

PATOLOGIA DA POLIEDROSE NUCLEAR DO CURUQUERÊ DO ALGODÃO
Alabama argillacea (HUBNER, 1818) (LEP., NOCTUIDAE)

C.F.S. Andrade ¹
M.E.M. Habib ¹

INTRODUÇÃO

Dentro do contexto da cultura do algodão no Brasil, o curuquerê, *Alabama argillacea* (Hübner, 1818), foi sempre considerado uma praga secundária. No entanto, é conhecida como ameaça aos algodoeiros do novo mundo desde o começo do século (HUNTER, 1912). Com o estabelecimento de programas de manejo integrado de pragas do algodão, abandonando-se o controle exclusivamente químico, HÁBIB (1976; 1977) previu que o curuquerê deverá tornar-se uma das pragas chaves dessa cultura.

O potencial das viroses, principalmente a causada pelo vírus da Poliedrose Nuclear (VPN), tem sido amplamente revisto, no sentido da sua utilização em programas de controle (STAIRS, 1974; DAVID, 1975; SUMMERS *et alii*, 1975; TINSLEY & HARRAP, 1978; TINSLEY, 1979; BURGESS, 1981). Aspectos da sintomatologia, histopatologia e morfologia viral, que compõem estudos básicos para qualquer tentativa de utilização dessas viroses, foram abordados por vários autores (VAIL & HALL, 1969; HARRAP, 1970; LEWIS *et alii*, 1977; HUGHES, 1972, 1977; GARCIA *et alii*, 1983).

No Brasil, o VPN de *A. argillacea* foi pela primeira vez detectado, em 1977 na região de Campinas (ANDRADE &

¹ Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.

HABIB, 1982). Visando sua possível participação em programas de controle, os mesmos autores avaliaram a ocorrência natural e os fatores bióticos relacionados com a dispersão da doença (ANDRADE, 1981; ANDRADE & HABIB, 1981) e aspectos fisiopatológicos (ANDRADE et alii, 1982) em larvas infectadas pelo VPN também foram estudados.

O presente trabalho teve por objetivo descrever e estabelecer uma seqüência cronológica dos sintomas externos e efeitos histopatológicos nas larvas de *A. argillacea* infectadas pelo VPN. Análise morfométrica dos poliedros e partículas foi ainda objetivada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Larvas de *A. argillacea*, no início do 6º estágio, provenientes do campo, foram infectadas por via oral com 1,5 a 2,0 µl de suspensão purificada de poliedros (10^9 cip/ml) de acordo com ANDRADE (1981). Vinte e cinco das larvas que sorveram toda a dose, foram mantidas individualmente em placas de petri, com folhas de algodão, para os estudos de sintomatologia externa e histopatologia. Foram adotados os critérios de STEINHAUS (1963) para a descrição dos sintomas patológicos.

Tanto para a microscopia eletrônica quanto a óptica, seguiu-se as técnicas de fixação, inclusão e microtomia adaptadas de SJUSTRAND (1967) e HAYAT (1972).

Larvas doentes foram dissecadas em solução isotônica, tamponada com cacodilato 0,4 M, pH 7,0. Partes dos diversos tecidos foram removidas e imediatamente colocadas em solução fixadora de glutaraldeído (4%) à 4º e acroleína, por 2 horas. O material foi em seguida mantido 24 horas em solução de glutaraldeído (4%) e 24 horas em solução isotônica de lavagem, para depois ser fixado em solução de tetróxido de ôsmio (1%). Para a inclusão em resina Epon e Araldite (MOLLENHAUER, 1964), se-

guiu-se a desidratação em bateria de álcool etílico e baⁿho em misturas de óxido de propileno e Epon (3:1, 1:1 e 1:3). A resina foi polimerizada a 60°C por 2 dias.

Cortes histológicos finos para a microscopia óptica e ultrafinos para a eletrônica foram obtidos em ultra^umicrôtomos Sorvall MT-2, Porter-Blum. Para a microscopia óptica, o material foi tratado 5 minutos com ácido periódico a 1% e corado a quente com azul de toluidina. Cortes ultrafinos foram tratados com acetato de uranila a 2% (mais de 15 min.) e citrato de chumbo 0,2%; observados e eletrografados em microscópio eletrônico Zeiss M9-S2.

A análise morfométrica dos poliedros e partículas baseou-se em micrografias de preparações purificadas; gotas da suspensão do vírus foram colocadas em grades de cobre (150 e 400 malhas/pol²) previamente cobertas por película de parlódio (sol. a 2% em acetato de amila) e diretamente vaporizadas com carvão. A contrastação foi feita com ácido fosfotungstênico a 2% ou acetato de uranila a 2% (NORDAM, 1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sintomatologia externa

Larvas de 6º estágio de *A. argillacea*, quando sujeitas a alta dose de VPN apresentaram no laboratório, sintomas semelhantes aos observados no campo, com mortalidade em menos de 4 dias. O desenvolvimento da doença teve sinais tanto comportamentais quanto morfológicos. As três fases principais bastante evidentes, pré-mortal, mortal e pós-mortal, puderam ainda ser subdivididas quando melhor caracterizadas (quadro 1). Dependendo das condições particulares de cada caso, o tempo necessário para as diferentes fases ou divisões, variou marcadamente (figura 1).

