

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

ESTUDOS ECOLÓGICOS E PATOLÓGICOS DA POLIEDROSE NUCLEAR DE

Alabama argillacea (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA; NOCTUIDAE)

CARLOS FERNANDO SALGUEIROSA DE ANDRADE

Tese apresentada à Universidade
Estadual de Campinas, para a
obtenção do grau de MESTRE em
BIOLOGIA (ECOLOGIA)

Orientador

Professor Doutor

Mohamed E.M. Habib

CAMPINAS

1981

An24e

4009/BC



AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PRE-
ÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Dia 3 de Julho de 1981

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

assinatura do aluno

12 / 0041981

assinatura do aluno

Orientador

À MARIANA , também deste ano ,

dedico

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho se deve à contribuição desinteressada de muitas pessoas. A não citação nominal de todas essas pessoas nesses agradecimentos é falta imperdoável, porém não significa de forma alguma o esquecimento das colaborações prestadas. A todos, os nossos mais sinceros agradecimentos,

Ao Prof.Dr. Mohamed E.M. Habib, sob cuja orientação sãbia e segura, foi realizada esta tese. Pelo apoio, assistência e grande amizade durante todas as fases deste trabalho,

Ao Prof.Dr. Paulo F. Bührnheim, atual Coordenador da Pós-Graduação em Entomologia (INPA, Manaus, AM), pela compreensão, amizade e apoio enquanto chefe desse departamento,

Ao Prof. Dr. Luiz R.G. de Britto, pelo apoio e amizade durante o desenvolvimento do trabalho e principalmente na assistência aos estudos fisiológicos,

Ao Prof. Dr. Pierre C.G. Montouchet, atual chefe do Departamento, pelo apoio e estímulo,

Aos professores, funcionários e técnicos do Centro de Microscopia Elettrônica, UNICAMP, pela cooperação e assistência sempre prestadas.

Aos Professores, funcionários e técnicos do Departamento de Zoologia, UNICAMP, pelo apoio e amizade durante estes anos,

À minha esposa pela compreensão, apoio e amor,

Agradeço

ÍNDICE

página

1. <u>INTRODUÇÃO</u> -----	1
2. <u>REVISÃO HISTÓRICA</u> -----	3
2.1. <u>Alabama argillacea</u> (Hübner, 1818) -----	3
2.2. <u>Viroses em insetos</u> -----	4
2.3. <u>Viroses em noctuídeos</u> -----	8
2.4. <u>Fatores bióticos de mortalidade em <u>Alabama argillacea</u></u> -----	10
2.4.1. <u>Viroses</u> -----	10
2.4.2. <u>Outras doenças</u> -----	11
2.4.3. <u>Insetos entomófagos</u> -----	12
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u> -----	14
3.1. <u>Estudos de campo</u> -----	14
3.2. <u>Obtenção e purificação de poliedros e partículas</u> -----	17
3.3. <u>Sintomatologia externa e histopatologia</u> -----	19
3.4. <u>Estudos morfométricos de poliedros e partículas</u> -----	21
3.5. <u>Bioensaios</u> -----	22
3.6. <u>Fisiopatologia</u> -----	26
4. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> -----	28
4.1. <u>Estudos de campo</u> -----	28
4.1.1. <u>Ocorrência natural de VPN, com avaliação de seu potencial</u> -----	28
4.1.2. <u>Papel dos inimigos naturais na dinâmica da virose</u> -----	36
4.2. <u>Estudos de laboratório</u> -----	49
4.2.1. <u>Sintomatologia externa</u> -----	49
4.2.2. <u>Histopatologia</u> -----	58

	página
4.2.2.1. Tecido adiposo -----	58
4.2.2.2. Matriz traqueal -----	61
4.2.2.3. Túbulos de Malpighi -----	63
4.2.2.4. Glândula labial -----	65
4.2.2.5. Gânglios nervosos -----	67
4.2.2.6. Epiderme -----	70
4.2.2.7. Tubo digestivo -----	72
4.2.2.8. Músculos -----	75
4.2.2.9. Hemócitos -----	76
4.2.3. Estudos morfométricos de poliedros e nu - cleocapsídeos -----	79
4.2.4. Fisiopatologia -----	84
4.2.4.1. Fisiopatologia da sensibilidade visual--	84
4.2.4.2. Fisiopatologia esofagiana -----	90
4.2.5. Susceptibilidade de larvas de <u>A. argillacea</u> ao VPN -----	96
4.2.5.1. Susceptibilidade do 1º estágio larval de <u>A. argillacea</u> ao VPN -----	96
4.2.5.2. Susceptibilidade do 2º e 3º estádios larvais ao VPN -----	104
4.2.5.3. Susceptibilidade do 5º estágio larval de <u>A. argillacea</u> ao VPN -----	110
4.2.5.4. Susceptibilidade do 6º estágio larval de <u>A. argillacea</u> ao VPN -----	112
5. <u>CONCLUSÕES</u> -----	123
6. <u>RESUMO</u> -----	125
7. <u>SUMMARY</u> -----	127
8. <u>LITERATURA CITADA</u> -----	128

I. INTRODUÇÃO

No começo do século Alabama argillacea (Hübner) já era considerada como uma das maiores pragas dos algodoeiros no Novo Mundo (Hunter, 1912). Este noctuídeo, que se caracteriza por vôos migratórios nas regiões sub-tropicais acompanhando a estação chuvosa (Creighton, 1936a; Lukefahr & Fryxell, 1969), provoca danos por desfolhamento, comprometedores à economia algodoeira. Após a 2a. Guerra Mundial no entanto, os inseticidas organosintéticos aplicados contra diversas pragas do algodoeiro, foram os responsáveis em evitar maiores danos econômicos causados por A. argillacea (Berger, 1968; Parencia et al., 1962).

Com a preocupação atual em relação ao uso inadequado dos defensivos químicos (Muirhead-Thomson, 1971; Matsumura et al., 1972; White-Stevens, 1975, 1976 e 1977) torna-se necessária a busca de métodos de controle que sejam mais seguros, econômicos e com menos efeitos colaterais desvantajosos ao ambiente.

Para os agro-ecossistemas brasileiros de algodão, Habib (1976, 1977) previu que com a tendência em se abandonar gradualmente o controle exclusivamente químico, o "curuquerê" do algodão, A. argillacea, deverá tornar-se um dos maiores problemas da cultura algodoeira do país. Salientou ainda que: "as larvas dessa espécie tem alta susceptibilidade às doenças, o que incentiva estudos de patologia e dos efeitos de aplicações de produtos comerciais de microorganismos entomopatogênicos...".

A possibilidade de utilização de fatores bióticos de mortalidade, principalmente os dependentes de densidade, tem merecido amplos estudos dentro do Controle Biológico, Manejo Integrado de pragas e da Ecologia Aplicada em geral.

São bem documentadas algumas viroses causadoras de epizootias naturais em populações de insetos praga. Em certos casos essas epizootias mantêm as populações em níveis sub-econômicos. Faltam porém, para muitas outras espécies pragas, maiores estudos sobre o complexo vírus/hospedeiro/ambiente.

A virose poliedro-nuclear (VPN) de A. argillacea foi apenas esporadicamente registrada em alguns países do Novo Mundo, porém, sem avaliações do seu potencial, investigações da relação hospedeiro/patógeno e nem da possibilidade de utilização do agente etiológico como recurso no controle microbiano desta praga. Assim, dentro deste contexto, o presente trabalho trata de avaliar e estudar os seguintes aspectos:

- Investigações de campo visando registros de ocorrência natural da virose, avaliação dos níveis alcançados e a relação destes com fatores bióticos e abióticos.
- Em laboratório, determinações dos níveis de virulência e susceptibilidade. Aspectos físico e histopatológicos da relação patógeno/hospedeiro. Sintomatologia da doença e estudos morfo-métricos do vírus.

2. REVISÃO HISTÓRICA

2.1. Alabama argillacea (Hübner, 1818)

No Brasil este noctuídeo é considerado praga desde 1578 (Calcagnolo, 1965) e na Argentina desde 1924 (Freiberg, 1945). Hambleton (1939), considerou-a como uma constante ameaça na região de Campinas/SP, principalmente nas estações chuvosas. Segundo esse autor, o aparecimento dá-se entre novembro e dezembro, sendo que nas segunda e terceira gerações (janeiro e fevereiro) os níveis de ataque requerem repetidas medidas de controle.

De acordo com Hunter (1912), a história da atividade de A. argillacea nos Estados Unidos é relativamente completa de 1793 até 1881; sendo considerado 1793 como o primeiro registro de infestações nos algodoeais norte americanos (Creighton, 1936b e Brown, 1938).

Como salientou Habib (1976), uma das questões de grande importância sobre essa espécie, é quanto à origem das erupções periódicas e a maneira pela qual o inseto se mantém ou reaparece, anualmente, nas várias regiões dos países americanos. No começo do século alguns pesquisadores apoiados em observações não criteriosas de leigos, ainda defendiam a idéia de que as pupas ou os adultos dessa espécie hibernassem na América do Norte ou que a espécie era nativa e possuía outras plantas hospedeiras onde permanecia nas entre-safras de algo-

dão (Hunter, 1912).

As experiências de Creighton (1936a) e diversos trabalhos sobre os hábitos migratórios dessa espécie (Grossbeck, 1911; Brown, 1938; Pyenson, 1940; Webster, 1961; Caswell, 1962; Parencia & Rainwater, 1964; Calcagnolo, 1965; Glick & Graham, 1965; Lukefahr & Fryxell, 1969) são unânimes em considerar a América Central e o norte da América do Sul, como centros de imigração e focos onde A. argillacea se mantém, sobre algodão silvestre e comercial.

O hábito migratório dessa espécie, agora já bem conhecido, deve ser o principal fator responsável pelo não desenvolvimento de resistência aos inseticidas químicos. Da mesma forma, como salientou Tanada (1963), o não desenvolvimento de resistência de insetos à doenças também depende diretamente de movimentos populacionais de emigração e imigração, favorecendo assim também as epizootias naturais.

2.2. Viroses em Insetos

Atualmente são conhecidas mais de 700 viroses em artrópodos, atacando 300 ou mais espécies de insetos e aranhas (Falcon, 1976). Nos insetos, grande parte dessas ocorrem em lepidópteros, himenópteros e dípteros (Chapman & Glaser, 1915; Sweetman, 1936; Bergold, 1943; Steinhaus, 1951; Hughes, 1957; Martignoni & Langston, 1960; Steinhaus & Marsh, 1962; Bergold, 1963 e Thomas & Poinar Jr., 1973).

A classificação, nomenclatura e caracterização

dos vírus entomopatogênicos têm sofrido algumas modificações à luz de novas descobertas e estudos mais avançados, até que o "Comitê Internacional para Nomenclatura de Vírus" estabeleceu novas bases para o sistema, baseadas em aspectos bioquímicos, biofísicos e morfológicos (David, 1975).

Afora muitos ainda não classificados, os vírus de artrópodos estão representados por seis gêneros, a saber: Baculovirus (causam a Poliedrose Nuclear e Granulose), Poxvirus (causam as Entomopoxviroses), Iridovirus (causam a virose iridescente dos insetos), Parvovirus (causam as Densonucleoses), Enterovirus e finalmente Rhabdovirus. As viroses poliedro-citoplasmáticas embora causadas por vírus próximos aos do gênero Reovirus (Reoviridae), não tiveram sua classificação ainda resolvida, sendo consideradas apenas como um grupo (Wildy, 1971 e David, 1975).

Muitos estudos têm sido feitos nos últimos anos, sobre vários aspectos das viroses de insetos (Smith, 1967 e 1971; Maramorosch, 1968; Hunter & Hall, 1968; Harrap, 1970

; Burges & Hussey, 1971; Bulla, 1973; Gibbs, 1973; Ignoffo, 1973; David, 1975; Falcon, 1976; Tinsley, 1979) e especialmente do ponto de vista do seu potencial como agentes no controle biológico. As baculoviroses são sem dúvida apontadas como as mais promissoras, principalmente as VPNs (Allen et al., 1966; Stelzer, 1967; Smith, 1973; Summers et al., 1975; Tinsley, 1975; Smirnoff et al., 1976; Jaques, 1977; Tinsley & Harrap, 1978; Tinsley, 1979).

No bicho da seda, Bombyx mori L., a VPN é conhecida há muito tempo como causadora da Icterícia. Maestri (1856) e Cornália (1856) parecem ter sido os primeiros a descrever os

poliedros em larvas dessa espécie, e associá-los à doença (De Bach, 1964).

Embora Bergold (1963a) cite von Prowazek como provavelmente o primeiro a observar as partículas dentro dos poliedros em 1913 e Komárek e Breindl como os primeiros a demonstrá-las com métodos histológicos em 1924, foi apenas com o surgimento do microscópio eletrônico em 1947, que ele pode realmente isolar e identificar as partículas virais como as unidades infecciosas.

Diversos autores têm descrito técnicas e métodos para isolamento e purificação dos poliedros e partículas virais (nucleocapsídeos) (Bergold, 1953; Onodera et al., 1965; Mizawa & Iida, 1963; van der Geest, 1968; Hayashi & Bird, 1968; Thompson, 1968; Scott et al., 1971; Komolpith & Ramakrishanan, 1975; Harrap et al., 1977). Alguns métodos serológicos, também têm sido desenvolvidos para evidenciar a presença do vírus em hospedeiros infectados (Krywienezky, 1963 e 1976). O desenvolvimento desses métodos têm sido de fundamental importância na manipulação desses patógenos em programas de Controle microbiano de pragas.

Os aspectos ultraestruturais, tanto do vírion como dos nucleocapsídeos, têm sido bem estudados e revistos nos últimos anos (Xerox, 1955 e 1956; Bergold, 1963b; Himeno et al., 1968; Krieg & Huger, 1969; Hughes, 1972; Kawamoto & Asayama, 1975; Kawamoto et al., 1976; Kawamoto et al., 1977; Maramorosch, 1977). Os passos na invasão celular e replicação, foram analisados para diferentes hospedeiros infectados pelo VPN (Harrap & Robertson, 1968; Summers, 1969 e 1971; Iwashita & Kanke, 1969; Harrap, 1970 e 1973; Hirumi et al., 1975; Paschke &

Summers, 1975; Tanada et al, 1975; Iwashita & Ueno, 1976; Allen & Knell, 1977; Falcon & Hess, 1977; Adams et al, 1977).

Do ponto de vista ecológico, a Epizootiologia tem recebido poucos estudos quantitativos apesar de algumas poliedroses nucleares como a de Diprion hercyniae (Hartig), acidentalmente introduzida no Canadá, se constituírem em ótimos modelos (Poole, 1974).

A partir das premissas básicas do equilíbrio natural propostas por Nicholson (1933), tem havido amplo debate sobre a maneira pela qual fatores dependentes e independentes de densidade atuam no controle populacional (Nicholson, 1954; Solomon, 1957; Milne, 1962; Huffaker & Messenger, 1964; Huffaker et al., 1971 e 1976). Os estudos de regulação de populações por fatores de mortalidade dependentes de densidade, têm suas origens em antigos trabalhos e certamente é como os patógenos em geral atuam regulando densidades populacionais (Huffaker, 1974; Ehler & van der Bosch, 1974).

Muitos princípios e critérios da Epizootiologia têm sido adaptados de estudos epidemiológicos (Steinhaus, 1949, 1954 e 1963; Franz, 1961). Assim, Tanada (1963) aponta fatores primários relacionados com a Epizootiologia e trata-os detalhadamente, relacionando-os com fatores secundários, bióticos e abióticos.

De acordo com Falcon (1974), patógenos de insetos além de causar morte, podem interferir no desenvolvimento, alterar a reprodução e reduzir a resistência ao ataque de parasitos, predadores e outros patógenos. Podem ainda influir nas respostas aos inseticidas químicos ou outros métodos de controle.

Alguns VPNs já são bastante usadas no controle de

pragas florestais e em campos de cultura (Burges & Hussey, 1974). Tinsley (1979) avaliou o potencial dos vírus entomopatogênicos como inseticidas microbianos e Falcon (1976), tratando dos problemas associados ao uso desses agentes, salientou a importância dada pela agência de proteção ao meio ambiente americana (EPA), aos estudos ecológicos e testes de segurança.

2.3. Viroses em noctuídeos

A família Noctuidae, além de talvez ser a que abrange maior número de lepidópteros conhecidas, é também das mais importantes sob o ponto de vista econômico, pois nela estão algumas das mais problemáticas pragas da agricultura (Lima, 1950).

Autores como Steinhaus (1951), Hughes (1957), Martignoni & Langston (1960), Steinhaus & Marsh (1962) e Thomas & Poinar (1973) têm regularmente registrado diversas viroses em membros desta família, sendo a VPN a mais frequente, seguida da Granulose, Poliedrose Citoplasmática e finalmente viroses não inclusas. Muitas dessas viroses têm demonstrado ser satisfatoriamente eficientes no controle natural ou quando aplicadas como inseticidas microbianos (Ignoffo, 1965a, b; Ignoffo et al., 1965 e Allen, 1968). Os estudos dessas viroses culminaram em 1976, com o primeiro registro e industrialização de um produto à base de vírus entomopatogênico nos Estados Unidos (Carter, 1976).

No Egito, Abul-Nasr (1956 e 1959) avaliou e suge-

riu o uso de VPN no controle de Prodenia litura Fabricius; noctuídeo que além de atacar outras culturas, é a mais séria praga do algodão no Oriente.

Jaques (1961, 1962, 1968, 1972 e 1974) tem demonstrado o papel do VPN de Trichoplusia ni (Hübner) como regulador de populações deste noctuídeo em couve e outras crucíferas. Este inseto é considerado nos Estados Unidos uma praga secundária do algodão (Falcon et al., 1968; Ehler et al., 1973). Ehler & van den Bosch (1974), demonstraram ainda que a ação conjunta de inimigos naturais e o VPN, é a responsável por manter populações desse inseto em níveis economicamente satisfatórios em campos de algodão norte americanos.

Outros noctuídeos de importância econômica, também têm merecido estudos no sentido de se avaliar o potencial de suas VPNs como meio de controle. Alguns deles são: Autographa californica (Speyer) (Kaya, 1977 e Harper, 1976); Pseudoplusia includens (Walker) (Livingston & Yearian, 1972; Cox et al., 1972), Rachioplusia ou (Guenée) (Paschke & Sweet, 1966); Spodoptera exigua (Hübner) (Hunter & Hall, 1968); S. litura (Fabricius) (Pawar, 1974 e Komolpith & Ramakrishanan, 1975); S. frugiperda (Smith) (Hamm, 1968 e Andrade et al., 1978) e Anticarsia gemmatalis Hübner, (Allen & Knell, 1977 e Moscardi, 1977).

2.4. Fatores bióticos de mortalidade em Alabama argillacea

2.4.1. Viroses

Pela sua descrição de sintomas, Carvalho (1944) parece ter sido o primeiro e até o momento o único a registrar uma epizootia causada pelo VPN em Alabama argillacea no Brasil.

Na América do Norte, Chapman & Glaser (1915) foram os primeiros a considerar também pelos sintomas, a espécie A. argillacea como susceptível ao VPN. Outros autores apenas citaram a espécie em listas de insetos susceptíveis à virose, sem fornecer maiores informações (Sweetman, 1936; Bergold, 1943 e Steinhaus, 1946 e 1949).

Steinhaus e Marsh (1962) reportaram em 1951 uma provável epizootia por VPN em A. argillacea ocorrida no Texas. Em 1957, os mesmos autores conseguiram um diagnóstico seguro e apontaram a virose como responsável por 100% de mortalidade numa área de 2 acres de algodão no Novo México. Salientaram ainda nesse registro, não haver início de infestações nos campos vizinhos, onde a doença não tinha sido detectada (Steinhaus & Marsh, 1962).

2.4.2. Outras doenças

O Curuquerê do algodão também tem sido apontado como susceptível a outros patógenos, tanto no laboratório como na natureza.

Thomas & Poinar Jr. (1973) registraram na Colômbia o microsporídeo Nosema sp e o fungo Nomuraea rileyi (Farlow) Samson; e na Nicarágua o mesmo fungo e uma espécie de Penicillium também atacando lagartas de A. argillacea. O fungo Metarrhizium anisopliae também foi registrado em 1950 em Columbia, Missouri (EUA) (Steinhaus, 1951).

No Brasil, a bactéria Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) foi observada causando 100% de mortalidade em criações de laboratório de A. argillacea, no Instituto Biológico de São Paulo (Lima et al., 1962 e 1963).

Habib (1978), no insetário da UNICAMP, isolou P. aeruginosa, P. acidovorans Jong e Proteus rettgeri (Hadley) de duas epizootias em A. argillacea; em 1973 e 1976. Essas bactérias facultativas foram observadas causando mais de 90% de mortalidade sob condições de temperaturas e umidade relativa bastante semelhantes às observadas por Lima e colaboradores.

A susceptibilidade de A. argillacea tem também motivado estudos sobre possibilidades de controle por Bacillus thuringiensis Berliner em preparações comerciais (Habib, 1977).

Figueiredo et al. (1960) e Ignoffo et al. (1964), a partir de bioensaios em laboratório e no campo, comprovaram a eficiência deste patógeno como alternativa viável de controle do curuquerê do algodão.

Tem-se observado também em algodoais da região de Campinas, SP, a ocorrência natural e esporádica do fungo Nomuraea rileyi em larvas de A. argillacea (Habib, Patel e Andrade, não publicado).

2.4.3. Insetos entomófagos

Diversos trabalhos têm tratado de levantamentos de inimigos naturais do curuquerê do algodão, (Myers, 1931; Creighton, 1936a e 1936b; Hambleton, 1939; Montera, 1941; Blanchard, 1942a e 1942b; Lima, 1948; Caswell, 1962; Calcagnolo, 1965; Habib, 1977); no entanto, poucos referem-se à importância desses agentes na dinâmica populacional desse inseto (Myers, 1931; Pyenson, 1938 e Caswel, 1962).

No Brasil, Oliveira (1935) tratando da possibilidade de controle de A. argillacea, considerou o díptero Sarcophaga chrysophora Schiner o principal inimigo natural dessa praga, promovendo até 100% de mortalidade. No Paraguai, na região do Chaco, Nickell (1958) aponta de seus levantamentos de inimigos naturais, alguns parasitos e predadores efetivos no controle de A. argillacea.

Alguns pesquisadores como Whitcomb & Bell (1964) e van den Bosch & Hagen (1966) têm demonstrado bem a importância

dos levantamentos de artrópodos predadores nos agroecossistemas americanos de algodão. Para esse agrosistema, são ainda poucos os trabalhos que fornecem uma análise quantitativa mais apurada dos efeitos dos insetos entomófagos nas densidades populacionais de seus hospedeiros ou presas (Witcomb & Bell, 1964; Ridgway et al., 1967; Lingren et al., 1968; van den Bosch et al., 1969; Ehler & van den Bosch, 1974).

Os inimigos naturais, além de atuarem diretamente no controle das populações, podem ainda funcionar como dispersores e transmissores de doenças (Metcalf & Luckmann, 1975; DeBach, 1964; Steinhaus, 1963; Tinsley, 1979 e Patel, 1981).

Deve-se de maneira geral, considerar tais inimigos como essenciais nos complexos que associam patógenos e seus hospedeiros nas enzootias e epizootias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudos de campo

Nas culturas de algodão de 1976/77 e 1978/79 em Campinas-SP e 1977/78 e 1978/79 em Mogi-Guaçu-SP, foram feitas observações sobre a ocorrência da virose poliedro-nuclear em populações de A. argillacea (curuquerê do algodão). Na primeira região, o trabalho foi desenvolvido na Fazenda Santa Genebra e na Estação Experimental da UNICAMP; enquanto que na segunda, na Fazenda Campininha e algodoais de pequenas propriedades nas vizinhanças dessa Fazenda.

Coletas de larvas, pré-pupas e pupas foram feitas manualmente, sendo colocadas em sacos de tela de náilon com folhas frescas do próprio algodão de onde foram coletadas. Os indivíduos suspeitos de doença ou parasitismo, foram acondicionados individualmente em vidros de 3,2 cm de diâmetro por 8 cm de altura, tampados com chumaço de algodão.

Durante maio de 1977 as larvas coletadas foram mantidas no insetário do laboratório de Entomologia da UNICAMP, em gaiolas de madeira (20 x 25 x 25 cm) com as laterais fechadas por tela de náilon. Em 1978 e 1979, tanto em Mogi-Guaçu quanto em Campinas as larvas foram criadas em vidros de 25 cm de altura e 15 cm de diâmetro, tampados com filô. Exceto para as lagartas coletadas em Mogi-Guaçu em 1978, criadas em Campi

nas com folhas de algodão (cultivar IAC-18) plantado na Estação Experimental da UNICAMP, todas as outras foram alimentadas com folhas de algodão do local onde foram coletadas. Ainda foi mantida no laboratório, em cubas de vidro de 19 cm de altura por 20 cm de diâmetro, uma criação estoque de A. argillacea. As larvas alimentadas com folhas de algodão da Estação Experimental e adultos com solução de sacarose a 20% (Habbib, 1976).

Temperaturas e umidades relativas do laboratório foram registradas diariamente pela manhã (8:00 h), ao meio dia e à tarde (18:00 h). Os dados meteorológicos do campo foram obtidos na seção de Climatologia do Instituto Agrônomo de Campinas, posto da fazenda Santa Eliza.

Os levantamentos de ocorrência de virose e parasitismo, em campos infestados, foram feitos no final da safra nas regiões ainda verdes da lavoura. Foram computados no laboratório os indivíduos mortos ou moribundos. O diagnóstico da virose foi sintomatológico; quando duvidoso confirmado por lâmina de esfregaço de hemolinfa e do tecido adiposo, fixado com álcool metílico absoluto (5 min) e corado com solução aquosa de Giensa à 10%.

Os parasitos adultos emergidos no laboratório, depois de computados, foram identificados baseando-se em Montera (1941), Blanchard (1942a,b), Lima (1948), Guimarães (1974) e em coleção de referência do Depto. de Zoologia, UNICAMP. Os Tachinidae foram identificados pelo Dr. J.H. Guimarães (Museu de Zoologia/USP, São Paulo). As formigas, pelo Dr. W.W. Benson e P.S. Oliveira (Depto. de Zoologia/UNICAMP, Campinas).

Predadores e necrófagos foram observados, coleta-

dos e criados durante todo o desenvolvimento do trabalho de campo, para o estudo do seu papel como dispersores de vírus. No laboratório esses agentes foram alimentados com larvas de A. argillacea mortas ou na fase pré-mortal da virose. A análise de fezes e mecônio dos parasitos e fezes dos predadores, foram feitas à microscopia óptica comum e de fase.

3.2. Obtenção e purificação de poliedros e partículas

Para as infecções no laboratório foram usadas preparações semi-purificadas de poliedros obtidas por técnica adaptada de Harrap et al. (1977). De 20 a 30 larvas de 6º estágio, mortas pela virose, foram colocadas em vidros escuros de 300 ml, com água de torneira e deixadas à temperatura ambiente por mais de duas semanas. Tal procedimento permite que pela putrefação, inócua aos poliedros, e pela autólise, grande parte dos tecidos se decomponham, formando um precipitado esbranquiçado de poliedros abaixo de uma camada de tecidos decompostos. Toda a preparação a seguir foi tratada em homogenizador Virtis, à velocidade média, por 15 min e filtrada em gaze dupla. O pH dessas preparações oscilou entre 6,5 e 7,5 não sendo necessária a adição de qualquer tampão para preservar a integridade dos poliedros.

Para a concentração, seguiu-se uma série tripla de centrifugação diferencial em centrífuga Sorvall RC2-B, rotor SS-34, à 3.000 gn (15 min), 1000 gn (30 s) e 2.000 gn (10 min), com temperaturas entre -4 e 0°C, sempre eliminando-se o sobrenadante. O precipitado obtido assim apresentou-se parcialmente purificado e de coloração amarronzada quando ressuspendido. Essas suspensões estoques foram avaliadas quanto ao número de poliedros por mililitro utilizando-se o retículo de Neubauer e guardadas no escuro à 7°C.

Para os estudos morfométricos de poliedros e partículas, seguiu-se à purificação inicial, um ciclo de ultracentrifugação em gradiente de densidade em equilíbrio (saca-

rose, 30/70%) em centrífuga Beckman (modelo L5-65), rotor SW 65LTi à 90.000 gn por 2 horas à 4°C. O purificado de poliedros obtido, foi ressuspendido em 10 volumes de água deionizada (pH 6) e concentrado duas vezes à 10.000 rpm durante 5 min. Parte do precipitado foi levado à microscopia eletrônica e óptica. O restante foi tratado segundo método adaptado de Bergold (1963a) para liberação das partículas em solução alcalina. Dois miligramas e meio de poliedros foram ressuspendidos em 1,0 ml de solução de Na_2CO_3 (0,025 M) e NaCl (0,05 M). A preparação foi mantida por 130 min à temperatura ambiente com agitação constante para dissolução dos poliedros. Seguiu-se a esse tratamento uma centrifugação à 3000 gn para retirada de impurezas. As partículas no sobrenadante foram concentradas por duas vezes à 10000 gn durante 1 hora e ressuspendidas em água deionizada.

3.3. Sintomatologia externa e histopatologia

Larvas de A. argillacea provenientes do campo, foram infectadas por via oral no laboratório logo após a última ecdise larval. Sob lupa estereoscópica e com o auxílio de microseringa (Microliter 7005, Hamilton), foram colocados entre 1,5 a 2,0 μ l de suspensão concentrada de poliedros (10^9 cip/ml) diretamente na boca das larvas. Vinte e cinco das que sorveram toda a dose, foram mantidas individualmente em placas de petri (10 cm de diâmetro), com folhas de algodão, para os estudos de sintomatologia externa e histopatologia. Foram adotados os critérios de Steinhaus (1963) para a descrição da sequência dos sintomas patológicos.

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

Larvas nas fase pré mortais da virose, foram dissecadas sob lupa estereoscópica, em solução isotônica de lavagens, tamponada com cacodilato 0,4 M, pH 7. Partes do tecido adiposo, intestino médio, tegumento, glândulas salivares, gônadas, túbulos de Malpighi, traquéias, músculos e gânglios nervosos torácicos foram removidas e imediatamente colocadas em solução fixadora de glutaraldeído e acroleína, ambos a 4%, por duas horas. O material foi, em seguida mantido 24 horas em solução de glutaraldeído (4%) na geladeira e 24 horas em solução isotônica de lavagem, para depois ser fixado em solução de tetróxido de ósmio (1%). Para a inclusão em resina

Epon e Araldite (Mollenhauer, 1964), seguiu-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 à 60°C por 2 dias.

Cortes semi-finos para a microscopia óptica e ultrafinos para a eletrônica, foram obtidos em ultramicrotomo Sorvall MT-2, Porter-Blum. Para a microscopia óptica, foram tratados 5 minutos com ácido periódico à 1%, corados à quente com azul de toluidina observados e fotografados. Cortes ultra finos foram corados em acetato de uranila à 2% (mais de 15 min) e citrato de chumbo 0,2%; observados e eletrografados em microscópio eletrônico Zeiss M9-S.

