

## AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE UN VIRUS EN LARVAS

### DE *Euprosterina elaeasa* Dyar. (Lepidoptera: Limacodidae)

Jorge Pedraza V.<sup>1</sup>  
Emilio Luque Z.<sup>2</sup>  
Pedro Nel Franco B.<sup>3</sup>

#### RESUMEN

De larvas *Euprosterina elaeasa* Dyar, con síntomas de una infección bacteriana y/o viral, recolectadas en la plantación de Palmas Oleaginosas Bucarelia S.A." (Puerto Wilches, Colombia), se efectuó un estudio bacteriológico y virológico de los agentes causantes de dichos síntomas.

En el caso de infección bacteriana, se aislaron los gérmenes *Serratia marcescens* Bizio y *Bacillus subtilis* Cohn, los cuales se caracterizaron e identificaron mediante observaciones macroscópicas y la realización de pruebas bioquímicas.

Por primera vez en Colombia, se aisló un Virus de la Poliedrosis Nuclear de tipo Múltiple (M V P N) en *E. elaeasa*, mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y se identificó por microscopía electrónica y electroforesis. Así mismo, se realizó una secuencia general de la infección a nivel histopatológico.

Para probar la patogenicidad del virus aislado, se realizó un bioensayo con larvas de III, IV y V instar de *E. elaeasa*, las cuales se inocularon con 6 concentraciones del virus. Con los porcentajes de mortalidad obtenidos, se realizó un análisis de regresión por el méto-

do "probit" y se calculó la dosis letal media (DL50), obteniéndose un valor de 1,24 pol/mm<sup>2</sup> y 13,49 pol/mm<sup>2</sup>, para larvas de IV y V instar, respectivamente.

Se confirmó la patogenicidad del virus y se concluye que, a medida que aumenta el instar larval, se requiere de un DL 50 mayor.

#### SUMMARY

The present study was carried out in *Euprosterina elaeasa* Dyar larvae with symptoms of a bacterial and/or virus infection, collected at the plantation of "Palmas Oleaginosas Bucarelia S.A." located in Puerto Wilches, Colombia. The bacteria and virus responsible of the symptoms were identified.

In the case of a bacterial infection, *Serratia marcescens* Bizio and *Bacillus subtilis* Cohn, were isolated and characterized by macroscopic and microscopic observations and biochemical tests.

For the first time in Colombia, a Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (M N P V) were isolated of *E. elaeasa* by ultracentrifugation in saccharose gradients and identified by electronic microscopy and electrophoresis. A general sequence of the infection at a histologic level was performed.

To test the pathogenicity of the isolated virus a bioassay was carried out with larvae of the III, IV and V instar inoculated with 6 different concentrations of the M N P V. The Lethal Dose (DL50) was calculated by the "Probit analysis" obtaining 1,24

pol/mm<sup>2</sup> and 13,49 pol/mm<sup>2</sup> DL 50 for the larvae in the IV and V instar, respectively.

The pathogenicity of the virus is confirmed. It is concluded that as the instar larvae increases a higher LD 50 is required.

#### INTRODUCCION

En Colombia, el cultivo de Palma Africana de Aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) ha sido el principal motor de desarrollo económico y social de la agricultura en amplias regiones del país que, antes se consideraban como fronteras agrícolas.

Entre las plagas más importantes que afectan este cultivo, se encuentra *Euprosterina elaeasa* (Lepidoptera: Limacodidae), defoliador que ha causado grandes pérdidas económicas en varias plantaciones colombianas, particularmente en la región del Magdalena Medio. En esta área, influida por el cultivo de Palma Africana de Aceite, se han detectado, en larvas de *E. elaeasa*, síntomas de infecciones de tipo bacteriana y/o viral, que hacen parte del control biológico natural de este insecto.

Con el fin de determinar estas causas y orientarlas hacia el manejo y regulación de las poblaciones de esta plaga, se realizó un estudio, cuyos objetivos principales fueron aislar e identificar los agentes causantes de dichos síntomas, seleccionar el ó los patógenos que presentaran la posibilidad de incorporarlos a programas de control biológico, realizando una evaluación preliminar de su efectividad en larvas de *E. elaeasa* en condiciones de laboratorio.

<sup>1</sup> Anteriormente, estudiante de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

<sup>2</sup> Profesor Asistente. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, A.A. 14490.

<sup>3</sup> Ingeniero Agrónomo, División de Sanidad Vegetal, Palmas Oleaginosas. Bucarelia, A.A. 050364.

## REVISION DE LITERATURA

El control microbiológico es, actualmente, uno de los métodos de control de plagas más promisorio, debido a los adelantos alcanzados en la producción masiva de patógenos de insectos, entre los cuales, los virus ocupan un lugar prominente y, entre estos, los del género Baculovirus han sido la causa predominante de enfermedades en lepidópteros, razón por la cual son considerados componentes ideales para programas de manejo y regulación de las poblaciones de plagas.

Entre las características que ofrece el control de plagas por medio de estos virus, está su protección al ambiente, la especificidad que los hace inócuos para insectos benéficos y vertebrados, incluyendo al hombre.

