

**Clonagem de Fragmentos de DNA de um
Baculovirus Patogênico à Lagarta-do-
Álamo**

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

ISSN 1676-1340
Dezembro, 2007

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 205

Clonagem de Fragmentos de DNA de um Baculovirus Patogênico à Lagarta-do- Álamo

Lucas Malta Almeida
Francisco José R. Pinedo
Maria Elita B. Castro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

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

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
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: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 447 Almeida, Lucas Malta

Clonagem de Fragmentos de DNA de um Baculovirus Patogênico à Lagarta-do-
Álamo / Lucas Malta Almeida, Francisco José R. Pinedo, Maria Elita B. Castro. --
Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

13 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, 1676 - 1340; 205).

1. CvMNPV - clonagem - fragmentos de DNA. 2. Endonuclease *HindIII*. 3. Biblioteca
genômica. I. Título. II. Pinedo, Francisco José R. III. Castro, Maria Elita B. IV. Série.

631.5233 - CDD 21.

Clonagem de Fragmentos de DNA de um Baculovirus Patogênico à Lagarta-do-Álamo

Lucas Malta Almeida

Francisco José R. Pinedo

Maria Elita B. Castro

Introdução

A família *Baculoviridae* engloba dois grupos similares de vírus que infectam apenas invertebrados, principalmente insetos. Estes grupos formam os gêneros *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) e seus vírions são protegidos por corpos de oclusão constituídos de uma matriz protéica tendo como principal proteína a poliedrina para os NPV e a granulina para os GV. São diferenciados, portanto, na forma, tamanho e localização dos seus corpos de oclusão (Theilmann *et al.*, 2005).

Na maioria das vezes, infectam insetos na sua forma larval, os quais se alimentam de folhas contaminadas com os poliedros ou grânulos. Estes liberam os vírions no intestino médio da lagarta e dentro das células, se replicam e disseminam por todo o corpo da lagarta causando infecção seguida de morte de seu hospedeiro (Blissard 1996, Miller 1996, Volkman 1997).

A lagarta da mariposa-do-álamo (*Condylorrhiza vestigialis*, Guenée, 1854, Lepdoptera: Cambridae) é considerada a principal praga da cultura do Álamo (ou choupo), planta da família Salicaceae (gênero *Populus*) que possui alto valor econômico e madeira clara e resistente. O álamo é plantado em mais de 3000 ha para produção de palitos e caixas para a indústria do fósforo, e móveis (May-de-Mio & Amorim, 2000), além de ser grande fonte de própolis para a indústria farmacêutica.

O controle dessa praga é de especial importância para aumento da produção de lenho para a indústria, visto que em seus estágios iniciais de crescimento (larva, lagartas), causa grande desfolha das plantas e conseqüente diminuição da produção de madeira. Para tal, tem sido proposto o uso de baculovirus como inseticida biológico, pois além de ser específico, evitando o ataque a outros insetos e vertebrados, não poluem o meio ambiente.

Um novo vírus identificado pelo Laboratório de Virologia de Insetos (NTCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) foi isolado de lagartas *Condylorrhiza vestigialis* coletadas em plantios de álamo (município de Porto União – SC), pertencente à empresa Swedish Match, e multiplicado em laboratório em colaboração com a Universidade Federal do Paraná (PR). Esse vírus pertence ao gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e está sendo chamado de *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV), pois a análise ultraestrutural realizada mostrou vírions com vários nucleocapsídeos por envelope que

se apresentam imersos em uma matriz protéica formando os corpos de oclusão (Castro *et al.*, 2003). Tal vírus ataca a lagarta *Condylorrhiza vestigialis* e possui alto poder patogênico contra esta praga do Álamo (Machado, 2000).

Em decorrência da possibilidade do uso deste baculovirus como bioinseticida, vários estudos tem sido conduzidos visando determinar a eficiência deste vírus contra a lagarta-do-álamo e desenvolver ensaios de criação massal do inseto, em laboratório, para produção do vírus (Castro *et al.*, 2003). A busca por outras informações sobre este vírus, tem sido de grande interesse, visto que o uso deste baculovirus como bioinseticida gerará menos gastos no controle da lagarta *C. vestigialis* além de causar menos impacto sobre o meio ambiente, como fazem os defensivos químicos.

