

MODALITÉS D'INFECTION
DES LARVES DE *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*
PAR *BEAUVERIA BASSIANA* AU COURS DE LA MUE

PAR

J. FARGUES & A. VEY

Station de Recherches de Lutte Biologique,
I.N.R.A., La Minière, 78000 Versailles, France

Station de Recherches Cytopathologiques
I.N.R.A., 30380 Saint-Christol-les-Alès, France

L'étude histopathologique des modalités d'infection des larves de *L. decemlineata* par *Beauveria bassiana* au cours de la mue a été réalisée pour mettre en évidence les phénomènes pathologiques particuliers se manifestant au cours du renouvellement du tégument en présence d'une infection cryptogamique.

Les techniques histologiques et la microscopie électronique à balayage permettent de suivre la pénétration du champignon chez les larves en prémue, montrant les modalités d'invasion du liquide exuvial et de contamination secondaire du tégument en formation. L'étude des perturbations de la mue chez les larves contaminées souligne l'importance des zones de déchirure du nouveau tégument, non seulement comme voies préférentielles de pénétration des éléments mycéliens multipliés dans le liquide exuvial, mais aussi comme portes d'entrée pour les bactéries.

Ces observations apportent une contribution originale à l'étude des mécanismes pathologiques provoquant une mortalité différée des insectes.

De nombreux travaux, consacrés à l'étude des maladies cryptogamiques des insectes, ont mis en évidence l'influence de divers facteurs liés au germe, à l'hôte ou au milieu (MÜLLER-KÖGLER, 1965; FERRON, 1967). Entre autres phénomènes, le rôle de la mue comme mécanisme naturel de résistance par rejet des téguments contaminés a été souvent signalé depuis les observations originales de KÜNCKEL D'HERCULAI (1899). Des infections expérimentales des larves de *Leptinotarsa decemlineata* SAY (*Col. Chrysomelidae*) par *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN nous ont permis de souligner l'acuité du problème de la coïncidence entre la phase infectieuse du germe (pénétration du tégument) et la phase réceptive de l'hôte (intermue) chez les insectes à cycle larvaire court, interrompu par plusieurs mues successives (FARGUES, 1972). En effet, suivant le moment où la contamination de la larve est réalisée en fonction du stade d'évolution de la mue, il a été observé que la maladie peut : soit être évitée, soit se manifester rapidement, soit à long terme au cours des stades ultérieurs

du développement de l'hôte. C'est pourquoi l'étude des modalités de l'infection à *Beauveria* a été effectuée dans ces conditions, qui se présentent fréquemment chez les insectes susceptibles d'être l'objet de recherches en lutte biologique avec les champignons entomopathogènes.

