

# BACULOVIRUS AUTÓCTONOS EN EL CONTROL DE PLAGAS: ESTUDIOS MOLECULARES DE LOS VIRUS AgMNPV Y EpAPGV

Ferrelli M. L.<sup>1\*</sup>, Haase S.<sup>1</sup>, Salvador R.<sup>2</sup>, Sciocco-Cap A.<sup>2</sup> & Romanowski V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), UNLP-CONICET.

<sup>2</sup> Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA), INTA Castelar, Argentina.

\*E-mail: lferrelli@biol.unlp.edu.ar

## RESUMEN

El desarrollo de una agricultura sustentable incluye el remplazo de los insecticidas químicos de amplio espectro por agentes de control biológico inofensivos para los organismos no blanco. Entre los microorganismos utilizados como agentes de biocontrol, los baculovirus son excelentes candidatos debido a su alta virulencia, especificidad, factibilidad de producción y compatibilidad con otras medidas de control de plagas. Sin embargo, salvo ciertas excepciones, el uso de baculovirus como alternativa de control de plagas se ha enfrentado con una serie de inconvenientes: 1) son demasiado específicos desde el punto de vista de la industria de los agroquímicos; 2) su velocidad de acción es relativamente lenta y, si bien se ha demostrado que los insectos causan menor daño una vez infectados, los productores agrícolas no los consideran atractivos al compararlos con los insecticidas químicos de alto poder de volteo. Ante tal situación, se han desarrollado estudios con el objetivo de aumentar la velocidad de acción de los baculovirus y ampliar el rango de huéspedes susceptibles manteniendo las cualidades de inocuidad hacia organismos no blanco. El granulovirus *Epinotia aporema* (EpapGV) y el nucleopolyhedrovirus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) fueron identificados como candidatos para el control biológico de dos lepidópteros-plagas claves de cultivos de leguminosas en Argentina. Nuestro equipo caracterizó en forma exhaustiva al EpapGV y desarrolló una metodología para la introducción de modificaciones en el genoma de AgMNPV, un virus que se ha usado en forma exitosa en control biológico de plagas en Brasil. Este proyecto apunta a la modificación genética de los baculovirus mencionados con el fin de mejorar sus capacidades bioinsecticidas. Otro foco de interés incluye el estudio de posibles factores involucrados en la especificidad viral, ampliando la base de información para el diseño de estrategias de modificación del el rango hospedadores de los baculovirus.

## ABSTRACT

Among the main objectives in the development of a sustainable agriculture is the replacement of broad-spectrum chemical insecticides with biological control

agents, harmless to non-target organisms. Among the microorganisms to be considered as biocontrol agents, baculoviruses are excellent candidates because of their high virulence, specificity, feasibility of mass production and compatibility with other pest control actions. However, the widespread application of baculoviruses faces some limitations: their host range is too narrow from the perspective of the agrochemical companies and their speed of kill is low compared with fast acting chemical pesticides. In order to overcome these limitations, several approaches have been explored to increase the speed of action and to expand the host range of these viruses, preserving their lack of virulence on non-target organisms. *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV) and *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) have been identified as potential candidates for the control of two relevant lepidopterous pests in leguminous crops in Argentina. We have fully characterized EpapGV and developed a system for genetic modification of AgMNPV, a virus that had been successfully used for biological control in Brazil. The present research aims at the genetic improvement of these baculoviruses. Additionally, genes putatively involved in host range will be studied aiming at the design of strategies directed towards modifying and/or expanding the host range of baculoviruses.

## **PALABRAS CLAVE**

Baculovirus, bioinsecticidas, control biológico, *Epinotia aporema*, *Anticarsia gemmatalis*.

## **INTRODUCCIÓN**

Entre los virus entomopatógenos, los baculovirus se destacan por su potencial en el desarrollo de insecticidas biológicos, habiéndose registrado y utilizado con éxito en distintas partes del mundo (Black *et al.* 1997; Moscardi 1999; Vail *et al.* 1999; Copping & Menn 2000).