3.4. Estudos morfométricos de poliedros e nucleo-capsídeos

As análises da forma e tamanho dos poliedros e partículas, basearam-se em micrografias de preparações purificadas e de cortes ultrafinos, também usados na histopatologia.

Os poliedros e partículas purificados foram tratados pela técnica usual de coloração negativa (Hayat, 1972). Gotas da suspensão do vírus foram colocadas em grades de cobre (150 e 400 malhas/pol²) previamente cobertas por película de parlódio (solução a 2% em acetato de amila) e diretamente vaporizadas com carvão. A contrastação foi feita com ácido fosfotungstênio a 2% ou acetato de uranila a 2% (Noordam, 1973). O excesso de corante foi retirado após alguns minutos e a preparação examinada e fotografada.

As medidas de partículas nuas envelopadas e poliedros, foram tomadas diretamente dos negativos quando projetados em ampliador fotográfico, obtendo-se os tamanhos reais por conversão das ampliações.

3.5. Bioensaios

Foram usadas para os tratamentos, larvas de A. argillacea coletadas na região de Campinas e mantidas na criação geral do laboratório de Entomologia. O estoque original de vírus de A. argillacea foi também obtido de larvas da região de Campinas. O vírus de Anticarsia gemmatalis foi obtido de larvas doentes dessa espécie, coletadas em Londrina/PR.

As aplicações do vírus para os bioensaios foram sempre feitas por contaminação de folhas frescas e tenras de algodão.

Para as larvas de 1ª, 2ª e 3ª estádios, foram colocadas quantidades conhecidas de poliedros, nas duas superfícies de discos foleares de 2,5 cm². Após 24 horas foram oferecidas folhas não tratadas. Os discos tratados oferecidos às larvas de 1ª estágio, eram apenas parcialmente comidos, e a epiderme raspada, restando assim parte do mesófilo.

Para os ensaios com larvas de 5ª e 6ª estádios, desenvolveu-se um sistema para aplicações semelhantes às condições usuais de Campo (Fig. 1). Um revólver comum de pintura, marca Arprex (modelo 5) foi acoplado a um compressor de ar Joagar, tipo J2H/25, conjugado a um filtro e válvula Arprex para pressões constantes. Com esse conjunto, foram feitas duas aplicações de suspensões previamente determinadas de poliedros à pressão de 40 lbs/pol², numa esteira vertical a 40 cm de distância movida por um quimógrafo a 1,26 Km/h.

A distribuição homogênea do aplicador foi estabe

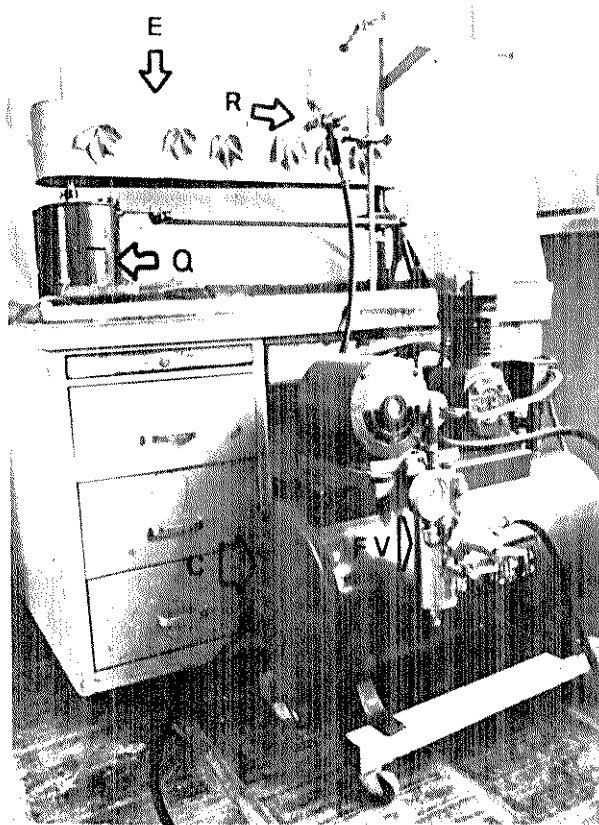


Fig. 1: Sistema adaptado para aplicações de vírus em laboratório

C = Compressor de ar

E - Esteira

FV - Filtro e válvula conjugados

Q - Quimógrafo

R - Revólver de pintura

lecida aplicando-se soluções de corantes em esteiras de papel branco. A vazão para esse conjunto de regulagens foi de 1 ml/s.

Na esteira móvel do aplicador foram fixadas folhas de algodão, cuja área havia sido previamente determinada com auxílio de um planímetro. Após 24 horas em contato com as larvas, as sobras das folhas tratadas (quando haviam) foram reavaliadas e por diferença, a área consumida foi estimada.

O cálculo do número de poliedros por área folear, foi baseado em contagens na microscopia óptica, do número de poliedros distribuídos em lâminas de microscopia também presas na esteira e que receberam as mesmas aplicações (Fig. 2). Dessa forma, pode-se estimar o número de poliedros ingerido por larva de 5º e 6º estádios.

As lagartas durante os ensaios foram mantidas em grupos de 40 à 50 indivíduos, em cubas de vidro de 33 cm de altura por 21 cm de diâmetro, tampadas com filô. Para o ensaio com larvas de 6º estágio privadas de ar, as cubas foram tampadas hermeticamente com plástico.

As mortalidades foram diagnosticadas e registradas diariamente. Para o cálculo do tempo letal, para larvas de 6º estágio, essas foram computadas em intervalos de 8 horas. Para todos os ensaios as mortalidades foram corrigidas de acordo com a fórmula de Henderson e Tilton (1955) e apresentadas em gráficos "Log.-Probit."

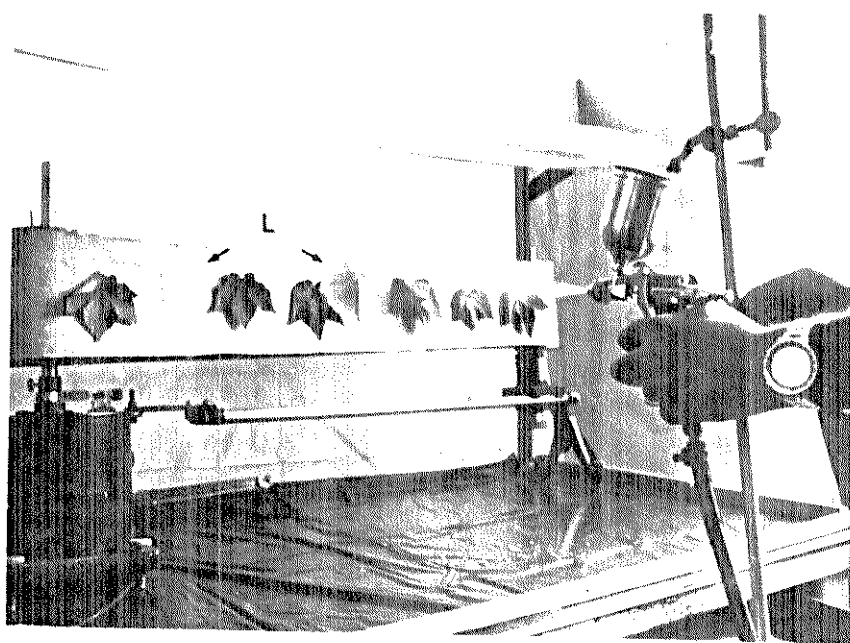


Fig. 2: Aplicação de vírus em lâminas de microscopia para avaliação de distribuição

L.: Lâminas

3.6. Fisiopatologia

Para os estudos fisiopatológicos, tanto nos registros de atividades de ocelos quanto de estomodeu, foram usadas larvas de 6º estágio de A. argillacea, na fase pré-mortal ii da virose.

Larvas sadias foram coletadas no campo e infectadas no laboratório por ingestão de 2 μ l de suspensão de $9,68 \times 10^9$ CIPs/ml. Foram mantidas em placas de Petri com folhas de algodão até o surgimento do sintoma pré-mortal.

Para os registros eletrográficos, as larvas foram imobilizadas sobre um suporte de isopor, presas por papel celofane fixado com alfinetes; sempre com a região ventral voltada para cima. Foram usados microelétrodos de tungstênio (0,2 mm de diâmetro inicial) afilados eletroliticamente e isolados em verniz isolante (G.E. 9564) (Levick, 1972). Como eletrodo de referência, foi usado um fio de prata clorada envolvido por algodão umedecido em solução salina e fixado sobre a região ventral da larva. Os sinais foram amplificados e filtrados de maneira convencional por uma sonda de alta impedância HI P.511 e por pré-amplificador Grass P.511; sendo enviados a um osciloscópio Tektronix 5103N e a um monitor de audio Grass AM-3.

Tanto os registros de atividade de ocelo nas larvas sadias como doentes foram feitos no segundo ocelo esquerdo da larva (considerando-se como primeiro o mais dorsal), colocando-se a ponta não isolada do eletrodo apenas em contato com a córnea. Para os registros esofagianos, os elétrodos foram

introduzidos via cavidade bucal até o início do estomodeu. Estas operações foram possíveis com o uso de um porta-eléttodos regulável e auxílio de lupa estereoscópica (Fig. 3).

Os estímulos usados para os registros ocelares foram obtidos de uma lanterna oftalmológica. Foram padronizados em 3000 lm/m^2 em ambiente de penumbra ($0,1 \text{ lm/m}^2$).

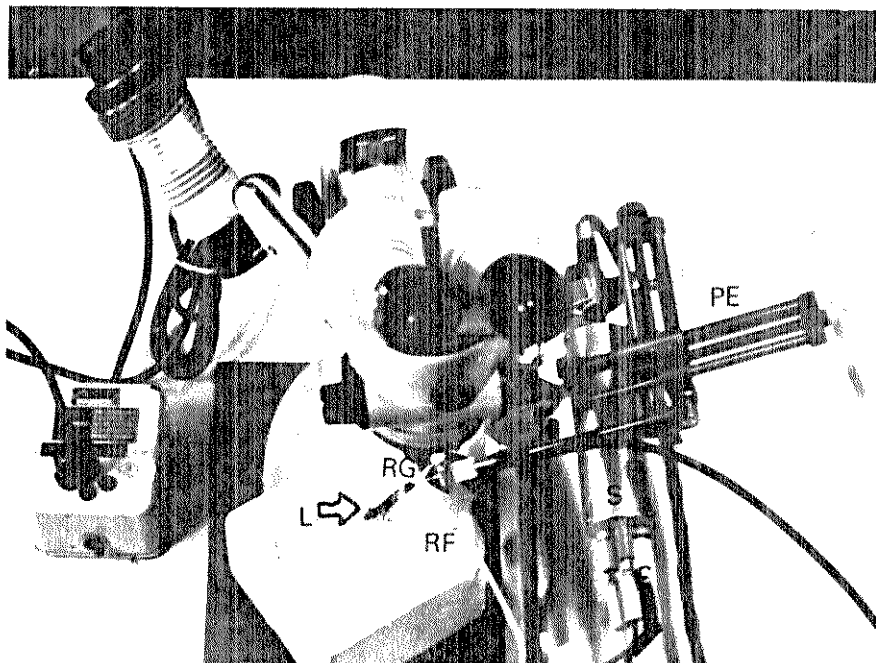


Fig. 3: Sistema para registros das respostas eletrofisiológicas

PE - porta-eléttodos

L - lagarta

RF - eléttodo de referência

RG - eléttodo de registro

S - sonda de alta impedância

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudos de campo

4.1.1. Ocorrência natural de VPN, com avaliação do seu potencial

Na região de Campinas a VPN de A. argillacea foi observada pela primeira vez durante este trabalho em 1977. Levantamentos feitos no segundo decanato de maio, no final da safra, mostraram mortalidades muito baixas devido à virose, inferiores a 1%. Na mesma época, larvas de 5ª e 6ª estádios, pré-pupas e pupas foram coletadas e criadas no laboratório. O material coletado apresentou em 10 dias, no laboratório, um total de 56,72% de mortalidade devido à virose (detalhes na Tabela 1).

TABELA 1. Porcentagem de mortalidade devido ao VPN em diferentes estágios de desenvolvimento de A. argillacea (238 indivíduos; Maio/1977).

ESTÁGIO	Larva	Pré-pupa	Pupa
% de mort.	17,03	9,62	73,32

A ocorrência de baixa mortalidade devido ao vírus no campo, pode representar apenas mais um fator natural de mor

talidade. Por outro lado, sob determinadas condições, uma enzootia pode também transformar-se em uma epizootia, com níveis maiores de mortalidade e efeito mais drástico na população do hospedeiro. A fase enzoótica de uma doença também torna-se de alto valor quando são feitas aplicações do mesmo patógeno. Coaker (1958) concluiu ser de valor duvidoso o uso da VPN de H. armigera (Hübner) em algodoads da Uganda onde a virose não fosse enzoótica. No Egito, Abul-Nasr (1959) também considerou a ocorrência natural da doença como importante fator na dinâmica do controle pelo uso de VPN contra a lagarta desfolhadora do algodão P. litura.

Tem sido generalizado que todas as doenças viróticas têm um limiar superior de temperatura para um ótimo nível de infecção e desenvolvimento, e que assim, o tempo necessário para a morte é mais uma função hiperbólica da temperatura do que exponencial (Dutky, 1959). Para a umidade relativa no entanto, apesar de vários autores terem-na correlacionado com maiores e menores incidências de VPN em vários hospedeiros (Harville, 1955; Vago & Cayrol, 1955; Szirmai, 1957; Schimidt & Philips, 1958; Wallis, 1957; Macovitch, 1958), outros pesquisadores também têm demonstrado não haver essa influência (Balch & Bird, 1944; Thompson & Steinhaus, 1950 e Krieg, 1955).

O aumento de mortalidade observada no período acima mencionado, devido ao vírus, pode ser associado a um estresse causado pelas mudanças das condições de temperatura e umidade relativa, e não às condições por si só (Tabela 2), além de outros fatores abióticos e bióticos que atuam numa criação de laboratório de insetos coletados no campo.

TABELA 2. Temperatura e umidade relativa no campo durante as coletas e do laboratório durante a manutenção da criação (1977)

	PERÍODO	MÉDIAS DE TEMPERATURA (°C)				UMIDADE RELATIVA (%)
		MAX.	MIN.	AMPL.	MÉDIA	
Campo	3º dec. abril	25,7	16,1	9,6	20,9	74,9
	1º dec. maio	27,2	16,4	10,8	21,8	71,2
	2º dec. maio	23,5	11,8	11,7	17,7	75,8
Laborat.	3º dec. maio	25,0	19,0	6,0	22,1	43,5

Os dados da Tabela 2 indicam que os indivíduos transferidos do campo para o laboratório sofreram a queda da umidade relativa média (de 75,8 para 43,5%) e encontraram temperaturas mínimas mais altas, com consequente redução das amplitudes e aumento da temperatura média. Tais alterações, podem ter funcionado como estressores provocando o desenvolvimento da virose nos indivíduos portadores, coincidindo com observações de vários autores, como Suzuki & Sakizaki (1925), Sakai (1935), Ishimori (1961), Aizawa & Sato (1961) e Aruga (1963a) apud Aruga, 1963.

De acordo com Vago (1963), torna-se muito difícil conhecer os mecanismos exatos de ação da temperatura e umidade relativa na incidência de uma determinada doença dada a heterogeneidade dos casos registrados. No entanto, as alterações desses fatores têm sido sempre indicadas como estressoras para insetos, porquanto interferem mais na homeostase do

organismo pecilotérmico (Steinhaus, 1958 , 1960 ; Aruga, 1963; Vago, 1956.).

Nas condições de laboratório podem atuar ainda, em maior ou menor escala, fatores abióticos como a ausência de luz solar direta, fotoperíodo e teor de Oxigênio disponível. Também, devem atuar fatores bióticos como qualidade de alimento fornecido e densidade populacional nas unidades da criação. Num balanço geral as condições artificiais de criação são quase sempre favoráveis ao desenvolvimento de doenças nos inse - tos (Steinhaus, 1953).

No presente trabalho, os levantamentos feitos em 1978 e 1979 em Mogi-Guaçu, não evidenciaram a ocorrência natural de VPN em A. argillacea nos meses de fevereiro e março. Nesses dois anos as infestações pela praga foram baixas devido ao uso intensivo de defensivos na região, e não foram feitas observações no final das duas safras.

Em 1978, as larvas e adultos coletados em Mogi-Guaçu foram criados no laboratório de Entomologia da UNICAMP. A primeira geração, alimentada com folhas de algodão na Estação Experimental da UNICAMP, sofreu 100% de mortalidade devido ao VPN, não passando do 4º estágio larval. As condições de laboratório, como ventilação precária e alta densidade populacional (nº de larvas por vidro), pareceram ter atuado como principais estressoras. A temperatura e umidade relativa durante a ocorrência da virose não sofreram grandes alterações, diferindo pouco das médias encontradas no campo (Tabela 3) e dentro do considerado adequado para a espécie (Habib, 1977).

TABELA 3. Comparação entre as condições de campo e laboratório durante a ocorrência de VPN em fevereiro e março, 1978

	2º dec. fev.		3º dec. fev.		1º dec. mar.	
	T(°C)	UR(%)	T(°C)	UR(%)	T(°C)	UR(%)
Laboratório	28.8	77.0	28.7	71.6	26.9	72.6
Campo	25.6	72.0	24.2	73.3	23.5	80.4

O fato de não haver infestação de A. argillacea na Estação Experimental da UNICAMP e portanto o alimento fornecido dificilmente estar contaminado com VPN, sugere a possibilidade dessa geração ter adquirido o vírus via-ovo da geração parental trazida do campo (Mogi-Guaçu). As condições de criação a que foram submetidas as larvas, desde a eclosão, devem ter sido suficientes para ativar o vírus latente e provocar a alta mortalidade observada. De maneira geral, sabe-se que em muitos lepidópteros a transmissão ovigênica de vírus ocorre em altas proporções via contaminação do córion ou via infecção no embrião (transovariana) (Steinhaus, 1954; Bergold, 1958; Smirnof, 1962 e Hamm & Young, 1974). A transmissão via-ovo chega a ser tão efetiva que Martignoni e Milstead (1962), sugeriram a contaminação da genitália de fêmeas de Colias eurytheme Boisduval, como método de introdução e controle desta praga. O mesmo foi sugerido por Nordin (1976) para Hyphantria cunea (Drury).

Durante fevereiro de 1979 foi feita uma pequena criação (120 larvas) de A. argillacea na Estação Experimental de Mogi-Guaçu. Larvas de 4º e 5º estádios foram coletadas e

mantidas nas mesmas condições que no anterior em Campinas, porém em ambiente aberto e sujeitas às suas condições climáticas. A ocorrência de 9,16% de mortalidade pelo VPN em larvas de 6º estágio confirma nessa época a existência da infecção, ao menos na forma latente, na população do campo. Os fatores responsáveis pela manifestação da doença neste caso devem ter sido os mesmos efeitos estressores que atuaram no ano anterior em Campinas. Acredita-se que mais para o final da safra, quando as aplicações de defensivos químicos diminuem ou param totalmente, a densidade populacional alta, também tenha no campo o mesmo efeito estressor. Tal fato foi comprovado no presente trabalho para a região de Campinas e o fenômeno é bem demonstrado para outros insetos susceptíveis ao VPN (Thompson & Steinhaus, 1950; Ehler & van den Bosch, 1974; Tinsley, 1979).

De maneira geral os patógenos de insetos agem como fatores de mortalidade dependentes de densidade (Steinhaus, 1954; Tanada, 1963 e 1967). As observações em Campinas mostraram diferentes incidências de VPN em larvas de A. argillacea quando em alta densidade populacional. As observações em Mogi Guaçu em fevereiro e março de 1978 e 1979, não revelaram ocorrência natural de VPN em baixas densidades populacionais. Maiores levantamentos no início das infestações em Campinas e outras regiões poderiam no entanto mostrar se ao modelo de outras poliedroses, a de A. argillacea também pode se iniciar a baixas densidades (Hall, 1953; Bird, 1954; Bird & Elgee, 1957; Tanada, 1961, Tanada & Omi, 1974).

As observações de campo em Campinas, na segunda quinzena de abril/1979, mostraram para A. argillacea em alta densidade populacional, variações entre os níveis de ocorrên-

cia de VPN com uma média geral de 7,89% de mortalidade (Tabela 4).

TABELA 4. Ocorrência de VPN em A. argillacea, Fazenda Santa Genebra, Abril/1979

DATA	MORTALIDADE DEVIDA AO VPN				TOTAL
	LARVA	PRÉ-PUPA	PUPA	% TOTAL	AMOSTRADO
17/IV	-	1	1	2,56	78
24/IV	4	32	53	15,18	586
26/IV	6	15	12	3,81	865
27/IV	12	2	5	4,83	393
29/IV	6	-	30	10,46	344
TOTAIS	28	50	101	7,89	2.266

A heterogeneidade do campo, relativa à disponibilidade de folhas nessa época final de safra (após a primeira apanha), produz uma distribuição bastante tendenciosa das larvas, principalmente concentradas em manchas na lavoura ou ao longo das curvas de nível (terraços) onde as plantas ainda oferecem condições favoráveis. Entre essas regiões a qualidade e quantidade de folhas sustenta mal e de forma não uniforme uma densidade alta de larvas de A. argillacea, que assim condicionadas a um maior ou menor estresse causado pelo ambiente precário e superpopulação, devem sofrer a virose em diferentes níveis.

As porcentagens de mortalidade encontradas na região de Campinas indicam o VPN como um importante fator de controle natural do "curuquerê do algodão". No entanto somen-

te o manejo adequado deste fator poderia resultar em maiores níveis de mortalidade, ou epizooticos, controlando quando necessário as infestações dessa praga. Numa situação diferente, Steinhaus & Marsh (1962) ao registrarem a ocorrência de 100% de mortalidade pelo VPN em larvas de A. argillacea no Novo México, salientaram não haver início de infestações nos campos vizinhos, indicando assim para aquelas condições, eficiência do vírus como agente no controle natural.

A ocorrência do fungo entomógeno Aspergillus parasiticus Speare em adultos de A. argillacea no laboratório e Nomuraea rileyi (Farlow) Samson em larvas de campo (Habib, Patel e Andrade, não publicado), sugere que na natureza tais patógenos também sejam importantes na dinâmica populacional deste inseto, formando com insetos entomófagos um complexo de agentes bióticos de controle natural.

4.1.2. Papel dos inimigos naturais na dinâmica da virose

Afora a óbvia importância de patógenos na dinâmica de controle populacional de insetos, a presença de predadores e parasitos tem mostrado ser fundamental na manutenção e regulação das fases epizoóticas. O exemplo clássico das vespas pragas do Abeto e Pinheiro, Gilpinia hercyniae (Hartig) e Neodiprion sertifer (Geoffroy) acidentalmente introduzidas nos Estados Unidos e Canadá por volta de 1900, constitui-se hoje um dos melhores modelos matemáticos sobre epizootias (Poole, 1974). Foi a introdução acidental de parasitos naturais europeus, a responsável pela introdução e a dispersão do VPN nas populações destas pragas, causando mortalidades normalmente próximas à 100% (Balch & Bird, 1944; Dutky, 1959; Nielson & Morris, 1964 e Tinsley, 1979).

Durante o mês de abril de 1979, as porcentagens de parasitismo em populações de A. argillacea, em Campinas, variaram entre 26,24% e 32,56%, com uma média geral de 28,28%. O parasitismo por dípteros mostrou-se significativamente maior que o causado pelos himenópteros, que a predação ou que todos os outros fatores juntos (Tabela 5).

TABELA 5. Porcentagens de mortalidade natural, em A. argillacea, Campinas, S.P., Abril/1979.

COLETA	MORTALIDADE NATURAL (%)					
	PARASITISMO			PREDACÃO		INDIVÍDUOS
	HYMEN.	DIPT.	TOT.	OBSERVADA	V.P.N.	OBSERVADOS
I	8,97	21,79	30,76	0	2,56	78
II	8,02	20,81	28,83	0,34	15,18	586
III	2,31	23,93	26,24	3,23	3,81	865
IV	2,29	30,27	32,56	1,52	4,83	393
V	1,45	25,58	27,03	0,87	10,46	344
MÉDIA	3,88	24,40	29,08	1,72	7,87	

Nessa época, quando não são feitas mais aplicações de inseticidas no algodão, notou-se que o controle natural de A. argillacea pode atingir altos níveis (em média 38,67%). Habib (1976) observou em Indiaporã/SP, uma baixa infestação por A. argillacea (26%), numa área de 200 alqueires de algodão não tratado por inseticidas químicos, associando o fato à ação dos inimigos naturais. Glik & Lattimore (1954) e Gaines (1954) têm sugerido técnicas e produtos a serem aplicados em agrossistemas de algodão, com o intuito de se preservar ao máximo a fauna de inimigos naturais, apoiando assim também essa forma de controle.

O uso experimental de inseticidas para a exclusão intencional de inimigos naturais, tem demonstrado bem o papel do controle natural de Trichoplusia ni, em campos de algodão

da California (Ehler et al., 1973 e Ehler & van der Bosch, 1974). No entanto, em populações de A. argillacea poucos trabalhos apenas referem-se a ação de predadores e parasitos (Myers, 1931; Pyenson, 1938 e Nickel, 1958).

O impacto da ação só dos predadores parece ter sido sempre subestimado, uma vez que eles destroem e removem uma fração de indivíduos da população, que acabam não sendo computados.

A. Parasitos:

No presente trabalho foram encontrados principal^{mente} dípteros Tachinidae parasitando larvas de A. argillacea, seguidos em frequência pelos Sarcophagidae e himenópteros em geral. A Tabela 6 apresenta as porcentagens aproximadas do parasitismo observado e o tipo de relação travada com o hospedeiro.

TABELA 6. Parasitos coletados, relação com o hospedeiro e porcentagens aproximadas de ocorrência (Abril, 1979, Campinas, SP)

PARASITO	RELAÇÃO COM O HOSPEDEIRO	% de ocorrência
DIPTERA		
Tachinidae		
<u>Patelloa similis</u> (Towsend)	Endoparasito larval/pupal	59,5
<u>Archytas</u> sp	"	3,2
<u>Winthemia</u> sp	"	10,0
Sarcophagidae		
<u>Sarcophaga</u> sp	"	13,5
Não ident.	"	0,5
HYMENOPTERA		
Chalcididae		
<u>Brachymeria</u> spp	Endoparasito pupal ou Hiperp.	6,7
<u>Spilochalcis</u> sp	Hiperparasito (Ichneum.)	1,0
Eulophidae		
<u>Euplectrus comstockii</u> Howard	Superparasito ectófago	0,5
Braconidae		
<u>Rogas</u> sp (Nees)	Endoparasito larval	1,5
Ichneumonidae		
<u>Paracharops</u> sp (=Charopsimorpha)	Endop. larval	3,2
<u>Hemiteles monterai</u> Lima	Hiperparasito de <u>Rogas</u> sp	1,0

A existência de uma enzootia numa população, não só garante uma certa mortalidade pelo patógeno como também interfere no desenvolvimento, reprodução e potencializa fatores naturais de mortalidade como outros patógenos, predadores e

parasitos. Tais fatores são conhecidos por atuarem na faixa da população que está desviada das condições ótimas ou seja, os tipicamente doentes, atipicamente doentes, os com a infecção latente (Classificação segundo Steinhaus, 1949). Esse fato, tem sido demonstrado para insetos praga de algodão (Dulmage, 1973 e Falcon, 1971).

Acredita-se que a ação conjunta de patógeno e inimigo natural passa a ser o mais sinérgico possível, em termos de controle, quando os seguintes requisitos são preenchidos:

1. Inimigo natural não é susceptível ao patógeno,
2. Patógeno ou inimigo natural (separadamente) não reduzem drasticamente a população hospedeira,
3. Inimigo natural atua eliminando tanto indivíduos infectados (doentes) como sadios (suseptíveis ou não ao patógeno),
4. Inimigo natural é transmissor ou dispersor (não exclusivo) do patógeno.
5. Ambos conseguem se manter no ambiente, na ausência do hospedeiro principal.

DeBach (1964) estabelece que os patógenos de insetos podem prejudicar outros agentes de controle natural indiretamente, reduzindo muito a população hospedeira ou diretamente, infectando-os ou competindo com eles nos tecidos do hospedeiro.

No presente trabalho o parasitismo por dípteros foi prejudicado em 28,5% pela ocorrência da virose enquanto que, o parasitismo por himenópteros em 9,3%. A Tabela 7 mos-

tra as porcentagens de mortalidade em dípteros e himenópteros nas diferentes coletas.

TABELA 7. Porcentagens de mortalidade em dípteros e himenópteros parasitos de *A. argillacea* durante o mês de abril de 1979, Campinas, SP.

Coleta	Nº de parasitos observados		% de mortalidade	
	DIP.	HYM.	DIP.	HYM.
I	17	7	0,0	0,0
II	122	47	17,2	10,6
III	207	20	28,5	10,0
IV	119	9	54,6	11,0
V	88	5	14,7	0,0
Total	553	88	28,57	9,3

Dentre os dípteros, tanto os Tachinidae como os Sarcophagidae foram prejudicados. Nos himenópteros, o dano foi verificado apenas para os Icneumonídeos e hiperparasitos calcidídeos, cujos casulos não originaram imagos. Essas estimativas devem ainda estar subestimadas, uma vez que registram apenas os parasitos que conseguiram terminar o desenvolvimento larval, deixar o hospedeiro e empupar, para finalmente não emergir. Aqueles que por falta de condições adequadas dos tecidos do hospedeiro não passaram do estágio larval, acabaram não registrados, e a mortalidade do hospedeiro foi atribuída ao VPN. Para os Chalcididae endoparasitos e para os ectoparasitos Eulophidae, a extensão do prejuízo pela ocorrência da

virose só poderia ser verificada em condições de laboratório, uma vez que os primeiros emergem diretamente das pupas de A. argillacea e os ectoparasitos tiveram uma ocorrência virtual. A ocorrência dessas mortalidades nos parasitos pode sugerir uma interação recente entre esses entomófagos e o patógeno. Caso contrário, interações bastantes co-evoluídas, permitiriam ou uma maior seletividade para hospedeiros sadios ou uma aptidão para desenvolverem-se em indivíduos doentes. Segundo DeBach (1964), alguns parasitos selecionam hospedeiros infectados com microsporídio, Apanteles glomeratus seleciona os sadios e o Tachinidae Parasetigena segregata Rond. seleciona os sadios ou ligeiramente infectados. Tais estratégias, envolvendo seleção de hospedeiros são bastante adaptativas, evitando os efeitos desvantajosos do hospedeiro inadequado e aumentando a aptidão da espécie.

Estudos histológicos em pupas de Tachinidae não evidenciaram uma ação direta do patógeno nos tecidos desses parasitos.

A ocorrência de grande número de poliedros nas pupas de A. argillacea, hospedeiros desses parasitos, reforça a idéia de uma competição por tecidos, acarretando num substrato insuficiente para o completo desenvolvimento. O fato de não se ter detectada diferença significativa entre os tamanhos dos pupários de dípteros não emergidos devido ao VPN e os emergidos, sugere que devem ocorrer problemas mais de ordem qualitativa e no final do desenvolvimento pupal.