Otras consideraciones importantes son que los virus presentan una alternativa para disminuir el uso de insecticidas químicos, son muy efectivos, selectivos y seguros y tienen una relativa facilidad de producción y alta capacidad de distribución y son almacenables por largos períodos de tiempo y los insectos no crean resistencia. Actualmente, muchas organizaciones relacionadas con agricultura han aceptado estos agentes de control como una de las mejores soluciones a los problemas de insectos plagas y un componente importante de las estrategias de manejo de las mismas (World Health Organization, 1973).

### Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN)

#### — Morfología del Poliedro

Las especies de virus que pertenecen al género Baculovirus, aislados de los insectos y causales de la poliedrosis nuclear, se caracterizan por la formación de una estructura proteínica cristalina, llamada poliedro o cuerpo de inclusión y se localizan dentro del núcleo de las células infectadas. Estos cuerpos y su característica localización dentro de las células dan a este grupo su nombre. (Harrap, 1972a, 1972b).

Los cuerpos de inclusión difieren en forma y tamaño (aproximadamente

0,5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) y, generalmente, dentro de un mismo insecto hospedante tiene una forma característica, sin embargo, se pueden ver, entre los poliedros de un insecto enfermo, varias formas (Harrap, 1972a; Tinsley y Harrap, 1978).

#### — Morfología del Virion

El Virion o partícula viral es baciliforme y de tamaño variable, pudiendo medir 200 a 400 nm de largo por 40 a 110 nm de ancho y contiene una membrana o envoltura. Morfológicamente, se pueden distinguir dos tipos de virus, según la cantidad de viriones envueltos y contenidos dentro del poliedro a saber: SNPV (simple), que posee un solo virion por envoltura y MNPV (Múltiple), que puede contener varias partículas virales por envoltura (Matthews, 1982).

#### — Composición Química

El poliedro está conformado por una proteína cristalina, con peso molecular de  $25 \times 33 \times 10^3$  daltons y esta proteína única se la denomina poliedrina. (Matthews, 1982). Los viriones son estructuralmente complejos y están constituidos, por lo menos, de 10 a 25 proteínas con peso molecular de  $10 \times 160 \times 10^3$  daltons, aproximadamente (Harrap et al., 1977; Summers y Smith, 1978; Matthews, 1982).

#### — Propiedades Físicas y Químicas

Los cuerpos poliédricos, asociados con estos virus, son notablemente resistentes al ataque de varios productos químicos, son insolubles en agua, alcohol, éter, cloroformo o acetona, pero solubles en NaOH,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Esta última sustancia, en diferentes concentraciones, se usa para remover las partículas virales del poliedro. Soluciones ácidas o bases fuertes disuelven la proteína del poliedro; y, además, son resistentes a tinciones biológicas, a menos que se traten previamente con un ácido débil. (Burges y Hussey, 1981).

#### — Propiedades Biológicas

Los Virus de la Poliedrosis Nuclear han

sido aislados de insectos que pertenecen a los órdenes Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Orthoptera, Neuroptera, Coleoptera y Trichoptera, además, de ácaros y crustáceos. (Martignoni e Iwai, 1981).

Smith, 1976, reportado por Jiménez, 1980, anota, acerca de la poliedrosis nuclear, que el período de incubación puede durar de una a tres semanas y, en gran parte de este período, las larvas pueden no mostrar síntomas. Como regla general, en los estados tempranos de la infección, las larvas "vomitan" y rehusan comer. El primer síntoma externo definido puede notarse en la coloración del tegumento, el cual se torna excesivamente frágil hasta romperse, liberando millones de poliedros. Este rompimiento y la subsiguiente liberación del contenido del cuerpo son características de la poliedrosis nuclear y la granulosis y estas enfermedades se diferencian de la poliedrosis citoplasmática, porque en ésta no se presenta ruptura del tegumento.

Burges y Hussey (1981) anotan que en larvas infectadas con VPN y VG, el tegumento, generalmente, cambia de color y el insecto comienza a ponerse flácido y frágil y la larva, en estado avanzado de enfermedad, puede colgarse en una posición invertida. A la muerte de la larva, frecuentemente su tegumento se rompe y libera la masa de cuerpos de inclusión.

#### — Propagación a Nivel Histológico

Varios estudios han demostrado que, en insectos del orden Lepidoptera, un ciclo inicial de replicación del virus ocurre en el epitelio del intestino medio. Los viriones producidos en estos núcleos pasan a través de la base de la membrana del estómago e infectan la mayoría de los tejidos y los principales sitios son la matriz traqueal, el cuerpo graso y la epidermis. (Harrap y Robertson, 1968; Cunningham, 1971; Kawanishi y et al. 1972).

Un ciclo definitivo de replicación y ensamblaje ocurre en estos tejidos, luego de lo cual, los viriones son envueltos en una membrana y, posteriormente,

ocluidos dentro de una proteína cristalina, conocida como poliedro. Las inclusiones o poliedros son fácilmente detectables en el núcleo de las células infectadas y presentan una citopatología que es característica de las infecciones iniciadas por virus de este género. (Harrap. 1972b; Knudson y Harrap, 1976).