Los baculovirus tienen características que los hacen excelentes insecticidas: son altamente específicos, ya que en general cada miembro de esta familia infecta a una sola especie de insecto; producen una enfermedad mortal en el mismo y son capaces de persistir en el ambiente fuera de su hospedador. Si bien los baculovirus han sido utilizados desde hace décadas como controladores de diversas plagas, sólo en contadas ocasiones han sido capaces de competir comercialmente con los insecticidas químicos. En este sentido, los insecticidas químicos cuentan con la ventaja de combatir diversas plagas simultáneas de forma rápida; sin embargo pueden ser tóxicos para organismos benéficos y riesgosos para la salud humana. Por el contrario, los baculovirus exhiben un nivel de seguridad más elevado: en la gran mayoría de los casos sólo atacan a una especie blanco, siendo inocuos para los demás organismos (Cory & Hails 1997). Esta característica, sin embargo, puede ser una limitación cuando se encuentra más de una plaga de manera simultánea en un cultivo. Es por esto que uno los

desafíos en la generación de baculovirus recombinantes es introducir modificaciones que, por un lado, amplíen el rango de huésped del virus hacia otras especies plaga, y por otro, mejoren su velocidad de acción.

Los baculovirus (*Baculoviridae*) producen dos fenotipos durante el curso de la infección: virus brotantes (BV: *Budded Virus*) en etapas tempranas y cuerpos de oclusión (OB: *Occlusion Body*) en etapas muy tardías. En base a la morfología de estos cuerpos de oclusión y otras características de su forma de infección, inicialmente, los baculovirus se clasificaron en los géneros *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) y *Granulovirus* (GVs). Más recientemente, se reclasificaron en 4 géneros que reflejan además la clasificación de sus insectos hospedadores: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* y *Delta-baculovirus*. De esta manera, el género *Betabaculovirus* comprende a los GVs que infectan a lepidópteros, mientras que los otros géneros comprenden a los NPVs (Herniou *et al.* 2011).

*Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) es un lepidóptero noctuido nativo de América. En Argentina, se encuentra en el Norte, la Mesopotamia y la región Pampeana, en coincidencia con la mayor área sembrada de soja, su planta predilecta. Además, puede encontrarse en maní, alfalfa, poroto y otras plantas diferentes a leguminosas que incluyen algodón, trigo, lino y algunas hortalizas. Esta plaga es infectada por un nucleopoliedrovirus (AgMNPV), el cual ha sido ampliamente utilizado como bioinsectida en Brasil y Paraguay (Moscardi 1999; Moscardi & Sosa Gómez 2007). El “barrenador de los brotes” *Crocidocema* (= *Epinotia*) *aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) es una plaga importante de cultivos tales como soja, poroto, arveja, haba, lino y algodón (Urretabizkaya *et al.* 2010). En la actualidad, se utilizan para su control insecticidas químicos de amplio espectro y alta toxicidad.

Los estudios realizados sobre la dinámica poblacional de *E. aporema* en cultivos de soja en Argentina permitieron identificar posibles enemigos naturales candidatos para el control biológico de esta plaga. Se detectó un granulovirus con alta incidencia en la mortalidad de larvas de *E. aporema* (Diaz & Diez 1989), que se caracterizó a nivel biológico, bioquímico y morfológico y se denominó EpapGV (Sciocco-Cap *et al.* 2001; Goldberg *et al.* 2002). En particular, se verificó que EpapGV es un virus poliorganotrópico y de acción relativamente rápida, características que lo convierten en un muy buen candidato para el control biológico del barrenador de brotes.

## OBJETIVO GENERAL

Prospección y análisis funcional de genes virales relevantes en la interacción de insectos-plaga de importancia agronómica con baculovirus autóctonos, y generación de nuevas herramientas aplicables al mejoramiento de la eficiencia de producción y a la sustentabilidad de uso de bioinsecticidas baculovirales en programas de manejo de plagas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