A principal forma de dispersão do VPN de A. argillacea, observada no presente trabalho foi atribuída aos dípteros. Adultos foram observados no campo, alimentando-se ex

clusivamente em larvas, pré-pupas e pupas (Fig. 4), total ou parcialmente mutiladas, mas sempre com o VPN. Outras vezes, visitando e alimentando-se em abrigos vazios de pupas, ou restos liquefeitos sobre as folhas; sempre com poliedros. A ocorrência de poliedros intactos nas fezes dos Tachinidae e Sarco - phagidae, confirma o papel desses parasitos como dispersores da doença. Também, foi observada a presença de poliedros no mecônio dos himenópteros, no entanto, a possibilidade de que as fêmeas sejam vetoras no momento da oviposição não foi demonstrada.

B. Predadores

Os principais predadores observados no presente trabalho, foram hemípteros e vespas (Tabela 8).

TABELA 8. Predadores observados, porcentagens aproximadas de ataque em A. argillacea (Abril, 1979, Campinas, SP)

Predador	% de observação
HEMIPTERA	
Pentatomidae	
Asopinae	28,0
Pentatominae	8,5
Reduviidae (ninfas)	19,0
HYMENOPTERA	
Vespidae	
<u>Polybia occidentalis</u> (White)	11,0
<u>Polistes canadensis</u> (Linn.)	5,5
<u>Polistes</u> sp	8,0
NEUROPTERA	
Chrysopidae	
<u>Chrysopa</u> sp	5,0
COLEOPTERA	
Tenebrionidae	3,0
Coccinellidae	11,0

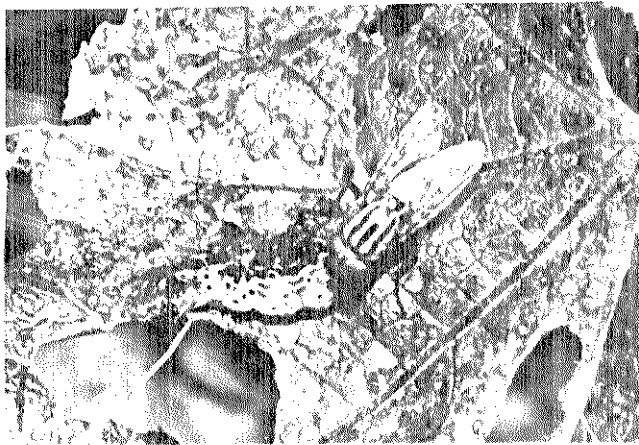
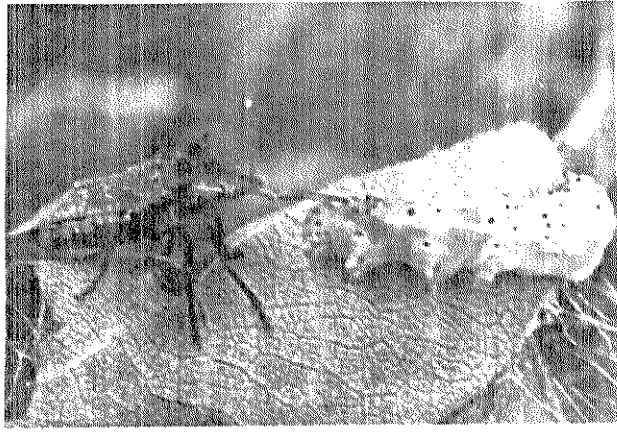


Fig. 4: Sarcófagídeo alimentando-se de lagarta de A. argillacea morta por VPN, no campo.

tactos nas fezes o que pode ser explicado, por não possuírem pH intestinal alcalino, necessário para a dissolução desses corpos de inclusão.

Muitos outros restos de larvas, pré-pupas ou pupas, parcialmente comidos e com VPN, foram observados, porém por não ter sido possível associá-los a qualquer predador, não foram computados como mortalidade devido a esse ou aquele fator.

Uma terceira categoria de insetos de importância na dispersão do vírus no campo, foi a dos necrófagos; principalmente representada pelas formigas. Grupos grandes, de 40 à 60 operárias e soldados de Pheidole sp (Myrmicinae), ou grupos menores, de 8 à 12 operárias de Conomyrma sp (Dolichoderinae), foram observados associados à abrigos nas folhas onde haviam pupas e larvas ou restos mortos por VPN. Tal categoria, deve ser a principal responsável pelos abrigos de pupas vazios e restos liquefeitos de larvas observados sobre as folhas, uma vez que retalham e removem os indivíduos mortos pela virose.



(47)

Fig. 5: Percevejo predador alimentando-se de larva de A. argillacea doente por VPN, no campo.



Fig. 6: Percevejos predador e necrófago, alimentando-se de larvas infectadas por VPN, no laboratório.

As porcentagens de ataque assinaladas, não se referem absolutamente ao papel desses predadores na dinâmica da população observada, e sim proporções diferentes no ataque, quanto a frequência observada. Avaliações quantitativas sobre a predação, têm demonstrado que dependendo das dimensões particulares do habitat, os predadores agindo como polípagos ou generalistas, podem promover um controle mais consistente e completo que os especialistas (parasitos), no entanto não são tão capazes de exercer regulação, uma vez que atuam mais de uma maneira independente de densidade (Huffaker et al., 1969; Ehler & van der Bosch, 1974).

No campo, a predação pelos hemípteros (Fig. 5) foi observada ser sempre em larvas atacadas pelo VPN, embora na maioria das vezes nos estágios iniciais da doença. Quando criados no laboratório com larvas infectadas, os percevejos não apresentaram quaisquer sintomas patológicos, desenvolvendo-se e reproduzindo-se de forma aparentemente normal (Figs. 6a, 6b).

Vespas foram observadas no campo, predando larvas sadias e com VPN e transportando-as, muito provavelmente para os seus ninhos. Polistes spp (Fig. 7) mastigavam as larvas fazendo com o auxílio do primeiro par de pernas, uma bolinha, para depois transportá-las. Essas vespas não se alimentaram no laboratório nem de larvas sadias ou doentes.

Coleópteros (Fig. 8) e Chrysopa sp, foram criados alimentando-se de larvas e pré-pupas na fase pré-mortal da doença, não mostrando sinais de que o alimento não fosse adequado.

Todos esses predadores apresentavam poliedros in

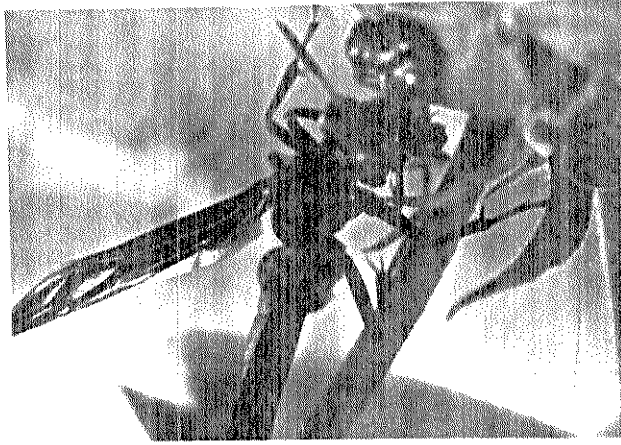


Fig. 7: Polistes sp predando larva de A. argillacea com VPN, no campo.



Fig. 8: Tenebrionídeo alimentando-se de pré-pupa de A. argillacea com VPN, no laboratório.

4.2. Estudos de laboratório

4.2.1. Sintomatologia externa

Durante muitos anos, uma doença comum em larvas do bicho da seda e outros insetos, foi conhecida apenas pelos seus sintomas, e referida como icterícia ("Jaundice"), doença da murcha ("Wilt disease"), doença de subir ("Wipfelkrankheit") ou doença dos poliedros ("Polyederkrankheit") (Cornalia, 1856; Maestri, 1856; Chapman & Glaser, 1915; Aizawa, 1963; Smith, 1967). Bargold (1947) conseguiu demonstrar por ultracentrifugação analítica e micrografias eletrônicas que trata-se de uma doença virótica, hoje conhecida por poliedrose nuclear.

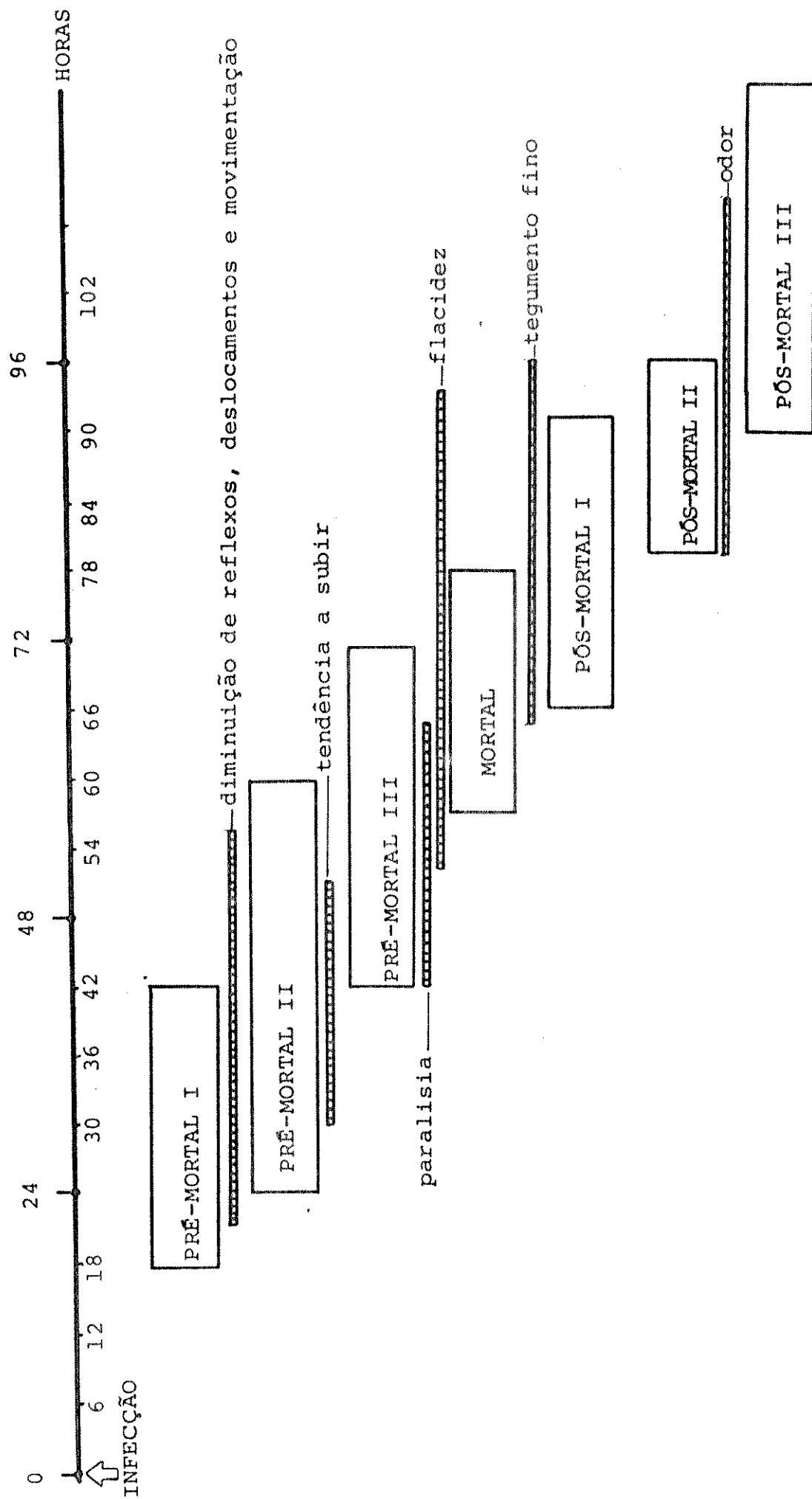
De acordo com Drake & McEwen (1959) e Vail & Hall (1969b), mesmo dentro de uma mesma espécie, encontram-se variações na progressão da infecção pelo VPN e portanto, no aparecimento de sintomas externos.

Larvas de 6º estágio de A. argillacea, quando sujeitas a altas doses de VPN apresentaram no laboratório, sintomas semelhantes aos observados no campo, com mortalidade em menos de 4 dias. O desenvolvimento da infecção, foi marcado por sinais tanto comportamentais quanto morfológicos, sendo possível uma caracterização da cronologia da virose, por esses parâmetros. As três fases principais foram bastante evidentes: a PRÉ-MORTAL, a MORTAL e a PÓS-MORTAL. Essas por sua vez, puderam ainda ser subdivididas quando melhor caracterizadas (Tabela 9). Dependendo das condições particulares de cada caso, o tempo necessário para as diferentes fases ou divisões, variou marcadamente (Fig. 9).

TABELA 9 - Sequência de sintomas externos observados em larvas de A. argillacea atacadas por VPN no laboratório

ASPECTOS	FASE PRÉ-MORTAL			FASE		FASE PÓS-MORTAL		
	I	II	III	MORTAL	I	II	III	
DESLOCAMENTO E MOVIMENTAÇÃO VOLUNTÁRIA	lenta, pouco alterada	ausente, só involuntária	ausente, paralisia	-	-	-	-	
ALIMENTAÇÃO	normal	pouca ou ausente	ausente	-	-	-	-	
REFLEXO DE FUGA	lento	mais lento e fraco	ausente	-	-	-	-	
VENTRAL	pouco ou não alterada	levemente esbranquiçada	esbranquiçada	creme amarelado	marron claro	marron escuro	preto	
COR DORSAL		pouco ou não alterada	levemente escurecido	marron	marron escuro			
BRILHO	normal	diminui	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
CONSISTÊNCIA DO CORPO	normal	normal	pouco flácida	flácida	flácida	pastosa	dura e seca	
OUTROS SINTOMAS	poliedros nas fezes	corpo levemente inchado	corpo inchado	corpo bastante inchado, pendura-se	tegumento transparente	tegumento -rompe-se fácil, forte odor	forte odor	
tendência a subir poliedros livres na hemocèle								

Figura 9 - Sequência cronológica de sintomas para larvas de A. argillacea infectadas por VPN.



Os sintomas comportamentais na fase pré-mortal, foram de certa forma sutis, e variaram sob determinadas condições, à despeito da própria progressão da doença.

O deslocamento ou movimentação voluntária cessou normalmente 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. De qualquer forma, uma paralisia irreversível antecedeu a morte, podendo durar de poucas horas à meio dia. Muitas vezes, num último deslocamento, as larvas sabiam pela folhagem ou paredes do recipiente, com a perda do tono muscular nas pernas torácicas (pré-mortal III) ficaram penduradas apenas pelas garras das falsas pernas abdominais, formando-se o quadro sintomatológico clássico (Fig. 10), citado por muitos autores (Chapman & Glaser, 1915; Tanada, 1959; Aizawa, 1963; De Bach, 1964; Smith, 1967; Vail & Hall, 1969a).

Deslocamentos rápidos de fuga, ou movimentos bruscos com a cabeça em resposta à estímulo de toque, rarearam entre 36 e 48 h. e desapareceram entre 48 e 60 h. após a infecção. Tal sintoma também foi citado precedendo a morte por VPN em Trichoplusia ni (Drake & McEwen, 1959).

A alimentação foi normalmente abandonada entre 24 e 48 h., variando também um pouco com o período normal de maior atividade das larvas. Vail e Hall (1969b) mostraram variações individuais na alcalinidade do tubo digestivo, podendo causar diferentes níveis de dissoluções dos poliedros ingeridos e a possível inativação de parte das partículas virais; o que determinam velocidades diferentes na infecção. Não são evidentes maiores sintomas associados ao trato digestivo, embo

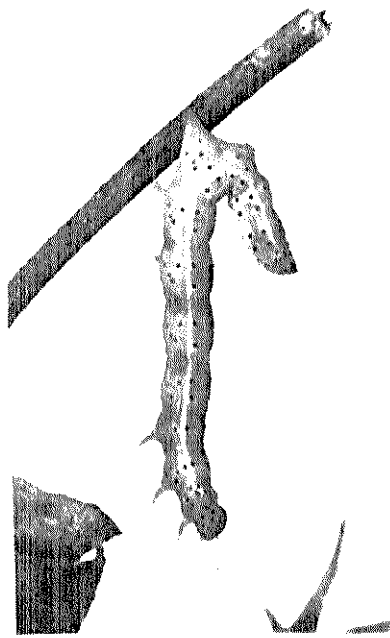


Fig. 10 - Sintoma comportamental em larva de A. argillacea infectada por VPN.

ra este seja apontado como o primeiro sítio da replicação viral (Bird, 1949; Drake & McEwen, 1959; e Adams et al., 1977). Poliedros nas fezes e uma ocasional disenteria foram observados respectivamente no início e fim da fase pré-mortal.

Larvas sadias de A. argillacea podem apresentar predominância de coloração verde ou preta na região dorsal, interpretada por Calcagnolo & Sauer (1955) como um fenômeno dependente da densidade populacional. As alterações da coloração descritas na tabela 9, se enquadram às larvas de predominância de cor verde, uma vez que foram as consideradas normais por esses autores.

Durante o desenvolvimento da virose, as larvas escuras sofreram menos alterações na coloração e brilho do dorso do que as claras. Independente do tipo de larvas, tais alterações ocorreram devida a infecção no tecido adiposo e na epiderme. Tais alterações internas justificam ainda a típica flacidez observada.

Flacidez e inchaço ocorreram decorrentes 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 h após a infecção, o corpo rompeu-se facilmente, os tecidos encontravam-se indistintos, com consistência pastosa ou até liquefeitos, e um forte odor característico podia ser percebido.

Como salientou Bergold (1958), sintomas externos não são sempre suficientes para um diagnóstico apurado da poliedrose nuclear, devendo em certos casos ser acompanhado de estudos à microscopia. A presença de poliedros foi verificada na hemolinfa, tecido adiposo de larvas recém mortas e nos te-

cidos decompostos nas fases pós-mortais durante o presente trabalho.

A sequência de sintomas em larvas do 1º ao 5º estádios, foi bastante semelhante à descrita para o último. Larvas até o 4º estágio no entanto, pareceram ter as fases pré-mortais e mortal relativamente mais rápidas, provavelmente devido à menor proporção de tecido adiposo em relação aos outros tecidos, o que permitiu degeneração mais rápida. Ainda o fato desse tecido, no último estágio, apresentar células grandes e multinucleadas, poderia determinar uma maior demora no aparecimento dos sintomas.

Larvas infectadas que alcançaram a fase mortal no estágio de pré-pupa e pupa, morreram com aspectos mistos desses estágios (Figs. 11A e B).

Tais situações podem ser explicadas levando-se em consideração que diferentes etapas ocorrem no sistema de controle neuroendócrino que regula a morfogênese a cada muda (Bursell, 1970; Wigglesworth, 1974). A ação direta ou indireta da virose nas células responsáveis pela produção ou regulação do hormônio juvenil e hormônio de muda, deve acarretar diferentes ativações e inibições da metamorfose pupal. Experimentalmente, tem-se conseguido variadas formas intermediárias entre o estágio imaturo e o imago, pela aplicação de substâncias de atividade hormonal ou implantes e ablações de estruturas neuroendócrinas nos insetos (Novák, 1975).

Os sintomas da virose na fase de pupa, não foram exclusivos para a poliedrose nuclear. A cor foi pouco alterada para preto amarronzado e as regiões intersegmentares apresentam-se distendidas e mais claras. Esses mesmos sintomas



B



A

Fig. 11 - Aspectos morfológicos mistos em indivíduos de A. argillacea mortos pelo VPN.

A - pré pupas

B - pupas mal formadas

têm sido observados pelo presente autor em pupas de A. argilla-
cea e outros noctuídeos, mortas por outras infecções ou mesmo
em mortes acépticas.

4.2.2. Histopatologia

A análise histopatológica desenvolvida no presente trabalho, concentrou-se em alguns tecidos da larva de A. argillacea afetados direta ou indiretamente pelo VPN. Algumas das alterações observadas na microscopia óptica e eletrônica mostraram-se associadas aos sinais patológicos externos e a distúrbios fisiológicos, para as diferentes fases pré-mortais.

4.2.2.1. Tecido adiposo

De acordo com Habib (1976) as larvas sadias de A. argillacea apresentam reservas lipídicas na forma de tecido adiposo sub-epidérmico e na cavidade do corpo (visceral). Estes últimos são massas menores de células adiposas com núcleos esféricos e envolvidos por membrana de tecido conectivo.

Com o desenvolvimento da virose o tecido visceral apresentou uma nítida dissociação estrutural. Na fase pré-mortal I da doença, esses gomos adiposos já se apresentaram infectados por poliedros e partículas. Nos núcleos infectados desse tecido, observou-se primeiro um acúmulo de poliedros na região periférica do nucleoplasma (Fig. 12A), circundando restos de cromatina e nucléolo. Com o progresso da infecção, aumentou pouco a quantidade de poliedros que passaram a ocupar quase todo o núcleo promovendo uma visível hipertrofia

(Fig. 12b).

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, estão parcialmente relacionadas aos caracteres de sintomatologia externa como flacidez do corpo e alterações no brilho e coloração do tegumento.

A Figura 13 revela algumas alterações citológicas a nível de microscopia eletrônica, mostrando feixes de partículas replicadas, poliedros estruturando-se e estroma viral nos núcleos deste tecido.

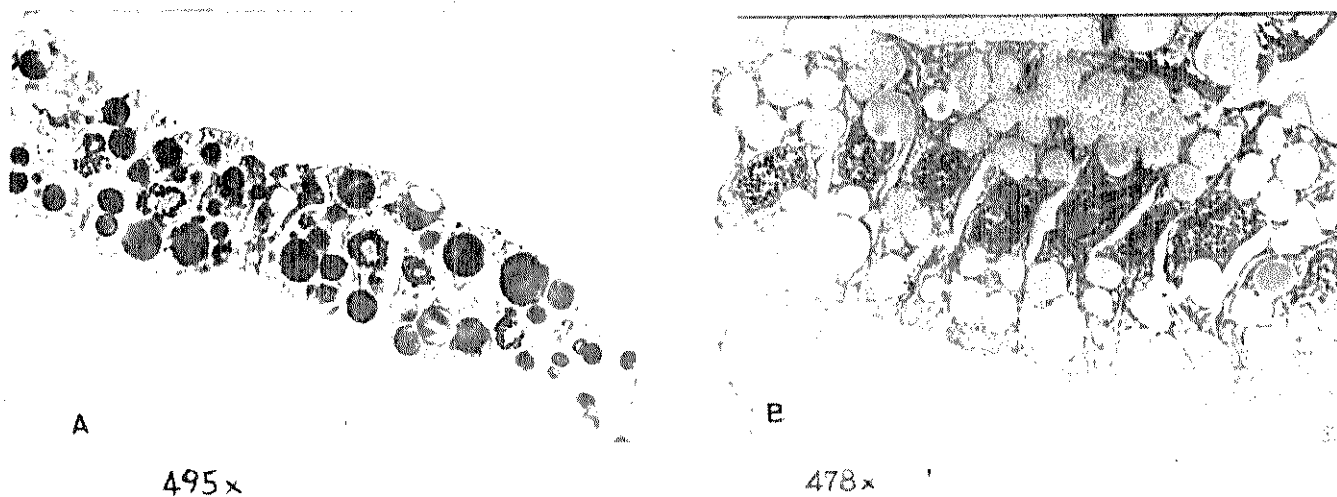


Fig. 12: Cortes no tecido adiposo infectado por VPN

A - distribuição periférica de poliedros nos núcleos.

Fase pré-mortal I.

B - hipertrofia nos núcleos. Fase pré-mortal II.

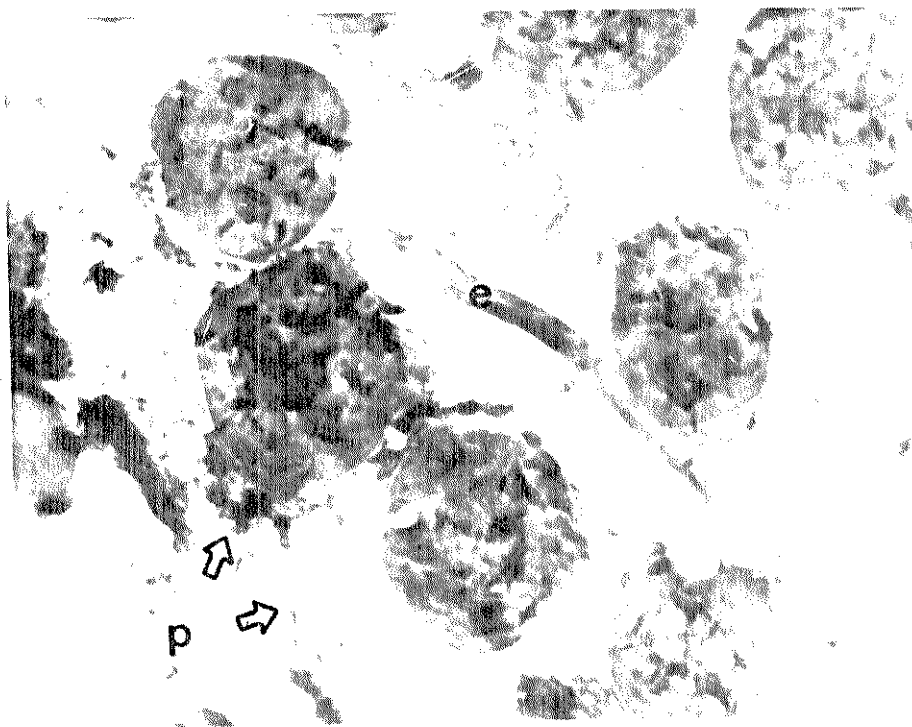


Fig. 13: Eletrografia de núcleo de tecido adiposo de larva ao

A. argillacea infectada pelo VPN

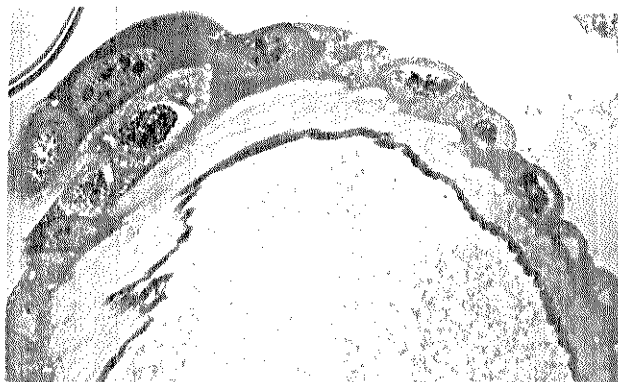
p - poliedros, e - estroma virogênico.

4.2.2.2. Matriz traqueal

Na fase pré-mortal I o epitélio das traquéias já se mostrou infectado por poliedros (Fig. 14). Tanto as traquéias maiores, dissociadas dos tecidos, quanto as menores, mais ramificadas e associadas, apresentaram células achatadas com núcleos grandes e citoplasma granuloso. Embora as traquéias ao redor do tubo digestivo tenham sido indicadas como primeiro sítio do processo de infecção (Bird, 1949), ao menos nessa fase 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 (Fig. 15A) e completamente destruídos (Fig. 16). Este tecido em geral, quando comparado com o adiposo, indicou uma infecção posterior, situação semelhante à encontrada por Drake & McEwen (1959) para Trichoplusia ni.

Asfixia ou ambientes com baixos teores de Oxigênio, são potencializadores da VPN de A. argillacea-(capítulo 4.2.5.4.). O comprometimento da matriz traqueal nas fases pré-mortais, no entanto, não deve estar relacionado com menor eficiência nas trocas gasosas, que ocorrem apenas a nível dos tecidos nas traqueolas, acelulares.



412x

Fig. 14: Corte transversal em traquéia infectada por VPN. Fase pré-mortal I.

4.2.2.3. Túbulos de Malpighi

Nas larvas de A. argillacea, a infecção pelo VPN foi bastante drástica nos túbulos de Malpighi. O epitélio apareceu infectado no início da virose e perdeu sua estrutura logo na fase pré-mortal I, apresentando uma desorganização celular decorrente da infecção. Núcleos e restos celulares na forma de amontoados citoplasmáticos foram encontrados aderidos à membrana peritoneal, no entanto, uma outra parte do epitélio já se encontrava desfeita e livre na luz do túbulo (Fig. 15A).

Nas fases pré-mortais II (Fig. 15B) e III (Fig. 16), o epitélio mostrou-se mais fino, com poucos núcleos e bastante estriado; ainda aderido à membrana peritoneal aparentemente intacta. Notou-se ainda na fase III, na luz do túbulo, cristais provavelmente de Oxalato de Cálcio. Embora o significado da excreção de oxalatos seja ainda incerto e frequentemente associado à eliminação de ácido oxálico do alimento ou do metabolismo (Wigglesworth, 1974), seu acúmulo dentro dos túbulos evidencia também o comprometimento funcional desse órgão.

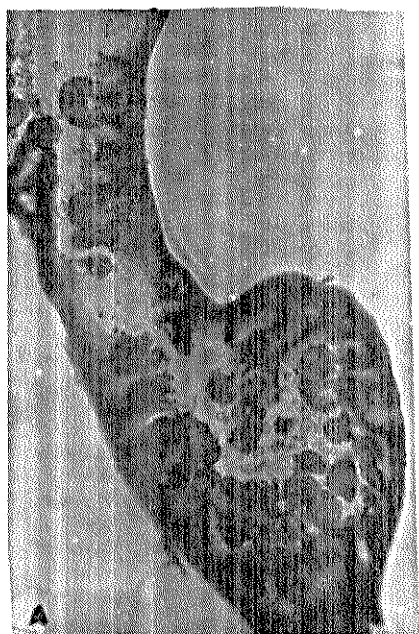


Fig. 15: Alterações histológicas detectadas em túbulos de Malpighi infectados por VPN

A - Fase pré-mortal I. 412x

B - Fase pré-mortal II. 445x

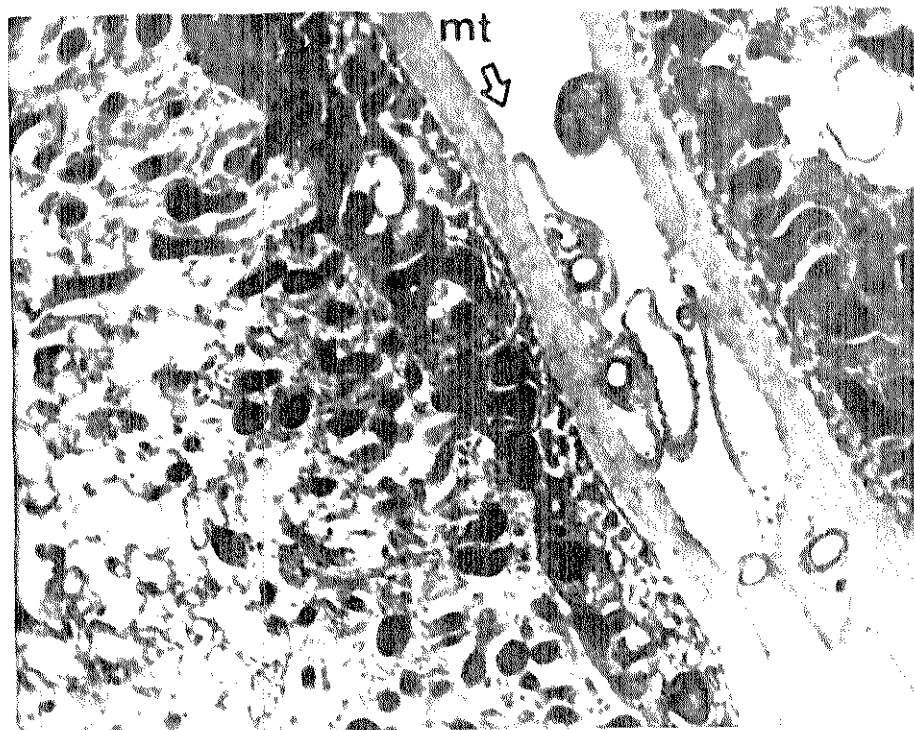


Fig. 16: Túbulos de Malpighi na fase pré-mortal III da virose.
mt - matriz traqueal.