Os baculovirus em geral possuem genomas de DNA grandes, variando de 80 a 180 kb, circulares, superenovelados, fita dupla, ocluídos em uma matriz protéica e os vírions se apresentam na forma de bastão (Nie *et al.*, 2005). Tais vírus também têm sido valiosos em experimentos de engenharia genética visto que fragmentos grandes de DNA podem ser inseridos em regiões de alta replicação do genoma dos vírus, permitindo sua replicação em células de insetos. Sendo assim, grande quantidade de proteínas de diferentes tipos pode ser produzida (Fraenkel-Contrat *et al.*, 1988).

Este trabalho teve como objetivo clonar os diferentes fragmentos de DNA de CvMNPV gerados pela ação da endonuclease *HindIII*, para posteriormente construir uma biblioteca genômica que poderá auxiliar numa melhor caracterização do vírus, incluindo clonagem de genes de interesse, construção de um mapa físico e sequenciamento completo de seu genoma.

Material e Métodos

Purificação de corpos de oclusão (OB)

Macerados de lagartas *Condylorrhiza vestigialis* infectadas foram utilizados para purificação das partículas virais oclusas (OB), também chamados de poliedros, por ultracentrifugação (24000 x g) a 4°C por 40min em gradiente de sacarose com densidades variando de 1,17 a 1,30 g/cm³. Uma banda de OB de coloração clara foi coletada com pipeta Pasteur, colocada em Becker e diluída em TE (4 volumes da amostra). Em seguida a amostra foi centrifugada a 12000 x g/15min a 4°C com rotor SS34. O pellet foi ressuscitado em H₂O destilada autoclavada e estocado a -20°C. Uma pequena alíquota desse material foi colocada em hemacitômetro e os OB foram contados com o auxílio de um microscópio de contraste de fase. A concentração de partículas OB foi estimada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\underline{\Sigma 5 \text{ quadrantes} \times 50.000 \times \text{fator de diluição} = \text{n}^\circ \text{ de OB/ml.}}$$

Extração e purificação de DNA a partir de partículas virais OB

Para purificação do DNA do baculovirus CvMNPV), 450µl de OB purificados foram incubados com 50µl de carbonato de sódio (1M), recém preparado, em banho-maria a 37°C por 30min. Alíquotas dessa amostra foram observadas em microscópio de luz até a obtenção da dissolução completa das partículas, o que levou mais 20min a 40°C em banho-maria. Seguida esta etapa, 62,5 µl de proteinase K (4mg/ml) foram adicionados e a incubação a 37°C foi continuada por cerca de 16 horas (*overnight*). O volume do eppendorf foi igualmente dividido em dois outros eppendorfs. A cada um deles foi acrescentado igual volume de fenol saturado, misturados por inversão dos tubos e centrifugado a 12000 x g/5min. O sobrenadante foi recolhido com ponteira cortada e transferida para outro eppendorf, sendo repetidos os ciclos de extração utilizando um com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e outro com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi coletada com ponteira cortada e precipitada em etanol 100% gelado (2 volumes), acetato de sódio (3M, pH 5,2) (1/10 do volume) a -20°C (*overnight*). O precipitado foi centrifugado a 14000 x g/30min, lavado com 500 µl de etanol 70% gelado e centrifugado a 14000 x g/10min. O sedimento foi seco em fluxo laminar e ressuspenso em 30µl de TE utilizando ponteira cortada.

Clivagem do DNA de CvMNPV com enzima de restrição

Em 10µl de DNA de CvMNPV (45ng/µl) foram adicionados 7µl de água Milli-Q autoclavada, 1µl da endonuclease de restrição *HindIII* (10U/µl) e 2µl do tampão desta enzima (*React 2*). Este sistema de digestão foi colocado a 37°C em estufa por 2h e posteriormente armazenado a 4°C.