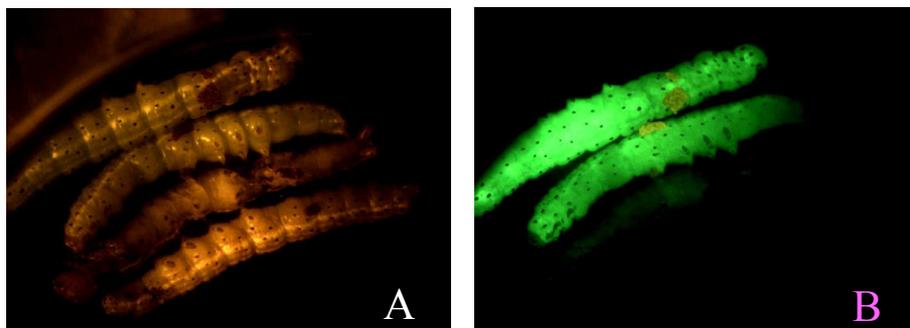
- A) Construcción de virus recombinantes (rAgMNPVs) con capacidad bioinsecticida mejorada.
- B) Análisis de la secuencia completa del genoma de EpapGV y anotación de genes.
- C) Evaluación de la funcionalidad y potencial de utilización de genes de EpapGV seleccionados (gp37, chiA), en el mejoramiento de la capacidad insecticida de baculovirus heterólogos.
- D) Evaluación de la actividad de promotores de genes de EpapGV en entornos celulares heterólogos provenientes de organismos no susceptibles a este virus.
- E) Desarrollo de líneas celulares recombinantes para el estudio de la complementación funcional de genes de baculovirus.

## RESULTADOS

### A. Construcción de virus recombinantes (rAgMNPVs) con capacidad bioinsecticida incrementada

Al momento de iniciar nuestros estudios se disponía de muy poca información acerca de la estructura y funciones del genoma de AgMNPV. En base al mapa físico del genoma circular de aproximadamente 133 kpb de longitud de una cepa de AgMNPV (Johnson & Maruniak 1989) y la secuencia del gen de la poliedrina (Zanotto *et al.* 1992) nuestro grupo de trabajo inició el desarrollo de un sistema para la construcción de virus recombinantes. Luego de clonar y secuenciar el gen de la poliedrina (*polh*) de AgMNPV y sus regiones flanqueantes se construyeron vectores de transferencia para la recombinación homóloga con el locus *polh*. Estos primeros plásmidos de transferencia se utilizaron en este laboratorio para interrumpir el gen *polh*. Mediante mutagénesis dirigida por recombinación homóloga, se generó un virus AgMNPV en el gen de poliedrina se encuentra remplazado por el gen de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (rAgMNPV *polh*-/*lacZ*+). Los resultados de la infección de la línea celular derivada de *A. gemmatalis* UFL-AG 286 con este recombinante mostraron que el gen clonado se expresa a muy altos niveles y que el producto posee la actividad enzimática adecuada (Arana *et al.* 2001). Una vez confirmada su estabilidad genética, este virus fue utilizado como parental en las ulteriores construcciones. Con el fin de incrementar la eficiencia en la recuperación de recombinantes, se diseñó una estrategia que consiste en la utilización de DNA viral linealizado en los experimentos de cotransfección. De esta manera, la única posibilidad de producir progenie viral es la recircularización del DNA viral mediante la recombinación con el plásmido de transferencia (McCarthy 2005). Para ello, se incorporaron sitios de restricción únicos para la endonucleasa I-*Ppo*I en el genoma de AgMNPV. Utilizando este sistema, se generaron rAgMNPV recombinantes que expresan diversos genes de interés. En particular, se generó un

recombinante que expresa una neurotoxina específica para insectos del ácaro *Pyemotes tritici* (TxpI). Este recombinante fue caracterizado genótipicamente y se verificó su actividad biológica, detectando una disminución considerable en el tiempo letal medio respecto al virus salvaje. Más recientemente, se construyeron vectores de transferencia de nueva generación que permiten obtener en forma eficiente rAgMNPV (*polh+*) infectivos por vía oral (Fig. 1).



**Fig. 1. AgMNPV recombinantes:** larvas de *Anticarsia gemmatalis* infectadas *per os* con AgMNPV-GFP (recombinante que expresa la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria*) y con el virus silvestre. A) iluminación con luz visible tenue; B) iluminación con luz ultravioleta.