Os sintomas comportamentais na fase pré-mortal, foram de certa forma sutis, e variaram sob determinadas

QUADRO I - Sequência de sintomas externos observados em larvas de *A. argillacea* atacadas por VPN no laboratório.

Aspectos	Fase pré-mortal		Fase pós-mortal	
	I	III	mortal	II
Deslocamento e movimentação voluntária	lenta, pouco alterada	ausente, so involuntária	ausente, paralisia	-
Alimentação	normal	pouca ou ausente	ausente	-
Reflexo de fuga	lento	mais lento e fraco	ausente	-
Cor	Ventral	pouco ou não alterada	levemente esbranquiçada	creme amarelado
	Dorsal	alterada	pouco ou não alterada	levemente escurecido
Brilho	normal	diminui	ausente	ausente
Consistência do corpo	normal	normal	fiácida	fiácida
Outros sintomas	poliedros nas fazes	poliedros nas fazes	corpo inchado	corpo bastante inchado, pendura-se
			tendência a subir	poliedros livres na hemocele
			tegumento romp-se fácil, forte odor	tegumento romp-se fácil, forte odor
			marrom escuro	marrom escuro
			ausente	ausente
			pastosa	dura e seca
			preto	preto

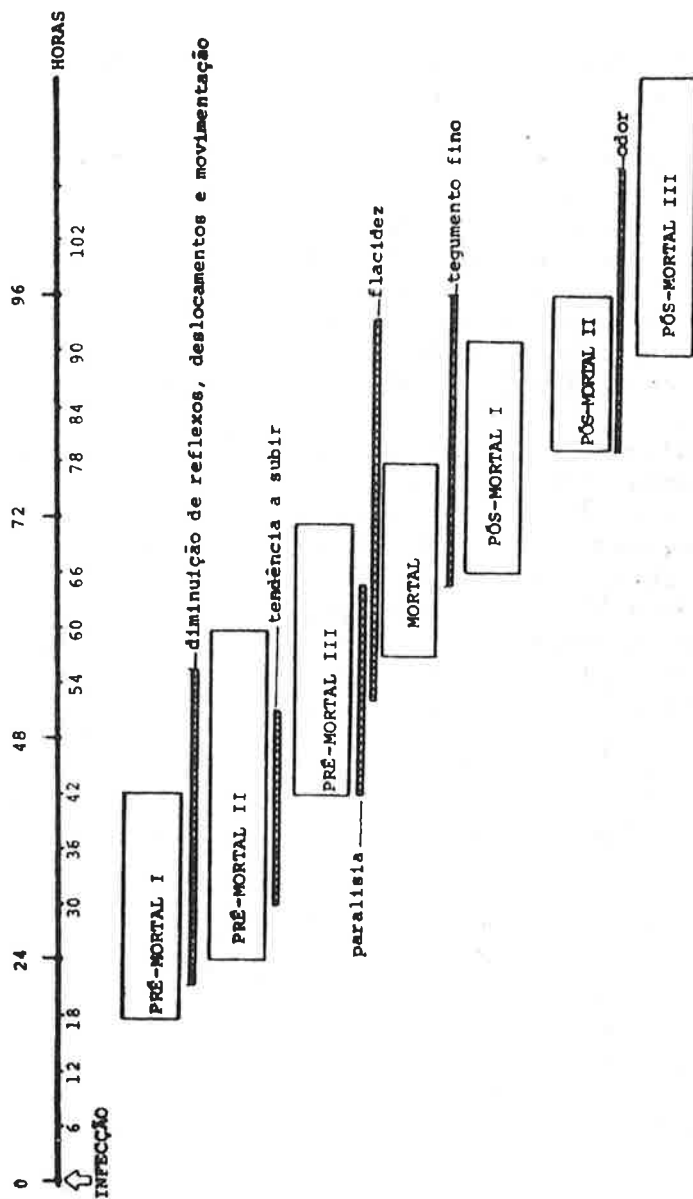


FIGURA 1 - Sequência cronológica de sintomas para larvas de *A. argillacea infecta* das por VPN.

condições, a despeito da própria progressão da doença.

O deslocamento ou movimentação voluntária diminuiu marcadamente na fase pré-mortal I, principalmente se esta era alcançada durante o dia, sob temperaturas mais altas. Por outro lado, podia voltar a ocorrer ou permanecer até o começo da pré-mortal III, durante os períodos de maior atividade, à noite e nas horas menos quentes. A alimentação foi normalmente abandonada entre 24 e 48 horas, variando também um pouco com o período normal de maior atividade das larvas. A parada alimentar foi associada a alterações de ordem neurológica em estudos fisiopatológicos (ANDRADE et alii, 1982).

Deslocamentos rápidos de fuga, ou movimentos bruscos com a cabeça em resposta a estímulo de toque, rarearam entre 36 e 48 horas e desapareceram entre 48 e 60 horas após a infecção. Tal sintoma foi citado precedendo a morte por VPN em *Trichoplusia ni* (DRAKE & McEWEN, 1969). Uma paralisia irreversível antecedeu a morte, podendo durar de poucas horas a meio dia. Num último deslocamento, larvas mantidas em viveiros, subiam pela folhagem e com a perda do tono muscular nas pernas torácicas (pré-mortal III) ficavam penduradas apenas pelas garras das falsas pernas abdominais, formando-se o quadro sintomatológico clássico (figura 2), citado por muitos autores (CHAPMAN & GLASER, 1915; TANADA, 1959; AIZAWA, 1963; De BACH, 1964; SMITH, 1967; VAIL & HALL, 1969).