4.2.2.4. Glândula labial

As larvas de A. argillacea apresentam duas glândulas labiais, na forma de tubos simples e alongados, estendendo-se posteriormente desde a cavidade bucal até o 6º segmento abdominal (Habib, 1978b). Tais glândulas, associadas à produção de seda, apresentaram sintomas típicos de infecção apenas na fase pré-mortal III da virose.

No início do aparecimento dos sintomas externos na larva, essas glândulas apresentaram-se ainda pouco alteradas, as células com o citoplasma ainda denso e os núcleos pouco hipertrofiados. Na fase pré-mortal III, os núcleos encontraram-se bastante hipertrofiados, com poucos poliedros e granulações no nucleoplasma. O citoplasma bem menos denso apresentou grande vacuolização na região periférica e descontinuidade das membranas celulares (Fig. 17).

Na microscopia eletrônica foram evidenciadas na fase pré-mortal II, vacuolização no citoplasma (Fig. 18) e presença de partículas no núcleo, associadas à heterocromatina.

As alterações patológicas observadas nas glândulas de seda parecem não perturbar de todo seu funcionamento. Em condições naturais, observou-se que larvas de 6º estágio atacadas pela virose, não são tão hábeis na construção dos abrigos foleares onde empupam, no entanto ainda produzem os fios de seda.

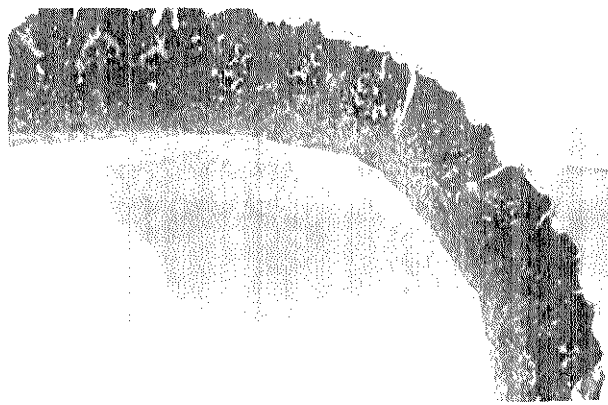


Fig. 17: Corte transversal em glândula labial de A. argillacea infectada por VPN. 445x



Fig. 18: Eletromicrografia de núcleo de glândula labial de larva de A. argillacea infectada por VPN
p - partículas.

4.2.2.5. Gânglios nervosos

Histologicamente os gânglios nervosos da larva de A. argillacea apresentam uma bainha externa ou neurolema, revestindo uma camada externa de células nervosas imaginais pequenas e camadas internas de células larvais, maiores. No centro ocorrem duas massas medulares, as neurôpilas (Habib, 1976).

Na fase pré-mortal I da virose, não foram detectados sinais patológicos no gânglio nervoso. No entanto, na fase II pode-se notar grande número de partículas virais e elementos fibrilares nos núcleos das células nervosas larvais (Fig. 19). Na fase posterior, os núcleos dessas células próximos à neurôpila, encontraram-se tomados pelos poliedros (Fig. 20), apresentando vacuolização e degeneração da carioteca. Outros autores tem também demonstrado a infecção pelo VPN nos núcleos de células ganglionares, cordão nervoso, neurônios, perineura e neurilema em outros hospedeiros (revisão em Mathad et al., 1968).

Uma vez demonstrada a infecção por partículas e poliedros nos gânglios nervosos da larva de A. argillacea, pode-se associá-la aos caracteres comportamentais indicados como sintomatológicos. O comprometimento do tecido nervoso, tardio em relação a outros tecidos, deve permitir ainda que após a contaminação o patógeno tenha mais tempo para a infecção e replicação. Em algumas viroses de insetos como a paralisia aguda das abelhas, a pronta infecção dos gânglios nervosos cerebrais causa a morte rapidamente (Smith, 1967), sendo

que muito pouco vírus é encontrado no hospedeiro.



*Fig. 19: Nucelocapsídeos no núcleo de células nervosas larvais.
Fase pré-mortal II.*

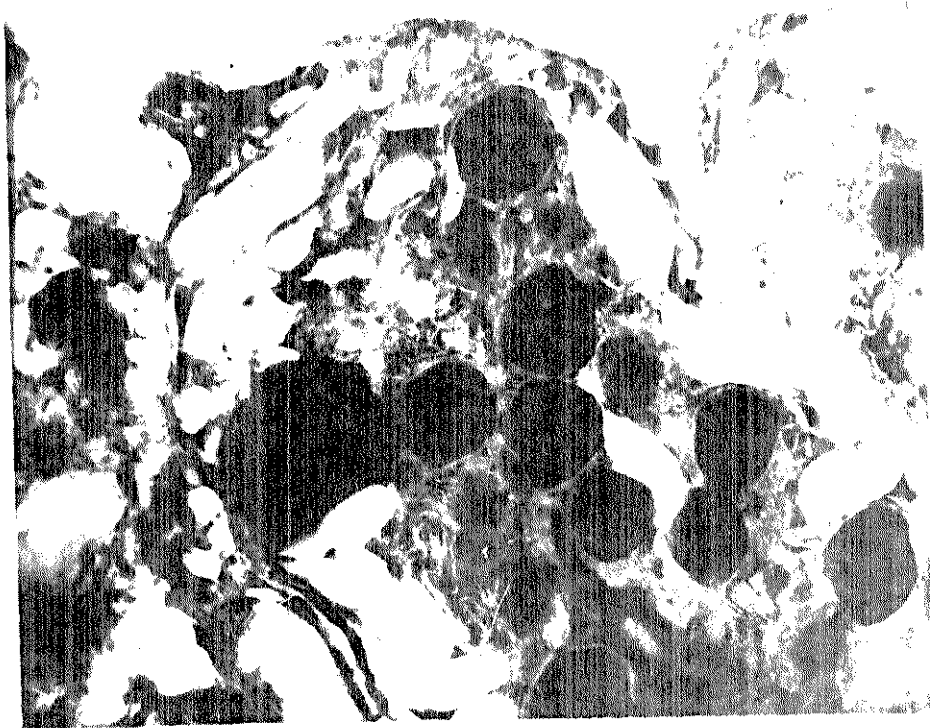


Fig. 20: Núcleo de célula nervosa larval do gânglio de A. argillacea. Fase pré-mortal III.

4.2.2.6. Epiderme

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; Adams et al., 1968; Hamm, 1968; Mathad et al., 1968; Vail & Hall, 1969a e Livingston & Yearian, 1972). A infecção é bastante similar à que ocorre no tecido adiposo sub-epidérmico, com grande número de poliedros nos núcleos já na fase pré-mortal I. Pouco antes da morte este tecido já se encontra tão desintegrado que a cutícula rompe-se facilmente liberando grande parte do conteúdo corporal liquefeito.

As Figuras 21 e 27 indicam que na fase pré-mortal III o epitélio já se desintegrou, formando junto à cutícula um aglomerado de células tegumentares, cenócitos e outros tipos celulares repletos de poliedros.

Segundo Imms (1964) o tegumento é responsável por 2/3 da coloração dos insetos: pigmentos permanentes na cutícula e grânulos e gotículas de gordura nas células da epiderme. Dessa forma pode-se atribuir em parte à epiderme as mudanças na coloração das larvas até antes de entrarem na fase pré-mortal III. Mudanças posteriores seriam atribuídas aos fatores sub-epidérmicos como as mencionadas alterações no tecido adiposo e outras na hemolinfa.

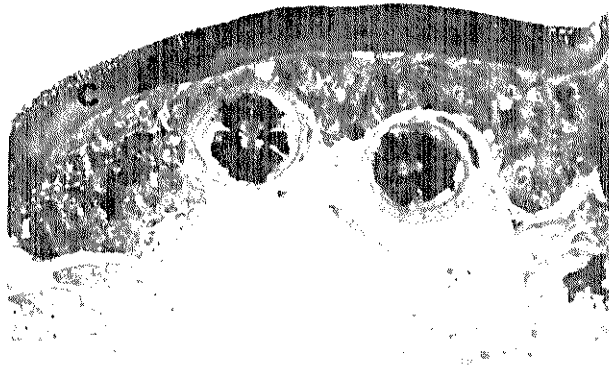


Fig. 21: Tegumento de A. argillacea; fase pré-mortal III.
c - cutícula. 162×

4.2.2.7. Tubo digestivo

No presente trabalho foram feitos estudos sobre alterações histológicas no esôfago e intestino médio. No primeiro, observado apenas para a fase pré-mortal III, foram detectados nucleocapsídeos nos espaços canaliculares e estromas virogênicos (Fig. 22). Os núcleos das células epiteliais apresentaram vacuolização, cromatina amorfa, elementos fibrilares, descontinuidade de carioteca e partículas em feixes (Fig. 23).

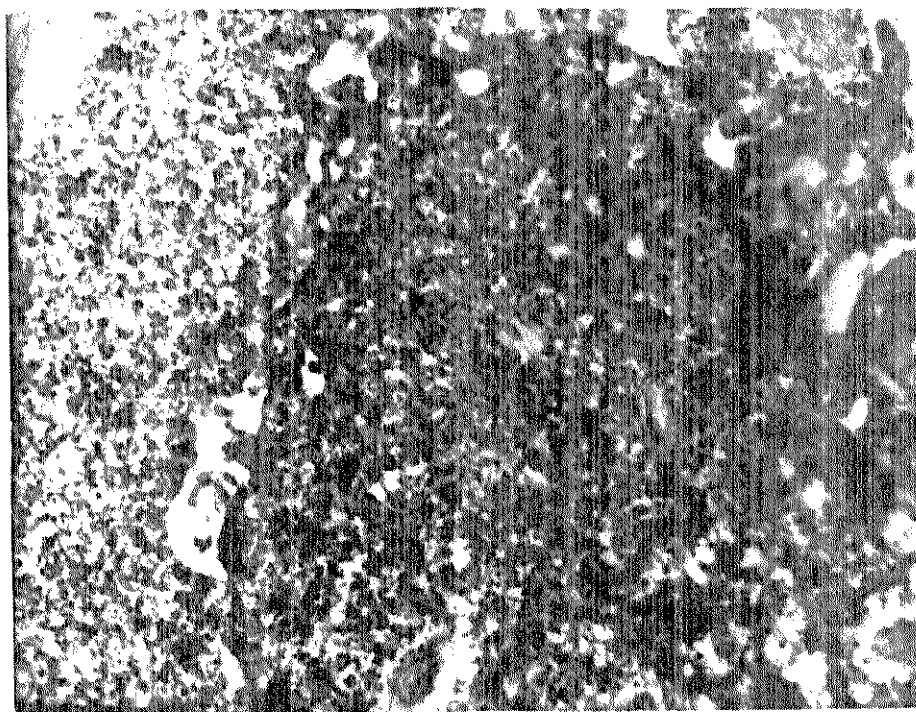
Quando comparado com outros tecidos, o esôfago não representa um sítio muito importante de replicação viral. No entanto, seu comprometimento, verificado eletrofisiologicamente no presente trabalho, deve determinar a parada alimentar.

Nas células do intestino médio foram observadas partículas associadas a região da membrana plasmática basal das células (fase pré-mortal II) (Fig. 24) e no citoplasma, próximo ao núcleo (fase III) (Fig. 25). Não foram observados poliedros nos núcleos deste tecido, coincidindo com alguns autores (Livingston & Yerian, 1972; Mathad et al., 1968 e Andrade et al., 1978) que identificam 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 hemócele por bactérias de luz intestinal, o que acarretaria em rápida septicemia.



(73)

*Fig. 22: Nucleocapsídeos no esôfago de A. argillacea.
m - músculo, mi - mitocôndria, n - núcleo.*



*Fig. 23: Núcleo de célula epitelial do esôfago de A. argillacea.
Fase pré-mortem III.
p - partículas.*

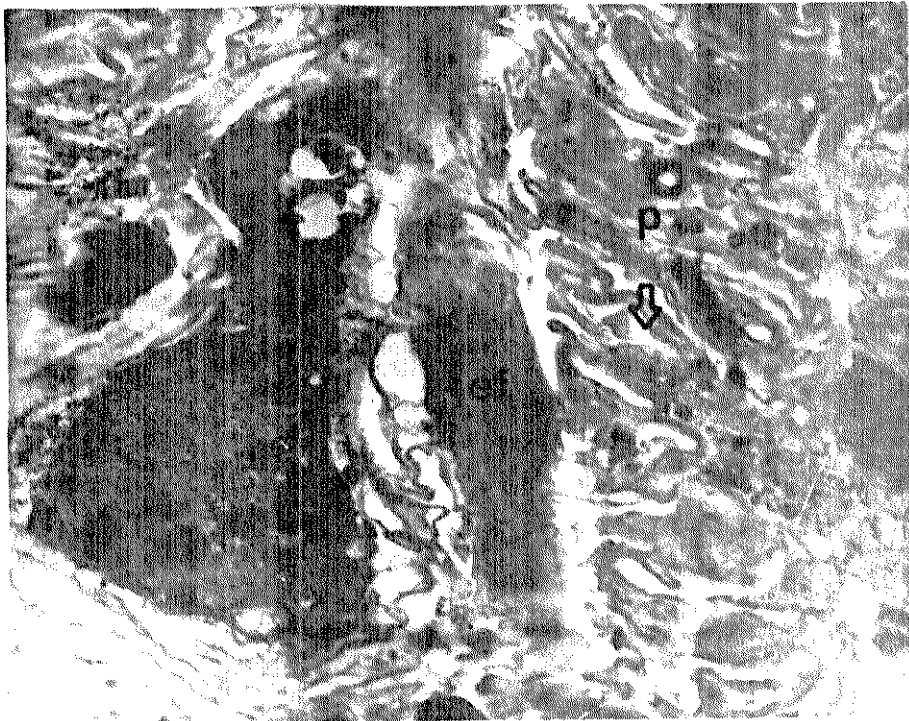


Fig. 24: Intestino médio de A. argillacea; fase pré-mortar II.
p - partículas, ef - elementos fibrilares.

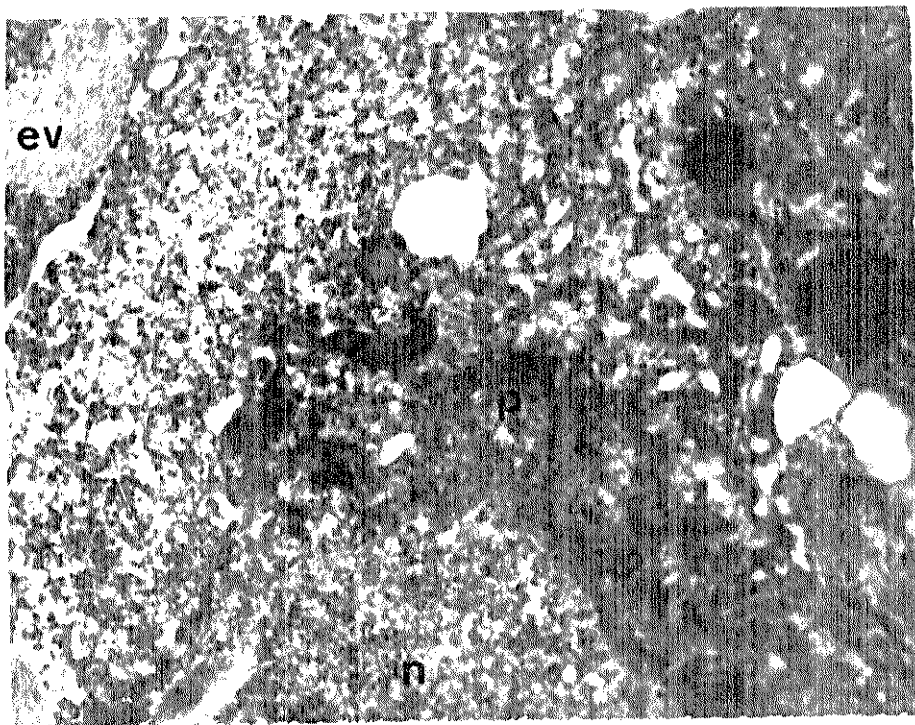


Fig. 25: Intestino médio de A. argillacea; fase pré-mortar III.
p - partículas, n - núcleo, ev - estroma virogênico.

4.2.2.8. Músculos

A análise histológica nos músculos esqueléticos, na fase pré-mortal III, indicaram seus núcleos também como centros de formação de poliedros. Nesta fase da virose, foi observado que os músculos laterais transversos podem perder seus pontos de ligação com os apodemas. Os sarcolema encontram-se também alterados deixando as fibras frouxas entre si. Poliedros virais são visíveis nos núcleos (Fig. 26). Alterações semelhantes também foram observadas para larvas de S. frugiperda atacadas pelo VPN (Hamm, 1968 e Andrade et al., 1978).

Apesar das alterações histológicas observadas na musculatura esquelética, as larvas atacadas pela virose ainda apresentam movimentos e podem até se deslocar muito, embora lentamente. Acredita-se que a paralisia geral que normalmente antecede a morte, esteja portanto mais relacionada à infecção no sistema nervoso, o qual depende mais de um complexo sistema de integração. A flacidez típica, por sua vez, estaria associada ao estado patológico do sistema muscular.

4.2.2.9. Hemócitos

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 mm^3 . Nas larvas de 6º estágio atacadas pelo VPN, poliedros livres na hemolinfa puderam ser observados, a partir da fase pré-mortal III. No final dessa fase todos os hemócitos apresentaram-se com núcleos repletos de poliedros e citoplasma degenerados (Figs. 27 e 28). Nessa situação não são mais típicos e não puderam ser classificados. A hemolinfa apresentou-se viscosa, de cor esbranquiçada e com o volume reduzido.

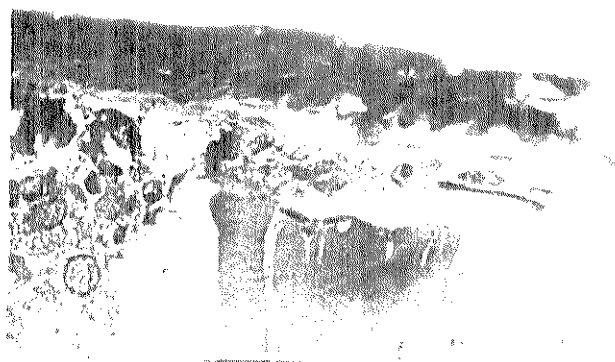


Fig. 26: Musculatura transversal de A. argillacea. Fase pré-mortal III. 445x

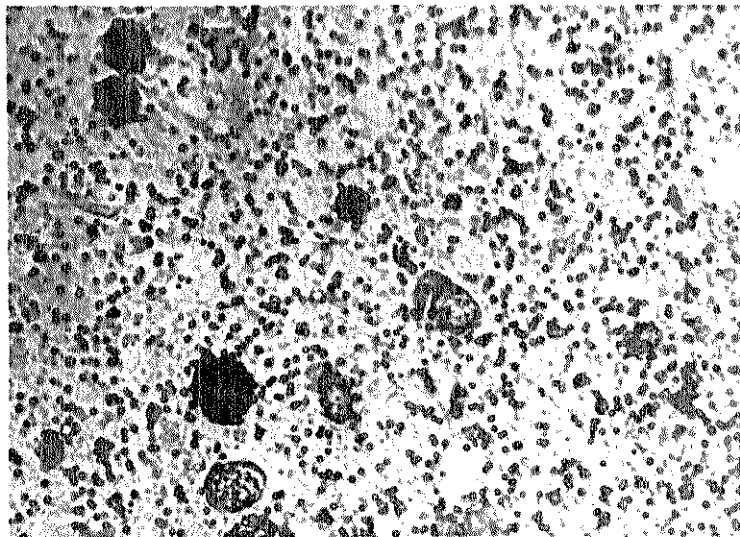
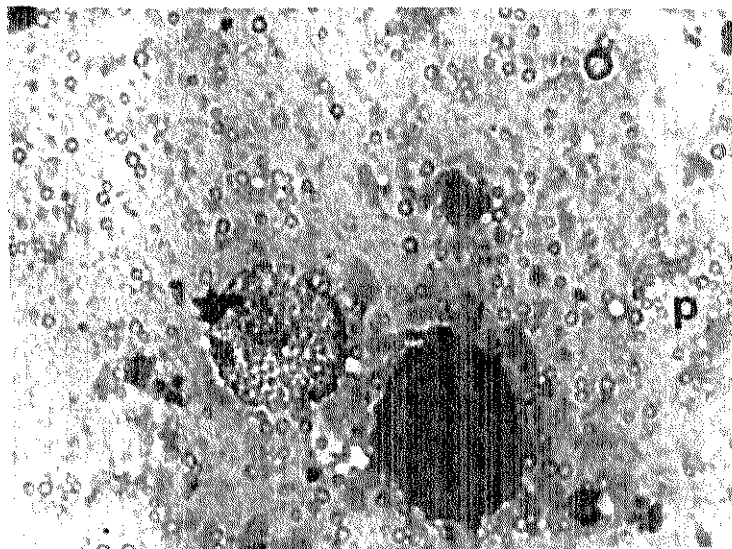


Fig. 27: Aspecto geral da hemolinfa de A. argillacea. Fase pré-mortal III.



*Fig. 28: Hemócitos da larva de 6º estágio de A. argillacea infectados pelo VPN.
p - poliedros.*

4.2.3. Estudos morfométricos de poliedros e nucleocapsídeos

Os vírus causadores da poliedrose nuclear e granulose (Baculovirus spp; Baculoviridae) são também identificados com base na morfologia dos nucleocapsídeos e corpos de inclusão (Summers, 1975; Wildy, 1971, apud 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).

No presente trabalho, tanto partículas isoladas quanto em feixes foram detectadas nas purificações. O tratamento alcalino, além da dissolução dos poliedros, removeu também a maioria dos envelopes virais (71,2%). Partículas individualmente envelopadas constituíram 17,5% e em feixes pequenos (2 à 3 partículas) com envelope parcialmente dissolvidos, 11,3% (Fig. 29). Para estudos de susceptibilidade ou aplicações para controle, uma preparação com essas características seria pouco apropriada, devido à pequena quantidade de partículas com envelope (infectivas).

As partículas virais observadas nos cortes histológicos apresentaram-se também individualmente, em feixes ou em vesículas, não imersas em matriz proteica (Fig. 30). Diversos autores têm associado essas formas às infectivas (Tanada & Leutenegger, 1970; Harrap, 1970; Summers, 1971 e Hunter et al., 1975).



Fig. 29 - Nucleocapsídeos do VPN de A. argillacea, em preparações purificadas, 174.564x

A. isolado, sem envelope

B. isolado, com envelope

C. em feixe, sem envelope

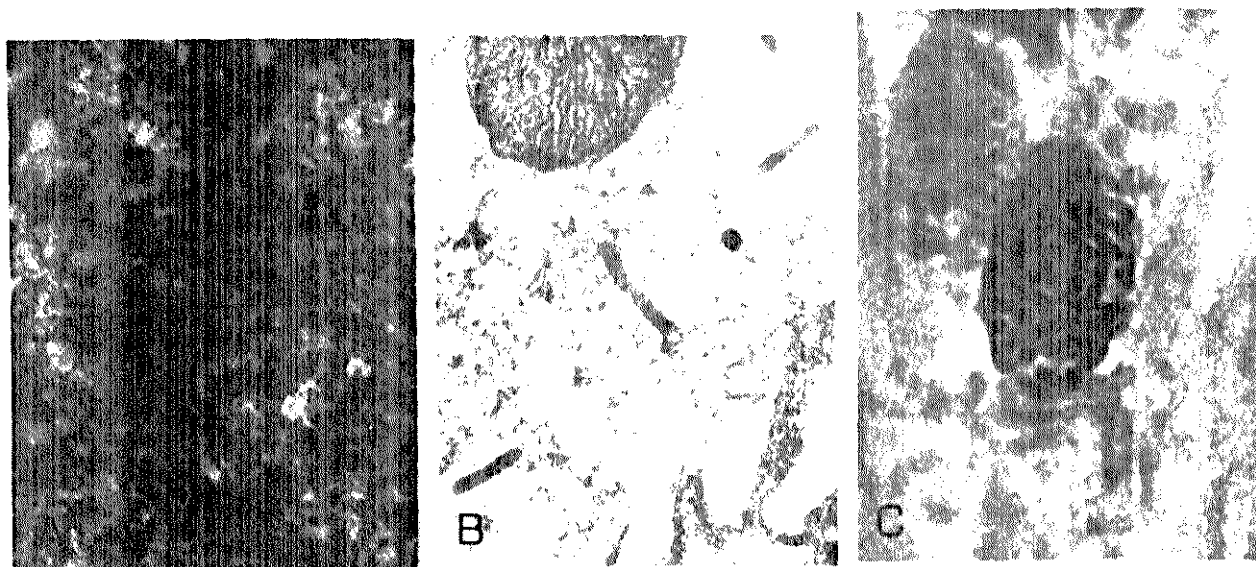


Fig. 30 - Nucleocapsídeos do VPN de A. argillacea, em cortes ultrafinos

A. em feixes no nucleoplasma, 50.204x.

B. isolados no citoplasma, 58.302x.

C. em vesículas no citoplasma, 58.302x.

Os corpos proteicos 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 (Fig. 31). Nos cortes histológicos apareceram também irregulares, por vezes redondos, 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.

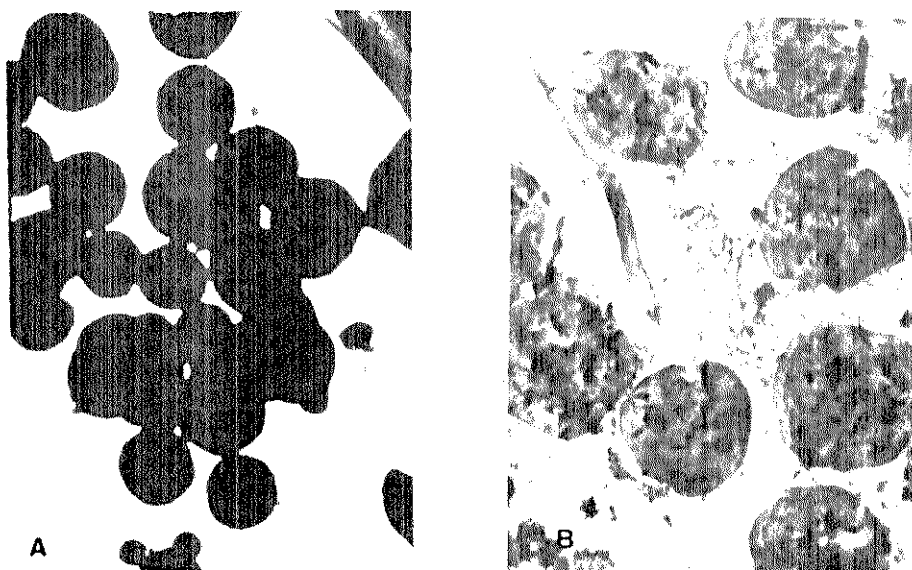


Fig. 31 - Poliedros de VPN de A. argillacea

A. Preparação semi-purificada, 8.640x.

B. Corte histológico, 15.540x.

A Tabela 10 apresenta os valores médios das medidas de poliedros e nucleocapsídeos, observados em preparações purificadas do CPN de A. argillacea.

Tabela 10 - Diâmetro de 99 poliedros (μm) e diâmetro e comprimento de 50 nucleocapsídeos (nm) do VPN de A. argillacea

POLIEDROS		NUCLEOCAPSIDEOS			
	diam.	Com envelope		Sem envelope	
		Comp.	diam.	comp.	diam.
$\bar{X} \pm$	1,60 $\pm$	311,35	102,02	297,54 $\pm$	63,07 $\pm$
e.p.	0,02	3,05	2,09	2,92	1,78
max.	2,11	368,3	119,1	346,65	97,49
min.	1,1	264,1	83,2	259,85	21,66

Segundo Bergold (1963), Borrelinavirus (= Baculovirus) causadores da VPN, apresentam corpos de inclusão variando entre 0,5 a 15 μ de diâmetro e partículas nuas entre 20 a 70 nm de comprimento. De acordo com os presentes dados, o VPN de A. argillacea enquadra-se nesses parâmetros. As medidas de partículas purificadas, sem envelope, diferiram no entanto das encontradas pelo presente autor para o VPN de D. juno juno (Nymphalidae) (245,31x45,82nm) (Andrade, 1980) e assemelharam-se às encontradas para o VPN de S. frugiperda (Noctuidae) (Andrade et al., 1978), o que poderia ser explicado pela proximidade filogenética entre hospedeiros de uma mesma família.

Bergold (1963) salienta que a técnica de contração negativa provoca algumas alterações nas partículas, que apresentam-se menores nas purificações do que quando oclusas nos poliedros (perdem 1/3 do diâmetro). As observações do pre

sente trabalho indicaram o contrário, coincidindo com o encontrado por Ongarelli (1979) para o VPN de B. mori. Segundo esse autor, tal fato poderia ser devido às forças mecânicas das macromoléculas do poliedro ou a uma oclusão seletiva de partículas menores.

4.2.4. Fisiopatologia

Vários autores têm demonstrado em estudos de Fisiopatologia, a ação da poliedrose nuclear no sistema nervoso de lepidópteros, indicando também patologias afetando funções como locomoção, respiração, circulação e digestão (Breindl, 1938; Lotmar, 1941; Martignoni, 1954 e Benz, 1961; apud Benz, 1963).

4.2.4.1. Fisiopatologia da sensibilidade visual

Os ocelos representam nas larvas de Lepidoptera as únicas estruturas capazes de gerar informações visuais. Podem dessa forma perceber a iluminação do ambiente e suas alterações temporais e espaciais particularmente relacionadas com as intensidades luminosas, mas não formar imagens (Goodman, 1970).

O uso de registros eletrográficos de ocelos de insetos, eletroretinogramas (ERG), tem sido indicado como um recurso adequado para se verificar a qualidade de insetos de importância econômica quando criados em condições artificiais (Agee, 1973; Agee & Park, 1975; Goodenough et al., 1977; 1978, Apud Wetzel & Luger, 1978). Da mesma forma, pode evidenciar algumas alterações de ordem fisiopatológica.