El poliedro representa la forma natural por medio de la cual la infección del virus es transmitida a los insectos. Cuando las larvas ingieren alimento contaminado con poliedros, el medio alcalino y la actividad enzimática asociada con el intestino de la larva, solubiliza la proteína del poliedro, liberando los viriones, iniciándose la infección (Harrap. 1972b; Knudson y Harrap, 1976).

La secuencia de los eventos comienza con la hipertrofia del núcleo y la condensación de la cromatina (Virogenic Stroma). Posteriormente, se presenta, en el núcleo, un aumento en las estructuras granulosas y se inicia la formación de viriones, simultáneamente con la incorporación de éstos a los poliedros, y se incrementa la cantidad y tamaño de éstos. (Knudson y Harrap, 1976).

## MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en los laboratorios de Biología de la Universidad Javeriana de Bogotá y de Bioquímica de la Facultad de Medicina, del Centro de Equipos Interfacultades "CEIF" de la Universidad Nacional de Colombia y en el Laboratorio de Entomología de la Empresa "Palmas Oleaginosas "Bucarelia, S.A.", Puerto Wilches (Santander, Colombia).

### Aislamiento e Identificación de Bacterias

Los aislamientos se realizaron a partir de larvas con síntomas de bacteriosis (larvas de color café oscuro), procedentes de diferentes sitios de la región en estudio (Plantación de Bucarelia).

Los procedimientos y medios empleados para la identificación fueron los que, comunmente, se utilizan en esta clase de investigación. La identifica-

ción se realizó de acuerdo con las características culturales y morfológicas a nivel microscópico, y, además, las pruebas bioquímicas.

### Aislamiento e Identificación del Virus

#### Purificación de Poliedros.

Se recolectaron larvas con síntomas de virosis y, posteriormente, se maceraron durante cinco minutos, utilizando una solución buffer de fosfato 0,1 M, pH, 7,0. La suspensión resultante se filtró a través de cuatro capas de gasa y se le adicionó Na<sub>3</sub>N, en concentración de 0,1%.

Posteriormente, se realizaron centrifugaciones diferenciales, para obtener los poliedros semipurificados. Estos poliedros fueron colocados en un gradiente de sacarosa (40-80% P/V) y centrifugados a 100000 x g, durante 45 minutos, utilizando un rotor SW-41 Ti.

La banda de poliedros, ubicada en la concentración del 55 al 65% del gradiente, fue recuperada y lavada con buffer. Los poliedros así purificados fueron congelados a -70°C y, posteriormente liofilizados. La técnica se basó en procedimientos descritos por Harrap y Longworth (1974), Beaton et al. (1975), Summer y Smith (1978), con algunas modificaciones en el pH, soluciones Buffer, gradientes, gravedades y tiempo de centrifugación.

#### Inclusión y Corte de Tejidos

Las larvas sanas de V y VI instar se alimentaron con folíolos de Palma asperjados con una suspensión, la cual contenía poliedros del virus a una concentración de 10<sup>9</sup> Pol/ml y, después de cinco días, las larvas se disectaron y secciones de intestino, tegumento, tejido graso y tubos de Malpighi fueron procesados e incluidos para corte y observación al microscopio óptico y al electrónico.

#### Purificación de los componentes del Poliedro.

La proteína del poliedro, viriones y envolturas virales fueron removidas de los poliedros purificados, utilizando el método de Summers y Smith (1978), con algunas modificaciones.

## ELECTROFORESIS DE PROTEINAS VIRALES

La electroforesis se realizó utilizando el método de Laemmli (1970), analizando la proteína del poliedro, los viriones y las envolturas virales. Los pesos moleculares se calcularon de acuerdo con el método descrito por Weber y Osborn (1969) y el gel se tiñó con nitrato de plata, utilizando el procedimiento descrito por Blum y et al. (1987).

### Recuento de Poliedros

De la muestra de poliedros liofilizados se tomaron 25 mg que se suspendieron en agua destilada, para realizar el recuento en cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad.

### Prueba de Patogenicidad

Las larvas de *E. elaeasa* de III, IV y V instar fueron inoculadas con 6 concentraciones de Poliedros. Las dosis evaluadas fueron: 3000; 1000; 100; 10; 1; 0,1 y 0,0 (Testigo) pol/mm<sup>2</sup> de superficie de folíolo. Estos tratamientos fueron arreglados en un D.C.A. con un factorial de 3x7 (3 instares, 7 dosis). Las unidades experimentales constaron de 18 larvas y se realizaron 5 repeticiones por tratamiento.

A partir de la fecha de infección, se realizaron, cada 24 horas, lecturas de mortalidad por virus. Además, se tuvo en cuenta la sintomatología que las larvas inoculadas presentaban con relación a los tejidos.

### Análisis Estadístico

Con los datos de mortalidad obtenidos en la prueba de patogenicidad, se realizó un análisis de regresión por el método "Probit", utilizando el paquete estadístico SAS.