Flacidez e aumento no volume corporal ocorreram de correntes do avançado estado de infecção e degeneração dos tecidos. Os segmentos do corpo ficaram fortemente marcados, com o tegumento fino e distendido. Entre 78 e 90 horas após a infecção, o corpo rompia-se facilmente, os tecidos encontravam-se indistintos, com consistência pastosa ou até liquefeitos, e um forte odor podia ser percebido.

Quando a morte ocorria no estágio de pré-pupa e pupa, os indivíduos apresentavam características morfológicas de ambos os estágios (figura 3).



FIGURA 2. Aspecto comportamental típico em larva de *Alabama argillacea* infectada pelo VPN.

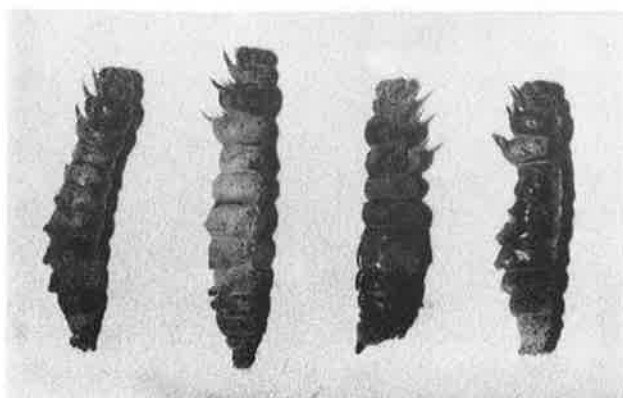


FIGURA 3. Aspectos morfológicos em pré-pupas de *Alabama argillacea* mortas pelo VPN.

Histopatologia

A análise histopatológica nos tecidos da larva de *A. argillacea* afetados direta ou indiretamente pelo VPN, mostrou uma associação direta aos sinais patológicos externos e aos distúrbios fisiológicos (ANDRADE et alii, 1982), detectados nas diferentes fases pré-mortais.

Com o desenvolvimento da virose, o tecido adiposo visceral apresentou uma nítida dissociação estrutural. Na fase pré-mortal I da doença, os núcleos dos gomos adiposos já se apresentaram infectados por poliedros e partículas. Nesses núcleos observou-se inicialmente um acúmulo de poliedros na região periférica do nucleoplasma (quadro IV), circundando restos de cromatina e nucléolo. Com o avanço da infecção, aumentou pouco a quantidade de poliedros que passaram a ocupar quase todo o núcleo promovendo uma visível hipertrofia (figura 4,B).

As massas de tecido adiposo visceral, junto com o adiposo adjacente à epiderme do tegumento, constituem-se no principal centro de reserva energética das larvas. Na fase pré-mortal III esses aglomerados sub-epidérmicos mostraram-se bastante dissociados, com pouca reserva de lipídeos e com os núcleos tomados pelos poliedros. Desintegração total da membrana conectiva e aumento da granulação citoplasmática foram também detectados nesta fase. Pouca cromatina apareceu no nucleoplasma, numa situação semelhante à encontrada para o tecido adiposo visceral na fase pré-mortal II. Tal comparação sugere que a infecção nas células adiposas sub-epidérmicas seja posterior ou mais lenta que a infecção nas massas adiposas viscerais.

As alterações histopatológicas descritas para o tecido adiposo, seja visceral ou sub-epidérmico, são parcialmente responsáveis pelas alterações no brilho e coloração do tegumento e flacidez do corpo. A figura 4,C revela algumas alterações citológicas, a nível de microscopia eletrônica, mostrando feixes de partículas replicadas, poliedros estruturando-se e estroma viral nos núcleos deste tecido.

