

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÉTICA DO *Erinnyis ello* granulovirus
APLICADO EM SANTA CATARINA COMO BIOINSETICIDA NO
PERÍODO DE 1986 A 2000**

República Federativa do Brasil
Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa
Silvio Crestana

Diretores Executivos
José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 110

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÉTICA DO
Erinnyis ello granulovirus APLICADO EM SANTA
CATARINA COMO BIOINSETICIDA NO PERÍODO DE
1986 A 2000**

Neiva Ramos Costa
Maria Elita Batista de Castro
William Sihler
Renato Arcangelo Pegoraro
Marlinda Lobo de Souza

Brasília, DF

2005

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) 3448-4600 Fax:
(61) 3340-3624

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

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

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

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

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 Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005)

A 532 Análise da estabilidade genética do *Erinnyis ello* granulovirus aplicado em Santa Catarina como bioinseticida no período de 1986 a 2000 / Neiva Ramos Costa ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

21 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 110)

1. *Erinnyis ello* granulovirus – bioinseticida. 2. *Erinnyis ello* granulovirus – *Baculovirus*. 3. *Erinnyis ello* granulovirus – estabilidade genética – monitoramento. 3. Controle biológico - mandaróvã da mandioca - Santa Catarina. I. Costa, Neiva Ramos. II. Série.

579.2436 – CDD 21.

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÉTICA DO
Erinnyis ello granulovirus APLICADO EM SANTA
CATARINA COMO BIOINSETICIDA NO PERÍODO DE
1986 A 2000**

Neiva Ramos Costa¹
Maria Elita Batista de Castro²
William Sihler³
Renato Arcangelo Pegoraro⁴
Marlinda Lobo de Souza²

¹ Graduanda em Biologia, Universidade Católica de Brasília (UCB)

² Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Biólogo, MsC, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Biólogo, MsC, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. – EPAGRI

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

RESUMO

Baculovirus é um importante grupo de vírus de insetos que infecta principalmente os lepidópteros. No Brasil, o *Erinnyis ello ello*, conhecido como mandarová da mandioca, é a principal praga da mandioca sendo também encontrado em áreas de seringueira. Em meados da década de 80, o *Erinnyis ello ello* granulovirus (EeGV), denominado baculovirus erinnyis, começou a ser aplicado como bioinseticida para o controle dessa praga no estado de Santa Catarina. Neste trabalho é feito o monitoramento da estabilidade genética desse vírus. Para tanto, isolados virais foram obtidos a partir de lagartas coletadas na região de Itajaí/Jaguaruna (SC) no período de 1986 a 2000. Partículas virais foram inicialmente purificadas das larvas através de ultracentrifugação em gradientes de sacarose. Em seguida, o DNA foi extraído através de ciclos de fenol e clorofórmio, digerido com diferentes enzimas de restrição e submetido a eletroforese em gel de agarose. A análise comparativa dos perfis de restrição obtidos com a enzima *Eco* RI revelou um total de vinte e um fragmentos de DNA presentes em todos os isolados. Entretanto uma banda submolar de 8,7 Kb mostrou uma grande variação de intensidade ao longo dos anos. Esse comportamento foi também observado ao comparar os perfis obtidos com a enzima *Pst* I. Nesta digestão, além dos três fragmentos comuns aos isolados, foi detectada uma banda submolar de 12,7 Kb que apresentou grande oscilação de intensidade nas amostras, caracterizando um fluxo na população. Na digestão com *Eco* RV foram produzidos um total de doze fragmentos, além de uma banda submolar de 13,6 Kb que esteve presente a partir do ano de 1999. Com a enzima *Bam* HI foram obtidos um total de sete fragmentos e, a partir da safra 1999, uma banda de 2,4 Kb e uma de 5,3 Kb deixou de ser detectada. Nenhuma alteração foi observada nos perfis obtidos por digestão com *Hind* III. Estes dados indicam um fluxo na população de genótipos virais de EeGV no qual alguns deles se tornam predominantes em anos distintos da aplicação do bioinseticida. Mudanças significantes foram observadas no ano de 1999, indicando que um novo genótipo (ou genótipos) tornou-se predominante a partir dessa safra.