No presente trabalho, a caracterização eletrofisiológica da sensibilidade visual de larvas de A. argillacea, sadias e na fase pré-mortal II da virose, veio ainda auxiliar a interpretação de alguns aspectos sintomatológicos comportamentais, bem como acrescentar conhecimentos básicos sobre a Fisiologia desse sistema.

Ruck, numa série de trabalhos revistos por Goodman (1970), apresentou uma interpretação funcional do ERG, discriminando quatro componentes nas respostas elétricas dos ocelos ao estímulo luminoso.

Os registros de potenciais efetuados entre a córnea ocelar e um elétrico distante, em larvas sadias de A. argillacea, mostraram alguns elementos envolvidos no processo de percepção da luz.

O primeiro elemento representou a resposta do sistema visual ao início do estímulo luminoso, identificado como uma deflexão positiva do registro, na forma de um potencial lento, monofásico e despolarizante (Fig. 32). Este elemento corresponde aos componentes I e II descritos por Ruck (1961a) e são atribuídos respectivamente às terminações dos rabdômeros das células visuais e membrana axônica das células receptoras.

O segundo elemento do ERG de A. argillacea (Fig. 32) apareceu como uma deflexão negativa e rápida, que junto ao primeiro constituiu o efeito "on" (liga). Segundo Ruck (1961a), tal deflexão corresponde a um potencial hiperpolarizante de origem pós-sináptica.

Durante o estímulo luminoso de 0,25 s, registrou-se no ERG uma deflexão positiva como terceiro componen-

te, durando até o ponto "off" (desliga) e associado à despolarização dos receptores. O quarto, quinto e sexto elementos, que apareceram com o fim do estímulo luminoso, foram registrados como uma variação elétrica negativa e lenta, um componente positivo rápido e o retorno à linha de base, discriminados como efeito "off".

Sob o estímulo luminoso de duração mais curta, os componentes do efeito "ON" ficaram representados pela deflexão positiva do registro quando da despolarização nos receptores, ou seja, pelo segundo elemento. O retorno brusco do registro à linha de base identifica o "OFF".

Estímulos curtos iterativos geraram respostas semelhantes quanto à amplitude do 2º elemento (Fig. 33), sendo que nessa frequência (aprox. 1 Hz) não se observou uma variação crescente da resposta*. Ruck (1961b) mostrou que nas libélulas a resposta quanto a amplitude deste componente pode aumentar quando do aumento da frequência (entre 2,5 a 16,2 Hz), para uma mesma intensidade de estímulo, associando ao fato um tipo de facilitação temporal.

Larvas de A. argillacea na fase pré-mortal II da virose mostraram no ERG ocelar, uma nítida alteração na velocidade da resposta ao estímulo, sendo que uma alteração menor pode ser notada quanto à sua amplitude (Fig. 34).

Os componentes do efeito "ON" ainda presentes, sugerem poucas alterações no sistema a nível de receptores. A

* Sob essas condições, a amplitude variou de 0,43 a 0,67 mV, com uma média de 0,61 mV.

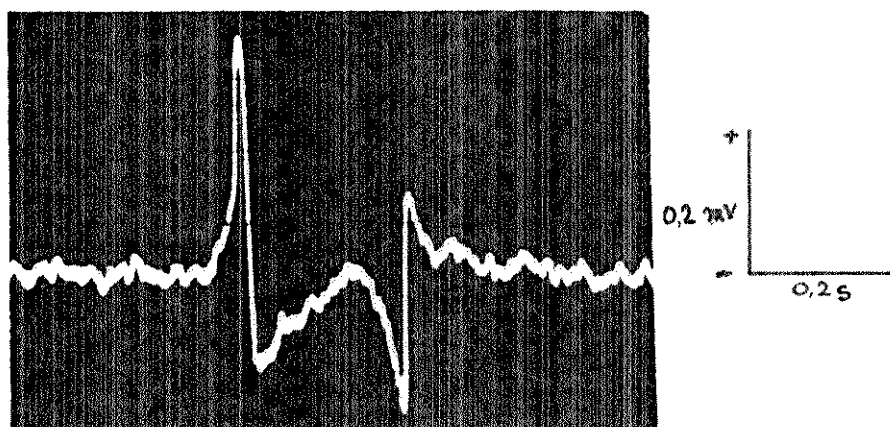


Fig. 32: Elementos do ERG de larvas de A. argillacea sadias, sob estímulo único.

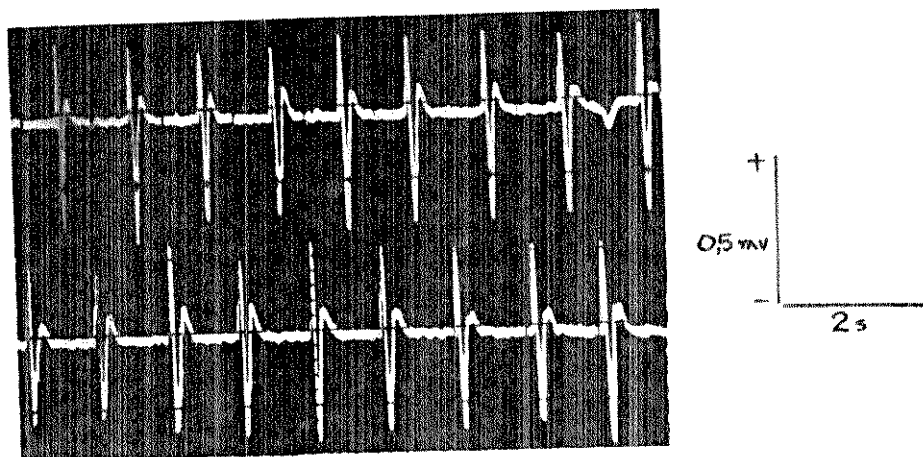


Fig. 33: ERG de larvas de A. argillacea sob estímulo repetitivo (aprox. 1,0 Hz).

lentidão da condução do estímulo evidenciada pelo primeiro elemento, além da evidente alteração dos segundo e terceiro elementos e do efeito "OFF" como um todo, indicam uma desorganização do processo a nível pós-sináptico, nas próprias fibras do nervo ocelar.

Sob estímulos repetitivos, ainda na fase pré-mortal II, a velocidade e a intensidade das primeiras respostas apareceram bastante alteradas. Nestas condições, uma somatória de estímulos foi necessária para evocar, nas últimas, uma resposta próxima à do ERG normal (Fig. 35).

Muitos autores têm considerado que além da função sensorial específica, os ocelos funcionam na manutenção do estado excitatório do tonus geral, enviando estímulos contínuos ao sistema nervoso central (Goodman, 1970). Apesar de não estar conclusivamente demonstrado, este papel estimulatório tem razoável suporte experimental. Goustard (1958) mostrou que em Blatella sp, a atividade geral é reduzida em 16% quando só os ocelos são vendados, enquanto Schremmer (1950) e Goodman (1968) demonstraram a perda do tonus e alterações no padrão de locomoção das abelhas com ocelos ou olhos composto vendados.

As mudanças nos padrões de deslocamento e movimentação voluntária das larvas doentes de A. argillacea, observadas no presente trabalho, tanto quanto nos movimentos de fuga, poderiam desta forma estar associados às condições patológicas no sistema nervoso sensório-motor, somadas a uma ação mais direta da infecção no sistema muscular voluntário.

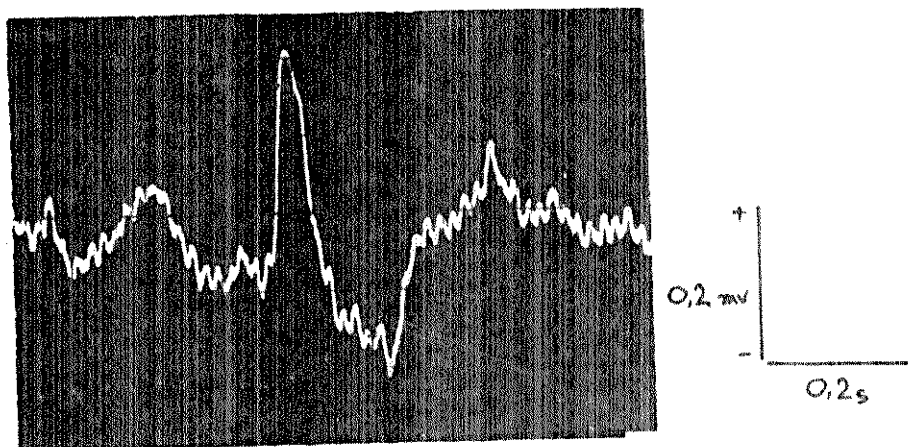


Fig. 34: ERG de larvas de A. argillacea na fase pré-mortal II da virose, sob estímulo único.

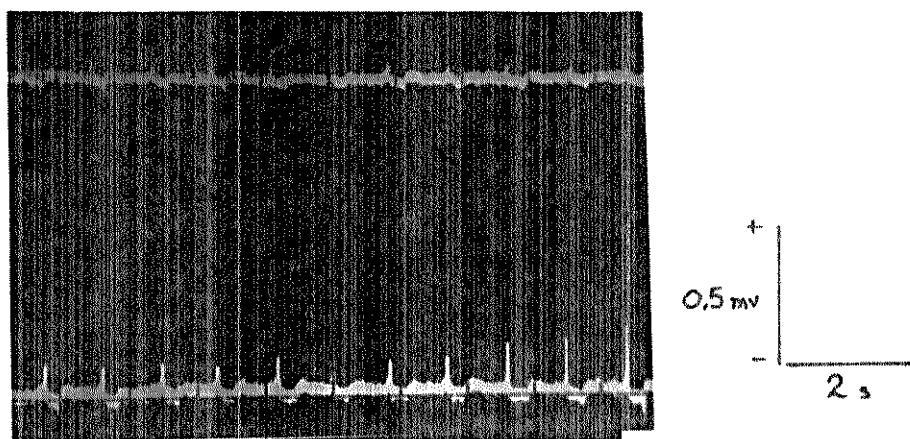


Fig. 35: ERG de larvas de A. argillacea na fase pré-mortal II da virose, sob estímulo repetitivo.

4.2.4.2. Fisiopatologia esofagiana

Os mecanismos fisiológicos regulatórios da alimentação, como os que governam a ingestão, sua velocidade e duração, têm sido investigados principalmente em insetos que despendem relativamente pequenas quantidades do seu tempo nessa atividade (Browne, 1975). Embora não seja o caso da maioria das larvas de Noctuidae, de maneira geral, sabe-se que a alimentação nos insetos é interrompida quando influências inibitórias no sistema nervoso central são suficientemente fortes para superar seus sinais ou as influências endógenas excitatórias (Davey, 1964).

Concomitante aos estudos fisiológicos da regulação alimentar, tem-se desenvolvido preparações para o estudo da atividade espontânea do intestino anterior e suas respostas a diferentes drogas. A ação de drogas tem sido verificada mais frequentemente em preparações do tubo digestivo isolado, enquanto a atividade normal e inerente ao sistema, estudada nos insetos intactos (Miller, 1979). Dessa forma, Yaeger (1931) caracterizou os movimentos do papo de Periplaneta fuliginosa (serv.) e Beard (1960) a atividade eletrofisiológica do tubo digestivo de Galleria mellonella (L.).

Em larvas sadias de A. argillacea os registros eletrofisiológicos esofagianos mostraram como atividade básica, potenciais rítmicos de cerca de 0,3 mV de amplitude, com frequência variando próximo a 12 Hz (Figs. 36a e 36b). Tais potenciais, que apareceram assimetricamente difásicos, assem-

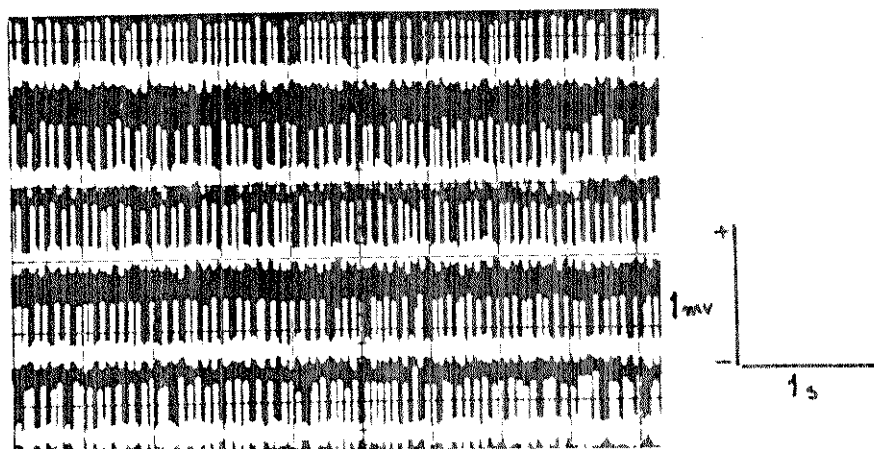


Fig. 36a: Atividade eletrofisiológica basal ritmica do esôfago de larva sadia de A. argillacea.

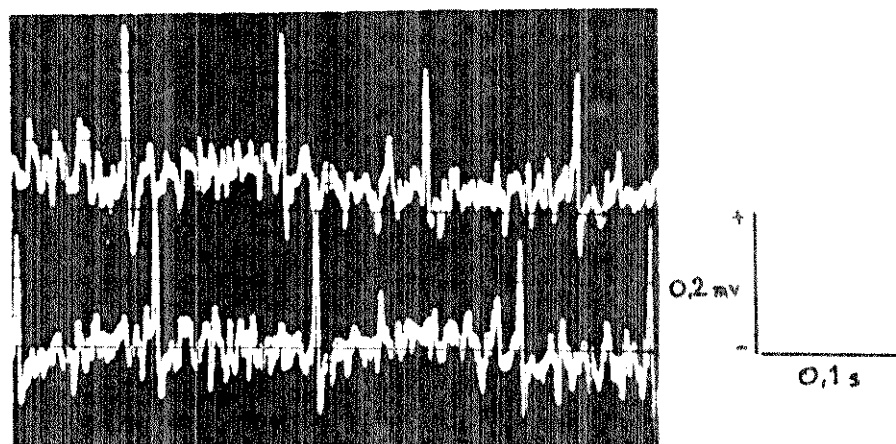


Fig. 36b: Detalhe dos potenciais registrados na região esofágica de larva sadia de A. argillacea.

lham-se às ondas E encontradas por Beard (1960) para o esôfago de G. mellonella: potenciais de cerca de 3 Hz de frequência, com 0,5 mV de amplitude. Estes potenciais segundo o mesmo autor, poderiam estar relacionados à pequenos pulsos originados no pró-ventrículo.

A constância da atividade eletrofisiológica básica na região esofagiana de larvas sadias de A. argillacea apareceu ainda interrompida por surtos de potenciais de cerca de 1,5 s de duração, com amplitudes e frequências maiores que o dobro da atividade basal, indicando um aumento geral e reorganizado da atividade eletrofisiológica (Fig. 37).

Segundo Gelperin (1971), caloforídeos alimentados com diferentes concentrações (molares) decimais de sacarose mostraram, em registros no tubo digestivo anterior, diferentes arranjos de surtos e inter-surtos de duração variada. Segundo o mesmo autor, receptores de estiramento situados nessa região, produzem surtos breves e inter-surtos longos com a ingestão de sacarose 0,1 M. Uma situação inversa foi por ele observada para a ingestão de sacarose 0,1 M, mais viscosa. Em A. argillacea, esses surtos associados ao peristaltismo, ocorreram em grupos de 4 a 6, intervalados inicialmente por períodos de 12 s e finalmente a cada 2 s, até o final da seção de registros. A ingestão neste caso poderia estar relacionada a secreções das glândulas labiais e salivares, uma vez que seriam estimuladas mecanicamente pela própria presença do eletrodo registrante. A capacidade de deglutição de líquidos dessas larvas é bastante acentuada; o que pode também ser evidenciado por ter se constituido no presente trabalho, em valioso recurso para a infecção via oral.

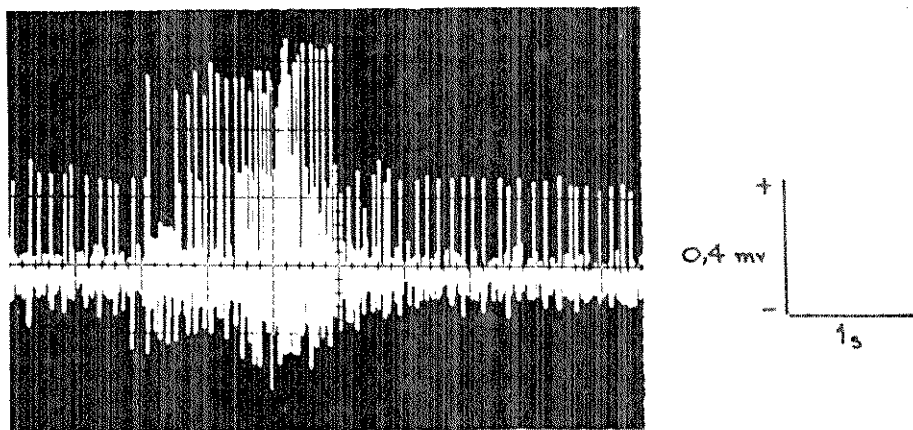


Fig. 37: Surto de potenciais na atividade basal do esôfago de larvas sadias de A. argillacea.

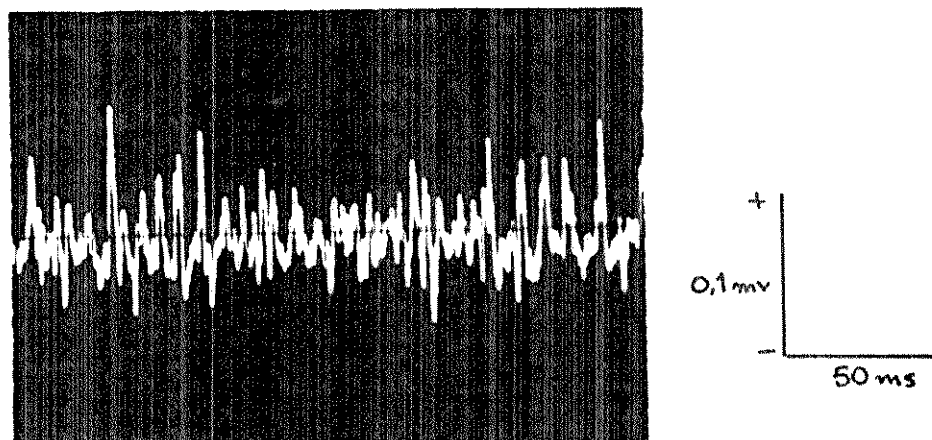


Fig. 38: Atividade detrofisiológica basal ritmica do esôfago de larvas doentes de A. argillacea.

Durante a fase pré-mortal II da virose, as larvas de A. argillacea não mais se alimentam. Registros eletrográficos feitos na região esofágica de larvas nessa fase mostraram uma marcante alteração na atividade eletrofisiológica, principalmente quanto à amplitude dos potenciais. Nessas condições, potenciais pequenos de até 0,1 mV, confundem-se com o ruído fisiológico de fundo, em geral aumentado. Para essa situação, tornou-se inconsistente uma análise das alterações quanto à frequência, uma vez que os potenciais eram em geral abortivos em diferentes graus e nem sempre puderam ser bem evidenciados (Fig. 38). A desorganização da atividade básica na região esofagiana sugere a perda da sua capacidade contráctil pulsatória nessa fase da doença.

Surtos de potenciais decorrentes da deglutição também foram observados em registros esofagianos em larvas doentes. Ocorreram sem uma ritmicidade constatável, ora em grupos, intercalados por períodos de inter-surtos, ora constantes. Os registros destes surtos, quando em grupos (Fig. 39), mostraram uma grande redução quanto à amplitude dos potenciais (cerca de 0,15 mv). Tal situação deve ser indicativa da redução acentuada e desorganização do peristaltismo esofagiano.

Uma vez que as atividades eletrofisiológicas registradas no presente trabalho podem ser associadas a receptores de estiramento, suas alterações patológicas indicam a perda da capacidade contráctil da região esofágica e consequentemente da capacidade de deglutição. Um distúrbio dessa natureza, somado a outros provocados pelo processo infeccioso nos demais sistemas, devem ser os responsáveis pelo bloqueio alimentar nessa fase da doença.

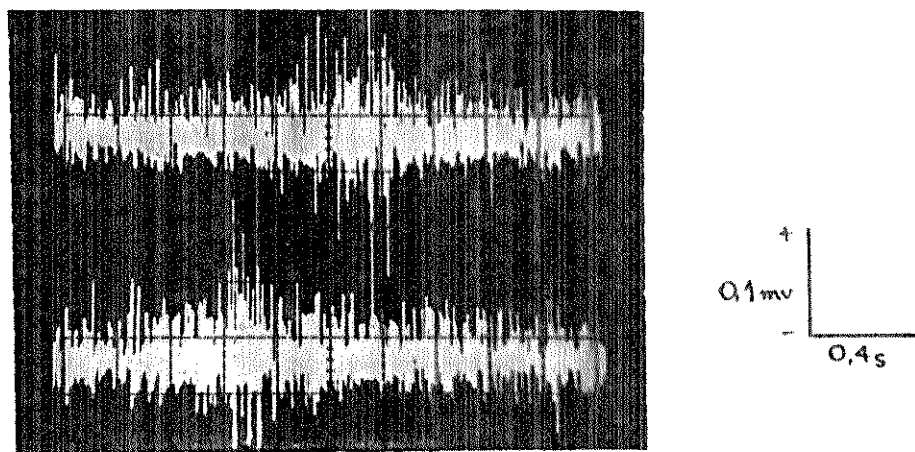


Fig. 39: Surtos de potenciais na atividade basal do esôfago de larvas doentes de A. argillacea.

4.2.5. Susceptibilidade de larvas de A. argillacea ao VPN

A medida de potência de um patógeno de inseto é equivalente à determinação de quantidade de ingrediente ativo de um inseticida químico (Burgess & Thomson, 1971). Como o que se deseja é a morte do inseto, tem-se nos ensaios um efeito tudo ou nada, com os resultados normalmente expressos em porcentagens de mortalidade relativas às doses ou tempo necessário para dada mortalidade; este último, segundo os citados autores, mais preciso e interpretativo.

Para o vírus da poliedrose nuclear a infecção via oral pode não ser a única, mas é certamente a principal, sendo por isso a adotada normalmente em bioensaios (Aizawa, 1963; Komolpith & Ramakrishanan, 1975; Dalmage e Burgerjon, 1977 e Andrade et al., 1978).

4.2.5.1. Susceptibilidade do 1º estágio larval de A. argillacea ao VPN

As larvas recém eclodidas sujeitas ao VPN mostraram pouca diferença nas respostas às diferentes doses (Fig. 40). Os tempos necessários para causar 50% de mortalidade (TL_{50}) foram próximos à 5 dias, quando as larvas estavam entre o fim do terceiro e começo do quarto estágio. O tempo letal para 90% (TL_{90}) variou entre 7 e 9 dias, ocorrendo nas larvas de

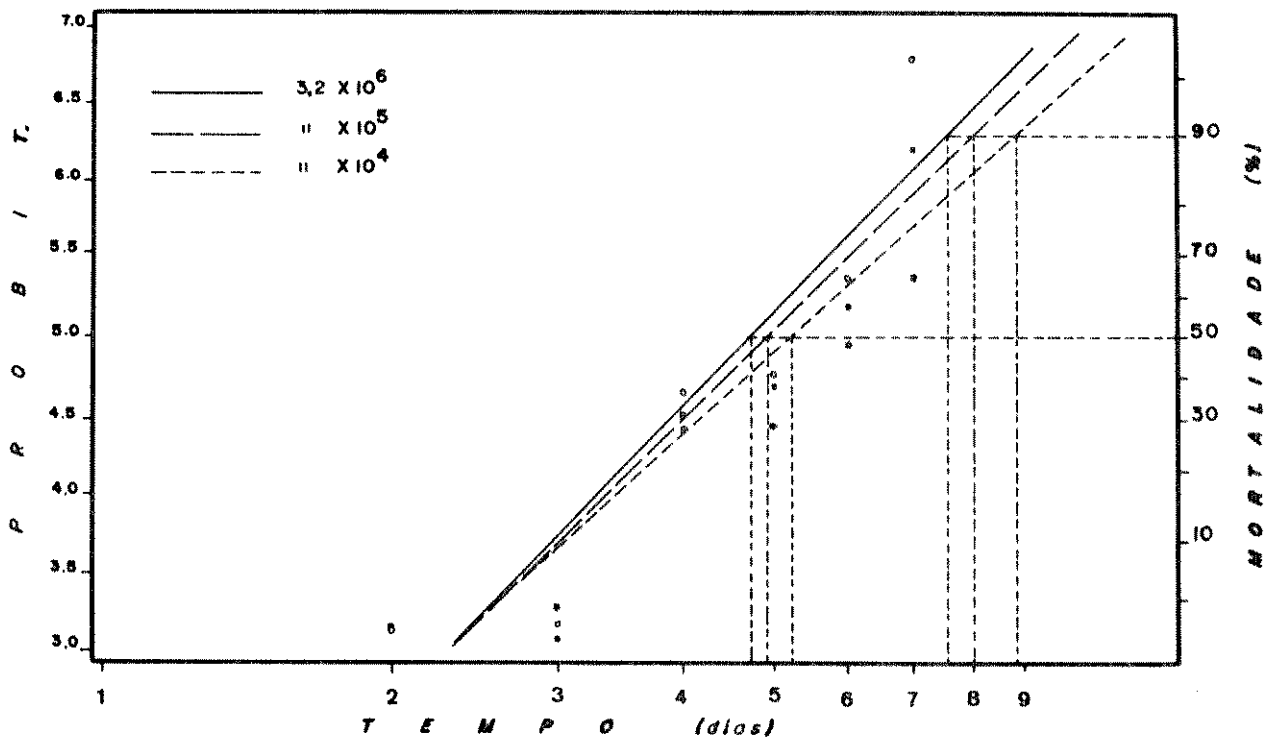


Fig.40 - Mortalidade/tempo (escala log.-probit.) em larvas de 1ª estãdio de A. argillacea tratadas com diferentes doses de VPN específico.

quarto para quinto estádios. A tabela 11 apresenta os coeficientes e tempos letais em horas para essas duas porcentagens de mortalidade. Em bioensaios com VPN, coeficientes angulares próximos ou menores que 1,0 são esperados (Paschke et al., 1968 e Burger & Tonson, 1971).

TABELA 11. - TL_{50} e TL_{90} aproximados em horas, devido ao VPN e coeficientes das correlações (40 larvas de 1º estágio por dose).

Parâmetros	Dose (CIPs/larva)		
	3.2×10^4	3.2×10^5	3.2×10^6
TL_{50}	125	119	116
TL_{90}	212	192	181
Coefic. angular	0,8792	0,9545	1,010
Coefic. linear	-7,7861	-8,5430	-9,0574
Coefic. de correlação (%)	92,42	93,01	92,81

As respostas semelhantes obtidas para diferentes doses e o longo tempo necessário para a manifestação da virose indicaram uma baixa susceptibilidade das larvas do primeiro estágio, aparentemente pouco dependente da dose ingerida. Tal situação poderia ser explicada pelo próprio mecanismo de ação do vírus e pelo estado fisiológico do inseto tratado. Para a dissolução dos poliedros e liberação das partículas é necessária uma faixa por vezes estreita de pH alcalino no tubo digestivo da larva (Day et al., 1958; Bird, 1959 e Vago &

Croissante, 1959). Este pH é normalmente associado às atividades fisiológicas no intestino médio, como a produção de amônia para a excreção de Nitrogênio (Wigglesworth, 1972), atividade da microfauna e tipo de alimento, sendo regulado por tampões naturais (House, 1974). Acredita-se que a curta duração do primeiro estágio larval, em média 1,7 dias (Habib, 1976) e o hábito de raspar a epiderme das folhas de algodão devem determinar condições que ainda não favoreçam a total dissolução dos poliedros, que assim são em parte eliminados nas fezes. Dessa forma, apesar da alta proporção entre o número de poliedros e o peso da larva, a quantidade de partículas infectantes não eliminadas foi próxima nas diferentes doses, provocando portanto graus semelhantes de mortalidade. Aruga (1963) salienta que os estágios de desenvolvimento dos insetos são importantes fatores na maior ou menor manifestação da virose, pois determinam diferenciação de tecidos e alterações metabólicas.

Bergold (1958) salienta que cada espécie de vírus tem sua espécie hospedeira específica, entretanto podem se multiplicar em outras espécies hospedeiras correlatas, particularmente quando grandes inóculos são usados.

No presente trabalho, larvas de primeiro estágio de A. argillacea mostraram-se susceptíveis ao VPN de A. gemmatalis mesmo nas doses equivalentes às do seu próprio vírus. A ocorrência de 50% de mortalidade entre o 4º e 5º dia apenas para a dose mais alta (Fig. 4) revelou no entanto uma susceptibilidade menor a esse vírus. Da mesma forma, o TL_{90} obtido apenas para a dose mais alta e após o 10º dia indicou também a menor patogenicidade desse VPN ao hospedeiro não específi-

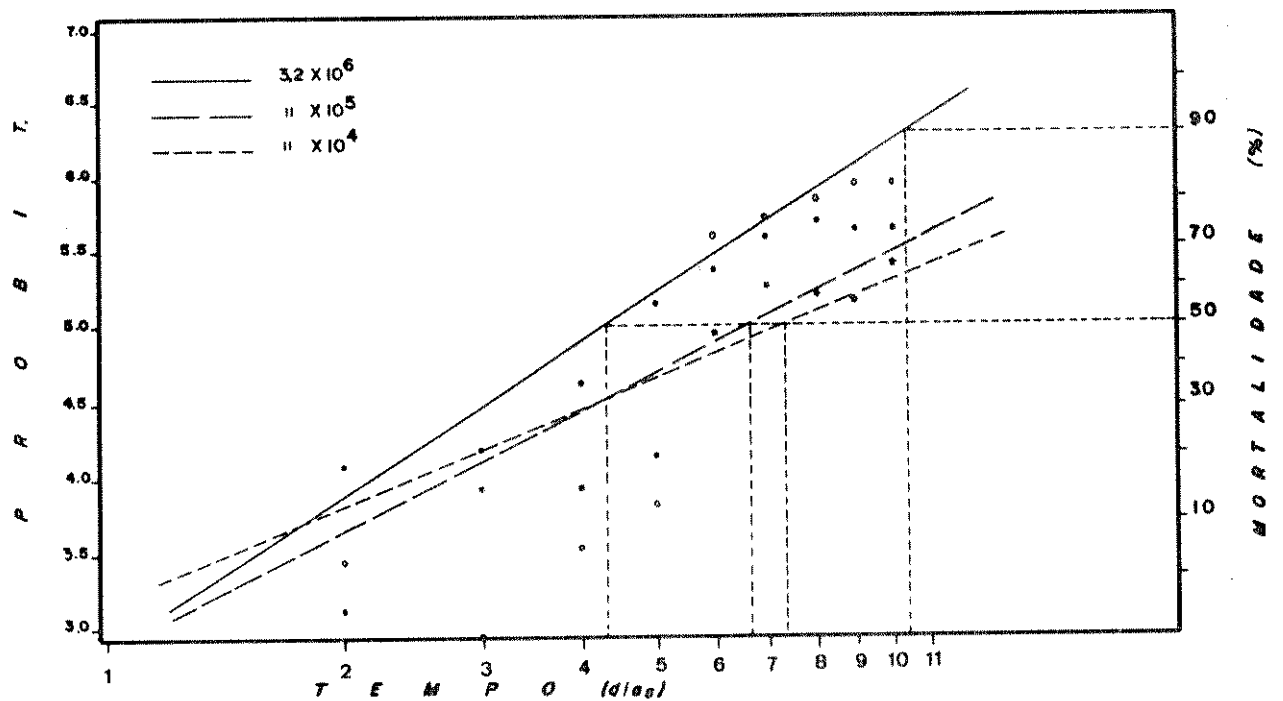


Fig. 41 - Mortalidade/tempo (escala log.-probit.) em larvas de 1º estágio de *A. argillacea* tratadas com diferentes dos do VPN de *A. gemmatilis*.

co. A Tabela 12 mostra os tempos aproximados em horas e coeficientes para essa relação.