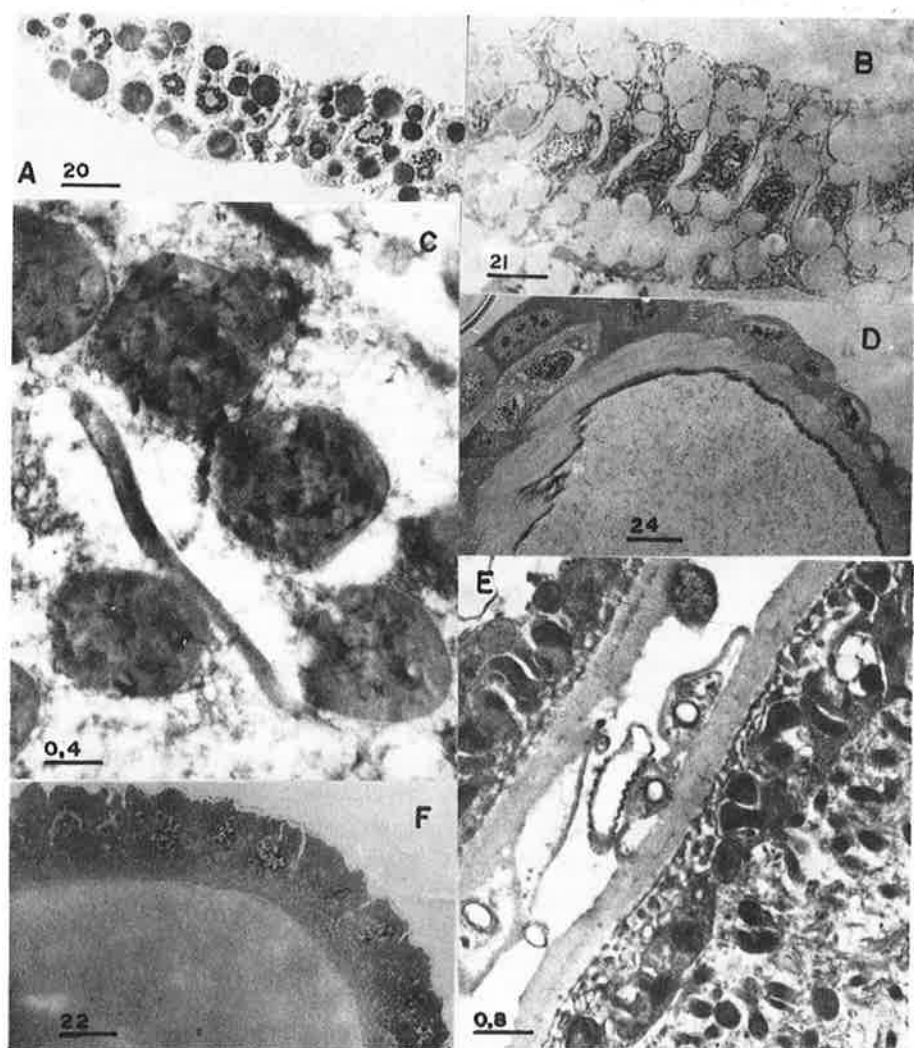


FIGURA 4 - Histopatologia em larvas de 6º estágio de *Alabama argillacea*, infectadas pelo VPV. Tecido adiposo visceral, fase pré-mortal I, (A) e II, (B e C). Matriz traqueal na fase pré-mortal I, (D). Degradação no túbulo de Malpighi (E) e glândula labial (F) na fase pré-mortal III da virose. Escala em μm .

O epitélio das traquéias já se mostrou infectado por poliedros na fase pré-mortal I (figura 4,D). Tanto as traquéias maiores, dissociadas dos tecidos, quanto as menores, mais ramificadas e associadas, apresentaram hipertrofia nuclear e citoplasma granuloso. Embora BIRD (1949) tenha indicado as traquéias ao redor do tubo digestivo como primeiro sítio do processo de infecção, ao mesmo tempo nessa fase as mesmas não mostraram alterações diferentes das encontradas nas traquéias associadas aos outros tecidos.

Nas fases pré-mortais II e III, respectivamente, os núcleos do epitélio adjacente às traquéias mostraram-se repletos de poliedros virais e completamente destruídos. Este tecido quando comparado com o adiposo, indicou uma infecção cronologicamente posterior, situação semelhante à encontrada por DRAKE & McEWEN (1959).

O epitélio dos túbulos de Malpighi apareceu infectado no início da virose e perdeu sua estrutura logo na fase pré-mortal I, apresentando desarranjo celular nítido. Núcleos e restos celulares foram encontrados aderidos à membrana peritoneal ou livres na luz do túbulo. Nas fases pré-mortais II e III, o epitélio mostrou-se mais fino, com poucos núcleos e bastante estriado, ainda aderido à membrana peritoneal aparentemente intacta (figura 4,E). Notou-se ainda na fase III, na luz do túbulo, cristais de oxalato de cálcio, evidenciando o comprometimento funcional deste órgão.

As glândulas labiais apresentaram alterações apenas na fase pré-mortal III da virose. Nas primeiras fases entretanto o citoplasma mantinha-se ainda denso e os núcleos pouco hipertrofiados. Na fase pré-mortal III, os núcleos encontravam-se hipertrofiados, com poucos poliedros e granulações no nucleoplasma. O citoplasma bem menos denso apresentou grande vacuolização na região periférica e descontinuidade das membranas celulares (figura 4,F).

Na fase pré-mortal I não foram detectados sinais patológicos nos gânglios nervosos. No entanto, na fase

II foi notado grande número de partículas virais e elementos fibrilares nos núcleos das células nervosas larvais (figura 5,A). Na fase posterior, os núcleos dessas células próximos à neurôpila, encontravam-se tomados pelos poliedros (figura 5,B). Alguns autores também têm demonstrado a infecção pelo VPN no sistema nervoso de outros hospedeiros (MATHAD et alii, 1968). A infecção tardia neste tecido, explicaria a razão do efeito fatal lento do VPN quando comparado com outras viroses de insetos como a paralisia aguda das abelhas, onde a pronta infecção dos gânglios nervosos cerebrais provoca a morte rápida (SMITH, 1967).

As alterações histológicas encontradas no tegumento das larvas de *A. argillacea*, coincidem com as descritas por vários autores para diferentes hospedeiros do VPN (DRAKE & McEWEN, 1959; ADANS et alii, 1968; HAMM, 1968; MATHAD et alii, 1968; VAIL & HALL, 1969; LIVINGSTON & YERIAN, 1972). A infecção foi bastante similar à que ocorreu no tecido adiposo sub-epidêmico com grande número de poliedros nos núcleos já na fase pré-mortal I. Nas fases seguintes este tecido já se encontrou desintegrado, formando junto à cutícula um aglomerado de células repletas de poliedros. A cutícula rompia-se facilmente liberando o conteúdo corporal liquefeito.