ABSTRACT

Genetic stability of *Erinnyis ello* granulovirus applied as a bioinsecticide in Brazil from 1986 to 2000

Baculovirus is an important group of insect viruses that infect mainly lepidoptera. In Brazil, the *Erinnyis ello ello*, known as cassava pest, is the main pest of cassava being also found in areas of rubber trees. In the middle eighties, the *Erinnyis ello ello* granulovirus (EeGV), named as baculovirus erinnyis, was applied in Santa Catarina State as a bioinsecticide in order to control this pest. Our work presents the monitoring of the genetic stability of the virus. Infected larvae were collected in cassava crops in the area of Jaguaruna-Itajai from season 1986 to 2000. Viral particles were first purified from larvae by ultracentrifugation in sucrose gradients. The viral DNA was then extracted by cycles of phenol and chloroform, cleaved with restriction enzymes and analyzed by agarose gel electrophoresis. Analysis of the DNA restriction profiles obtained by *Eco* RI enzyme showed a total of twenty one fragments present in all viral isolates. However, an 8.7 Kb submolar band showed changes in its intensity level during different years. This behavior was also observed by cleavage with *Pst* I. In this digestion, in addition to the four fragments generated in all viral isolates, a 12.7 Kb submolar band presented also great variation of intensity in the samples, characterizing a flow in the virus population. Digestion with *Eco* RV enzyme generated a total of twelve fragments and also a 13.6 Kb submolar band that became present from year 1999. Seven molar bands were produced by cleavage with *Bam* HI. The DNA profile showed that a 2.4 Kb and a 5.3 Kb bands were no longer detected after year 1999. No changes were shown in the virus restriction profiles after digestion with *Hind* III. Our results showed a genotypic viral flow in the EeGV population in which some of them became dominant in distinct years of the bioinsecticide application. A major change was observed in season 1999, indicating that a new genotypic variant (s) became predominant from that year.

INTRODUÇÃO

Das duzentas espécies de artrópodes que se alimentam da mandioca, o mandarová (*Erinnyis ello ello*) constitui a principal praga dessa cultura, devido à sua alta capacidade de consumo foliar especialmente nos últimos instares larvais. Esta praga também tem sido observada em trinta e cinco espécies de plantas, especialmente da família *Euphorbiaceae* (Schmitt, 2002). Os danos causados pela praga atingem diretamente a produção da mandioca. Ela pode ocorrer durante todo o ano, variando a intensidade do ataque. Segundo Schmitt (2002), a fêmea pode depositar até 1800 ovos durante o seu ciclo de vida. Os ovos eclodem 3 a 5 dias após a oviposição. A lagarta passa por cinco fases de desenvolvimento e dura aproximadamente de 12 dias a 15 dias, período em que consome, em média, 1.107 cm² de área foliar, o equivalente a 12 folhas bem desenvolvidas, sendo que 75% dessa área é consumida no 5º ínstar. Em grandes infestações, o mandarová da mandioca afeta o material de plantio, ao atacar folhas, talos, gemas apicais e laterais causando redução em até 50% no rendimento de raízes.