## **B. Análisis de la secuencia completa del genoma de EpapGV y anotación de genes**

Los estudios preliminares de EpapGV condujeron a la clasificación de este virus como un granulovirus de tipo 2, ya que presenta una infección poliorganotrópica, una excelente característica para considerar su uso como bioinsecticida para el control de la plaga *E. aporema* (Sciocco-Cap *et al.* 2001; Goldberg *et al.* 2002). Posteriormente, se realizaron estudios genómicos, obteniendo un mapa físico que permitió estimar el tamaño del genoma de EpapGV en 120.000 pares de bases, se obtuvo la secuencia parcial de 27 genes que se ubicaron en el mapa de restricción (Parola *et al.* 2002) y se caracterizaron los genes *egt* (ecdisona glicosil transferasa) (Manzan *et al.* 2002), el gen de la proteína mayoritaria de los cuerpos de inclusión, granulina (Parola *et al.* 2003), y el gen *gp37* (Salvador *et al.* 2012). Posteriormente, se secuenció y caracterizó su genoma completo (Ferrelli *et al.* 2012). Mediante estudios bioinformáticos se detectaron 133 genes candidatos correspondientes a marcos de lectura abiertos (ORFs: *Open Reading Frames*) de más de 50 codones. Entre ellos se detectó un gen codificante para la enzima timidilato kinasa (TMPK), sin precedentes en la familia Baculoviridae. Además, se estableció mediante un análisis filogenético que EpapGV es el granulovirus más primitivo de todos los secuenciados completamente. Posteriormente, se abordó la caracterización de la enzima

TMPK, que podría afectar el metabolismo de nucleótidos en la célula infectada, aunque su rol en replicación del DNA viral no se conoce.

### **C. Evaluación de la funcionalidad y potencial de utilización de genes de EpapGV seleccionados (gp37, chiA.), en el mejoramiento de la capacidad insecticida de baculovirus**

El gen *gp37* de EpapGV codifica una proteína con dominios de unión a quitina que podría facilitar el pasaje de los viriones a través de la membrana peritrófica. Esta última, se compone de una matriz quitinosa que recubre el epitelio intestinal en el cual se inicia el proceso de infección. Una proteína homóloga de entomopoxvirus, denominada fusolina, forma cristales que son capaces de cumplir esta función en los insectos hospedadores.

Se caracterizó la proteína *gp37* de EpapGV y se comprobó que es una proteína glicosilada, muy relacionada con su homóloga de entomopoxvirus ya que es reconocida por anticuerpos anti-fusolina. Además, el análisis filogenético reveló que las *gp37* presentes en GVs están más relacionadas con aquellas de entomopoxvirus que con sus homólogas de NPVs sugiriendo posibles eventos de transferencia horizontal entre estas familias de virus entomopatógenos (Salvador *et al.* 2012).

La quitinasa, codificada en el genoma de EpapGV y otros baculovirus, participa junto con la proteasa viral catepsina en el proceso de licuefacción de la larva al final de la infección, permitiendo la liberación de cuerpos de oclusión al ambiente. Se construyó un recombinante de AcMNPV que expresa la quitinasa de EpapGV bajo el control del promotor de poliedrina y se detectó en OBs por western blot. Se observó que estos OBs alteran la membrana peritrófica de larvas de *Anticarsia gemmatalis* evidenciando su potencial uso como intensificador de la actividad bioinsecticida.

La inclusión de este tipo de genes (*gp37* y quitinasa) en virus que no los contengan en su genoma podría contribuir a su mejoramiento como agentes de biocontrol. Alternativamente, estas proteínas purificadas podrían incluirse en formulaciones de baculovirus con el mismo fin.

### **D. Evaluación de la actividad de promotores de genes de EpapGV en entornos celulares heterólogos provenientes de organismos no susceptibles a este virus**

La modificación del rango de hospedadores de un baculovirus constituye un objetivo importante para la adaptación de los baculovirus al tratamiento de cultivos con múltiples plagas simultáneas. Uno de los abordajes para conseguir en esta dirección apunta a la generación de baculovirus recombinantes que contengan genes de virus relacionados, seguidos por el análisis de la infectividad de estos recombinantes en hospedadores poco susceptibles. Sin embargo, aún no se ha llevado a cabo un estudio extendido acerca del reconocimiento de los elementos promotores en entornos heterólogos. En nuestro laboratorio se ha estudiado la transactivación transcripcional de promotores entre AgMNPV y

EpapGV y se ha demostrado que los promotores de EpapGV de diferentes fases de la transcripción son activados por los factores transcripcionales de AgMNPV.