Nas células do intestino médio foram observadas partículas virais associadas à região da membrana plasmática basal (fase pré-mortal II) e no citoplasma, próximo ao núcleo (fase III) (figura 5,C). Não foram observados poliedros nos núcleos deste tecido, coincidindo com alguns autores (LIVINGSTON & YERIAN, 1972; MATHAD et alii, 1968; ANDRADE et alii, 1978), que identificamos o intestino médio como primeiro sítio da replicação viral, porém não responsável pela formação de poliedros. Tal situação parece ser a responsável em permitir uma grande replicação do VPN nos outros tecidos, uma vez que o intestino, mantendo-se íntegro, não permitiria a invasão da hemocele por bactérias da luz intestinal, o que acarretaria em rápida septicemia.

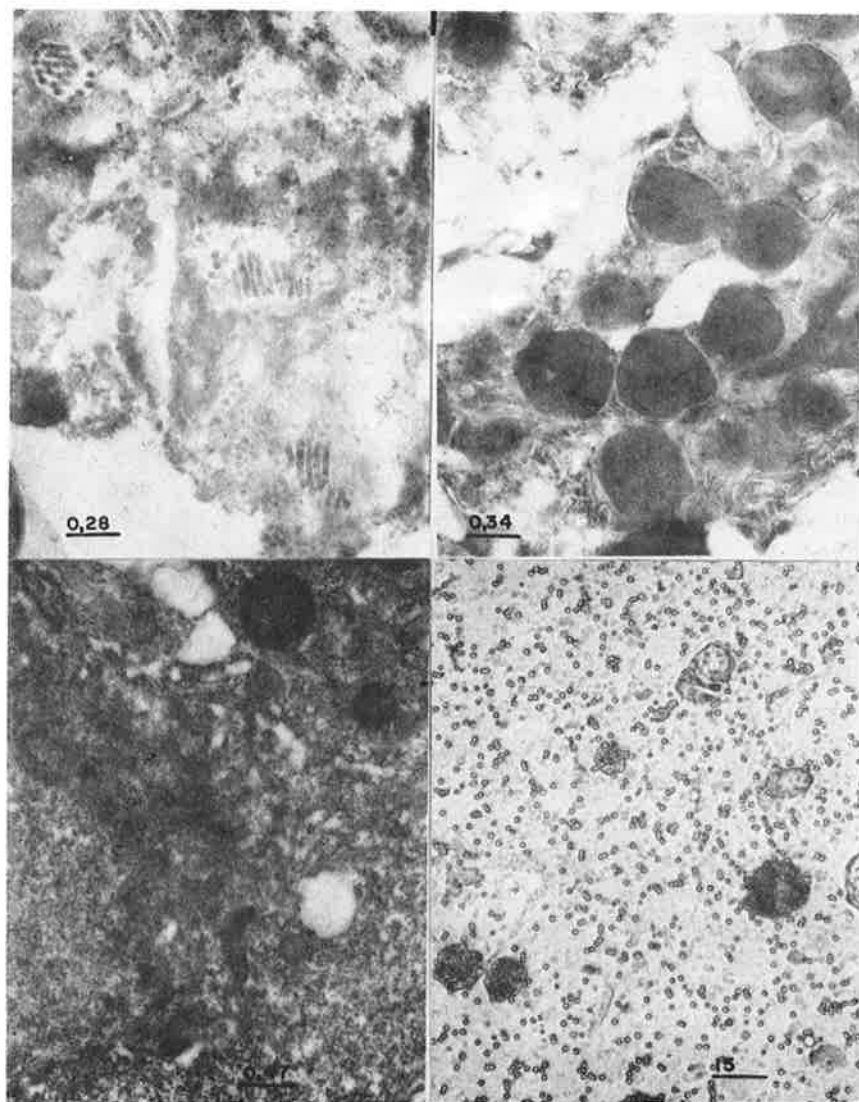


FIGURA 5 - Histopatologia em larvas de 6º estágio de *Alabama argillacea*, infectadas pelo VPN. Nucleocapsídeos e poliedros em células nervosas larvais; fase pré-mortal II, (A) e III (B). Célula epitelial do intestino médio (C) e aspecto geral da hemolinfa, na fase pré-mortal III. Escala em micrômetros.

A análise histológica nos músculos esqueléticos (fase pré-mortal III), indicou perda de alguns pontos de ligação com os apodemas. Os sarcolemas encontraram-se também alterados deixando as fibras dissociadas. Alterações semelhantes também foram observadas para larvas de *Spodoptera frugiperda* atacadas pelo VPN (HAMM, 1968; GARCIA et alii, 1983), sendo responsáveis parcialmente pela flacidez típica anteriormente mencionada. A paralisia geral que normalmente antecedeu a morte, estaria provavelmente mais relacionada à infecção direta no sistema nervoso do que aos efeitos da invasão de conteúdo intestinal alcalino na hemolinfa.