## RESULTADOS Y DISCUSION

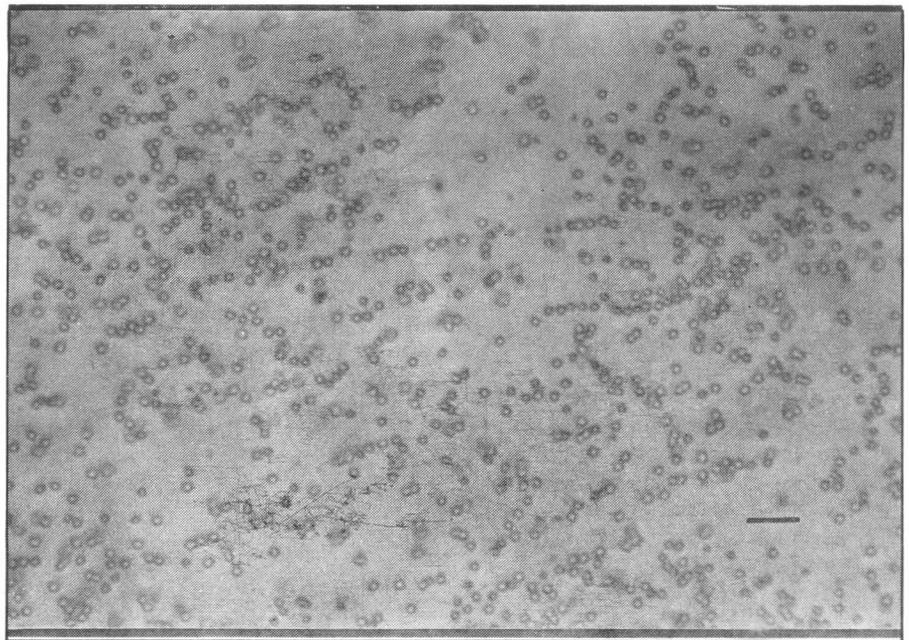
### Aislamiento e Identificación de Bacterias.

Las larvas con síntomas bacteriales se caracterizaron por la presencia de las bacterias *Serratia marcescens* Bizio (Eubacteriales: Enterobacteriaceae) y

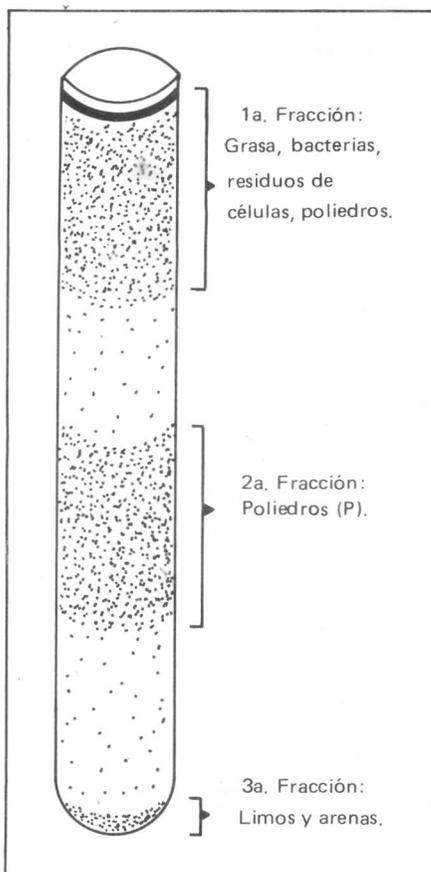
**Bacillus subtilis** Cohn. (Eubacteriales: Bacillaceae), que son patógenas registradas como causantes de septicemias en humanos (Black y et al 1967; Dason, 1968), infecciones intestinales (Mc Cormack y Kuyrin, 1966), citados por Burges y Hussey (1971). Estas aseveraciones y el hecho de que afectan a algunos insectos benéficos (Godwin y Shields, 1982), constituyen inconvenientes para ser tenidas en cuenta como alternativa en el control de plagas.

**Aislamiento e Identificación del virus.**

La centrifugación en gradientes de sacarosa facilitó la separación de los poliedros de otros materiales contaminantes, como grasa, bacterias, residuos celulares y limos. (Figura 1). Estos poliedros, observados al microscopio óptico, presentaron forma irregular redondeada con diámetro entre 0,855 y 1,955  $\mu\text{m}$  (Figura 2).



**Figura 2.** Microfotografía óptica de un frotis de Poliedros del VPN de *Euprosterina elaeasa*. Dyar. (3.250 X; Barra= 3.0  $\mu\text{m}$ ). Foto: CEIF).



**Figura 1.** Esquema de las fracciones del gradiente de densidad de sacarosa (40-80% P/V). Centrifugado a 100.000 x g. por 45 min. en un rotor SW.-41 Ti.