Clivagem do plasmídeo Bluescript (pBS)

Em 4 µl de DNA plasmidial (Bluescript 200ng/µl) foram adicionados 13µl de água Milli-Q autoclavada, 2µl do tampão desta enzima (*React 2*) e 1µl da endonuclease de restrição *HindIII*. Tal sistema de digestão foi incubado a 37°C em estufa por 2h e posteriormente armazenado a 4°C.

Reação de desfosforilação

O sistema composto de 20µl do DNA plasmidial clivado com *HindIII* foi tratado com 10µl da fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIAP - *calf intestinal alkaline phosphatase*) (0,01U/µl) em um volume final de 50µl a 37°C por 30min. Nova alíquota (10µl) da CIAP (0,01U/µl) foi acrescentada ao plasmídeo e incubada a 37°C por mais 30min. Ao mesmo foi acrescentado fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, vortexado e centrifugado (12000 x g/10min). Ao sobrenadante foi acrescentado 10% de acetato de amônia 7,5M, proporcional ao seu volume e

2 volumes de álcool gelado (100%), misturado por inversão de tubo e colocado no freezer (15min) para precipitação do DNA. A re-purificação deste DNA seguiu-se com uma centrifugação (12000 x g/10min), descarte do sobrenadante, lavagem do tubo com 2 volumes de álcool 70% gelado seguida de centrifugação (12000 x g/5min). O material depois de seco foi ressuspendido em 15µl de TE autoclavado e armazenado a 4°C.

Reação de ligação

Um sistema de ligação com volume final de 20µl foi montado usando 4µl do plasmídeo pBS defosforilado e 4µl do DNA de CvMNPV (45ng/µl), ambos digeridos por *HindIII*. Os mesmos foram unidos pela ação da T4 DNA ligase em seu respectivo tampão, a 13°C por 1h. O material foi posteriormente armazenado a 4°C.

Transformação de células competentes

Plasmídios ligados a fragmentos de DNA de CvMNPV foram utilizados no processo de transformação de células competentes de *Escherichia coli* (linhagem XL-1-Blue). Células bacterianas (50µl) foram transformadas pela adição de 5µl da reação de ligação (pBS + insertos de CvMNPV), seguida de incubação no gelo (0°C) por 30min, no banho-maria a 42°C por 1,5min e novamente no gelo por mais 2min. Para crescimento das células transformadas foram adicionados 500 µl de meio LB com ampicilina (0,1mg/ml) e utilizada incubação a 37°C sob agitação constante (250 rpm) por 30-60min. Dando prosseguimento as células transformadas foram centrifugadas (10.000 x g/1 min), sendo parte do meio descartado e o restante usado para ressuspender o sedimento. Células em suspensão foram então plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (0,1mg/ml), IPTG (0,02mg/ml) e X-Gal (0,025/ml), e incubadas a 37°C *overnight*.

Plaqueamento das colônias brancas amplificadas

Colônias brancas transformadas foram aleatoriamente coletadas e amplificadas em 500µl de meio LB com ampicilina (0,1mg/ml) a 37°C sob agitação constante, sendo posteriormente plaqueadas em meio LB-Ágar com ampicilina (0,1mg/ml), IPTG (0,02mg/ml) e X-Gal (0,025mg/ml) sob um registro numérico para diferenciá-las, e colocadas para crescer a 37°C por 16-18h.

Extração de DNA bacteriano utilizando fenol

Colônias amplificadas e registradas numericamente foram centrifugadas a 12000 x g/2min, parte do meio foi descartado, e o restante utilizado para ressuspender as bactérias. Um volume (1V) da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado a cada tubo, os

mesmos foram vortexados e ao sobrenadante foi adicionado 1µl de RNase. O sobrenadante resultante da extração de DNA de cada colônia (8µl) foi aplicado em gel de agarose 0,8% e submetido a uma eletroforese a 100V para observação e seleção das colônias transformadas.