Em meados da década de oitenta, um vírus patogênico ao mandarová foi utilizado como bioinseticida (baculovirus erinnyis), em lavouras de mandioca, em programa estabelecido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. – EPAGRI. A família *Baculorividae* infecta principalmente os representantes da ordem Lepidoptera. Os vírus também podem ser encontrados nas ordens Hymenoptera, Díptera, Coleoptera, Orthoptera, Neuroptera, Trichoptera e nas classes Crustácea e Arachnida. Os baculovírus são compostos pelos gêneros Nucleopolyhedrovirus e Granulovirus (Van Regenmortel *et al*, 2000) os quais são diferenciados pelo tamanho e forma de seus corpos de oclusão. Os granulovirus produzem pequenas oclusões de forma oval, chamadas grânulos, com cerca de 0.50 µm de comprimento. Os nucleopoliedrovirus são maiores e produzem oclusões de formato poliédrico variando tipicamente de 1,0 µm a 5,0 µm (Federici,1997). Esses corpos de oclusão protegem as unidades infectivas (vírions) de degradação pelo meio ambiente, permitindo a

disseminação da doença entre os insetos. Os nucleopoliedrovirus podem formar vírions contendo somente um nucleocapsídeo por envelope (SNPV) ou contendo vários nucleocapsídeos (MNPV). Os granulovirus possuem em geral apenas um nucleocapsídeo por vírion, ou raramente dois, e um único vírion por corpo de oclusão.

Os baculovirus possuem como característica peculiar a produção, durante seu ciclo de vida, de dois fenotipos virais distintos em estrutura e função: os *Occluded Derived Virus* (ODVs) e os *Budded Virus* (BVs). A forma ODV, é encontrada nas partículas oclusas (poliedros ou grânulos), sendo altamente infecciosa às células epiteliais do intestino. A forma BV é produzida por brotamento do vírus através da membrana plasmática de células infectadas e serve para transmitir a doença entre várias células e tecidos dos insetos. Essas duas formas utilizam diferentes mecanismos de penetração e variam em sua composição protéica (Funk *et al*, 1997).

O *Erinnyis ello ello* granulovirus (EeGV) é um vírus de ocorrência natural e tem demonstrado ser uma alternativa viável, segura e econômica para o controle do mandarová (Schmitt, 2002). Um estudo sobre a eficiência deste baculovirus como inseticida na região de Itajaí demonstrou alta capacidade de dispersão o que permite que a infecção chegue a locais não pulverizados através do vento, de trânsito de pessoas na lavoura, de insetos parasitas e de predadores (Schmitt, 1985). A alta virulência deste vírus foi verificada em condições de campo, causando 90% de mortalidade, e comprovada em condições de laboratório, levando também até 90% de mortalidade após nove dias de infecção.

A infecção da lagarta pelo baculovirus inicia-se com a ingestão deste vírus juntamente com as folhas da mandioca. Aproximadamente após quatro dias da ingestão do vírus surgem os primeiros sintomas da doença que são descoloração da lagarta, perda dos movimentos e da capacidade de se alimentar. No estágio final da infecção, por volta de nove dias, as lagartas mortas apresentam comportamento de geotropismo negativo (Fig. 1), ou seja, elas são encontradas dependuradas nos pecíolos das folhas. Após a morte do inseto os grânulos são

liberados no meio ambiente, devido à lise da cutícula larval, transmitindo a infecção a outros insetos (Schmitt, 1985).



Figura 1 - Mandarová da mandioca infectada com baculovirus *erinnys* (folder EPAGRI).

Neste trabalho é apresentado o monitoramento da estabilidade genética do *Erinnys ello ello* granulovirus coletado em Santa Catarina, em lavouras de mandioca na região de Itajaí/Jaguaruna, nos anos de 1986, 1990, 1994, 1998, 1999 e 2000. Para esse propósito foi utilizada a técnica de análise de restrição do DNA viral. A presença de fragmentos submolares de DNA, em perfis de restrição, indica a ocorrência de variantes genotípicos em populações de baculovirus.