Matériel et méthodes

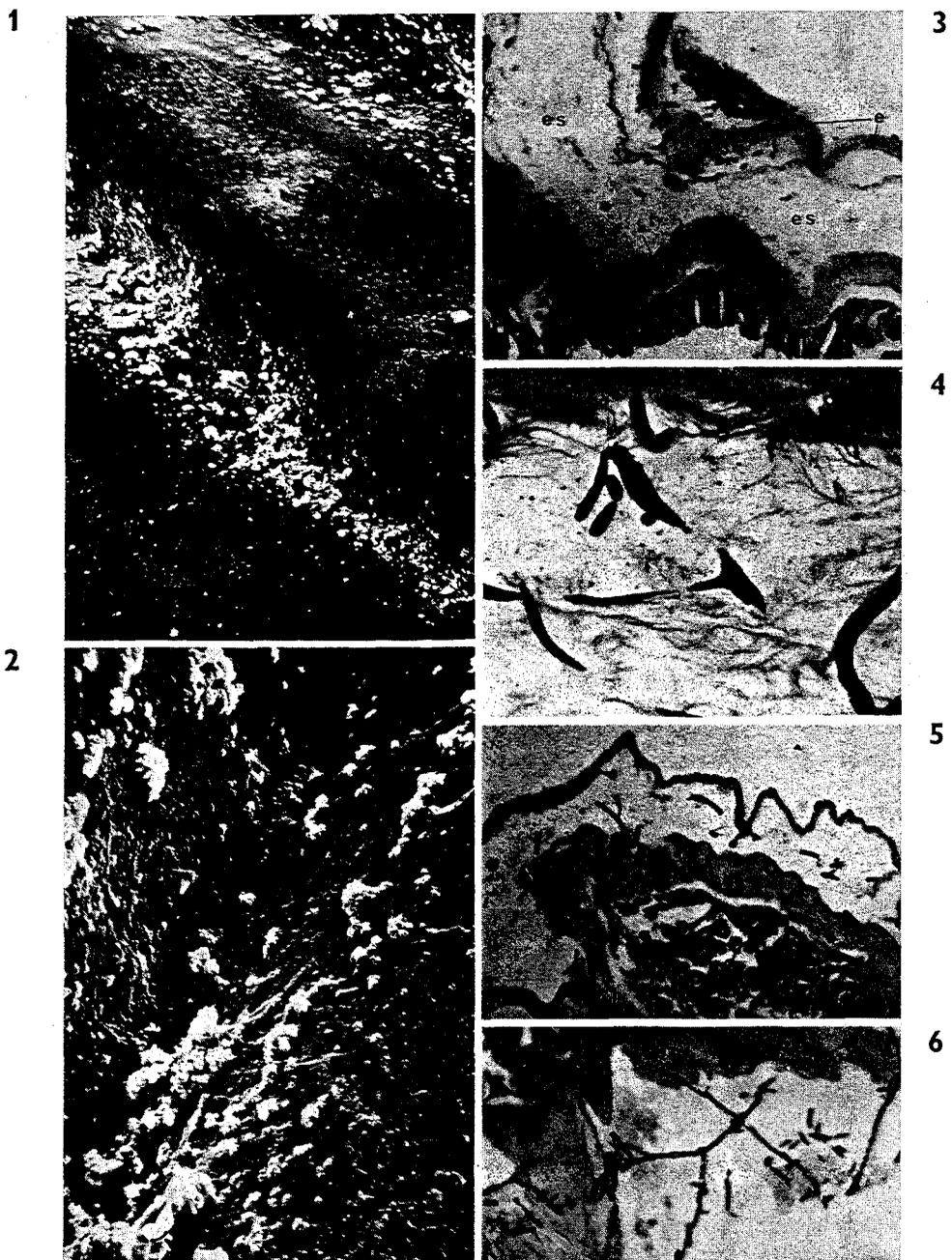
L'élevage du doryphore est réalisé sur feuillage de pomme de terre, de la variété Ackersegen, dans des cages placées en enceinte climatisée (photopériode de 16 h sur 24 h, température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ et hygrométrie de $70 \pm 5\%$). Les infections expérimentales ont été effectuées avec deux souches de *B. bassiana*, la souche n° 18 isolée en 1968 d'une chenille d'*Epinotia cedricida* (Lep. Tortricidae) et la souche n° 32 isolée en 1972 d'une larve de *L. decemlineata*, de virulence comparable pour les larves de doryphore. La multiplication du champignon a été assurée sur milieu nutritif gélosé. Le titrage des suspensions aqueuses de conidiospores a été fait par comptage à la cellule hématimétrique de Malassez.

La contamination des larves consiste à pulvériser une suspension de titre connu sous tour de traitement (FARGUES, 1972). Nous avons retenu la dose correspondant à un dépôt de 3.10^5 spores par centimètre carré. Cette quantité de spores de *B. bassiana* pulvérisée sur des larves en prémue, c'est-à-dire âgées de 2 jours alors que la durée du stade est de 3-4 jours, provoque une mortalité différée qui peut se traduire par la mort du tiers des larves en fin de 3^e stade, les autres individus succombant successivement au 4^e stade, en prénymphe ou en nymphose.

Nous avons fixé des larves au 3^e stade en prémue, en cours d'exuviation et des jeunes larves du 4^e stade afin de suivre l'infection pendant et après la mue, par les techniques histologiques et la microscopie électronique à balayage (M. E. B.).