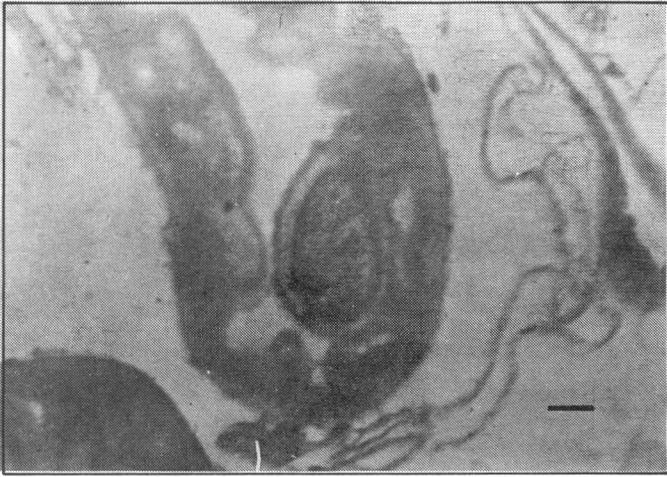
Las observaciones de los cortes de tejido infectado mostraron en células del intestino, tejido graso, epidermis y tubos de Malpighi, hipertrofia del núcleo e inclusiones nucleares irregulares en forma y tamaño. Estas inclusiones son iguales a los poliedros purificados. La cantidad de poliedros encontrados por núcleo varió de 5 a 22. También, se observaron, dentro del núcleo, grandes espacios o vacuolas (1 o 2) sin ninguna estructura interna; este fenómeno es registrado por Hudson et al. (1979), quienes realizaron un estudio en larvas de *Anticarsia gemmatilis* (Hubner) y confirman la presencia de vacuolas dentro del núcleo de células infectadas con VPN y afirman que no fue posible encontrar registros previos de estas estructuras y su función es desconocida.

En las células que presentaron núcleos hipertrofiados, éstas alcanzaron tamaños hasta de 6 veces mayor que el núcleo de células normales. No todos estos núcleos contenían poliedros y algunos mostraron manchas oscuras en diferentes zonas del núcleo, debido, posiblemente, a la concentración de la cromatina (Virogenic Stroma). Este fenómeno, que prevee que la infección por los virus se ha desarrollado en insectos, es reportado, también, por Cunningham (1971).

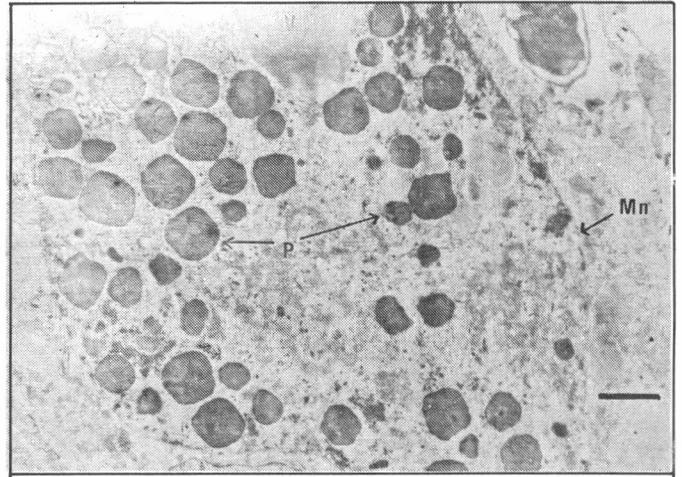
Los cortes de los tubos de Malpighi observados al microscopio óptico presentan células con diferente grado de infección y células normales. Levington y Yearian (1972) encontraron resultados similares en infecciones virales en *Pseudoplusia includens* y afirman que el sitio de replicación del VPN fue restringido al núcleo y que las gonadas y tubos de Malpighi fueron moderadamente infectados. El presente estudio presenta una secuencia general de infección por el VPN de *E. elaeasa*, que es similar a otros Baculovirus estudiados (Figuras 3, 4 y 5).

Las partículas virales presentaron morfología homogénea, pero tamaño variable y presencia de envolturas que contienen de 1 a 11 partículas virales y se observaron, además, envolturas en proceso de desprendimiento y envolturas vacías. (Figuras 6 y 7). La longitud de la partícula viral es de 307,50 nm y el ancho de 68,12 nm y es de forma baciliforme o de varilla. El tamaño y forma concuerda con el observado usualmente en Baculovirus (200 a 400 nm x 40 a 110 nm) (Matthews, 1982).

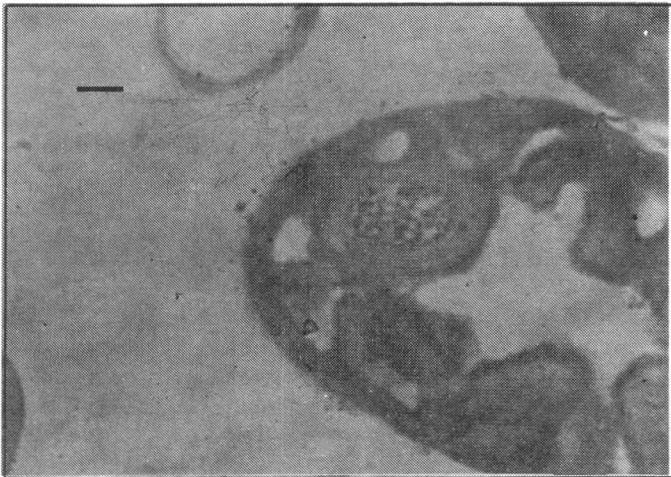
La electroforesis de los componentes del poliedro produjo patrones de bandas de proteínas diferentes para cada una de las muestras analizadas. La par-