MATERIAL E MÉTODOS

- 1. Vírus:** Isolados temporais do vírus EeGV presentes em larvas de mandarová coletadas em lavouras de mandioca na região de Itajaí/Jaguaruna S.C., nos anos de 1986, 1990, 1994, 1998, 1999 e 2000.
- 2. Purificação de partículas virais:** A purificação de grânulos foi feita de acordo com Maruniak, 1986. A partir das lagartas infectadas com o vírus

EeGV, foi obtido um macerado com tampão de homogeneização (1% de ácido ascórbico, 2% de SDS, 0,01M de Tris pH 7,8 e 0,01M de EDTA para 1 litro). O macerado foi filtrado em três camadas de gaze com uma fina camada de lã de vidro entre elas. Este material foi cedido pelo Dr. Renato Pegoraro (EPAGRI) para posterior processamento no Laboratório LGM-Virologia, do Núcleo de Controle Biológico da EMBRAPA-Cenargen. O macerado foi submetido a duas centrifugações de 10000 e 12000 rpm (rotor SS 34), respectivamente, onde o sobrenadante obtido em cada etapa era descartado e o pellet era ressuspensão em tampão TE (0,01M de Tris pH 7,8 e 0,001M de EDTA para 1 litro). O material coletado do macerado foi aplicado em um volume igual a 5 ml em gradientes de sacarose. Para o preparo destes gradientes, soluções de sacarose nas concentrações de 40% e 65% diluídas em tampão TE eram preparadas no dia anterior. A solução mais densa (65%) era colocada primeiramente em uma quantidade de 5ml em um tubo de ensaio, logo após eram adicionadas diluições intermediárias. O preparo destas diluições era realizado através da mistura em quantidades diferentes das soluções de 65% e 40%, formando assim um gradiente de diferentes concentrações da parte inferior para a superior do tubo (65%, 2:1, 1:1, 1:2 e 40%), respectivamente. O gradiente era reservado a 4°C *overnight*. As amostras aplicadas nos gradientes podiam ser diluídas a concentrações de 1:1 ou até 1:10, dependendo do filtrado obtido. Os gradientes foram submetidos a ultracentrifugação a 24000 rpm por 40 minutos a 4°C (rotor AH-627). Após centrifugação, a banda correspondente aos grânulos foi coletada e diluída 4 vezes em tampão TE. A amostra diluída era então centrifugada novamente a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C (rotor SS 34) e o pellet resultante foi ressuspensionado em aproximadamente 1 ml de água destilada e estocado a -20°C.

- 3. Extração e análise de DNA viral:** Em 500µl da suspensão de grânulos purificados, foi adicionado 250µl de Solução Alcalina 3x, pH 10,9 (0,3M de Na₂CO₃, 0,51M de NaCl e 0,03M de EDTA em 50ml de água destilada)

e incubado a 37°C. Após 30 minutos foi adicionado à amostra, 25µl de SDS 20% e incubado a 37°C. Após 10 minutos, foi adicionado 12,5µl da enzima Proteinase K (20mg/ml) e incubado a 37°C *overnight*. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 12000 rpm e o pellet foi descartado. O sobrenadante foi submetido a ciclos de igual volume de fenol saturado com cloreto de sódio 5M (1:1), fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), onde a cada etapa de extração a amostra era submetida a centrifugações de 12000 rpm por 5 minutos. Após passar por essas etapas, a fase aquosa foi concentrada com dois volumes de etanol 95%, 10% do volume final de Acetato de Sódio 3M, pH 5,2 e armazenado a -20°C *overnight*. A amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 30 minutos, seguida de lavagem com etanol 70% ao pellet resultante e submetida a nova centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. O pellet obtido dessa centrifugação era seco no centrivap e logo em seguida ressuspensão em 10 a 50µl de tampão TE. Para obter uma melhor solubilização, o DNA era incubado a 56-65°C em banho-maria por 30 minutos e então era estocado a 4°C.