PLANCHE 1

- FIG. 1. Tégument d'une larve du 3^e stade contaminée par *B. bassiana*, présentant un inoculum plus dense le long des zones intersegmentaires. M.E.B. $\times 270$.
- FIG. 2. Développement réduit de *Beauveria* à la surface du tégument après germination des conidiospores. M.E.B. $\times 980$.
- FIG. 3. Zone de pénétration de l'exuvie (e) avec déformation des couches internes de l'endocuticule et début de développement du champignon dans l'espace exuvial (es) chez une larve L3 en prémue; le tégument de la L4 (t) n'est pas encore contaminé. Coloration A.P.S.-hémalun. $\times 290$.
- FIG. 4. Désorganisation de l'endocuticule pénétrée par *B. bassiana*. Inclusion dans l'Épon. Coupe semi-fine tangentielle. $\times 720$.
- FIG. 5. Développement du champignon dans le liquide exuvial chez une larve L4 partiellement dégagée de son exuvie. Coloration A.P.S.-hémalun. $\times 290$.
- FIG. 6. Formation de blastospores dans le liquide exuvial d'une L3 en prémue. Coloration Giemsa. $\times 290$.



En vue d'observations en microscopie électronique à balayage les larves, dont les pattes étaient sectionnées, ont été placées pendant 24 heures dans du fixateur de Carnoy à 5°C, puis transférées dans deux bains successifs de 12 heures dans l'éthanol absolu à 20°C, et conservées dans le butanol. Après séchage des pièces à observer à l'air libre, celles-ci ont été fixées sur le porte-objet soit avec du vernis, soit avec de l'argent colloïdal Degussa n° 200. Les observations microscopiques ont été effectuées grâce à un appareil Cameca MEB 07.

Pour les études histologiques et cytologiques en microscopie photonique nous avons utilisé deux types de méthodes.

D'une part, des larves fixées *in toto* dans le liquide de Bouin, le Carnoy ou le Helly, ont été incluses dans le paraplast, et débitées en coupes sériées. Ces coupes, de 5 à 7 μ d'épaisseur, ont été colorées par l'hémalun-picro-indigocarmin, l'azan modifié, le Giemsa, et l'A.P.S. qui met particulièrement bien en évidence la paroi des champignons.

D'autre part, de petits fragments de tégument accompagné de tissus sous-jacents ont été prélevés, fixés pendant 1 heure à 4°C par le glutaraldéhyde à 2 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M de pH 7.2, et postfixés dans le tétr oxyde d'osmium à 0,5 % en solution dans le même tampon. Les pièces ont été ensuite déshydratées dans un gradient d'acétone et incluses dans l'Épon. A partir du matériel inclus ont été confectionnées des coupes semi-fines de 0,3 μ d'épaisseur environ, préparées avec l'ultramicrotome, et colorées par le bleu de toluidine.

Résultats et discussion

MODE DE PÉNÉTRATION DU CHAMPIGNON CHEZ LES LARVES EN PRÉMUE

Chez les larves du troisième stade contaminées par pulvérisation, l'inoculum apparaît plus dense le long des zones intersegmentaires, qui constituent des replis (fig. 1), ce qui rejoint les observations de BAO & YENDOL (1971) effectuées après contamination par immersion. Après germination des conidies le champignon se développe peu en surface du tégument (fig. 2), mais commence par contre à croître rapidement en direction de l'intérieur de l'organisme. Il pénètre à travers l'exuvie commençant à se détacher (fig. 3) en provoquant une certaine désorganisation des couches internes (fig. 4). De telles déformations de l'endocuticule ont été fréquemment notées (MÜLLER-KÖGLER, 1965) et ce phénomène est reconnu dans les récentes études ultrastructurales de ZACHARUK (1970) et de GÖTZ & VEY (1974).

Bien que la contamination des larves soit générale, le nombre de zones de pénétration effective paraît très limité. L'examen de l'ensemble des coupes histologiques n'a pas permis de détecter des sites d'infection préférentiels comme cela a été récemment démontré chez les larves de *Melolontha melolontha* L. par contamination ponctuelle (DELMAS, 1973).

Ayant traversé l'exuvie, le mycélium atteint le liquide exuvial et s'y développe sous forme d'hyphes et d'articles courts isolés du type blastospore (fig. 5 et 6). Dans l'espace exuvial, la croissance de *B. bassiana* est donc du même type que celle qui a été observée par de nombreux auteurs dans l'hémocoèle de divers insectes contaminés par des Deutéromycètes entomopathogènes (MÜLLER-KÖGLER, 1965; FERRON, 1967; Mc CAULEY *et al.*, 1968; PRATSERPHON & TANADA, 1968).