Segundo HABIB (1976), nas larvas sadias de *A. argillacea*, a hemolinfa corresponde em média a 12,3% do peso total, com uma média de 21.723 hemócitos por milímetro cúbico. Nas larvas atacadas pelo VPN, poliedros livres na hemolinfa puderam ser observados, a partir a fase pré-mortal III. No final desta fase todos os hemócitos apresentaram-se com núcleos repletos de poliedros e citoplasma degenerado (figura 5,D). Nessa situação não são mais típicos e não puderam ser classificados. A hemolinfa apresentou-se viscosa, de cor esbranquiçada e com o volume reduzido.

Morfometria de poliedros e partículas

Os vírus causadores da poliedrose nuclear e granulose (*Baculovirus* spp; Baculoviridae) são também identificados e classificados com base na morfologia dos nucleocapsídeos e corpos de inclusão (WILDY, 1971; SUMMERS, 1977). Para os VPNs, imersos na matriz proteica do poliedro, os nucleocapsídeos podem apresentar-se em dois tipos básicos de arranjo; na forma de bastões envolvidos individualmente numa membrana (envelope) ou em grupos, variando de 2 a mais de 39 no mesmo envelope (KAWAMOTO & ASAYAMA, 1975), dependendo da espécie.

No presente trabalho, tanto partículas isoladas quanto em feixes foram detectadas nas purificações. 0

tratamento alcalino, além da dissolução dos poliedros, removeu também a maioria dos envelopes virais (71,2%). Partículas individualmente envelopados constituíram 17,5% e em feixes pequenos (2 a 3 partículas) com envelope parcialmente dissolvido, 11,3% (figura 4, A, B e C).

As partículas virais observadas nos cortes histológicos apresentaram-se também individualmente, em feixes ou vesículas, não imersas em matriz proteica (figura 4, D, E e F). Diversos autores têm atribuído a essas formas a infectividade (TANADA & KEUTENEGGER, 1970; HARRAP, 1970; SUMMERS, 1971; HUNTER et alii, 1975).

Os corpos protéicos de inclusão do VPN de *A. argillacea*, mostraram-se nas preparações purificadas variando quanto ao contorno e tamanho, sendo a forma poliédrica irregular a mais frequente (figura 6, G e H). Nos cortes histológicos apareceram também irregulares, por vezes redondos, menores, e com uma característica distribuição aleatória de partículas no seu interior. A não existência da membrana e o pequeno tamanho desses poliedros sugerem que ainda estivessem em formação.

O quadro II apresenta os valores médios das medidas de poliedros e nucleocapsídeos observados. As medidas de partículas sem envelope, enquadram-se dentro do proposto por BERGOLD (1963) para *Borrelina virus* (= *Baculovirus*) e é considerado até hoje:

RESUMO

Sequência cronológica de sintomas externos e internos, foi descrita para larvas de 6º estágio de *Alabama argillacea*, infectadas com o vírus da Poliedrose Nuclear no laboratório. Estudos histológicos demonstraram nas diferentes fases pré-mortais, presença de poliedros e de partículas bem como efeitos patológicos nos tecidos infectados. Possível sequência no processo de infecção do vírus nos tecidos e replicação foi discutida e associada à sintomatologia.