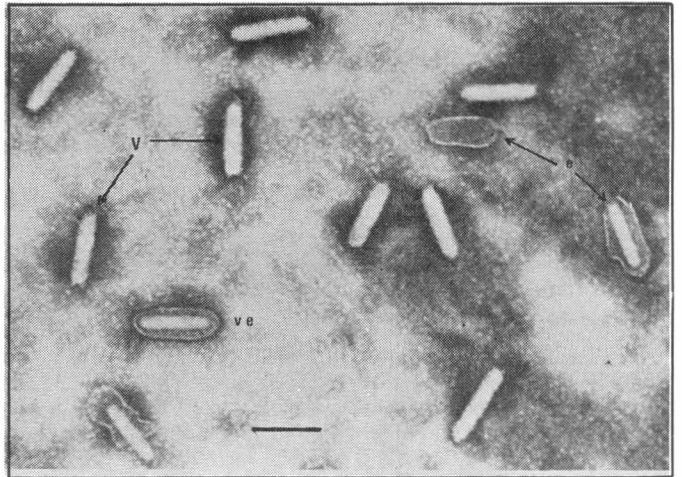
**Figura 3.** Microfotografía óptica del corte transversal en un tubo de Malpighi de larvas de *Euprosterina elaeasa* Dyar, donde se observa una célula con hipertrofia del núcleo y estructuras granulares internas correspondientes a los poliedros en formación, en un estado inicial de infección causado por el VPN. (3.250 X; Barra =  $\mu$ m). Foto: CEIF.



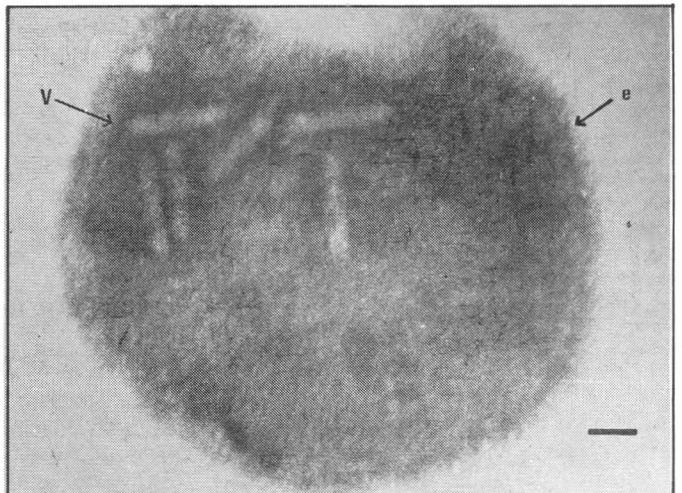
**Figura 5.** Microfotografía electrónica de un corte transversal de una célula del intestino medio de *Euprosterina elaeasa* Dyar, infectada con poliedros del VPN, en un estado final de infección. P: poliedros, Mn: membrana nuclear, V: vacuolas. Las manchas internas de los poliedros corresponden a los viriones individuales o en grupo, incluidos dentro de éstos. (7.850 X; Barra = 2,0  $\mu$ m). (Foto: CEIF).



**Figura 4.** Microfotografía óptica del corte transversal de un tubo de Malpighi de larvas de *Euprosterina elaeasa* Dyar, donde se observa una célula con hipertrofia del núcleo y estructuras granulares internas correspondientes a los poliedros en formación, en un estado intermedio de infección causado por el VPN. (3250 X; Barra = 3  $\mu$ m). (Foto: CEIF).