Preparação de plasmídios por lise alcalina

Colônias transformadas e selecionadas foram crescidas em 5ml de meio LB com ampicilina (0,1mg/ml) a 37°C (*overnight*) e centrifugadas a 4000 x g/5min, a 4°C. Parte do meio foi descartada e o restante usado para ressuspender o sedimento. Cada sedimento foi então submetido aos seguintes tratamentos: 2V da Solução I gelada e homogeneização por vortex; 3V da Solução II e homogeneização por inversão de tubo; temperatura ambiente por 10min; 2V da Solução III gelada e homogeneização por inversão de tubo, gelo (0°C) por 10min. Em seguida o material foi centrifugado a 4400 x g/15min a 4°C, e aos sobrenadantes resultantes foram adicionados 2V de etanol 100% gelado e mantidos a -20°C (*overnight*). Em continuidade, o DNA plasmidial precipitado foi coletado por centrifugação a 4400 x g/25min, 4°C, lavado em 2 volumes de etanol 70% gelado, seco em fluxo laminar e re-suspendido em 600µl de tampão TE. Para uma melhor purificação, foram adicionados 3µl de RNase às amostras de DNA, e após 1h em temperatura ambiente, foram extraídas por ciclos de fenol com centrifugações entre as etapas, de 13000 x g/5min. Em seguida 2 volumes de etanol 100% gelado e acetato de sódio (3M, 10% do volume do tubo) foram adicionados a cada amostra e colocados para precipitar a -20°C durante a noite (“overnight”). As amostras precipitadas foram então centrifugadas a 13000 x g/15min e o etanol 100% foi substituído por etanol 70% gelado com uma centrifugação a 10000 x g/5min. O material foi seco em fluxo laminar e resuspenso em 30 a 50µl de água Milli-Q autoclavada.

Quantificação das amostras de DNA plasmidial

Para estimativa da concentração de DNA plasmidial foram utilizados 2µl de cada amostra e adicionados 6µl de água Milli-Q autoclavada e 2µl de tampão de amostra 5x. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio (0,5µg/µl) a 80V por 60min. Para auxiliar na quantificação das concentrações, foram usados 10µl do marcador DNA λ (20ng/µl).

Clivagem do DNA plasmidial com HindIII e observação dos insertos liberados

Uma pequena alíquota de cada amostra de DNA plasmidial com insertos do DNA de CvMNPV, de forma a obter uma concentração de 1µg num volume final de 15µl, foi adicionada a um sistema de digestão com 6µl da enzima *HindIII*, 12U/µl utilizando o tampão 10x (lote A1060). As amostras foram incubadas a 37°C por 3h. Posteriormente, 2µl do tampão de amostra foram adicionados a cada amostra e destas, 3µl foram aplicados em gel de agarose 0,8% com

brometo de etídio (0,3µg/ml) e submetidos a uma voltagem de 80V. Também 3µl do marcador molecular DNA λ clivado com a enzima *Pst*I foram usados em cada gel para auxiliar na estimativa do tamanho (em kb) do(s) fragmento(s) liberado(s) do plasmídeo.

Resultados e Discussão

A concentração de partículas virais foi estimada em $1,9 \times 10^9$ OB/ml, concentração bem próxima a utilizada em procedimentos de extração de DNA de baculovirus (O'Reilly *et al*, 1992). A partir desta concentração de poliedros, DNA de CvMNPV foi extraído e mantido numa concentração estimada de 45ng/µl.

O DNA de CvMNPV foi clivado com a endonuclease de restrição *Hind*III gerando ~20 diferentes fragmentos. O plasmídeo pBluescript tem uma seqüência reconhecida pela *Hind*III em um "polylinker" que gera a forma linear deste plasmídeo, expondo assim extremidades coesivas que podem se ligar àquelas dos fragmentos do DNA genômico de CvMNPV.

Foi observado que após transformação e plaqueamento de *E. coli* em meio LB-Ágar com ampicilina, X-Gal e IPTG, houve grande número de colônias brancas crescidas, juntamente com outras azuis. A ausência de coloração azul é um indicativo de que algum inserto do DNA de CvMNPV se inseriu no sítio de clonagem, fato que impede a expressão do gene da galactose induzida pelo IPTG com conseqüente inibição do catabolismo do X-Gal (a quebra do X-Gal gera um composto de coloração azul).