4. **Clivagem de DNA viral com enzimas de restrição:** Os perfis de restrição das amostras de DNA viral foram obtidos através da clivagem com cinco enzimas. Foram utilizadas as enzimas *Eco* RI (Sigma), *Eco* RV (Pharmacia Biotech), *Bam* HI, *Pst* I e *Hind* III (Promega). Para cada enzima, o sistema de digestão foi feito em um volume de reação de 20µl contendo: 1,5 µg de DNA molde (EeGV), 1µl de enzima (10 U) e 2µl do tampão (10X). Os sistemas de digestão foram submetidos à temperatura de 37°C, em banho-maria, por 3 horas.
5. **Eletroforese em gel de agarose:** Os géis de agarose foram preparados em uma concentração de 0,8% em tampão TAE 1X (Tris Base, 5,71% de ácido acético glacial, 10% de EDTA 0,5M pH 8.0) contendo brometo de etídeo 0,2 µg/100 ml de acordo com Sambrook *et al*, 1989. Após solidificação, o gel foi submerso na cuba contendo tampão TAE 1X. As amostras, após diluição em tampão 6X (0,05 % de *bromophenol blue*,

0,05 % de *xylene cyanole* e 50 % de glicerol) foram aplicadas nos poços do gel. A migração das amostras foi feita a uma corrente elétrica constante de 80V.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do DNA extraído de EeGV e digerido *Hind* III produziu um total de quatro fragmentos em todos os isolados, sendo que nenhuma alteração foi visualizada em seus perfis de restrição (Fig. 2). Por outro lado, modificações foram detectadas após digestão com todas as outras enzimas.

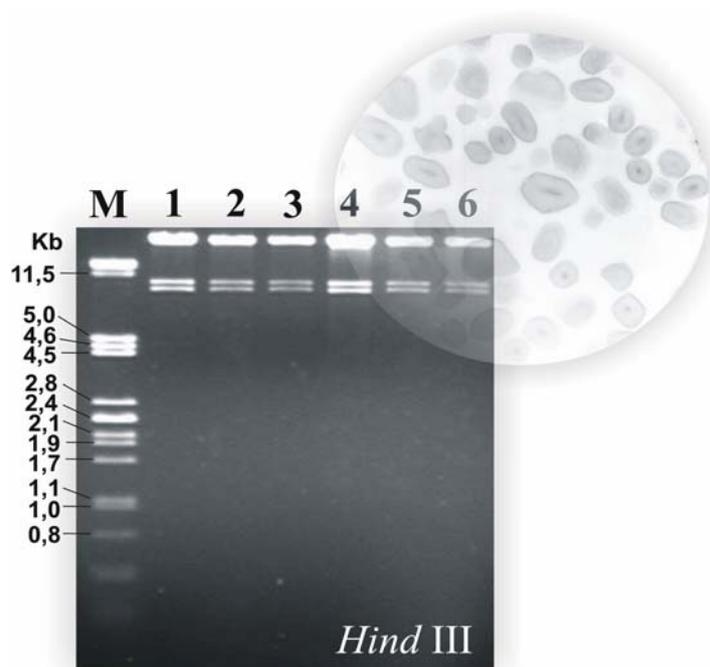


FIGURA 2 – Perfis de restrição do DNA dos isolados temporais de EeGV. Análise em gel de agarose 0,8% após digestão do DNA viral com *Hind* III e micrografia eletrônica do vírus EeGV.

M – Marcador

1 – EeGV 1986

2 – EeGV 1990

3 – EeGV 1994

4 – EeGV 1998

5 – EeGV 1999

6 – EeGV 2000

A análise comparativa dos perfis de restrição obtidos com *Eco* RI revelou um total de vinte e um fragmentos presentes em todos os isolados. Entretanto uma banda submolar de 8,7 Kb esteve presente no ano de 86, sendo que sua intensidade diminuiu no ano de 94, aumentou nos anos de 98 e 99 e novamente decaiu no ano de 2000. Esse comportamento foi também observado ao comparar os perfis obtidos com a enzima *Pst* I. Nesta digestão, além dos 4 fragmentos comuns aos isolados, foi detectada uma banda submolar de 12,7 Kb presente na amostra do ano de 86 que aumentou de intensidade em 90 e não foi detectada em 94. Entretanto, ela apareceu novamente em 99 mas teve sua intensidade reduzida em 2000 caracterizando um fluxo na população viral (Fig.3).