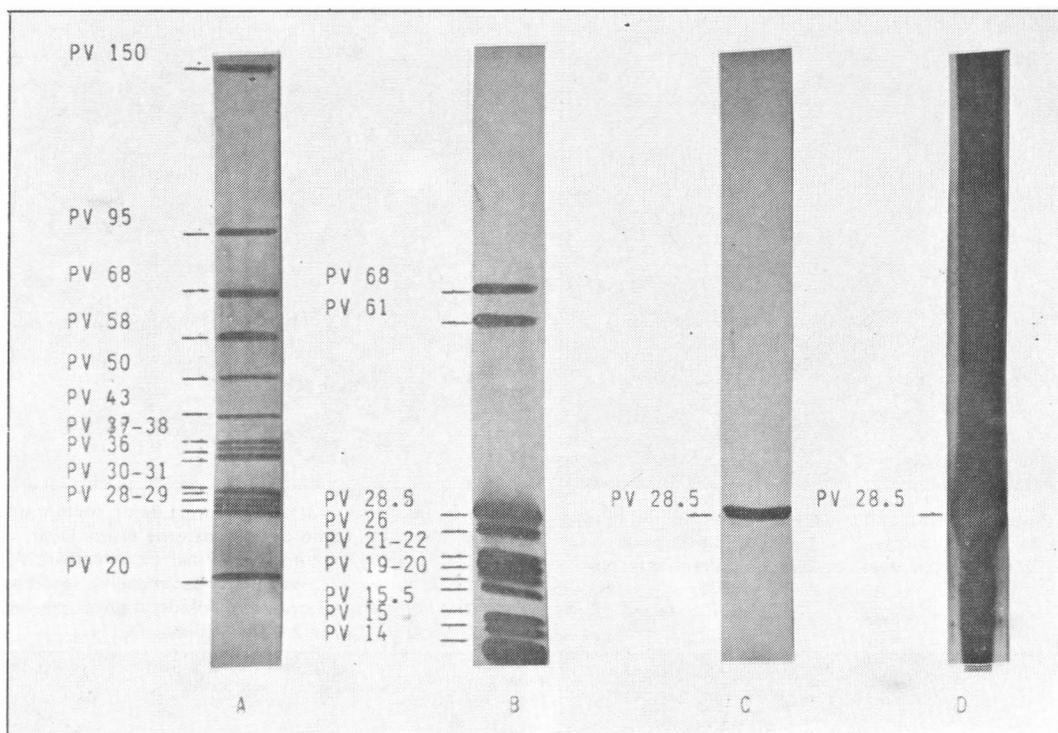
**Figura 6.** Microfotografía electrónica de partículas virales sin envoltura (v), partícula viral con envoltura (ve), envoltura en proceso de desprendimiento y envoltura vacía (e); del VPN de *Euprosterina elaeasa* Dyar. (62.500 X; Barra = 300 nm). (Foto: CEIF).



**Figura 7.** Microfotografía electrónica de una envoltura viral en proceso de degradación (e), conteniendo varias partículas virales (v), del VPN de *Euprosterina elaeasa* Dyar. (56.000 X; Barra = 150  $\mu$ m). (Foto: CEIF).

tícula viral presentó un total de 14 proteínas, con un rango de 20.000 a 150.000 daltons; las envolturas virales presentaron un total de 11 bandas con un peso entre 14.000 a 68.000 daltons; la proteína del poliedro se presentó en mayor proporción y con un peso aproximado a 28.500 daltons (Figura-8).

Esto confirma que los Baculovirus y, en particular los VPN, son estructuralmente complejos y poseen por lo menos 12 a 25 proteínas con pesos moleculares de 10 a 160 x 10<sup>3</sup> daltons (Matthews, 1982).



**Figura 8.** Electroforesis de las proteínas virales (PV) y pesos moleculares ( $\times 10^3$  daltons) del VPN de *E. elaeasa*. Carril A: Proteínas de la partícula viral: 35  $\mu$ g. Carril B: Proteínas de la envoltura viral: 35  $\mu$ g. Carril C: Proteína del Poliedro: 5  $\mu$ g. Carril D: Proteína del Poliedro: 25  $\mu$ g.

**Prueba de Patogenicidad**

Con los datos de mortalidad obtenidos en laboratorio y mediante el análisis "Probit", se calculó la DL 50, el cual presentó un valor de 1,24 pol/mm<sup>2</sup> y 13,49 pol/mm<sup>2</sup> para larvas de IV y V instar, respectivamente.

Estos valores de DL50 obtenidos son similares a otros, entre los cuales están la DL50 de *H. gemmatalis* y del VPN de *Heliothis* Spp, los cuales presentaron actividad entre 0,7 y 12,7 pol/mm<sup>2</sup> de superficie de dieta (Shapiro e Ignoffo, 1970; Richter y Fuxa, 1984). Así, el VPN de *E. elaeasa* muestra un buen potencial para el control micro-biológico de esta plaga.

**CONCLUSIONES**

1. Se aislaron e identificaron dos especies de bacterias las cuales fueron: *Serratia marcescens* Bizio y *Bacillus subtilis* Cohn.
2. Se aisló e identificó el virus, el cual se clasifica como Virus de la Poliedrosis Nuclear de tipo Múltiple de

*Euprosterina elaeasa* Dyar (*E. e. MVPN*). (Baculoviridae: Baculovirus).

3. Se comprobó la patogenesis viral y se calculó la DL50 del VPN para larvas de IV y V instar de *E. elaeasa* (1,24 y 13,49 Pol/mm<sup>2</sup>, respectivamente).
4. La identificación del virus se basó en una combinación de características morfológicas y bioquímicas, complementadas con información biológica del hospedante a nivel histológico, así como de su sintomatología.
5. La alta mortalidad causada por el VPN de *E. elaeasa*, en condiciones de laboratorio, muestra un buen potencial como un insecticida biológico para el control integrado de este insecto.

**RECOMENDACIONES**

1. Para conocer su comportamiento en condiciones naturales, se deben realizar evaluaciones del VPN en campo, teniendo en cuenta las DL50 obtenidas en laboratorio.