As colônias obtidas tiveram seu DNA plasmidial extraído e observado em gel de agarose 0,8% para comprovação da presença de plasmídeo(s) com seu(s) inserto(s) e seleção de colônias (Figura 1).

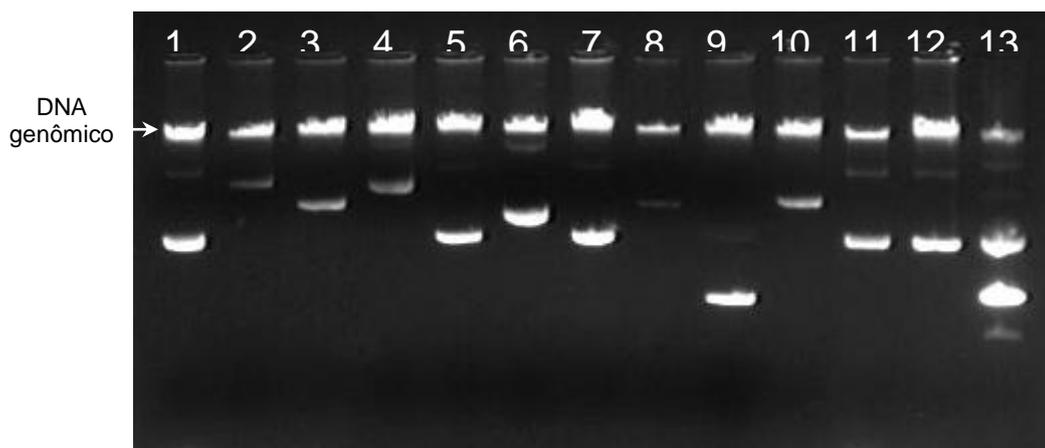


Figura 1: Plasmídios extraídos de colônias de *E. coli* transformadas (coloração branca) com plasmídeos pBluescript contendo fragmentos de DNA de CvMNPV. Gel de agarose 0,8% com brometo de etídio à 0,3µg/µl. **Seta** - linha mostra o DNA genômico bacteriano, com exceção da coluna 13; cada coluna há banda(s) abaixo daquela do DNA genômico (linha da seta) que corresponde(m) ao plasmídeo; Colunas de 1 a 12 representam as colônias de 23A a 34A; Coluna 13 corresponde ao plasmídeo pBluescript purificado (20ng/µl).

As colunas 5, 7, 11 e 12 mostram plasmídios que estão alinhados com uma das bandas da coluna 13, fato que pode sugerir que estas colônias possuem o plasmídio pBluescript sem algum inserto de CvMNPV, ou então possuem o inserto e estão em um grau de enovelamento que lhes permitiu correr à mesma altura de uma das bandas do plasmídeo purificado. Quanto mais próximas estiverem as bandas das colunas de 1 a 12 do DNA genômico (seta), maior será, provavelmente, o tamanho de seu inserto. Duas ou mais bandas observadas nas colunas de 1 a 12 podem indicar diferentes graus de superenovelamento do DNA plasmidial. O mesmo procedimento e interpretação descrita acima foram usados para outras colônias. As colônias selecionadas foram multiplicadas em 5ml de meio LB líquido com ampicilina e tiveram seu DNA plasmidial extraído por lise alcalina, purificado e quantificado em gel de agarose 0,8% (Figura 2).