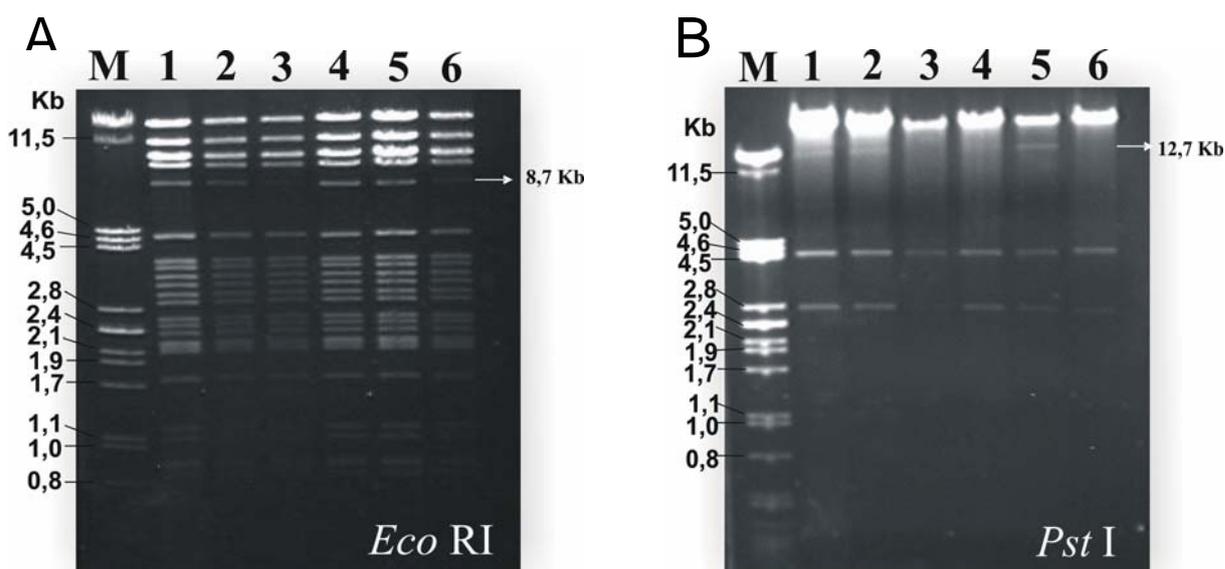


FIGURA 3 – Perfis de restrição do DNA dos isolados temporais de EeGV. Análise em gel de agarose 0,8% após digestão do DNA viral com *Eco* RI (A) e *Pst* I (B).

M – Marcador DNA λ *Pst* I

1 – EeGV 1986

3 – EeGV 1994

5 – EeGV 1999

2 – EeGV 1990

4 – EeGV 1998

6 – EeGV 2000

Na digestão com *Eco* RV foram produzidos um total de 12 fragmentos além de uma banda submolar de 13,6 Kb que esteve presente a partir do ano de 99 e tornou-se menos intensa no ano de 2000. Ao se analisar os perfis obtidos

com Bam HI, além dos 7 fragmentos molares de DNA, observou-se também uma modificação a partir de 1999 em que uma banda de 2,4 Kb deixou de ser observada. Além disso, uma banda submolar de 5,3 Kb não foi detectada nos anos de 86 e 99. Entretanto, na figura 4b essa banda se apresenta visível somente nas safras de 90 e 94 devido a intensidade dessas amostras (Fig. 4).