TABELA 12 - TL_{50} e TL_{90} em horas devido ao VPN de A. gemmatilis e coeficientes das correlações (40 larvas de 1º estágio por dose).

Parâmetros	Dose (CIPs/larva)		
	3.2×10^4	3.2×10^5	3.2×10^6
TL_{50}	175	156	103
TL_{90}	-	-	247
Coefic. angular	0,3841	0,5772	0,6151
Coefic. linear	1,0561	-0,6715	-2,0048
Coefic. de correlação (%)	90,71	96,54	82,56

Além das diferenças detectadas nos tempos letais, a determinação das doses letais (DL) desses VPNs (Fig. 42), mostrou uma pequena diferença entre os DL_{50} e uma grande diferença entre os DL_{90} . No entanto, não houve diferença significativa de mortalidade (χ^2) entre os dois VPNs (Tabela 13) (ao nível de 95% de probabilidade), revelando o mesmo potencial.

TABELA 13 - Porcentagens de mortalidade causada pelo VPN de A. argillacea e A. gemmatalis em larvas de 1ª estãdio ao final do 9º dia.

DOSE	% de mortalidade devido a	
	VPN de <u>A. argillacea</u>	VPN de <u>A. gemmatalis</u>
1.632 CIPs/larva	50.0	47.0
49.600 CIPs/larva	90.0	75.5

Diferentes VPNs de Noctuidae com grande espectro de atividade dentro da família, são diferentes quando submetidos a testes quantitativos de especificidade. Assim o uso de bioensaios como método alternativo para identificação desses vírus tem sido proposto (Burgerjon et al., 1975; Harper, 1976; Burgerjon, 1977).

A ocorrência de VPN em várias espécies correlatas ou simpátricas sugere que essas viroses evoluam em um complexo de hospedeiros, sendo que alta especificidade poderia ser encontrada em espécies mais isoladas (Andrade, 1980). A possibilidade portanto de se infectar um hospedeiro não original pode contribuir em situações onde se tem infestações múltiplas por espécies correlatas. É o caso específico de A. argillacea e da maioria das regiões algodoeiras do país, onde outras culturas com outros noctuídeos praga ocorrem na mesma época, compartilhando também dos inimigos naturais e outras doenças não espécie-específicas.

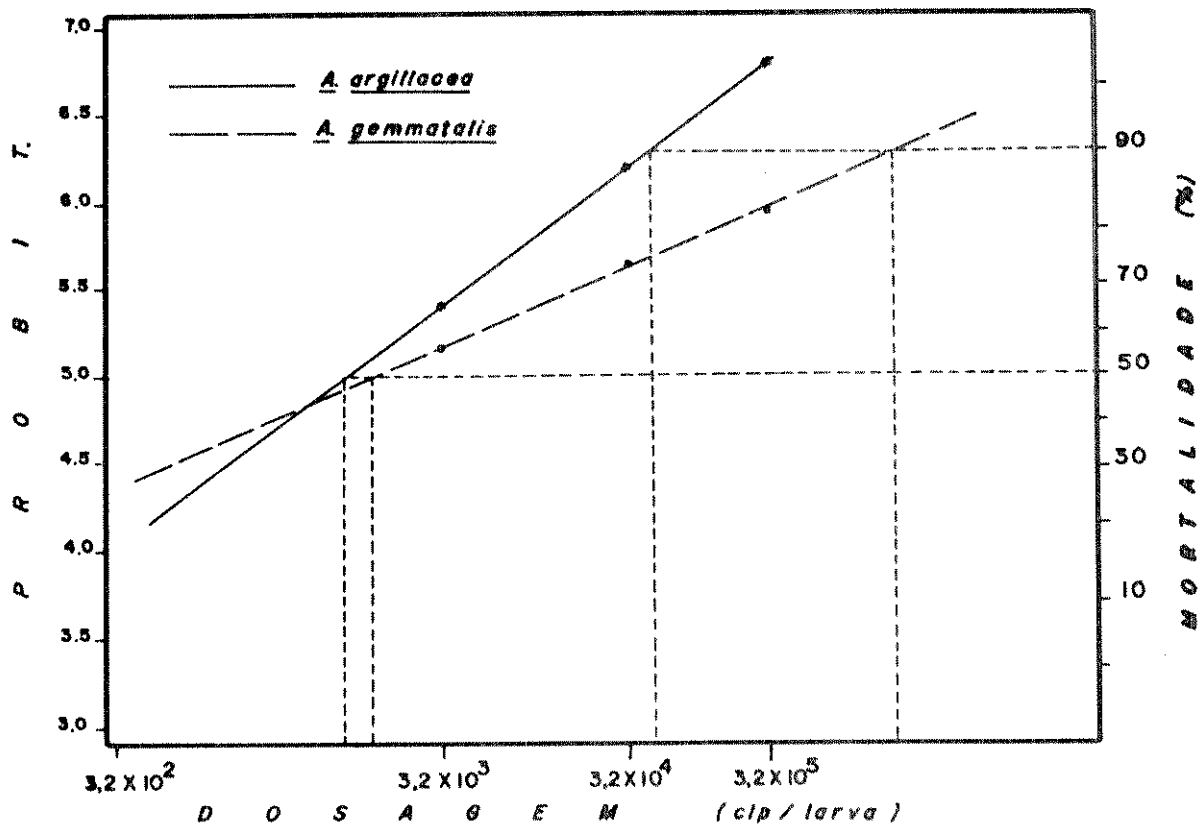


Fig. 42 - Mortalidade/dose (escala log.-probit.) em larvas de 1º estágio de *A. argillacea* tratadas com diferentes doses de dois VPNs, após 9 dias de infecção.

4.2.5.2. Susceptibilidade do 2º e 3º estádios larvais ao VPN

A determinação dos tempos para 50 e 90% de mortalidade em larvas de segundo estágio, mostrou haver uma grande relação com as doses, sendo que para as mais altas o tempo letal mediano foi menor que 24 horas, nas doses medianas entre 1 e 3 dias e na mais baixa 8 dias (Fig.43 e Tabela14).

TABELA 14 : TL_{50} e TL_{90} em horas devido ao VPN e coeficientes das correlações (40 larvas de 2º estágio por dose).

Parâmetros	DOSE (CIPs/larva)				
	3.6×10^2	3.6×10^3	3.6×10^4	3.6×10^5	3.6×10^6
TL_{50}	192	74	37	-	-
TL_{90}	-	181	153	50	22
Coefic. angular	0,0674	0,4970	0,3564	0,5506	0,4972
Coefic. linear	6,7726	2,3763	6,5088	9,0620	10,1683
Coefic. de correlação (%)	78,42	84,44	87,42	89,73	94,62

Para o terceiro estágio as doses mostraram também grande relação com o tempo letal, porém não causaram mortalidades tão rápido quanto as causadas no 2º estágio (Fig.44). Os tempos letais obtidos (Tabela 15) revelaram ser as larvas de

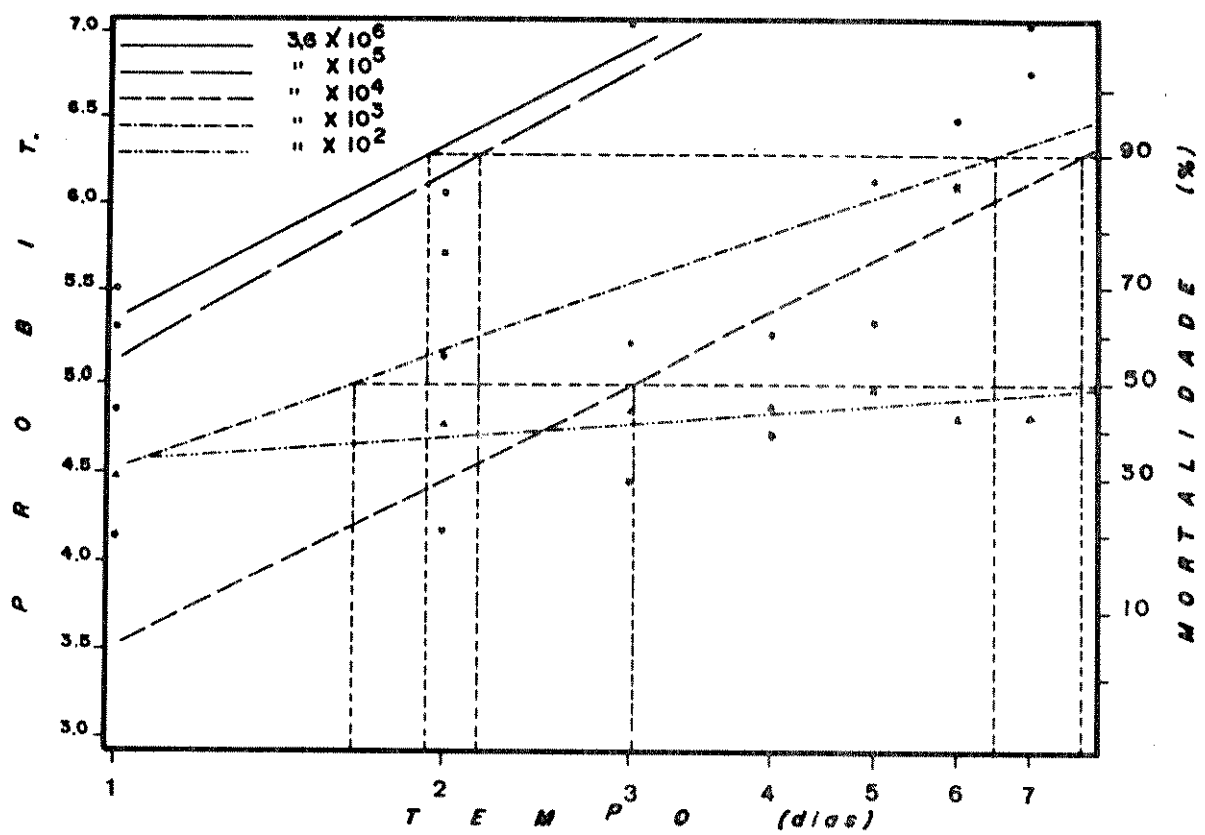


Fig. 43 - Mortalidade/tempo (escala log.-probit.) em larvas de 2º estágio de *A. argillacea* tratadas com diferentes doses de VPN

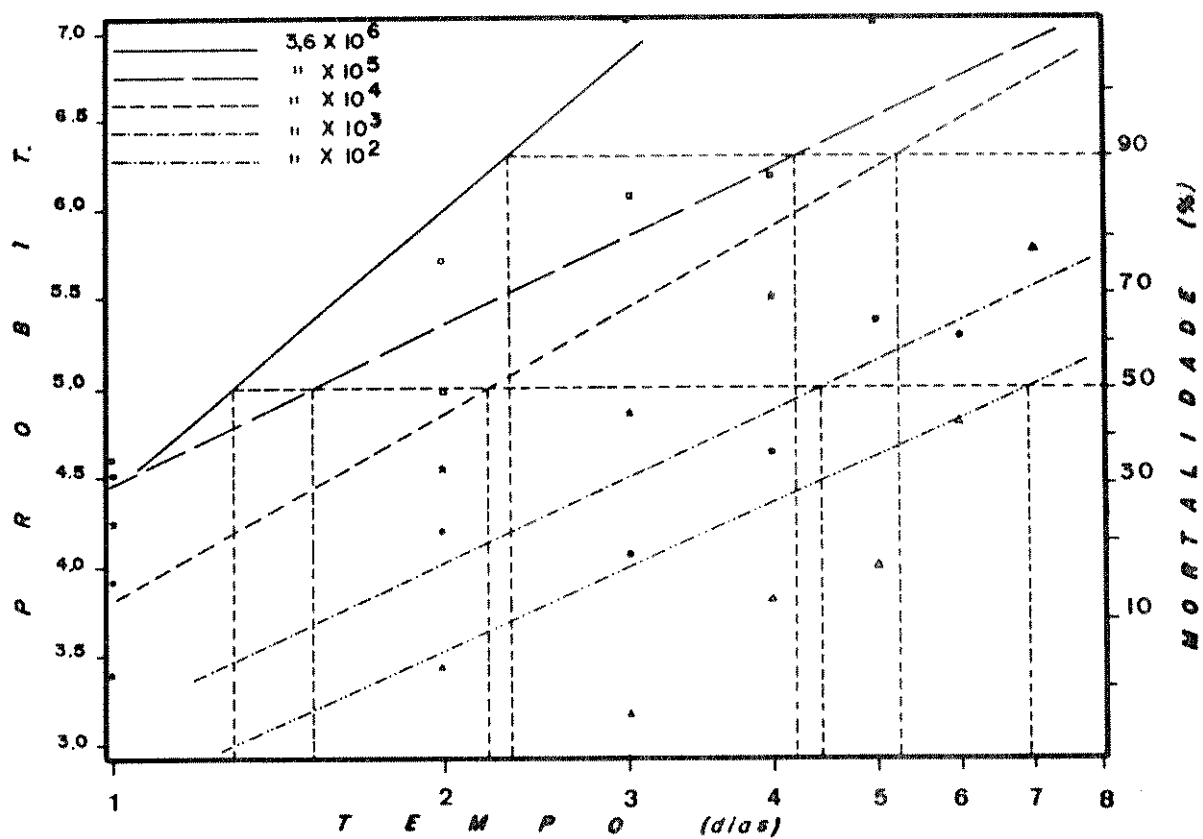


Fig. 44 - Mortalidade/tempo (escala log.-probit.) em larvas de 3º estágio de A. argillacea tratadas com diferentes doses de VPN.

segundo estágio mais susceptíveis que as do terceiro. Nestas últimas 50% de mortalidade nas quatro doses mais altas ocorreu após períodos de tempo maiores que os obtidos para as larvas de segundo estágio.

TABELA 15 - TL_{50} e TL_{90} em horas devido ao VPN e coeficientes das correlações (40 larvas de A. argillacea por dose)

Coeficientes	DOSE (CIPs/larva)				
	3.6×10^2	3.6×10^3	3.6×10^4	3.6×10^5	3.6×10^6
TL_{50}	168	106	53	35	30
TL_{90}	-	-	124	101	53
Coefic. angular	0,4427	0,3791	0,5479	0,5320	0,8286
Coefic. linear	-1,1036	2,4340	3,5921	5,9630	6,1091
Coefic. de correlação (%)	80,19	90,67	84,22	96,59	97,87

A relação de susceptibilidade constatada entre o segundo e terceiro estádios aplica-se principalmente em termos de comparação. Para o controle no campo, torna-se fundamental saber para uma determinada dose aplicada o que se pode esperar de mortalidade nos diferentes estádios, e portanto que impacto tal medida terá na população. Assim, para a DL_{90} as larvas de segundo estágio mostraram-se quase 7 vezes (6,87) mais susceptíveis que as de terceiro; enquanto que para a DL_{50} apenas 4 vezes. No entanto as susceptibilidades reais

obtidas da relação número de CIPs por peso médio de larva poderiam não coincidir com a relação observada.

A figura 45 indica as doses de poliedros que causam 50 e 90% de mortalidade em larvas de segundo e terceiro estádios, 96 horas após a infecção. As posições das retas de correlação para segundo e terceiro estádios indicam bastante semelhança na resposta desses indivíduos à infecção, e a variabilidade dentro dos lotes tratados é evidenciada pelas inclinações (detalhes na Tabela 16).

TABELA 16 - Concentrações para 50 e 90% de mortalidade e coeficientes das correlações (40 larvas de 2º e 3º estádios)

Parâmetros	ESTÁDIO	
	2º	3º
DL ₅₀	$1,3 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$
DL ₉₀	$1,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
Coefic. angular	0,5187	0,6198
Coefic. linear	6,1547	3,3231
Coefic. de correlação (%)	91,17	95,22

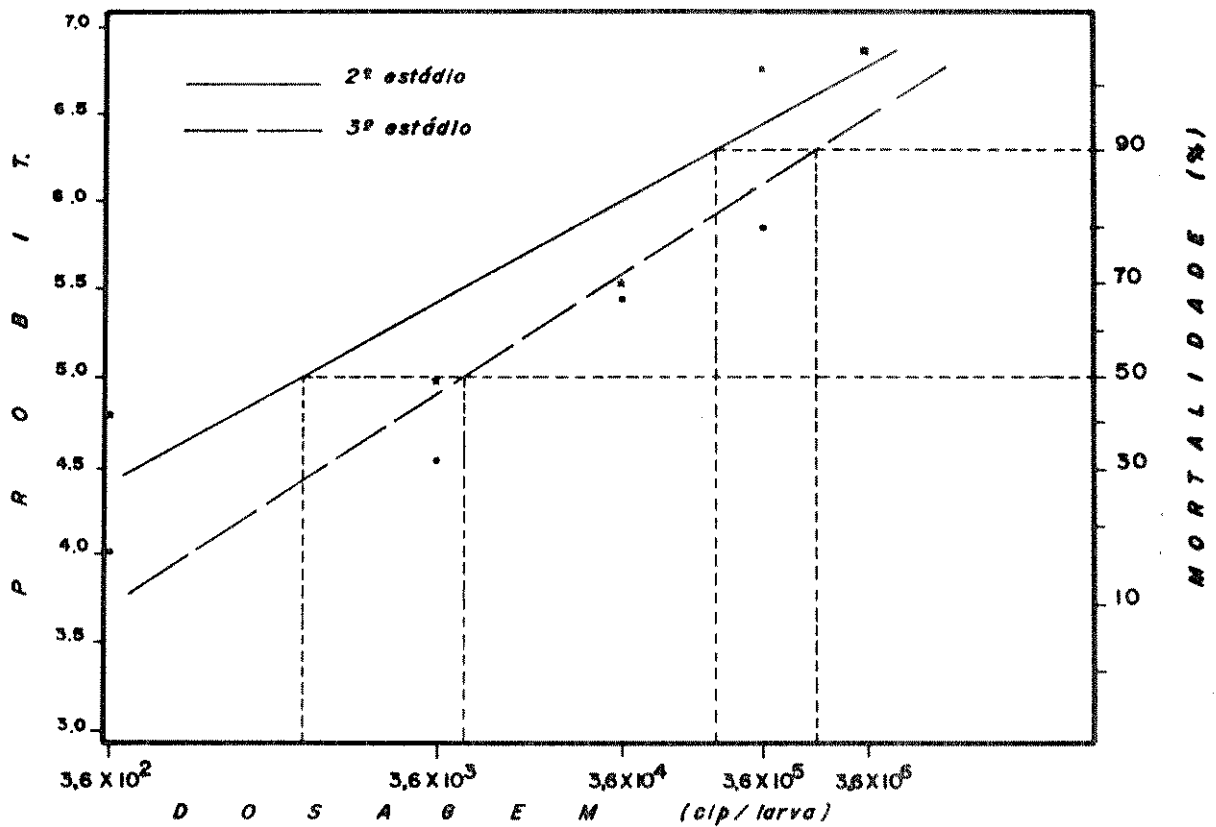


Fig. 45 - Mortalidade/dose (escala log.-probit.) em larvas de 2º e 3º estágio de *A. argillacea* tratadas com VPN, 96 h. após a infecção.

4.2.5.3. Susceptibilidade do 5º estágio larval de A. argillacea ao VPN

A susceptibilidade de larvas de quinto estágio, de terminada em termos de tempo letal, mostrou-se relativamente menor que a do terceiro e portanto que a do segundo, quando comparada apenas entre as dosagens de $\times 10^5$ CIP/larva. A figura 46 mostra os TL_{50} e TL_{90} , sendo o primeiro próximo à 5 dias e o segundo 12 dias. A tabela 17 apresenta os tempos em horas para essas mortalidades e os seus coeficientes, para o quinto estágio.

TABELA 17 - TL_{50} e TL_{90} em horas devido ao VPN e coeficientes da correlação (50 larvas de A. argillacea no 5º estágio)

Parâmetros	DOSE (CIPs/larva)
	5.19×10^5
TL_{50}	130
TL_{90}	228
Coefic. angular	0,9430
Coefic. linear	-4,1176
Coefic. de correlação (%)	98,32

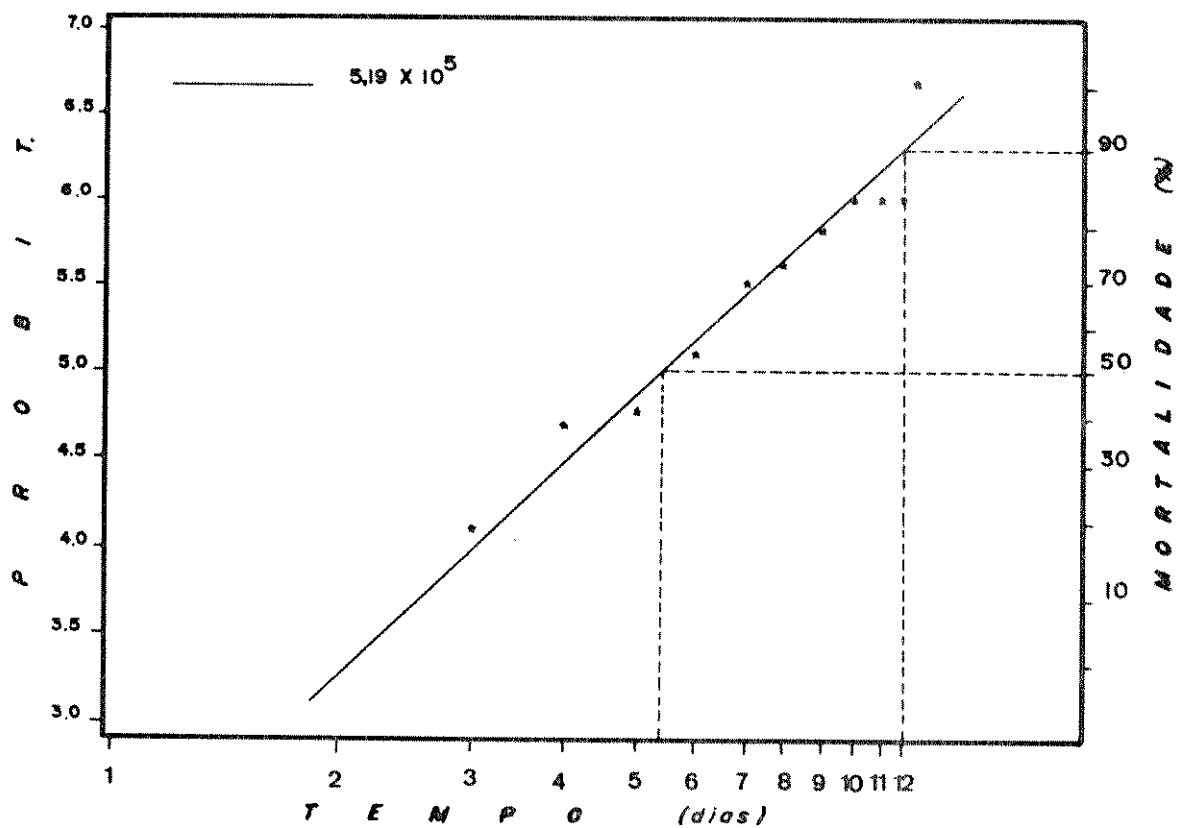


Fig. 46 - Mortalidade/tempo (escala log.-probit.) em larvas de 5º estágio de A. argillacea tratadas com uma dose de VPN.

A menor susceptibilidade relativa do quinto estágio quando comparada com as anteriores é evidenciada principalmente pelo tempo necessário para 90% de mortalidade (Fig.46). Deve-se salientar que para este estágio, a relação número de poliedros por peso de larvas, usada nestes ensaios, é ainda menor; sendo assim coerente uma menor mortalidade quando comparada com as causadas por doses equivalentes em larvas dos estágios anteriores.

4.2.5.4. Susceptibilidade do 6º estágio larval de A. argillacea ao VPN

A susceptibilidade do último estágio larval foi verificada sob diferentes condições. Larvas tratadas logo após a muda (Fig.47), mostraram-se mais susceptíveis do que as do quinto estágio. A Tabela 18 apresenta esses tempos letais em horas e os seus coeficientes de correlação.

Ishimori (1951) e Aruga & Arai (1959) demonstraram ser as larvas do bicho da seda muito susceptíveis à indução do VPN após as ecdises no quarto e quinto estágios (Aruga, 1963) coincidindo com os presentes resultados. A relação ecdise-susceptibilidade tem sido associada à taxa de biosíntese de ácido nucleico (Vail & Hall, 1969a) e alterações fisiológicas durante a muda (Vago, 1951a; Stairs, 1965). Para a ocorrência natural de VPN em Dione juno juno (Cramer) nem sempre se observou uma correlação entre ecdises e maiores mortalidades (Andrade, 1980).

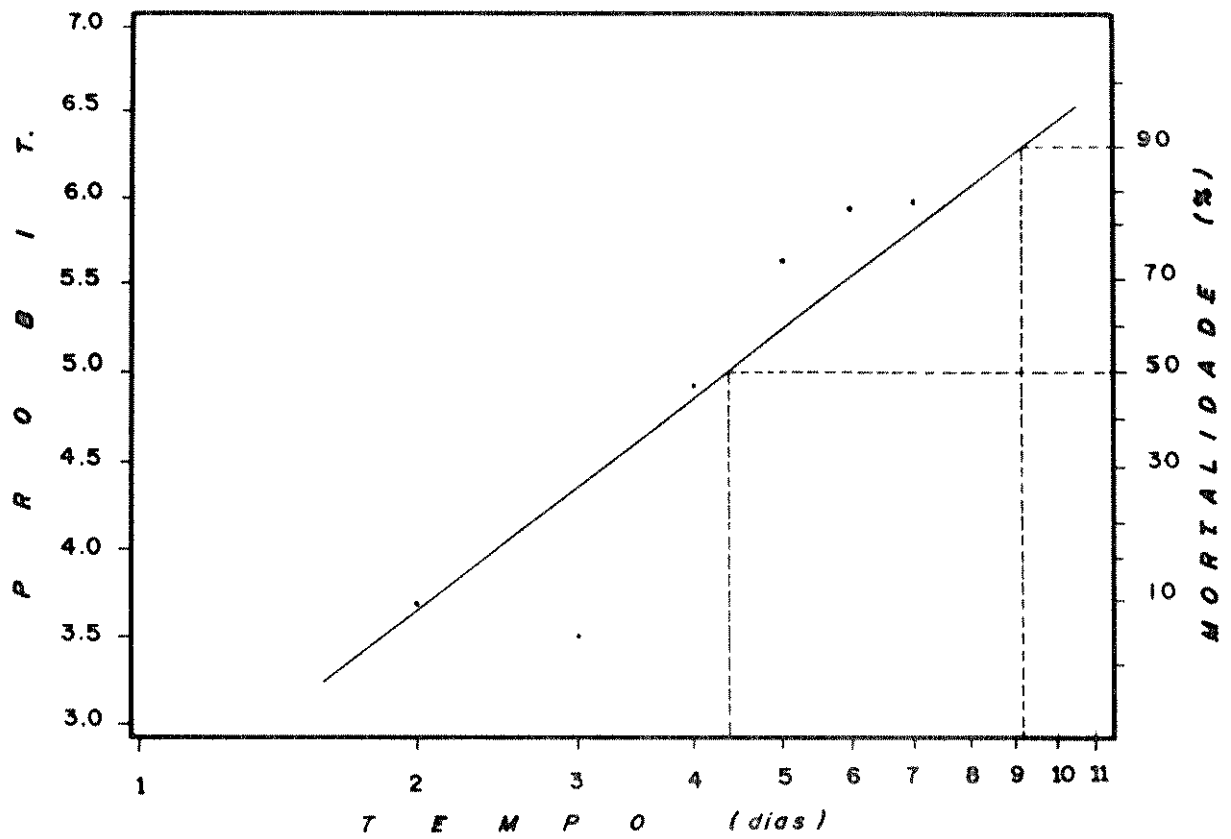


Fig. 47 - Mortalidade/tempo (escala log.-probit.) em larvas no início do 6º estágio, tratadas com uma dose de $5,13 \times 10^3$ CIPs/larva.

TABELA 18 - TL_{50} e TL_{90} em horas, devido ao VPN e coeficientes da correlação (100 larvas de A. argillacea no início do 6º estágio)

Parâmetros	DOSE (CIPs/larva)
	$5,13 \times 10^3$
TL_{50}	103
TL_{90}	221
Coefic. angular	0,7730
Coefic. linear	-2,3387
Coefic. de correlação (%)	87,89

O tempo letal mediano obtido entre o 4º e 5º dias ocorreu ainda no final do estágio, enquanto que o TL_{90} foi alcançado apenas no estágio pupal, estando condicionado às alterações fisiológicas da metamorfose larva/pupa, como a histólise e reorganização de tecidos.

É conhecido o fato de que viroses latentes ou enzooticas em populações de insetos favorecem infecções por outros microorganismos (Vago, 1963) ou tornam-se epizooticas quando o mesmo vírus é aplicado (Stairs, 1964). As figuras 48 e 49 mostram diferentes respostas de larvas de sexto estágio quando mesmas dosagens de poliedros foram aplicadas em duas populações com diferentes níveis de ocorrência natural de VPN. A Tabela 19 apresenta esses níveis para as populações tratadas, os coeficientes das correlações e doses letais.