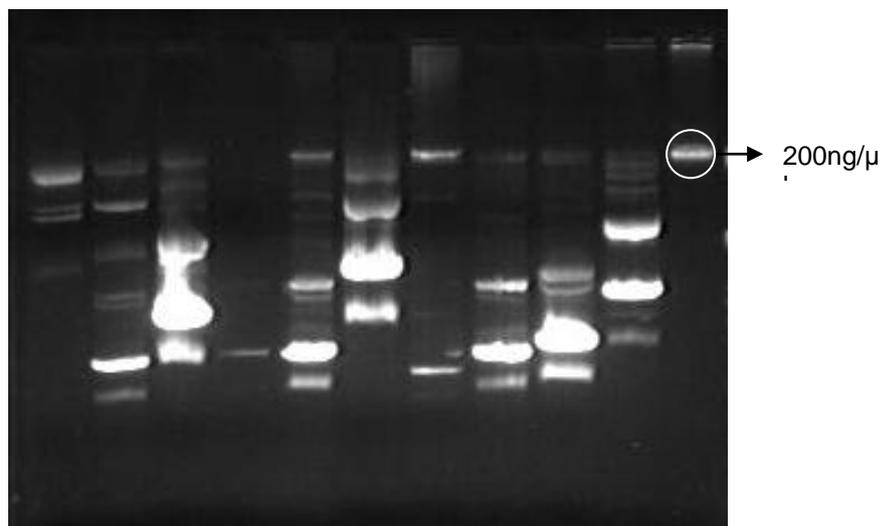


Figura 2: Quantificação da concentração de DNA plasmidial em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio (0,3μg/μl). Colunas de 1 a 10 mostram plasmídios extraídos e purificados das colônias: 3B, 6B, 11B, 16B, 23B, 24B, 27B, 32B, 37B e 12A, respectivamente; a coluna 12 mostra DNA λ (200ng/μl).

Uma estimativa da concentração de DNA plasmidial foi feita baseada na concentração do DNA λ (200ng/μl). Concentrações de DNA plasmidial variaram bastante (0,005 a 1μg/μl) entre as colônias submetidas ao mesmo processo de lise alcalina. Isso pode ser explicado pela variação de densidade celular verificada no crescimento das células em cada tubo.

Colônias selecionadas tiveram seus plasmídios extraídos e clivados com a enzima *HindIII* para liberação do provável fragmento de DNA de CvMNPV inserido. Tais insertos podem ser observados na figura 3.