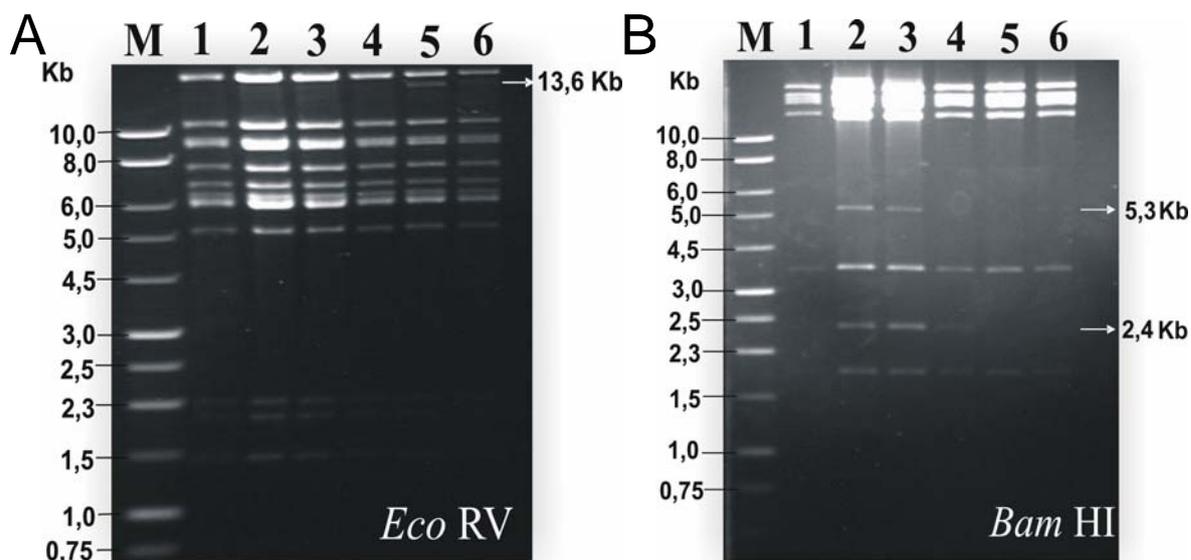


FIGURA 4 – Perfis de restrição do DNA dos isolados temporais de EeGV. Análise em gel de agarose 0,8% após digestão do DNA viral com *Eco* RV (A) e *Bam* HI (B).

M – Marcador DNA Ladder

1 – EeGV 1986

3 – EeGV 1994

5 – EeGV 1999

2 – EeGV 1990

4 – EeGV 1998

6 – EeGV 2000

A ocorrência de variantes genótipicos é uma característica da família Baculoviridae e tem sido descrita em populações de campo (McIntosh *et al.*, 1987). Essa maior plasticidade do vírus está relacionada ao evento de recombinação, um importante mecanismo que aumenta a diversidade genética e confere ao vírus uma maior adaptabilidade a mudanças ambientais. Isso estaria associado a fatores de virulência e manutenção de um equilíbrio entre a população do vírus e o inseto alvo. Os dados obtidos nesse trabalho revelam um fluxo na população de genótipos virais nos quais alguns deles se tornam predominantes em anos distintos de aplicação do baculovirus. Mudanças

significantes foram observadas no ano de 1999, indicando que um novo genótipo (ou genótipos) tornou-se predominante a partir dessa safra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 33-59.

FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 7-32.

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

MCINTOSH, A. H.; RICE, W. C.; IGNOFFO, C. M. Genotypic variants in wild-type populations of baculoviruses. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture**. San Diego: Academic Press, 1987. p. 305-325.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 2. ed. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHMITT, A. T. **Eficiência da aplicação de *Baculovirus erinnyis* no controle do mandarová da mandioca**. Florianópolis: EMPASC, 1985. 7 p. (EMPASC. Comunicado Técnico, 88).

SCHMITT, A. T. Principais insetos pragas da mandioca e seu controle. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Cultura de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. v. 2, p. 350-357.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. 475 p. Seventh Report of International Committee on Taxonomy of viruses.