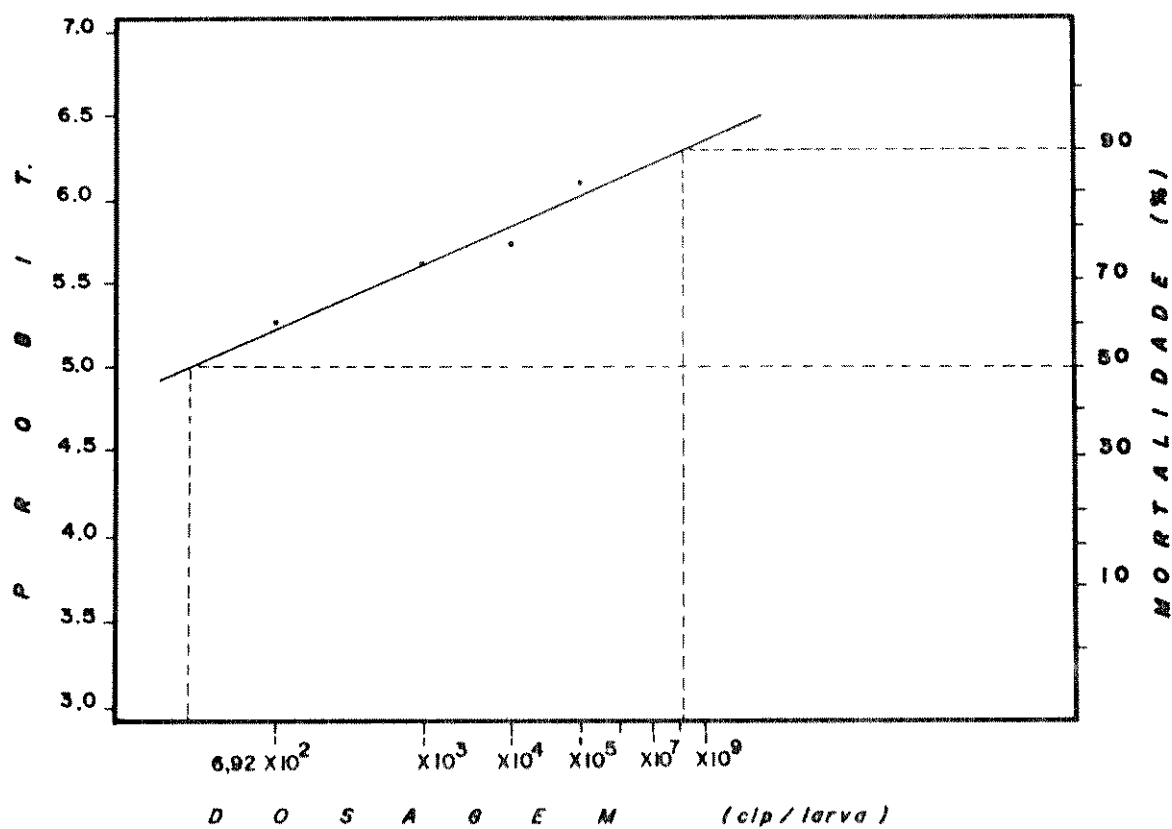


Fig. 48 - Mortalidade/dose (escala log.-probit.) em larvas de 6º estágio de *A. argillacea* criadas em laboratório 10 dias após a infecção por VPN.

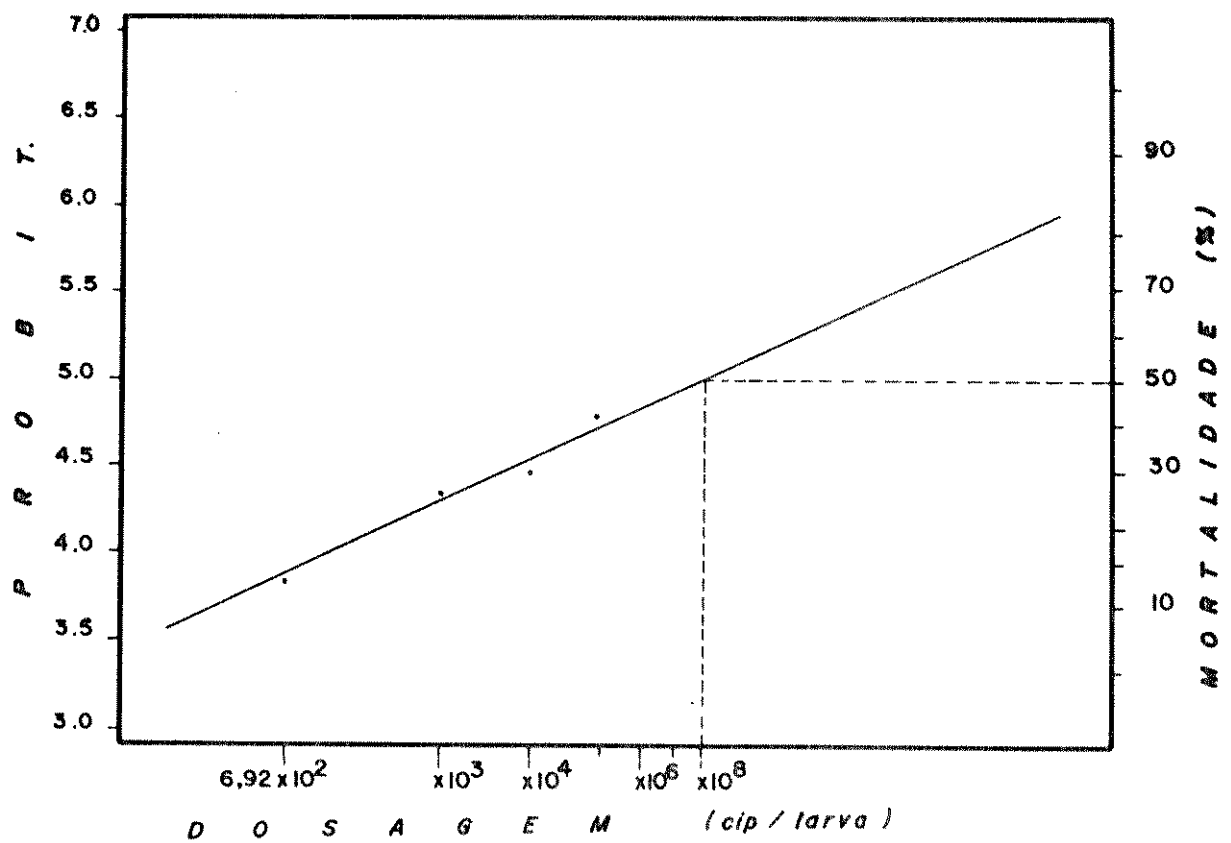


Fig. 49 - Mortalidade/dose (escala log.-probit.) em larvas de 6º estágio de A. argillacea coletadas no campo, 10 dias após a infecção por VPN.

TABELA 19 : Ocorrência natural de VPN, DL_{50} e DL_{90} e coeficientes das correlações (50 larvas de A. argillacea por tratamento).

	Campo	Laboratório
Ocorrência natural de VPN (%)	1.96	21.56
DL_{50}	6.92×10^8	3.69×10^2
DL_{90}	$\gg 6.92 \times 10^{10}$	9.80×10^8
Coefic. angular	0.4563	0.4240
Coefic. linear	2.1242	7.8757
Coefic. de correlação (%)	99.06	96.86

A diferença entre as DL_{50} bem como entre as DL_{90} nesses dois lotes de larvas foi altamente significativa. Tal situação deveria estar relacionada com o complexo de condições fisiológicas das larvas. Por um lado, a ocorrência de VPN relativamente alta (21,56%) no laboratório permitiu que as doses aplicadas potencializassem facilmente a virose. Dessa forma, apenas cerca de 370 poliedros por larva foram suficientes para em 10 dias causar 50% de mortalidade. Nas larvas do campo onde a ocorrência de VPN era enzoótica (1,96%), as mesmas doses potencializaram menos a virose, de forma que para se obter 50% de mortalidade no mesmo tempo, foram necessários quase 700 milhões de poliedros por larva.

Esses dados obtidos para larvas do campo, no fi-

nal de abril de 1979, podem ser comparados com dados de maio de 1977 (ver 4.1.1.). No segundo caso as mudanças de condições de temperatura e umidade relativa eleveram uma baixa mortalidade natural à 56,72%. A existência de proporções diferentes de indivíduos susceptíveis, por quaisquer motivos, entre esses lotes de larvas, confirmam que outros fatores, além do número de poliedros governam a expressão da doença na população.

Em 1979, a população devia possuir poucos indivíduos susceptíveis sofrendo a doença, e poucos portadores. Assim apenas doses muito altas foram capazes de provocar a virose em 50% da população. Já em maio de 1977, a população observada devia ter muitos indivíduos susceptíveis e portadores mas em condições favoráveis, apenas poucos sofriam a virose. Quando essas condições se alteraram a mortalidade em 10 dias atingiu mais da metade da população sem aplicação alguma.

Ensaio de laboratório feitos na Uganda com o VPN de Heliothis armigera mostraram que as DL_{50} a DL_{90} eram 10^6 e 10^7 CIPs/planta de algodão respectivamente. No entanto nos testes de campo, essas concentrações causaram mortalidades muito baixas, nada eficientes (Coaker, 1958). Por outro lado em campos de algodão norteamericanos, concentrações finais desse VPN variando entre 10^{10} e 10^{13} CIPs por acre, portanto menores, mostraram-se eficientes contra H. virescens e H. armigera somente quando aplicadas em várias vezes (Stairs, 1971).

No final da safra de 1980, quando a ocorrência natural de VPN na região de Campinas era de 8,12%, as larvas de sexto estágio mostraram-se mais susceptíveis à virose, apresentando 50% de mortalidade em cerca de um dia e meio (Fig. 50)

para uma dose de $2,0 \times 10^6$ CIPs/larva. Uma dose correspondente ao triplo dessa ($6,9 \times 10^6$), causou no ano anterior 41% de mortalidade em 10 dias (Fig. 49). O principal fator ainda nesse caso parece ter sido os níveis de VPN enzoóticos, uma vez que as aplicações foram feitas em condições semelhantes e a ocorrência natural em Abril de 1979 era bastante baixa (1,96%).

Larvas de sexto estágio de A. argillacea após receberem a dose de $2,0 \times 10^6$ CIPs/larva, quando privadas de ar, apresentaram-se muito mais susceptíveis à virose. A Fig. 50 mostra o TL_{50} entre 8 e 16 horas e o TL_{90} próximo a 2 dias para essas larvas. A tabela 20 indica os tempos letais para 50 e 90% de mortalidade e os seus coeficientes para larvas privadas ou não de Oxigênio.

De acordo com Aruga (1963), poucas investigações têm sido feitas com relação à correntes de ar ou Oxigênio disponível e ocorrência de VPN. Segundo o mesmo autor, acredita-se de maneira geral que tenham um papel (não especificado por ele) nas salas de criação do bicho da seda. O aumento de mortalidade devido ao VPN notado por Vago (1951b) e Vago & Cayrol (1955) em Plusia gamma (L.) e em Porthetria dispar (L.), e relacionado com a alta umidade relativa (95%), ocorreu na verdade devido à distúrbios metabólicos causados pela respiração deficiente (Vago, 1963).

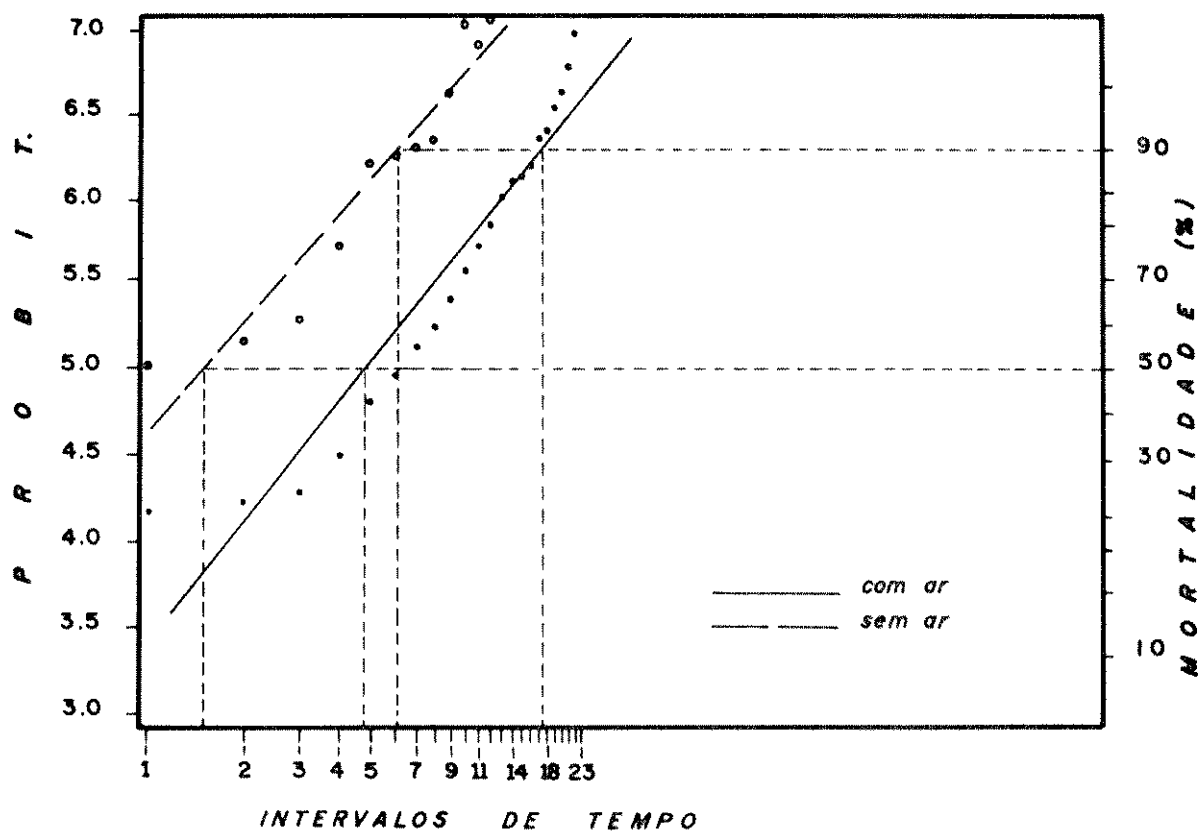


Fig.50 - Mortalidade/tempo (escala log.-probit.) em larvas do 69 estádio tratadas com uma dose de 2.0×10^6 CIPs/larva.

TABELA 20 : Tempos letais em horas e coeficientes para a ocorrência de 50 e 90% de mortalidade (160 larvas por tratamento)

Parâmetros	Não privadas de ar	Privadas de ar
TL ₅₀	38	12
TL ₉₀	139	49
Coefic. angular	1.2207	1.7219
Coefic. linear	2.0222	7.0318
Coefic. de correlação (%)	95.22	94.99

A privação de ar renovado, acarretando uma asfixia parcial e um constante aumento na taxa de dióxido de carbono, em geral parece ter como primeiro efeito fisiológico o aumento da frequência cardíaca. Em larvas de sexto estágio do bicho da seda a frequência pode aumentar de 2 a 10 vezes (Silans *et al.*, 1969). Atua ainda na aminoacidemia (Somme, 1967), e acaba introduzindo fatores que em maior ou menor escala podem mascarar os dados reais de um bioensaio.

Dulmage & Burgerjon (1977) discutem algumas técnicas de bioensaios para a padronização de VPN como inseticidas microbianos e outros autores tem proposto outras (Chauthani, 1968; Paschke *et al.*, 1968 e Klein, 1978); no entanto acreditamos que fatores como dieta artificial, pequenos recipientes, larvas criadas muitas gerações no laboratório, controle de temperatura e umidade relativa, deixar os insetos teste em jejum antes das aplicações, forçar a ingestão com microaplica

dores e a não avaliação do número de poliedros por inseto tes
te irão sempre afastar os resultados do que se pode esperar
nas condições reais de aplicação para controle.

5. CONCLUSÕES

1. As populações de A. argillacea, em condições naturais, podem sofrer com frequência infecções causadas pelo VPN.
2. A ocorrência da virose nas larvas, junto com a ação de inimigos naturais, representa significativo fator de mortalidade natural em A. argillacea.
3. Os parasitos e predadores desta praga podem desempenhar relevante papel como dispersores do vírus e na manutenção da doença.
4. Larvas infectadas no laboratório apresentaram típicos sinais patológicos, morfológicos e comportamentais, observados também no campo.
5. Vários órgãos e tecidos como intestino médio, glândulas salivares, túbulos de Malpighi, tecido adiposo, matriz traqueal, epiderme e sistema nervoso sofrem alterações histológicas devida a infecção.
6. Estudos morfométricos mostram que o VPN de A. argillacea apresenta as dimensões e arranjos típicos de Baculovirus de noctuídeos.
7. Alterações fisiológicas da sensibilidade visual e de atividades da região esofágica podem ser avaliadas e caracterizadas eletrograficamente em larvas doentes.
8. Em bioensaios, as larvas mostram diferentes níveis de susceptibilidade às diferentes doses do vírus, dependendo da idade e do tempo pós-infecção.
9. Estressores como baixo teor de Oxigênio, alta densidade populacional e alterações nas condições climáticas, podem

potencializar as infecções latentes.

10. O complexo patógeno/hospedeiro/ambiente para a poliedrose nuclear de A. argillacea, permite com altas possibilidades a participação dessa virose em programas de Manejo Integrado dessa praga.

6. RESUMO

No presente trabalho foi detectada e avaliada a ocorrência natural da virose poliedro-nuclear (VPN) em populações de Alabama argillacea (curuquerê do algodão), nas regiões de Campinas/SP e Mogi-Guaçu/SP.

Os parasitos de A. argillacea principalmente os Tachinidae, mostraram ter papel fundamental na dispersão do vírus e na manutenção da doença. Tais parasitos, junto com outros fatores bióticos de mortalidade determinaram altos níveis de controle natural dessa praga.

No laboratório, quando infectadas experimentalmente, as larvas de A. argillacea mostraram uma típica sequência de sinais patológicos, caracterizada por várias etapas. O tempo de duração das fases pré-mortais dependeu de vários fatores como dose, idade e condições pré-infecção.

Os estudos histopatológicos revelaram alterações a nível dos órgãos, tecidos e células, nas larvas infectadas pelo vírus. Tais alterações resultaram nas disfunções e degenerações observadas determinando a morte do inseto. Os tecidos mais afetados foram: adiposo, epiderme, matriz traqueal e sistema nervoso.

Nucleocapsídeos sem envelope (297,54 por 63,07 nm) foram encontrados individualmente ou em feixes, nos núcleos e citoplasmas das células infectadas. Os com envelope (311,35 por 102,02 nm) foram encontrados somente nos núcleos. Poliedros em formação, estromas virais e elementos fibrilares também foram detectados nas células atacadas. Poliedros desenvolvidos (1,6µm de diâmetro) foram abundantes na hemolinfa e tecidos decompostos das larvas mortas pela doença.

Registros eletrográficos revelaram alterações na sensibilidade visual de larvas doentes. Da mesma forma, atividades básicas e peristaltismo da região esofagiana, tanto quanto suas alterações, foram detectadas na análise fisiopatológica.

A susceptibilidade ao VPN foi verificada para vários estádios larvais, sob diferentes condições. O papel de alguns

estressores e de um vírus não específico (VPN de A. gemmatalis) foi também avaliado.

Com a atual tendência na busca de alternativas racionais para métodos de controle, o presente trabalho demonstrou que o VPN de A. argillacea pode ser considerado como um elemento promissor nos programas de manejo integrado dessa praga.

7. SUMMARY

Natural occurrence of NPV in populations of Alabama argillacea was detected and evaluated several times, during the present work, in cotton fields (Campinas, SP. and Mogi-Guaçu, SP) and laboratory.

Some entomophagous insects, principally tachinid parasites, was shown to have an important role as agents responsible for disperssion and maintenance of the virus. Populations of this insect pest suffered high natural mortalities due to the combined action of entomophagous insects and pathogen.

Typical symptoms characterized by morphological and behavioral alterations were described. The duration of different pre-mortal stages varied according to dose, age and stress conditions.

System\$, tissues and cells suffered disturbances, disintegration and total mal-function resulting in death to the infected larvae. Nervous system, fat tissue, epidermal cells and tracheal matrix suffered more effects than in other sites.

Nucleocapsids, as well as polyhedra, were measured in purified material and its presence in the diseased cells was detected.

Some physiological disturbances were evaluated through responses of ocelli as well as fore-gut activities in diseased larvae, utilizing electrographic records. The activities of these two organs in infected larvae, when compared with healthy ones, was significantly associated with many external symptoms.

The susceptibility tests revealed how the response of the larvae to the pathogen is related to many factors, such as dose, age and experimental conditions.

Within the modern criteria of insect pest control, it is suggested that NPV of A. argillacea could be easily utilized in integrated control of this insect species.

8.

LITERATURA CITADA

- Abul-Nasr, S. 1956. Polyhedrosis virus disease on cotton leafworm, Prodenia litura F. Bull. Soc. Entomol., Egypt, 40: 321-332.
- Abul-Nasr, S. 1959. Further tests on the use of a Polyhedrosis virus in the control of the cotton leafworm Prodenia litura Fabr. J. Insect Pathol., 1: 112-120.
- Adams, J.R.; Walls, R.L.; Wilcox, T.A. & R.M. Faust 1968. A previously Underscribed Polyhedrosis of the Zebra Caterpillar, Ceramica picta. J. Invertebr. Pathol., 11: 45-58.
- Adams, J.R.; Goodwin, R.H. & T.A. Wilcox 1977. Electron microscopic investigation on invasion and replication of Insect Bocoloviruses in vivo and in vitro. Rev. Bioll. Cel ; 28: 261-268.
- 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.
- Aizawa, K. & S. Iida 1963. Nucleic Acids Extracted from the Virus Polyhedra of the Silkworm. J. Insect. Pathol., 5: 344-348-
- Allen, G.E. 1968. Proc. Joint. U.S.-Japan Semin. Microbial Control Insect Pests. U.S.-Japan Committee Sci. Cooperation. Panel 8. Fukuoka, 37-41.
- Allen, G.C.; Gregory, B.C. & J.R. Brazzel. 1966. Integration of the Heliothis nuclear polyhedrosis virus into a biological control program on cotton. J. Econ. Entomol., 59: 1333-1336.

- Allen, G.E. & J.D. Knell 1977. A Nuclear Polyhedrosis virus of Anticarsia gemmatalis. I. Ultrastructure, Replication and Pathogenicity. Florida Entomologist., 60: 233-240.
- Andrade, C.F.S. 1980. Ocorrência de Poliedrose Nuclear em espécies de Heliconinae (Lepidoptera; Nymphalidae) com estudos de histopatologia. VI Congresso Brasileiro de Entomologia, Fevereiro, 1980. Campinas, SP.
- Andrade, C.F.S.; Lauritis, J. & M.A. Garcia. 1978. Ocorrência de Poliedrose Nuclear em larvas de Spodoptera frugiperda (Abbott & Smith, 1797). III Congresso Latinoamericano de Entomologia. V Congresso Brasileiro de Entomologia, Julho, 1978. Itabuna, BA.
- Aruga, H. 1963. Induction of virus Infections. em Steinhaus, E.A. (Ed.). Insect Pathology, An advanced treatise, 1: 499-530. Academic Press, N.Y.
- Aruga, H. & N. Arai. 1959. Studies on the induction of polyhedroses by the low temperature treatment in the silkworm Bombyx mori. J. Sericult. Sci. Japan, 28: 362-368.
- Balch, R.E. & F.T. Bird. 1944. A disease of the European spruce sawfly, Gilpinia hercyniae (Htg.), and its place in natural control. Sci. Agric. Ottawa, 25: 65-80.
- Beard, R.L. 1960. Electrographic recording of fore gut activity in larvae of Galleria mellonella. Ann. Entomol. Soc. Amer., 53: 346-351.
- Benz, G. 1963. Physiopathology and Histochemistry. em, Steinhaus, E.A. (Ed.). Insect Pathology, An advanced treatise. 1: 299-338, Academic Press, N.Y.
- Berger, R.S. 1968. Sex pheromone of the cotton leafworm. J. Econ. Entomol., 61(1): 326-327.

- Bergold, G.H. 1943. Über Polyeder Krankheiten bei Insekten
Biol. Zentr., 63: 1-55.
- Bergold, G.H. 1953. Insect viruses. Adv. Virus Res. 1: 91-139.
- Bergold, G.H. 1958. Viruses of insects. Handbuch der Virusforschung,
4: 60-142.
- Bergold, G.H. 1963a. Nature of Nuclear Polyhedrosis viruses.
in E.A. Steinhaus (Ed.), Insect Pathology. An advanced Treatise,
1: 413-456, Academic Press, N.Y.
- Bergold, G.H. 1963b. Fine Structure of Some Insect viruses .
J. of Insect Pathol., 5: 111-128.
- Bird, F.T. 1949. The polyhedral disease of the spruce
budworm Choristoneura fumiferana (Clem.). Forest Insect Invest. ,
(Ottawa), 5: 2-3.
- Bird, F.T. 1954. The use of a virus disease in the biological
control of the European spruce sawfly. Dipsion hercyniae (Htg.).
Canada Dept. Agric. Sci. Serv. Rep., 10: 2-3.
- Bird, F.T. 1959. Polyhedrosis and granulosis viruses causing
single and double infection in the spruce budworm, Choristoneura
fumiferana Clemens. J. Insect. Pathol., 1: 406-430.
- Bird, F.T. & D.E. Elgee, 1957. A virus disease and introduced
parasites as factors controlling the European spruce sawfly.
Diprion hercyniae (Htg.) in central New Brunswick. Canadian
Ento., 89: 317-378.
- Blanchard, E.E. 1942a. Parasitos de Alabama argillacea Hübner
en la Republica Argentina. Ann . Soc. Ci. Argent.; 134: 54-63.

- Blanchard, E.E. 1942b. Parasitos de Alabama argillacea Hübner en la Republica Argentina . Ann.Soc.Ci. Argent., 134:94-128.
- Brown, H.B. 1938. Cotton. Mac Graw-Hill Book Company, Inc., N.Y. and London.
- Browne, L.B. 1975. Regulatory Mechanisms in Insect Feeding. em Treherne, J.E.; Berridge, M.J. & V.B. Wiggles worth (Eds.). Advances in Insect Physiology . Academic Press, N.Y., London and San Francisco, 11: 1-16.
- Bulla, L.A. 1973. Regulation of Insect Population by Microorganisms. Ann. N.Y. Acad. Sc. 217: 1-243.
- Burgerjon, A. 1977. Use of specificity difference indices for the identification of nuclear polyhedroses viruses (Baculovirus) of insects. Entomophaga, 22: 187-192.
- Burgerjon, A.; Blache, G. & J. Chaufaux 1975. Recherches sur la spécificité de trois virus a Polyèdresnucléaires vis-a-vis de Mamestra brassicae, Trichoplusia ni, Scotia segetum et Spodoptera exigua. Entomophaga, 20: 153-160.
- Burges, H.D. & E.M. Thomson. 1971. Standardization and Assay of Microbial Insecticides. em Burges, H.D. & N.W. Hussey (Eds.) Microbial Control of Insects and Mites, Academic Press, N.Y. 591-638.
- Burges, H.D. & N.W. Hussey. 1971. Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press, London and N.Y. 861 p .
- Bursell, G. 1970. An introduction to insect physiology. Academic Press, London & N.Y., 276 p.
- Calcagnolo, G. 1965. O curuquerê do algodão. em M. Neves et al. (Eds.) Cultura e adubação do algodoeiro. Instituto Brasileiro de

Potassa, São Paulo. 379-415.

Calcagnolo, G. & H.F.G. Sauer. 1955. O fenômeno de diversidade de coloração em lagartas de Curuquerê (Alabama argillacea) O Biol., 21: 77-86.

Carter, L.J. 1976. Pest Control: NAS Panel Warns of Possible Technological Breakdown. Science, 191: 836-837.

Carvalho, R.F. 1944. O combate aos Insetos Prejudiciais por meio da Luta Biológica. Bol. Secr. Agric. Ind. Com. (Pernambuco); 8: 12-51.

Caswell, G.H. 1962. Agriculture entomology in the tropics. Edward Arnold Ltd., London.

Chapman, J.W. & P. M. Glaser 1915. A preliminary list of Insects which have wilt, with Comparative Study of their Polyedra. J. Econ. Entomol., 8: 140-150.

Chauthani, A.R. 1968. Biossay Technique for Insect Viruses. J. Invertebr. Pathol., 11: 242-245.

Coaker, T.H. 1958. Experiments with a virus disease of the cotton bollworm Heliothis armigera (Hbn.). Ann. Appl. Biol. 46: 536-541.

Cornalia, E. 1856. Monografia del bombice del gelso. Rend. Ist. Lombardo Sci. Lettere, Mem. 1: 348-351.

Cox, M.E.; Larson, A.D. & R.L. Ambroski 1972. Nuclear Polyhedrosis Virus of Pseudoplusia includens. J. Invertebr. Pathol. 19: 411-413.

Creighton, J.T. 1936a. Report on cotton leafworm investigation in Florida, including temperature and hibernation studies. J. Econ. Entomol., 29: 88-94.

- Creighton, J.T. 1936b. Anomis erosa Hübner as an insect pest in cotton. J. Econ. Entomol., 29: 279-282.
- Davey, K.G. 1964. The control of Visceral Muscles in Insects em Beament, J.W.L.; Treherne, J. E. & V.B. Wiggles worth . (Ed.) Advances in Insect Physiology 2: 219-242.
- David, W.A.L. 1975. The status of viruses pathogenic for Insects and Mites. Ann. Rev. Entomol., 20: 97-117.
- Day, M.F., Farrant, J.L., & C. Potter 1958. The structure and development of a polyhedral virus affecting the moth larva, Pterolocesa amplicornis. J. Ultrastruct. Research, 2: 227-238.
- De-Bach, P. 1964. Control Biologico de las plagas de Insectos y malas Hierbas. Comp. Ed. Continental. México, 949 p.
- Drake, E.L. & F.L. McEwen 1959. Pathology of a nuclear polyhedrosis of the cabbage looper, Trichoplusia ni (Hübner). J. Insect Pathol., 1: 281-293.
- Dulmage, H.T. 1973. Assay and standardization of microbial insecticides. Ann. N.Y. Acad. Sci. 217: 187-199.
- Dulmage, H. & A. Burgerjon. 1977. Industrial and International standardization of Microbial pesticides. II. Insect viruses. Entomophaga, 22: 131-139.
- Dutky, S.R. 1959. Insect microbiology. Advances Appl. Microbiol., 1: 175-200.
- Ehler, L.E.; Eveleens, K.G. & R. van den Bosch. 1973. An evaluation of some natural enemies of cabbage looper on cotton in California. Environ. Ent., 2: 1009-1015.

Ehler, L.E. & R. van den Bosch. 1974. An analysis of the natural biological control of Trichoplusia ni (Lepidoptera; Noctuidae) on cotton in California. Can. Ent. 106: 1067-1073.

Falcon, L.A. 1971. Microbial control as a tool in integrated control programs. em Huffaker, C.B. (Ed.). Biological Control 346-364, Plenum Press. N.Y.

Falcon, L.A. 1974. Patterns of use as they influence virus levels in the environment. em Black, D.C. The effect of patent laws on industrialization of insect viruses. Symp. Specificity and Development of Insect Viruses for Pest Control., Soc. Invertebr. Pathol. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. Tempe, Arizona.

Falcon, L.A. 1976. Problems associated with the use of arthropod viruses in pest control. Ann. Rev. Entomol., 21: 305-324.

Falcon, L.A.; van den Bosch, R.; Ferris C.A.; Stromberg, L.K.; Etzel, L.K. Stinner, R.F. & T.F. Leigh. 1968. A comparison of season-long cotton-pest-control-programs in California during 1966. J. Econ. Entomol., 61: 633-642.

Falcon, L.A. & R.T. Hess. 1977. Electron Microscope Study on the replication of Autographa N.P.V. and Spodoptera N.V.P. in Spodoptera exigua. J. Invertebr. Pathol., 29: 36-43.