A partir du liquide exuvial, le champignon contamine secondairement la jeune larve dont le nouveau tégument est en formation. Au niveau de ces points d'infection secondaire les cellules hypodermiques sont désorganisées (fig. 7). Bien que dans ces zones d'histolyse on observe une forte concentration d'hémocytes autour des éléments mycéliens atteignant l'hémolymphe parmi des débris de cellules hypodermiques (fig. 8), les cas de phagocytose sont très rares. Cette lyse hypodermique est identique à celle que provoque la contamination primaire des larves en intermue (Mc CAULEY *et al.*, 1968; SANNASI, 1969). L'hypoderme paraît d'ailleurs être le seul tissu subissant des atteintes notables chez les larves de doryphore en prémue au cours du développement parasitaire de *B. bassiana*. Une étude préliminaire de LABOUR sur le tissu adipeux des larves de doryphore contaminées par ce champignon, faisant suite à un travail sur le corps gras de larves saines (LABOUR, 1970) confirme l'absence de lésions décelables dans ce tissu par la microscopie photonique. Nous insisterons cependant sur le fait que des altérations discrètes provoquées par le champignon peuvent n'être décelables qu'en cytologie fine (Mc CAULEY *et al.*, 1968, ZACHARUK, 1971).

PERTURBATION DE L'EXUVIATION CHEZ LES LARVES CONTAMINÉES

De l'interaction entre la pénétration du champignon et la mue, mécanisme de résistance de l'insecte hôte, dépend en grande partie le devenir de l'individu malade (FARGUES, 1972).

Chez les larves contaminées avant le début de l'exuviation il se produit très fréquemment dans la zone d'infection des déchirures du nouveau tégument, certainement très fragile, au cours de la mue. Il est possible que des cellules sanguines passent dans le liquide exuvial par ces brèches car le nombre d'hémocytes observés à ce niveau (fig. 9 et 10; 11; 12) semble trop élevé pour qu'il ne s'agisse que d'hémocytes ecdysiaux. Quoiqu'il en soit, ces déchirures sont des voies préférentielles de passage pour le germe qui s'est multiplié dans le liquide exuvial (fig. 3). Elles favorisent le passage des hyphes et peuvent rendre possible une contamination secondaire à partir des blastospores considérées comme incapables d'exercer une pression mécanique (MADELIN, 1963).

Une certaine proportion d'animaux meurt de mycose en prémue, sans que la jeune larve du 4^e stade ait pu se dégager de son fourreau exuvial. Par contre, d'autres L4 bloquées dans leur exuvie meurent de septicémie. Les examens histopathologiques des larves chez lesquelles la bactériose se manifeste montrent que les corps bactériens sont abondants dans la partie superficielle du caillot, et dans l'hémocoel immédiatement au-dessous de la zone cicatricielle (fig. 14). Nous en avons conclu que les blessures liées à la pénétration du champignon peuvent jouer le rôle de porte d'entrée pour les bactéries souvent présentes dans l'espace exuvial. Dans ce cas le développement bactérien intense inhibe la progression de l'agent cryptogamique dans l'hôte, phénomène qui se rattache aux enchaînements de maladies définis par VAGO (1956), et au parasitisme de blessure (VEY, 1968).

Ce résultat doit être rapproché des observations de ZACHARUK (1973) chez les larves d'Élatérides infectées par *Metarrhizium anisopliae*. Cet auteur constate d'une part un envahissement fréquent de l'espace exuvial des larves par des bactéries du sol de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (SCHR.) MIGULA, d'autre part des cas de mortalité avec des symptômes caractéristiques de bactériose parmi les larves dont la mue est perturbée. ZACHARUK attribue cette mortalité à l'action de *P. aeruginosa* et suppose que les bactéries pourraient infecter l'hôte au niveau du mésentéron à partir du liquide exuvial proctodéal, sans que soit démontrée l'existence d'un tel processus. Nos observations chez les larves de *L. decemlineata* contaminées par *B. bassiana*, montrent donc, pour la première fois, l'intervention d'un mécanisme expliquant des infections bactériennes dues à des germes qui, ayant envahi l'espace exuvial, parviennent ensuite à passer dans l'hémolymphe de l'insecte.