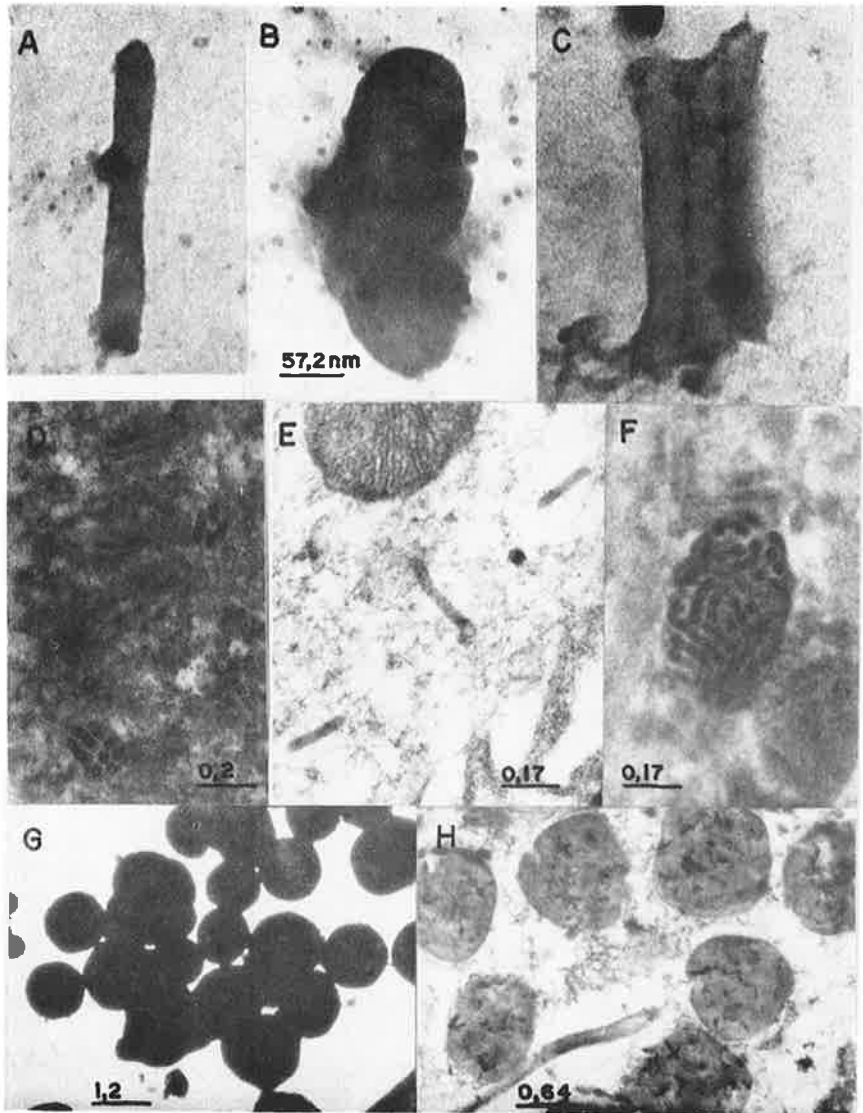


FIGURA 6 - Nucleocapsídeos do VPN de *Alabama argillacea*, isolado e sem envelope, (A): isolado com envelope, (B) e em feixe sem envelope, (C). Em cortes ultrafinos, em feixes no nucleoplasma, (D) isolados no citoplasma, (E) e em vesículas no citoplasma, (F). Poliedros semi-purificados (G), e em cortes histológicos, (H). Escala em μm .

QUADRO II - Diâmetro de 99 poliedros (μm) e diâmetro e comprimento de 50 nucleocapsídeos (μm) do VPB de *A. argillacea*.

Poliedros diam.	Nucleocapsídeos					
	Com envelope			Sem envelope		
	Comp.	Diam.	Comp.	Comp.	Diam.	Diam.
$\bar{X} \pm$	311,35	102,02	297,54 \pm	63,07 \pm		
e.p.	3,05	2,09	2,92	1,78		
max.	368,3	119,1	346,65	97,49		
min.	264,1	83,2	259,85	21,66		

A análise morfométrica de preparações purificadas revelou um diâmetro médio de $1,60 \pm 0,02 \mu\text{m}$ para os corpos de inclusão poliédricos. Para os nucleocapsídeos entretanto, as dimensões variaram de acordo com a presença ou não do envelope.

SUMMARY

PATHOLOGICAL STUDIES ON THE NUCLEAR POLYEDROSIS VIRUSIS OF THE COTTON LEAFWORM *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (LEPIDOPTERA; NOCTUIDAE).

A chronological sequence of external and internal symptoms shown by 6th instar larvae of *Alabama argillacea* infected by NPV were described. Histopathological observations indicated the presence of polyhedrons and viral particles in the infected tissues. Possible sequence of infection and viral replication was discussed and associated with the external and internal alterations.

Morphometrically, the polyhedrons showed an average of $1.60 \pm 0.02 \mu\text{m}$ in diameter. The dimensions of viral particles, however, varied according to the presence or not of the envelope.

LITERATURA CITADA

- AIZAWA, K., 1963. The nature of infections caused by Nuclear Polyhedrosis viruses. Em Steinhaus, E. A. (Ed.), **Insect Pathology, an advanced treatise**, Academic Press, N.Y. and London, 1: 381-412.
- ANDRADE, C.F.S., 1981. **Estudos ecológicos e patológicos da poliedrose nuclear de *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lep.; Noctuidae)**, Tese de Mestrado, UNICAMP, 153p.

- ANDRADE, C.F.S. & M.E.M. HABIB, 1981. Vírus da Poliedrose nuclear de *Alabama argillacea*. Estudos de susceptibilidade. VII Cong. Bras. Entomologia, Resumos p. 150.
- ANDRADE, C.F.S. & M.E.M. HABIB, 1982. Ocorrência e dispersão da poliedrose nuclear do curuquerê do algodão *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lep., Noctuidae). *Rev. Agric.* 57(4): 233-246.
- ANDRADE, C.F.S., J. LAURITIS & M.A. GARCIA, 1978. Ocorrência de poliedrose nuclear em larvas de *Spodoptera frugiperda* (Abbott & Smith, 1797). V Cong. Bras. Entomologia e III Cong. Latinoam. de Entomologia. Resumos, p.26.
- ANDRADE, C.F.S., L.R.G. BRITTO & M.E.M. HABIB, 1982. Aspectos eletrofisiológicos em larvas de *Alabama argillacea* (H., 1818) infectadas pelo vírus da poliedrose nuclear. *Rev. Agric.* 57(4): 247-256.
- BERGOLD, G.H., 1963. Nature of nuclear polyhedrosis viruses. Em Steinhaus, E.A. (Ed.), *Insect Pathology, an advanced treatise*, Academic Press, N.Y. and London, 1: 413-456.
- BIRD, F.T., 1949. The polyhedral disease of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.). *Forest Insect Invest.* (Ottawa) 5: 2-3.
- BURGES, H.D. (Ed.), 1981. *Microbial control of Pests and plant diseases 1970-1980*, Academic Press, N.Y. and London.
- CHAPMAN, J.W. & P.M. GLASER, 1915. A preliminary list of insects which have wilt, with comparative study of their polyhedra. *J. Econ. Entomol.* 8: 140-150.
- DAVID, W.A.L., 1975. The status of viruses pathogenic for insects and mites. *Ann. Rev. Entomol.* 20: 97-117.