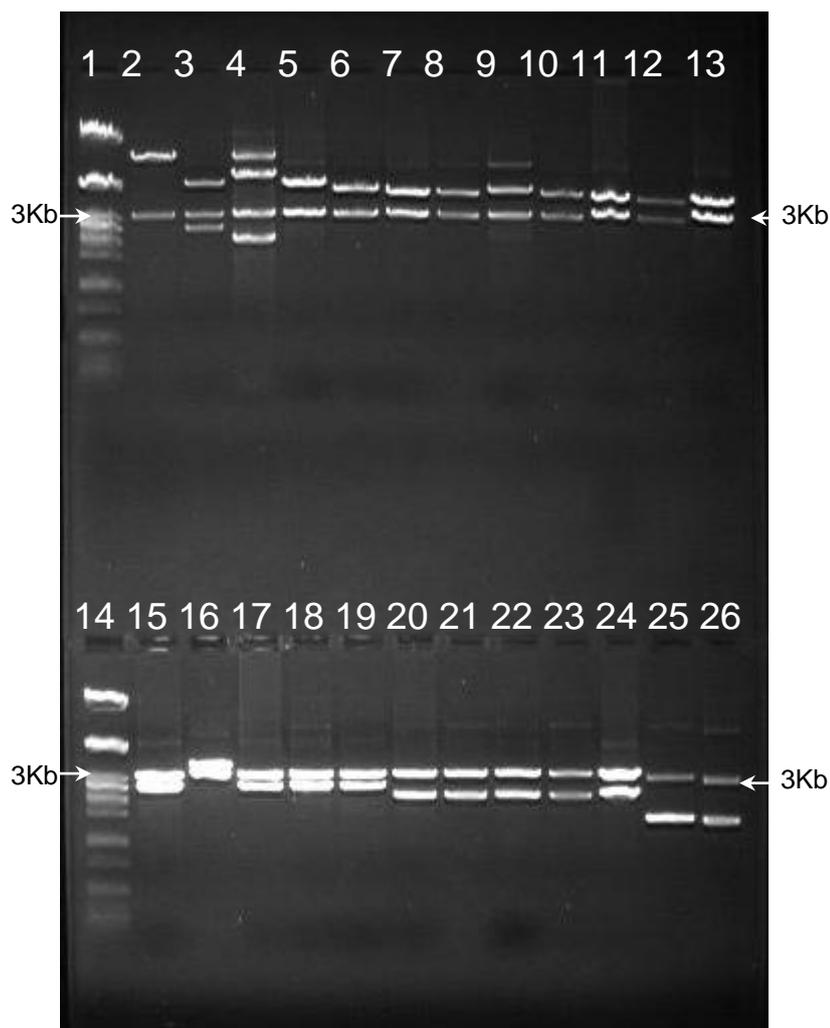


Figura 3: Plasmídios e seus respectivos insertos extraídos de colônias de *E. coli* transformadas, e separados pela ação da endonuclease *Hind*III. Gel de agarose 0,8% com brometo de etídio (0,3µg/µl). As colunas 1 e 14 correspondem ao marcador DNA λ clivado com *Pst*I; as colunas de 2 a 13 correspondem aos clones 18B, 10A, 40A, 36A, 30B, 8B, 20A, 40B, 25B, 9B, 29B, 20B, respectivamente e as colunas de 15 a 26 correspondem aos clones 35B, 24B, 10B, 38A, 33B, 27A, 12A, 1B, 26B, 13B, 6A, 32B, respectivamente. Seta indica os plasmídios linearizados de ~3Kb.

O perfil de bandas apresentado na figura 3, mostra uma banda de ~3Kb, observada em todos os poços, que corresponde ao plasmídio pBluescript. Acima ou abaixo destas bandas há outra(s) que corresponde(m) a inserto(s) de DNA de CvMNPV liberados pela ação da enzima *Hind*III, confirmando a clonagem de cerca de dez diferentes fragmentos ~7Kb a ~1,6Kb. Os poços 3 e 4 mostram, além da banda do plasmídio, 2 e 3 bandas respectivamente, o que poderia ser explicado pela possível presença de mais de um fragmento de DNA de CvMNPV. De 84 clones obtidos, 24 amostras de plasmídios obtidas de clones são mostradas na figura 3, sendo que destas podemos observar a presença de insertos que parecem ser os mesmos nos poços: 7, 8, 10 e 11; 12 e 13; 17, 18 e 19; 20, 21, 22 e 23 e nos poços 25 e 26.

O processo de clonagem se mostrou eficiente o que sugere que este procedimento pode ser mantido até a completa clonagem de todos os fragmentos do DNA de CvMNPV, para posterior sequenciamento de suas extremidades e análise da contiguidade entre os clones.

REFERÊNCIA

BLISSARD, G. W. (1996). Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology* 20: 73-93.

CASTRO, M.E.B.; RIBEIRO, Z.M.A.; SIQUEIRA, C.B.; SANTOS, A.C.B.; SOUZA, M.L.; SOUZA, N.J. Infecção por *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* em diferentes linhagens celulares e espécies de insetos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 16p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 72).

FRAENKEL-CONRAT, H.; KIMBALL, P.C.; LEVY, J.A. *Virology*. 440p. New Jersey: Prentice Hall, Inc., a division of Simon & Shuster Englewood Cliffs, 1988.

MAY-DE-MIO, L.L.; AMORIM, L. Doenças do álamo. *Floresta* 30(1/2): 139-153. 2000.

MILLER, L. K. (1996). Insect Viruses. In: *Fundamental Virology* 401-424. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.

NIE, Y.; WANG, Q.; LIANG, C.; FANG, M.; YU, Z.; CHEN, X. (2005). Characterization of ORF2 and its encoded protein of the *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. *Virus Research* 116: 129-135.

O' REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V.A. *Baculovirus Expression Vectors: a laboratory manual*. 339p. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

THEIMANN, D.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.; JEHLE, J.A.; O'REILY, D.R.; ROHRMANN, G.F.; THIEM, S.; VLAK, J.M. Baculoviridae. p. 177-185. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball (ed.), *VIIIth Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, New York, N.Y. 2005.

VOLKMAN, L. E. (1997). Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. *Adv. Virus Res.* 48:313-348