2. Es conveniente que estas evaluaciones se realicen con poliedros puros y liofilizados, como un procedimiento para conservar la virulencia del virus y obtener un mejor control de la plaga.
3. Se recomienda aplicar el VPN en los primeros instares de *E. elaeasa*, ya que éstos requieren una DL50 menor.
4. La identificación, caracterización y liofilización del virus son un aporte básico para futuros trabajos prácticos y de nuevas investigaciones y constituyen un punto de partida para llegar a una producción semi-industrial o industrial de cepas comerciales con virus patógenos de insectos, en especial con los pertenecientes al género Baculovirus, sobre la base de la necesidad de aprovechar el potencial de acción de entomopatógenos en el manejo adecuado de plagas.

**BIBLIOGRAFIA**

BEATON, C.D. y B.K. FILSHIE. 1976. Comparative ultrastructural studies of

- insects Granulosis and Nuclear Polyhedrosis Viruses. *J. Gen. Virol.* V. 31 p. 151-16.
- BLUM, H., H. BEIER, and H.J. GROSS. 1987. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis*. 8, 93-99.
- BURGES, H.D., and N.W. HUSSEY. 1981. Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980 Academic Press, U.S.A. Ed. H.D.
- CUNNINGHAM, J. 1971. An Ultrastructural study of the development of a nuclear polyhedrosis virus of the eastern hemlock looper, *Lambdina fiscelloria*. *Canad. J. Microbiol.* V. 17, p. 69-72.
- GODWIN, P.A. and K.S. SHIELDS. 1982. Some interactions of *Serratia marcescens* nucleopolyhedrosis virus and *Blepharipa pratensis* (Diptera: Tachinidae) in *Lymantria dispar* (Lepidoptera Lymantriidae). *Entomophaga*. V. 27, p. 189-196.
- HARRAP, K.A. 1972 a. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. I. The Inclusion Body. *Virology*. V. 50, p. 114-123.
- HARRAP, K.A. 1972 b. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. III. Virus assembly. *Virology* V. 50, 133-139.
- HARRAP, K.A., C.C. PAYNE, and J.S. ROBERTSON. 1977. The properties of three Baculoviruses from closely related host. *Virology*. V. 79, p. 14-31.
- HARRAP, K.A., and J.S. ROBERTSON. 1968. A possible infection pathway in the development of a nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* V. 3, p. 221-225.
- HUDSON, J.S., G.R. CORNIR, and O.W. BARNETT, 1979. Ultrastructure of fat body cells of the velvetbean caterpillar infected with nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. pathol.* V. 33, p. 31-39.
- JIMENEZ, J. 1980. Estudios preliminares tendientes al control microbial de *Spodoptera frugiperda*. Programa Estudios para Graduados ICA—Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. (Tesis) p. 165.
- KAWANISHI, C.Y., M.D. SUMMERS, D.B. STOLTA, and H.J. ARNOTT. 1972. Entry of an insect virus in vivo by fusion of viral envelope and microvillus membrane. *J. Invertebr. Pathol.* V. 20, p. 104-108.
- KNUDSON, D.E., and K.A. HARRAP. 1976. Replication of a nuclear Polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: Microscopy study of the sequence of events of the virus infection. *J. Virol.* V. 17, p. 254-268.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T 4. *Nature* (London), V. 227, p. 680-685.
- LEVINGTON, J.H., and W.C. YEARLIAN. 1972. A Nuclear Polyhedrosis virus of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebrate pathol.* V. 19, p. 107-112.
- LOWRY, O.H., A. ROSEBROUGH, A.L. FARRA, and R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* V. 193, p. 265-275.
- MARTIGNONI, M.E., and P.J. IWAI. 1981. A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. In "Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980" (D. H.D. Burges, ed.) pp. 897-911, London/New York. Academic Press.
- MARTIGNONI, M.E., and P.J. IWAI. 1981. A Catalog of viral diseases of Insects and mites. USDA Forest Service General Technical Report PNW-40 2 nd ed., U.S. Dept. of Agric., Washington, D.C.
- MATTHEWS, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. IUMS. University of Auckland. New Zealand. Dept. of Cell Biology.
- RICHTER, A.R. y J.R. FUXA. 1984. Timing, Formulation, and persistence of a nuclear polyhedrosis virus and microsporidium for control of the velvetbean caterpillar (Lep. Noctuidae) in soybeans. *J. Econ. Entomol.* V. 77: p. 1299-1306.
- SHAPIRO, M. y C.M. IGNOFFO. 1970. Nucleopolyhedrosis of *Heliothis*: Activity of Isolates from *Heliothis zea*. *J. Invertebr. Pathol.* Vol. 16, p. 107-111.
- SUMMERS, M.D. and G.E. SMITH, 1978. Baculovirus Structural Polypeptides. *Virology* V. 84, p. 390-402.
- TINSLEY, T.W., and K.A. HARRAP. 1978. Viruses of invertebrates. *comp. Virol.* V. 12, p. 1-101.
- WEBER, K. and M. OSBORNE. 1969. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* V. 244, p. 4606-4412.
- W.H.O. 1973. The use of viruses for the control of insect pest and disease vectors. Report of a joint FAO/WHO Meeting on insect viruses. World Health Organization Technical Report series No. 531. GENEVA.