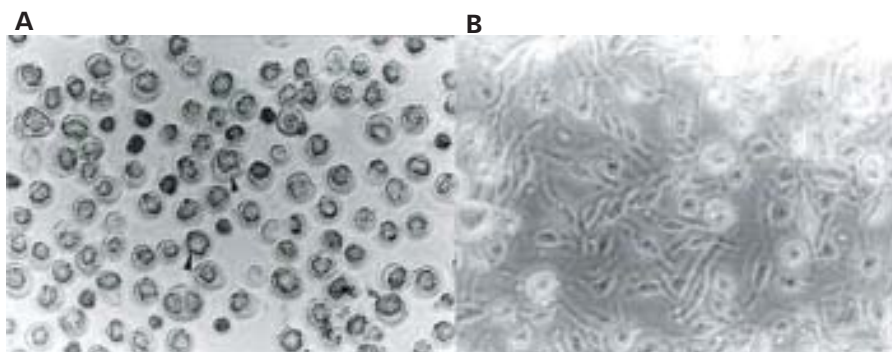


Fig.2. Passagem seriada do clone viral AgMNPV-2D em cultura de células de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286).

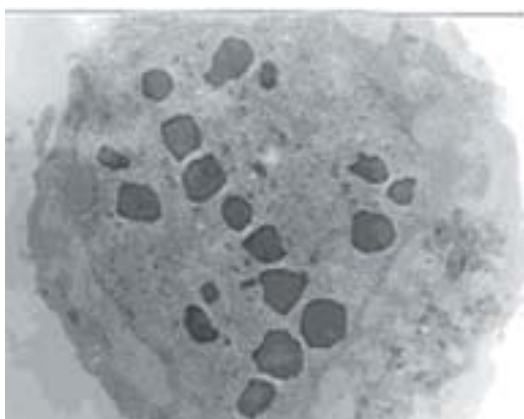
Os efeitos citopáticos observados por microscopia óptica e eletrônica indicam possíveis alterações genéticas apresentadas pelo vírus (AgMNPV) durante a passagem seriada em cultura de células UFL-AG-286. Células infectadas com vírus com baixas passagens seriadas mostraram hipertrofia nuclear e vários corpos de oclusão (Fig. 3). Os eventos de replicação, tais como, formação de

estroma virogênico, produção de nucleocapsídeos e empacotamento de vírions no poliedro, referentes à primeira passagem do AgMNPV, são mostrados pela análise ultraestrutural da célula infectada (Fig. 4).



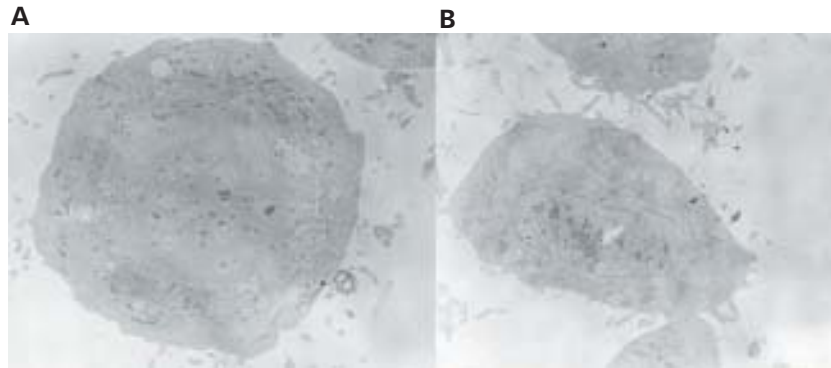
**Fig. 3.** (A) - Microscopia de contraste de fase de células UFL-AG-286 infectadas com AgMNPV-79. Passagem seriada do vírus (P5). As setas indicam células arredondadas com hipertrofia nuclear e corpos de oclusão (poliedros).

(B) - Micrografia de contraste de fase de células UFL-AG-286 não infectadas.



**Fig. 4.** Micrografia eletrônica de célula UFL-AG-286 infectada com AgMNPV-79 mostrando estroma virogênico, produção de nucleocapsídeos e de poliedros. Passagem seriada do vírus (P5).

Observa-se que quando se estabelece uma análise comparativa entre baixas e altas passagens do vírus nas células, alterações ultraestruturais e fenotípicas distintas de uma infecção produtiva são nitidamente visualizadas em altas passagens seriadas. Hipertrofia nuclear é notada, a região mostrando a cromatina é claramente definida e alguns vírions são evidenciados na estrutura, porém, a formação de poliedros não é evidenciada (Fig. 5). Sinais de infecção tendem a desaparecer na passagem P10 quando as células mostram a mesma morfologia das células controle.



**Fig. 5.** (A) - Micrografia eletrônica de célula UFL-AG-286 infectada com AgMNPV-2D mostrando cromatina e alguns vírions. Note que a formação de poliedros não é evidenciada. Passagem seriada do vírus (P9).

(B)- Micrografia eletrônica de célula UFL-AG-286 não infectada.

## Referências Bibliográficas

FRASER, M. J. Analysis of transpositional mutagenesis in baculoviruses. Roberts, D. W. & Granados, R. R. (eds.) 1988.

FRASER, M. J. Transposon-mediated mutagenesis of baculoviruses: Transposon shuttling and implications for speciation. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 79, p. 773-783, 1986.

FRASER, M. J. FP mutation of nuclear polyhedrosis viruses: A novel system for the study of transposon-mediated mutagenesis, p. 265-293. *In: Maramorosch, K. (Ed.). Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture.* New York: Academic Press, 1987.

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

FRASER, M. J.; SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D. Acquisition of host cell DNA sequences by baculovirus: relationship between host DNA insertion and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, San Diego, v. 47, p. 287-300, 1983.

HARRISON, R. L.; SUMMERS, M. D. Mutations in the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *Journal of General Virology*, Reading, v. 76, p. 1451-9, 1995.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of ring osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

HINK, W. F.; VAIL, P. V. A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper (TN 368) cell line. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 22, p. 168-174. 1973.

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*, Washington, DC, v. 17, p. 254 - 268, 1976.

KOOL, M.; VONCKEN, J. W.; VAN LIER, F. L.; TRAMPER, J.; VLAK, J. M. Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology*, San Diego, v. 183, p. 739 - 46, 1991.

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.

LEE, H. Y.; KRELL, P. J. Generation and analysis of defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, Washington, DC, v. 66, p. 4339 - 4347, 1992.

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

MILLER, D. W.; MILLER, L. K. A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element. *Nature*, London, v. 299, p. 562-564, 1982.

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

RAMOSKA, W. A.; HINK, W. F. Electron microscope examination of two plaque variants from a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper, *Autographa californica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego v. 23, p. 197-201, 1974.

SLAVICEK, J. M.; PODGEWAITE, 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.

SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*, San Diego, v. 26, p. 31-43, 1969.

SUMMERS, M. D. Baculoviruses (Baculoviridae). Maramorosch, K. (Ed.). **The atlas of insects and plant virus**. New York: Academic Press, 1977. p. 3-27.

WICKHAM, T. J.; DAVIS, T.; GRANADOS, R. R.; HAMMER, D. A.; SHULER, M. L.; WOOD, H. A. Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnology Letters*, London, v. 13, p. 483-488, 1991.