- DeBACH, P., 1964. **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**, Comp. Ed. Continental, México, 959p.
- DRAKE, E.L. & F.L. McEWEN, 1959. Pathology of a nuclear polyhedrosis of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Insect Pathol.* 1: 281-293.
- GARCIA, M.A., C.F.S. ANDRADE, J. LAURITIS & M.E.M. HABIB, 1984. Pathogenicity and histopathological studies on the nuclear polyhedrosis virus of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Abbott & Smith, 1797) (Lep. Noctuidae). *Rev. Agric.* no prelo.
- HABIB, M.E.M., 1976. **Estudos biológicos e anatômicos sobre *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lep., Noctuidae)**, Tese de Doutorado, UNICAMP, 108p.
- HABIB, M.E.M., 1977. Contribution to the biology of *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lep., Noctuidae). *Z. ang. Ent.* 84: 412-418.
- HARRAP, K.A., 1970. Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 24: 311-318.
- HAYAT, M.A., 1972. **Basic Electron Microscopy Techniques**, N. Reinhold Comp., N.Y., 119p.
- HUGHES, K.M., 1972. Fine structure and development of two polyhedrosis viruses. *J. Invert. Pathol.* 19: 198-207.
- HUGHES, K.M., 1977. Observations on the morphology of a nuclear polyhedrosis virus from six forest insects. *Can. Ent.* 109: 759-762.
- HUNTER, W.D., 1912. The outbreak of *Alabama argillacea* in 1911. *J. Econ. Entomol.* 5: 123-131.
- HUNTER, D.K., D.F. HOFFMAN & S.J. COLLIER, 1975. Observations on a granulosis virus of the potato tuberworm, *Phytophthora operculella*. *J. Invert. Pathol.* 26: 397-400.

- KAWAMOTO, F. & T. ASAYAMA, 1975. Studies on the arrangement patterns on nucleocapsids within the envelopes of nuclear polyhedrosis virus in the fat-body cells of brown tail moth, *Euproctis similis*. **J. Invert. Pathol.** 26: 47-55.
- LEWIS, L.C., R.E. LYNCH & J.J. JACKSON, 1977. Pathology of a *Baculovirus* of the alfalfa looper *Autographa californica* in the european corn borer *Ostrinia nubilalis*. **Environ. Entomol.** 6(4): 535-538.
- LIVINGSTON, J.M. & W.C. YERIAN, 1972. A nuclear polyhedrosis virus of *Pseudoplusia includens* (Lep., Noctuidae). **J. Invert. Pathol.** 19: 107-112.
- MATHAD, S.B., C.M. SPLITTSTOESSER & F.L. McEWEN, 1968. Histopathology of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* infected with NPV. **J. Invert. Pathol.** 11: 456-464.
- MOLLENHAUER, H.H., 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. **Stain Technol.** 39: 113-114.
- NOORDAM, D., 1973. **Identification of plant viruses. Methods & experiments**, Pudoc. Centre. Agric. Publish Docu., Wageningen, 75p.
- SJÖSTRAND, F.S., 1967. **Electron microscopy of cells and tissues**, Academic Press, N.Y. and London, V. 1, 462p.
- SMITH, K.M.; 1967. **Insect Virology**, Academic Press, N. Y. and London, 250p.
- STAIRS, G.R., 1974. Use of viruses for microbial control of insects. Em Burges, H.D. & N.W. Hussey (Eds.), **Microbial control of insects and mites**, Academic Press, N.Y. and London, 97-124.

- STEINHAUS, E.A., 1963. **Insect Pathology: an advanced treatise.** Academic Press, N.Y. and London, V. I e V. II.
- SUMMERS, M.D., 1971. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut-cells of *Trichoplusia ni*. **J. Ultrastruct. Res.** 35: 606-625.
- SUMMERS, M.D., R. ENGLER, L. FALCON & P. VAIL, 1975. **Baculoviruses for insect pest control: safety considerations,** Washington, DC, Am. Soc. Microbiol.
- SUMMERS, M.D., 1977. Baculoviruses (Baculoviridae). Em Maramorosch, K. (Ed.), **The atlas of insect and plant viruses,** Ultrastructure in Biological Systems, Academic Press, N.Y. and London, V. VIII: 3-28.
- TANADA, Y., 1959. Microbial control of insect pest. **Ann. Rev. Ent.** 4: 277-302.
- TANADA, Y. & R. LEUTENEGGER, 1970. Multiplication of a granulosis virus in larval midgut cells of *Trichoplusia ni* and possible pathways of invasion into the hemocoel. **J. Ultrastruct. Res.** 30: 589-600.
- TINSLEY, T.W., 1979. The potential of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. **Ann. Rev. Entomol,** 24: 63-87.
- TINSLEY, T.W. & K.A. HARRAP, 1978. Viruses of invertebrates. Em Fraenkel-Conrat, H. & R.R. Wagner (Eds.), **Comprehensive Virology,** 12: 1-99, Plenum Press, N.Y.
- VAIL, P.V. & I.M. HALL, 1969. The histology of a nuclear polyhedrosis in larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, related to symptoms and mortality, **J. Invert. Pathol.** 13: 188-198.

WILDY, P., 1971. Classification and nomenclature of viruses. **Monographs in Virology** 5: 81p.