### **E. Desarrollo de líneas celulares recombinantes para el estudio de la complementación funcional de genes de baculovirus**

Los estudios de complementación concentrados en gen que codifica la proteína mayoritaria de los cuerpos de oclusión de los nucleopoliedrovirus (poliedrina), no han logrado aún establecer con claridad si un gen de poliedrina heterólogo puede restituir completamente el fenotipo de un virus deficiente en este gen (Eason *et al.* 1998; Zhou *et al.* 1998). Para abordar esta hipótesis, se analizó la complementación de la poliedrina entre los baculovirus AgMNPV y AcMNPV (nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*) a través de la generación de líneas celulares derivadas de insecto que expresan la poliedrina de estos virus.

Se desarrollaron líneas celulares derivadas de la línea celular comercial High Five™, que expresan la poliedrina de AcMNPV y de AgMNPV. Estas líneas celulares se infectaron con virus AgMNPV y AcMNPV deficientes en el gen de la poliedrina (*polh-*) y se observó la expresión de poliedrina heteróloga y la formación de cuerpos de oclusión heterólogos. Finalmente, se evaluó la capacidad infectiva por vía oral de los cuerpos de oclusión heterólogos.

## **PERSPECTIVAS**

Se ha desarrollado un sistema de recombinación para la generación de AgMNPV recombinantes y se han generado baculovirus que expresan genes para el mejoramiento de los parámetros bioinsecticidas. Estos virus recombinantes están siendo evaluados para mediante la aplicación en ensayos experimentales y se espera que puedan ser integrados al mercado en el futuro. Por otra parte, se ha abordado la caracterización del granulovirus EpapGV y se ha evaluado su aplicación a campo. Se ha generado un cuerpo de conocimientos importante acerca de este virus y los resultados obtenidos demuestran que es un buen candidato para el control biológico de *Epinotia aporema*. La evaluación de los genes quitinasa y gp37 de este granulovirus sugiere que pueden ser utilizados como incrementadores de la eficiencia biológica de otros baculovirus. A su vez, se ha iniciado el estudio del gen de la enzima timidilato kinasa y se evaluará su influencia en el metabolismo celular y en la eficiencia de replicación del virus.

La evaluación de la transactivación transcripcional entre baculovirus indica que los promotores heterólogos pueden ser reconocidos. Este resultado genera posibilidades para la generación de baculovirus quiméricos conteniendo secuencias genómicas heterólogas de varios genes.

Finalmente, se han desarrollado líneas celulares transgénicas y haciendo uso de ellas se ha demostrado la complementación funcional de la poliedrina entre AcMNPV y AgMNPV. Este resultado demuestra que este tipo de