Figueiredo, M.B.; Coutinho, J.M. & A. Orlando. 1960. Novas perspectivas para o controle biológico de algumas pragas com Bacillus thuringiensis. Arg. Inst. biol., 27: 77-85.

Franz, J.M. 1961. Biologische Schädlingsbe-Kämpfung. em H. Richter (Ed.), Handbuch der Pflanzenkrankheiten 6: 1-302, Paul Parey, Berlin.

Freiberg, M.A. 1945. Contribuicion al conocimiento de la

Biologica de Alabama argillacea (Hübner), oruga de la hoja - Plaga del algodónero. Minist. Agr. de la Nacion, (Argentina) Inst. Sanid. Veg., Rep. 9: 1-16.

Gaines, R.C. 1954. Effect on beneficial insects of several insecticides applied for cotton insect control. J. Econ. Entomol., 47: 543-544.

Gelperin, A. 1971. Regulation of feeding. Ann. Rev. Ent., 16: 365-378.

Gibbs, A.J. 1973. Viruses and Invertebrates North-Holland Publ., Amsterdam. 673 p.

Glick, P.A. & W.B. Lattimore J. 1954. The relation of insecticides to insects populations in cotton fields. J. Econ. Entomol. 47: 681-687.

Glick, P.A. & H.M. Graham. 1965. Light-trap collections of lepidopterous cotton insects in South Texas. J. Econ. Entomol., 58: 880-882.

Goodman, L.J. 1968. Interaction between ocellar and compound eye visual units in Schistocerca gregaria. Proc. 13th Intern. Congr. Entomology, Moscow.

Goodman, L.J. 1970. The structure and function of the insect dorsal ocellus. in . Beament, J.W.L.; Treherne, J.E. & V.B. Wigglesworth. (Ed.) Advances in Insect Physiology 7: 97-190, Academic Press, N.Y.

Goustard, M. 1958. Réaction phototropique et régulation du comportement chez l'image male de Blatella germanica. Bull. biol. Suppl., 45: 1-112.

Grossbeck, J.A. 1911. Migration of Alabama argillacea (Hübner) J.N.Y. Entomol. Soc. 19: 259-261.

- Guimarães, J.H. 1971. Family Tachinidae, em. A catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States. 104: 1-333, Museu de Zoologia, USP, São Paulo.
- Habib, M.E.M. 1976. Estudos Biológicos e Anatômicos sobre Alabama argillacea (Hübner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae). Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas.
- Habib, M.E.M. 1977. Contribution to the biology of Alabama argillacea (Hübner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae). Z. ang. Ent., 84: 412-418.
- Habib, M.E.M. 1978a. A bacterial disease in the larvae of Alabama argillacea, with notes on its histopathological effects Z. ang. Ent., 85: 76-81.
- Habib, M.E.M. 1978b. Anatomy and Histology of the Mature larva of the American cotton leafworm Alabama argillacea (Hübner, 1918) (Lepidoptera, Noctuidae). Anais da S.E.B., 7: 7-14.
- Hall, I.M. 1953. The role of virus diseases in the control of the alfalfa looper. J. Econ. Entomol., 46: 1110-1111.
- Hambleton, E.J. 1939. Notas sobre lepidópteros que atacam algodoeiros no Brasil. Arq. Inst. Biol., 10: 235-248.
- Hamm, J.J. 1968. Comparative Histopathology of a Granulosis and a Nuclear Polyhedrosis virus of Spodoptera frugiperda. J. Invertebr. Pathol., 10: 320-326.
- Hamm, J.J. & J.R. Young. 1974. Mode of transmission of nuclear polyhedrosis virus to progeny of adult Heliothis zea. J. Invertebr. Pathol. 24: 70-81.
- Harper, J.D. 1976. Cross-infectivity of six Plusiinae nuclear Polyhedrosis hosts. J. Invertebrate Pathol., 27: 275-277.

- Harrap, K.A. 1970. Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus. Virology, 42: 311-318.
- Harrap, K.A. 1973. Virus infection in invertebrates. em Gibbs A.J. (Ed.). Viruses and Invertebrates, 271-299. North-Holland, Amsterdam.
- Harrap, K.A. & J.S. Robertson 1968. A possible infection pathway in the development of a nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol., 3: 221-225.
- Harrap, K.A.; C. Payne & J.S. Robertson. 1977. The properties of three Baculoviruses from closely related hosts. Virology, 79: 14-31.
- Harville, J.P. 1955. Ecology and population dynamics of the California oak moth, Phryganidia californica Packard (Lepidoptera: Dioptidae). Microentomology, 20: 83-166.
- House, H.L. 1974. The Insect and the Internal Environment. Homeostasis; II, Nutrition, Digestion. em Rockstein, M. (Ed.) The Physiology of Insects. Academic Press, N.Y. and London, 5: 1-117.
- Hayashi, Y. & F.T. Bird. 1968. The use of Sucrose Gradients in the Isolation of Cytoplasmic- Polyhedrosis virus Particles . J. Invertebr. Pathol., 11: 40-44.
- Hayat, M.A. 1972. Basic Electron Microscopy Techniques. N. Reinhold Comp., N.Y., 119 p.
- Henderson, C.F. & E. W. Tilton. 1955. Tests with acaricides against the brown wheat mite . J. Econ. Ent. 48: 157-161.
- Himeno, M.; Yasuda, S.; Kohsaka, T. & K. Onodera. 1968. The fine structure of a Nuclear - Polyhedrosis virus of the Silkworm. J. Invertebr. Pathol., 10: 516-519.

- Hirumi, H., Hirumi, K., & A.H. McIntosh 1975. Morphogenesis of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper in a continuous cabbage looper cell line. Ann. N.Y. Acad. Sci. , 226: 302-326.
- Huffaker, C.B., Messenger, P.S. & P. DeBack. 1971. The natural enemy component in natural control and the theory of biological control. em C.B. Huffaker (Ed.), Biological Control, Academic Press, N.Y. 511 p.
- Huffaker, C.B. & P.S. Messenger, 1964. Population Ecology-Historical development. em DeBach, P. (Ed.) . Biological Control of Insect Pests and Weeds. N. Reinhold Comp., N.Y. 45-73.
- Huffaker, C.B., van de Vrie, M. & J.A. McMurphy 1969. The Ecology of tetranychid mites and their natural control. Ann. Rev. Ent., 14: 125-174.
- Huffaker, C.B. 1974.. Some Ecological roots of pest control. Entomophaga, 19: 371-389.
- Huffaker, C.B.; Simmonds, F.J. & J.E. Laing. 1976. The theoretical and Empirical Basis of Biological Control . em Huffaker, C.B. & P.S. Messenger (Eds.) Theory and Practice of Biological Control. 42-73. Academic Press, London.
- Hughes, K.M. 1957. An annotated list and bibliography of insects reported to have virus diseases. Hilgardia, 26: 597-629.
- Hughes, K.M. 1972. Fine structure and development of two polyhedrosis viruses. J. Invertebr. Pathol., 19: 198-207.
- Hunter, D.K. & I.M. Hall. 1968. Pathogenicity of a nuclear polyhedrosis virus of the beet army worm, Spodoptera exigua. J. Invertebr. Pathol. 10: 83-85.

- Hunter, D.K.; Hoffman, D.F. & S.J. Collier, 1975. Observations on a granulosus virus of the potato tuberworm, Phthorimaea operculella. J. Invertebr. Pathol., 26: 397-400.
- Hunter, W.D. 1912. The outbreak of Alabama argillacea in 1911. J. Econ. Entomol., 5: 123- 31.
- Ignoffo, C.M. 1965a. The nuclear Polyhedrosis virus of Heliothis zea (Boddie) and H. virescens (Fabricius), I. virus propagation and its virulence . J. Invertebr. Pathol., 7: 209-216.
- Ignoffo, C.M. 1965b. II. Biology and propagation of Diet-Reared Heliothis. J. Invertebr. Pathol., 7: 217-226.
- Ignoffo, C.M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. Ann. N.Y. Acad. Sci., 217: 141-172.
- Ignoffo, C.M.; McGarr, R.L. & D.F. Martin. 1964. Control of Alabama argillacea (Hübner) with Bacillus thuringiensis Berliner. J. Insect Pathol., 6: 411-416.
- Ignoffo, C.M.; A.J. Cahpman & D.F. Martin. 1965. III. Effectiveness of the virus against Field Populations of Heliothis on Cotton, Corn, and Grain Sorghum. J. Invertebr. Pathol., 7: 227-235.
- Imms, A.D. 1964. A General Texbook of Entomology . E.P. Dutton, N.Y. 727 p.
- Ishimori, N. 1951. On the temperature limits for grasseric virus induction and grasseri virus infection in the silkworm Bombyx mori L. J. Sericult. Sci. Japan, 20: 51-52.
- Iwashita, Y. & K. Eiji. 1969. Histopathological diagnosis of diseased larva infected with flacherie virus of the Silkworm Bombyx mori Lin. J. Seri. Science Japan, 38: 64-70.

- Iwashita, Y. & E. Kanke. 1969. Histopathological diagnosis of diseased infected flocherie virus of the silkworm. Bombyx mori Linnaeus. J. Sericult. Sci. Japan, 38: 64-70.
- Iwashita, Y. & M. Ueno. 1976. On the Infection Pathway in the Development of a Nuclear Polyhedrosis virus in the Young Silkworm. Bull. Col. Agric. Utsunomiya Univ. 9: 11-29.
- Jaques, R.P. 1961. The influence of physical stress on growth and Nuclear Polyhedrosis of Trichoplusia ni (Hübner). J. Insect Pathol., 3: 47-54.
- Jaques, R.P. 1962. Stress and Nuclear Polyhedrosis in crowded populations of Trichoplusia ni (Hübner). J. Insect. Pathol., 4: 1-22.
- Jaques, R.P. 1968. The inactivation of NPV of Trichoplusia ni by gamma and ultra-violet radiation. Can. J. of Microbiol., 14: 1161-1163.
- Jaques, R.P. 1972. The inactivation of foliar deposits of viruses of Trichoplusia ni and Pieris rapae and tests on protectant activities. Can. Entomol. 104: 1985-1994.
- Jaques, R.P. 1974. Occurrence and accumulation of viruses of Trichoplusia ni in treated field plots. J. Invertebr. Pathol. 23: 140-152.
- Jaques, R.P. 1977. Field efficacy of virus infections to the Cabbage Looper and imported Cabbage worm on late Cabbage. J. Econ. Entomol., 70: 111-118.
- Kaya, H.K. 1977. Transmission of a NPV isolated from Autographa californica (Noct.) to Alsophila pometaria (Geom.), Hyphantria cunea (Arct.) and other forest defoliators. J. Econ. Entomol., 70: 9-12.

- Kawamoto, F. & T. Asayama. 1975. Studies on the Arrangement Patterns of Nucleocapsids within the Envelopes of Nuclear - Polyhedrosis virus in the fat-Body cells of Brown Tail Moth, Euproctis similis. J. Invertebr. Pathol., 26: 47-55.
- Kawamoto, F.; Asayama, T. & M. Kobayashi. 1976. Acquisition of the Envelope of NPV in the Chinese Oak Silkworm Antheraea pernyi Guer-Min, and the Japanese Giant Silkworm, Dictyoploca japonica Butter. Appl. Ent. Zool. 11: 59-69.
- Kawamoto, F.; Kumada, N. & M. Kobayashi. 1977. Envelopment of the Nuclear Polyhedrosis virus of the Oriental Tussock Moth, Euproctis subflava. Virology, 77: 867-871.
- Klein, M. 1978. An improved peroral administration technique for bioassay of NPV against Egyptian Cotton Worm Spodoptera littoralis. J. Invertebr. Pathol., 31: 134-136.
- Komolpith, U. & N. Ramakrishanan. 1975. Bioassay of nuclear polyhedrosis virus against larval stages of Spodoptera frugiperda (Fabricius) and the effect of prolectants against ultraviolet light. Proc. Indian Acad. Sci., 82: 195-203.
- Krieg, A. 1955. Zur Frage einer "künstlichen virus - Erzeugung" in Bombyx mori L. Naturwissenschaften, 42: 472-481.
- Krieg, A. & A.M. Huger. 1969. New Ultracytological Findings in Insect Nuclear Polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., 13: 272-279.
- Krywienczyk, J. 1963. Demonstration of Nuclear Polyhedrosis virus in Bombyx mori (L.) by Fluorescent Antibody technique . J. Insect Pathol., 5: 309-317.
- Krywienczyk, J. 1976. An evaluation of the potential of serological methods for the rapid detection of NPV in white-marked tussor moth larvae. Canadian Forestry Service Information

Report IP-X-12.

Levic, W.R. 1972. Another tungsten microelectrode. Med. & Biol. Eng., 10: 510-515.

Lima, A.M. da C. 1948. Sobre parasitos e hiperparasitos do curuquerê. An. Acad. Bras. Ciênc., 20: 31-37.

Lima, A.M. da C. 1950. Insetos do Brasil. Escola Nacional de Agronomia (Imprensa Nacional), Rio de Janeiro. V. 6. 420 p.

Lima, A.; Pereira, G. & A.G. Zagatto. 1962. Identificação do agente etiológico (Pseudomonas septica Bergey) responsável pela destruição do Curuquerê (Alabama argillacea Hübner). Arq. Inst. Biol., 29: 153-158.

Lima, A.; Pereira, G. & A.G. Zagatto. 1963. Estudos comparativos entre um germe isolado da lagarta do Curuquerê (Alabama argillacea) e Pseudomonas aeruginosa (Shroeter) Migula. Arq. Inst. Biol., 30: 77-82.

Lingren, P.D.; Ridgway, R.L. & S.L. Jones. 1968. Consumption by several common arthropod predators of eggs and larvae of two Heliothis species that attack cotton. J. Econ. Entomol., 61: 613-618.

Livingston, J.M. & W.C. Yearian 1972. A Nuclear Polyhedrosis Virus of Pseudoplusia includens (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol., 19: 107-112.

Lukefahr, M.J. & P.A. Fryxell. 1969. The role of Hawpea spp. in the migration of the cotton leafworm to the United State. J. Econ. Entomol., 62 (1): 263-264.

Maestri, A. 1856. Del giallume, em Frammenti anatomici, fisiologici e patologici sul baco da seta. Fusi, Ravia. 117-120.

- Maramorosch, I.D. 1968. Insect viruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 42: 1-192.
- Macovitch, S. 1958. Some climatic relations of armyworm outbreaks. J. Tennessee Acad. Sci., 33: 348-350.
- Maramorosch, K. 1977. The Atlas of insect and plant viruses. Academic Press, N.Y. and London. 477 p.
- Martignoni, M.E. & R.L. Langston. 1960. Supplement to an annotated list and bibliography of insects reported to have virus diseases. Hilgardia, 30: 1-40.
- Martignoni, M.E. & J.E. Milstead. 1962. Trans-ovum transmission of the NPV of Colias eurytheme Boisduval through contamination of the female genitalia. J. Insect Pathol., 4: 113-121.
- Martignoni, M.E.; Breillatt. J.P. & N.G. Anderson. 1968. Mass Purification of Polyhedral Inclusion Bodies by Isopycnic Banding in Zonal Rotors. J. Invertebr. Pathol., 11: 507-510.
- Mathad, S.B.; Splittstoesser, C.M. & F.L. McEwen, 1968. Histopathology of the cabbage Looper, Trichoplusia ni, infected with o NPV. J. Invertebr. Pathol., 11: 456-464.
- Matsumura, F.; Boush, G.M. & T. Misato. 1972. Environmental Toxicology of Pesticides. Academic Press, N.Y. and London. 637 p.
- Metcalf, R.L. & W.H. Luckmann. 1975. Introduction to insect pest management. John Wiley & Sons, London and N.Y. 587 p.
- Miller, T.A. 1979. Insect Neurophysiological Techniques. Springer-Verlag Inc., N.Y. Heidelberg, Berlin. 308 p.
- Milne, A. 1962. On a theory of natural control of insect

- populations. J. Theor. Biol., 3: 19-50.
- Mollenhauer, H.H. 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. Stain Technol., 39: 113-114.
- Montera, J.O. 1941. Contribuição para o estudo das parasitos da lagarta de curuquerê (Alabama argillacea Hübner). O Euplectrus cowstockii Howard e seus dois destruidores. O Campo, 11: 25-28.
- Moscardi, F. 1977. Control of Anticarsia gemmatalis (Hübner) on soybean with a baculovirus and selected insecticides and their effect on natural epizootics of the entomogenous fungus Nomuraea rileyi (Farlow) Samson. Tese de Mestrado, Univ. Florida.
- Muirhead-Thomson, R.C. 1971. Pesticides and Freshwater Fauna. Academic Press, London and N.Y. 245 p.
- Myers, J.G. 1931. A preliminary report on an investigation into the biological control of west Indian insect pests. Bull. Entomol. Res., 22: 181-184.
- Nicholson, A.J. 1933. The balance of animal populations. jour. Animal Ecol., 2: 132-178.
- Nicholson, A.J. 1954. An outline of the dynamics of animal populations. Australian Jour. Zool., 2: 9-65.
- Nickel, J.L. 1958. Agricultural insects of the paraguayan Chaco. J. Econ. Entomol., 51: 633-637.
- Nielson, M. M. & R.F. Morris. 1964. The Regulation of the European Spruce Sawfly Numbers in the Maritime Provinces of Canada from 1937 to 1963. Can. Entomol., 96: 773-785.
- Noordam, D. 1973. Identification of plant viruses. Methods &

experiments. Pudoc. Centre. Agr. Publish. Docu., Wageningen.
75 p.

Nardin, G.L. 1976. Transovum transmission of a Nuclear Polyhedrosis virus of the Fall Webworm, Hyphantria cunea (Lep.; Arctiidae). J. Kansas Entomol. Soc., 49: 589-594.

Novak, V.J.A. 1975. Insect Hormones. Chapman and Hall, London
600 p.

Oliveira, M.L. 1935. O Curuquerê. O Campo, 6: 50-52.

Ongarelli, M.G. 1979. Alterações e modo de ação das partículas do vírus da poliedrose nuclear e estudos autoradiográficos em células de Bombyx mori L., 1758 (Lep., Bombycidae). Tese de Mestrado, Univ. S. Paulo.

Onodera, K., Komano, T.; Himeno, M. & F. Sokai. 1965. The nucleic acid of nuclear polyhedrosis virus of the silkworm. J. Mol. Biol., 13: 532-539.

Parencia, C.R.; C.B. Cowan & J.W. Davis. 1962. Relationship of Lepidoptera light-trap collection to cotton field infestations J. Econ. Entomol., 53: 692-695.

Parentia, C.R. & C.R. Rainwater. 1964. First findings of cotton leafworm larvae in the United States, 1922 to 1936. J. Econ. Entomol., 57 (4): 432.

Paschke, J.D.; Lowe, R.E. & R.L. Giese. 1968. Bioassay of the Nucleopolyhedrosis and Granulosis Viruses of Trichoplusia ni J. Invertebr. Pathol., 10: 327-334.

Paschke, J.D. & H.A. Sweet. 1966. The pathology of a Nucleopolyhedrosis of Rachiplusia ou (Guenée) Lep. Noctuidae. J. Insect Pathol., 8: 1-7.

Paschke, J.D. & M.D. Summers. 1975. Maramorosch, K. & R.E.

Shope (Eds.) em *Invertebrate Immunity*, 75-112. Academic Press N.Y.

Patel, P.N. 1981. Estudos de Fatores Bióticos de Controle Natural em Populações de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797). (Lepidoptera: Noctuidae). Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas.

Pawar, V.M. 1974. Structure, development and physico-chemical properties of the nuclear polyhedrosis virus of Spodoptera litura (F.) and associated changes in the haemolymph of the host. Tese de Ph.D., Post Graduate School, IARI, Nova Delhi, India.

Poole, R.W. 1974. *An Introduction to Quantitative Ecology*. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo. 532 p.

Pyenson, L. 1938. The problems of applied entomology in Pernambuco, Brazil. Part I. The ecological conditions influencing activities and abundance of insects in Pernambuco. Rev. Entomol., 8(34): 237-254.

Pyenson, L. 1940. The cotton leafworm in the western Hemisphere. J. Econ. Entomol., 33(6): 830-833.

Ridgway, R.L.; Gorzycki, L.J. & D.A. Lindquist, D.A. 1965. Evaluation of systemic insecticides for insect control. J. Econ. Entomol., 58: 666-669.

Ruck, P. 1961a. "Electrophysiology of the Insect Dorsal ocellus". "I. Origin of the components of the electroretinogram". J. Gen. Physiol., 44: 605.

Ruck, P. 1961b. "Electrophysiology of the insect Dorsal ocellus". II. Mechanisms of generation and inhibition of impulses in the ocellar nerve of dragonflies. J. Gen. Physiol., 44: 629.

- Schmidt, L. & G. Philips. 1958. Granulosis- a new virus disease of the fall web-worm. Fac. Agr. Forestry, Inst. Entomol. Zagreb, 1: 1-27.
- Schremmer, F. 1950. Bemerkungen zur Ocellen funktion bei hummeln. Öst. zool. Z., 2: 242-274.
- Scott, H.A.; Young, S.Y. & J.A. McMasters. 1971. Isolation and some properties of components of nuclear polyhedra from the cabbage looper, Trichoplusia ni. J. Invertebr. Pathol., 18: 117-182.
- Sillans, D.; Estève, J. & J.M. Legay. 1969. Influence de l'anesthésic à l'anhydride carbonique sur le rythme circulatoire des chenilles de Bombyx mori. C.R. Acad. Sci. Paris, 269: 1209.
- Sjöstrand, F.S. 1967. Electron Microscopy of Cells and tissues. Academic Press, N.Y. and London, V.1, 462 p.
- Smirnoff, W.A. 1962. A nuclear polyhedrosis of Erannis tiliaria (harris) (Lepidoptera, Geometridae). J. Insect Pathol. 4:393-400.
- Smirnoff, W.A.; McNeil, J.N. & J.R. Valero. 1976. Experiments on the control of the European skipper, Thymelicus lineola (Lep.: Hesperidae) by aerial application of a Nuclear Polyhedrosis virus. Can. Ent., 108: 1221-1222.
- Smith, K.M. 1967. Insect Virology. Academic Press, N.Y. and London. 250 p.
- Smith, K.M. 1971. The viruses causing the polyhedrosis and granuloses of insects. em Maramorosch K. & E. Kurstak Comparative Virology, 479-507. Academic Press, N.Y.
- Smith, R.F. 1973. Considerations on the safety of certain biological agents for arthropod control. Bull. Wld, Hlth. Org. 48: 685-698.

Solomon, M.E. 1957. Dynamics of insect populations. Ann. Rev. Ent., 2: 121-142.

Somme, L. 1967. The effect of temperature and anoxia on haemolymph composition and supercooling in three overwintering insects. J. Insect Physiol., 13: 805-814.

Stairs, G.R. 1964. Dissemination of nuclear polyhedrosis virus against the forest tent caterpillar, Malacosoma disstria (Hübner) (Lepidoptera; Lasiocampidae). Can. Entomologist., 96: 1017-1020.

Stairs, G.R. 1965. The effect of metamorphosis on NPV infection in Lepidoptera. Can. J. Microbiol., 11: 509-512.

Stairs, G.R. 1974. Use of viruses for microbial control of insects. in Burges, H.D. & N. W. Hussey (Eds.). Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press, London and N.Y., 97-124.

Steinhaus, E.A. 1946. Insect Microbiology. Comstock (Cornell Univ. Press), N.Y., 763 p.

Steinhaus, E.A. 1949. Polyhedrosis (With disease) of the alfalfa caterpillar. J. Econ. Ent., 41: 859-65.

Steinhaus, E.A. 1951. Report on diagnoses of diseased insects 1944-1950. Hilgardia, 20: 629-678.

Steinhaus, E.A. 1953. Diseases of insects reared in the laboratory or insectary. Univ. Calif. Coll. Agr. Leaflet, 9: 1-26.

Steinhaus, E.A. 1954. The effects of disease on insect populations. Hilgardia, 23: 197-261.

- Steinhaus, E.A. 1958. Stress as a factor in insect disease. Proc. 10th. Intern. Congr. Entomol., Montreal.
- Steinhaus, E.A. 1960. Notes on polyhedrosis in Peridroma, Prodenia, Colias, Heliothis, and other Lepidoptera. J. Insect Pathol., 2: 327-333.
- Steinhaus, E.A. & G.A. Marsh. 1962. Report of diagnosis of diseased insects 1951-1961. Hilgardia, 33: 349-479.
- Steinhaus, E.A. 1963. Insect Pathology - An advanced treatise. Academic Press, N.Y. V.1 e V. 2, 661 p. e 689 p.
- Stelzer, M.J. 1967. Control of a Tent Caterpillar, Malacosoma fragile incurva, with an Aerial application of a NPV and Bacillus thuringiensis. J. Econ. Entomol., 60: 38-41.
- Summers, M.D. 1969. Apparent in vivo pathway of granulosis virus invasion and infection. J. Virol., 4: 188-190.
- 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., Engler, R., Falcon, L. & 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., San Francisco and London. V. 8: 3 - 28.
- Sweetman, H.L. 1936. The Biological Control of Insects. Comstock Publ. Co., Ithaca, N.Y., 46lp.

- Szirmai, J. 1957. Biologische Abwehr mittels Virus zur Bekämpfung der *Hyphantria cunea* Drury. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 4: 31 - 42.
- Tanada, Y. 1959. Microbiol control of insect pests. Ann. Rev. Ent., 4: 277 - 302.
- Tanada, Y. 1961. The epizootiology of virus diseases in field populations of the Armyworm Pseudaletia unipuncta (Haworth). J. Insect Pathol., 3: 310 - 323.
- Tanada, Y. 1963. Epizootiology of infectious Diseases. ~~em~~, E.A. Steinhaus (Ed.), Insect Pathology. An Advanced Treatise 1: 423 - 463, Academic Press, N.Y.
- Tanada, Y. 1967. Microbial pesticides. ~~em~~, Kilgore, W.W. & R.L. Doutt (Eds.). Pest control, biological, physical, and selected chemical methods. 31 - 38, Academic Press, N.Y.
- 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.
- Tanada, Y. & E.M. Omi. 1974. Epizootiology of virus diseases in three lepidopterous insect species of alfalfa. Res. Popul. Ecol., 16: 59 - 68.
- Tanada, Y.; Hess, R.T. & E.M. Omi. 1975. Invasion of a Nuclear Polyhedrosis Virus in Midgut of the Armyworm, Pseudaletia unipuncta, and the Enhancement of a Synergistic Enzyme. J. Invertebr. Pathol., 26: 99 - 104.
- Thomas, G.M. & G.O. Pionar. 1973. Report of diagnoses of diseased insects. 1962-1972. Hilgardia, 42: 261 - 360.

- Thompson, C.G. & E.A. Steinhaus. 1950. Further tests using a polyedrosis virus to control the alfalfa caterpillar. Hilgardia, 19: 411 - 445.
- Thompson, J.V. 1968. Isolation of a Nuclear Polyhedrosis virus from the Almond Moth, Cadra cautella. J. Invertebr. Pathol., 10: 441-444.
- Tinsley, T. W. 1975. Viruses as pesticial agents: Potential and Limitations. Proc. 8th Br. Insectic. Fungic. Conf. Brighton.
- 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 H. Fraenkel-Conrat & R. R. Wagner (Eds.), Comprehensive Virology. 12: 1 - 99, Plenum Press, N. Y.
- Vago, C. 1951a. Phénomène de "latentia" dans une maladie à ultravirus des insectes. Rev. can. biol., 10: 299 - 308.
- Vago, C. 1951b. Polyédrie du Bombyx mori L. aux symptômes atypiques Bull. Soc. Entomol., 56: 108 - 111.
- Vago, C. 1956. L'enchaînement des maladies chez les insectes. J. Silkworm, 8: 39 - 47.
- Vago, C. 1963. Predispositions and Interrelations in Insect Diseases em Steinhaus, E. A. (Ed.). Insect Pathology, An advanced treatise. 1: 339 - 379.
- Vago, C. & O. Croissant 1959. Recherches sur la pathogénèse des viroses d'insectes. La libération des virus dans le tube digestif de l'insecte à partir des corps d'inclusion ingérés. Ann. Epiphyt., 10 : 5 - 18

- Vago, C. & R. Cayrol 1955. Une virose à polyèdres de la noctuelle Plusia gamma L. (Lepidoptera).
Ann. inst. natl. recherche agron., Sér. C, 4 : 421 - 432
- Vail, P.V. & I.M. Hall 1969a . The histology of a Nuclear Polyhedrosis in larvae of the cabbage looper, Trichoplusia ni, related to symptoms and mortality.
J. Invertebr. Pathol., 13: 188 - 198
- Vail, P.V. & I.M. Hall 1969b. The influence of infections of Nuclear-Polyhedrosis Virus on adult cabbage loopers and their progeny.
J. Invertebr. Pathol., 13: 358 - 370
- van den Bosch, R. & K.S. Hagen 1966. Predaceous and parasitic arthropods in California cotton fields.
Bull. Calif. agric. Exp. Stn., 820 : 32 p
- van den Bosch, R.; Leigh, R.; Gonzales, D. & R.E. Stinner 1969
Cage studies on predators of the bollworm in cotton.
J. Econ. Entomol., 62 : 1486 - 1489
- van der Geest, L.P.S. 1968 . A method for the purification of polyhedra. J. Invertebr. Pathol., 11 : 502
- Wallis, R.S. 1957 . Incidence of polyhedrosis of gypsy-moth larvae and the influence of relative humidity.
J. Econ. Entomol., 50 : 580 - 583
- Webster, F.M. 1961 . Winds and storms as agents in the diffusion of insects. Am. Nat., 36 : 795 - 801
- Wetzel, H. & D. Luger 1978 . Electroretinograms to determine the visual sensitivity for tsetse flies (Diptera, Glossinidae).
Z. ang. Ent., 87 : 91 - 100

- Whitcomb, W.A. & K.Bell 1964. Predaceous insects, spiders, and mites of Arkansas cotton fields.
Arkansas Agr. Exp. Sta. Bull. 690
- White-Stevens, R. 1975. Pesticides in the environment.
Marcel Dekker, Inc., N.Y., Vol.1, 270 pp.
- White-Stevens, R. 1976. Pesticides in the environment.
Marcel Dekker, Inc. N.Y. , Vol.2, 458 pp.
- White-Stevens, R. 1977. Pesticides in the environment.
Marcel Dekker, Inc. N.Y., Vol. 3, 366 pp.
- Wigglesworth, V.B. 1972. The Principles of Insect Physiology.
Chapman & Hall, London, 827 pp.
- Wigglesworth, V.B. 1974. Insect Physiology.
Chapman & Hall, London, 166 pp.
- Wildy, P. 1971. Classification and nomenclature of viruses.
Monographs in Virology, 5 : 81 pp.
- Xeros, N. 1955. Origin of the virus-producing chromatic mass on net of the insect nuclear polyhedroses.
Nature, 175 : 588
- Xeros, N. 1956. The virogenic stroma in nuclear and cytoplasmic polyhedroses. Nature, 178 : 412 - 413.
- Yaeger, J.F. 1931. Observations on crop and gizzard movements in the cockroach, Periplaneta fuliginosa (Serv.).
Ann. Ent. Soc. Amer. ,24 : 739 - 745.