experimento puede ser una alternativa muy conveniente para abordar estudios de genes y elementos regulatorios de baculovirus.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de las siguientes instituciones que contribuyeron económicamente a la financiación de proyectos específicos, a la provisión de infraestructura, y al sostén de becarios e investigadores: CONICET, INTA, UNLP, MINCyT (ANPCyT, FONCyT), British Council, CABBIO. También se reconoce la colaboración de P. D. Ghiringhelli, A. V. Goldberg-Cavalleri, M. F. Berretta, M. E. Biedma, E. I. Arana, C. B. McCarthy, M. A. Manzán, A. D. Parola, M. G. López, O. Taboga.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arana E.I., C.G. Albarino, D. O'Reilly, P.D. Ghiringhelli & V. Romanowski.** 2001. Generation of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus expressing a foreign gene under the control of a very late promoter. *Virus Genes* 22: 363-372.
- Black B.C., L.A. Brennan, P.M. Dierks & I.E. Gard.** 1997. Commercialization of baculoviral insecticides. En: Miller L. (Ed.). *The baculoviruses*. Plenum Press, NY. Pp.: 341-387.
- Copping L.G. & J.J. Menn.** 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag. Sci.* 56: 651-676.
- Cory J.S. & R.S. Hails.** 1997. The ecology and biosafety of baculoviruses. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 323-327.
- Diaz B. & S. Diez.** 1989. Presencia de un virus de la granulosis en larvas de *Epinotia aporema* (Wals.), en cultivos de soja. En: IV Conferencia Mundial de Investigación en soja, vol. III, pp.: 1588-1592. Buenos Aires.
- Eason J.E., R.H. Hice, J.J. Johnson & B.A. Federici.** 1998. Effects of substituting granulin or a granulin-polyhedrin chimera for polyhedrin on virion occlusion and polyhedral morphology in *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 72: 6237-6243.
- Ferrelli M.L., R. Salvador, M.E. Biedma, M.F. Berretta et al.** 2012. Genome of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV), a polyorganotropic fast killing betabaculovirus with a novel thymidylate kinase gene. *BMC Genomics* 13: 548.
- Goldberg A.V., V. Romanowski, B.A. Federici & A. Sciocco de Cap.** 2002. Effects of the Epap granulovirus on its host, *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Invertebr. Pathol.* 80: 148-159.
- Herniou E.A., B.M. Arif, J.J. Becnel, G.W. Blissard et al.** 2011. Baculoviridae. En: King, A., M. Adams, E. Carstens & E. Lefkowitz (Eds.). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: 9<sup>th</sup> Report of the Internat. Comm. Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego. Pp.: 163-173.
- Johnson D.W. & J.E. Maruniak.** 1989. Physical Map of *Anticarsia gemmatalis* Nuclear Polyhedrosis Virus (AgMNPV-2) DNA. *J. Gen. Virol.* 70: 1877-1883.
- Manzan M.A., M.E. Lozano, A. Sciocco-Cap, P.D. Ghiringhelli & V. Romanowski.** 2002. Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-glycosyltransferase gene of *Epinotia aporema* granulovirus. *Virus Genes* 24: 119-130.
- McCarthy C.B.** 2005. Generación de recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). Tesis doctoral. UNLP, La Plata, Argentina..
- Moscardi F.** 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289.

- Moscardi F. & D. Sosa Gómez.** 2007. Microbial control of insect pest of soybean. En: Lacey L.A. & H.K. Kaya (Eds.). Field Manual of Techniques in Insect Pathology. Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp.: 411-426.
- Parola A.D., A. Sciocco-Cap, G. Glikmann & V. Romanowski.** 2003. An immunochemical method for quantitation of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV). J. Virol. Meth. 112: 13-21.
- Parola A.D., M.A. Manzan, M.E. Lozano, P.D. Ghiringhelli et al.** 2002. Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. Virus Genes 25: 329-341.
- Salvador R., M.L. Ferrelli, M. Berretta, W. Mitsuhashi et al.** 2012. Analysis of EpapGV gp37 gene reveals a close relationship between granulovirus and entomopoxvirus. Virus Genes 45: 610-613.
- Sciocco-Cap A., A.D. Parola, A.V. Goldberg, P.D. Ghiringhelli & V. Romanowski.** 2001. Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3702-3706.
- Urretabizkaya N., N. Vasicek & E. Saini.** (Eds.). 2010. Insectos perjudiciales de importancia agronómica. I. Lepidópteros. INTA – UNLZ - UNLP.
- Vail P.V., D.L. Hostetter & D.F. Hoffmann.** 1999. Development of the Multi-nucleocapsid Nucleopolyhedroviruses (MNPVs) Infectious to Loopers (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) as Microbial Control Agents. Integ. Pest Manag. Rev. 4: 231-257.
- Zanotto P.M., M.J. Sampaio, D.W. Johnson, T.L. Rocha & J.E. Maruniak.** 1992. The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. J. Gen. Virol. 73: 1049-1056.
- Zhou C.E., R. Ko & S. Maeda.** 1998. Polyhedron-like inclusion body formation by a mutant nucleopolyhedrovirus expressing the granulin gene from a granulovirus. Virology 240: 282-294.