PLANCHE 2

- FIG. 7. Lyse de l'hypoderme au niveau d'une zone d'infection secondaire chez une larve L4 partiellement dégagée de son exuvie. Coloration Azan. $\times 290$.
- FIG. 8. Pullulement d'éléments mycéliens et accumulation d'hémocytes au niveau de la zone d'infection secondaire chez une L4 partiellement dégagée. Coloration Azan. $\times 290$.
- FIG. 9. Face interne de l'exuvie d'une L3 en prémue, montrant des hémocytes ecdysiaux et des hyphes développés dans le liquide exuvial. M.E.B. $\times 200$.
- FIG. 10. Vue détaillée du tégument d'une jeune L4 en cours d'exuviation montrant des blastospores (b) et des hémocytes ecdysiaux (h) M.E.B. $\times 500$.
- FIG. 11. Éléments mycéliens dans l'exuvie et l'espace exuvial, et hémocytes ecdysiaux (h). Inclusion dans l'Épon. Coupe semi-fine. $\times 290$.
- FIG. 12. Vue détaillée du même sujet. $\times 720$.
- FIG. 13. Pénétration massive de *B. bassiana* au niveau d'une blessure du tégument chez une larve L4 partiellement dégagée de son exuvie. Coloration hémalun-picro-indigo carmin. $\times 140$.

Cependant, la plupart des larves arrivent à se dégager de leur exuvie, et il est alors possible de distinguer schématiquement les trois modalités suivantes :

— Dégagement total de la nouvelle larve sans blessure apparente; des taches de mélanisation consécutives à une infection secondaire se forment rapidement sur la jeune larve du 4^e stade (fig. 15), les éléments fongiques de l'espace exuvial ayant commencé à infecter le nouveau tégument. La dimension des taches s'accroît, jusqu'à ce que ces dernières occupent la plus grande surface du corps de ces insectes.

— Dégagement total de la nouvelle larve avec zones cicatricielles fortement mélanisées, constituées par un caillot d'hémolymphe coagulée et un agglomérat d'hémocytes (fig. 16 et 17). Ces zones présentent le même aspect que celui de coupures tégumentaires expérimentales après mise en œuvre du processus de guérison (VAGO, 1956; VEY, 1968). En ces points, les éléments mycéliens sont souvent très abondants au niveau sous-hypodermique (fig. 18).

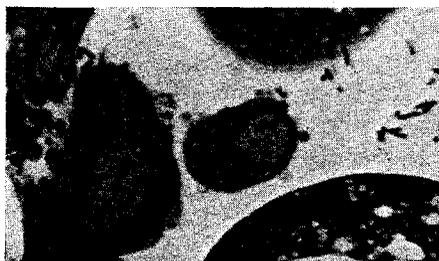
— Dégagement partiel de la nouvelle larve, l'exuvie restant fixée sur une partie de l'abdomen de la larve du 4^e stade (fig. 19 et 20). Dans la zone d'attache de l'exuvie et du nouveau tégument les structures tissulaires sont très modifiées, difficiles à reconnaître du fait de la forte mélanisation, et il s'est produit une accumulation d'hémocytes lâches, mais groupant de nombreuses cellules (fig. 21). Il est malaisé de distinguer dans cette région des éléments mycéliens, toutefois la présence de quelques-uns de ces éléments a pu être décelée (fig. 22).

Les larves survivantes continuent leur développement et s'enfouissent dans le substrat de nymphose. Un grand nombre d'entre elles présentent des éléments mycéliens dans l'hémolymphe (fig. 23) ou dans le tissu adipeux (fig. 24) qui provoqueront finalement une mortalité différée chez des prénymphe (fig. 25), des nymphes (fig. 26) ou des insectes parfaits (FARGUES, 1972, 1973).

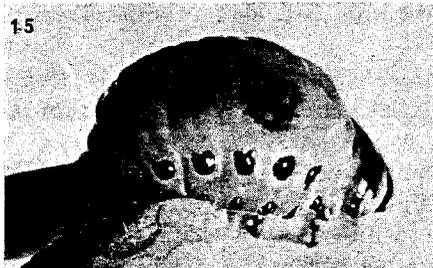
PLANCHE 3

- FIG. 14. Bactéries dans l'hémocoel d'une L3 en prémue présentant une blessure. Les corps bactériens sont abondants immédiatement au-dessous de l'hypoderme. Inclusion dans l'Épon. Coupe semi-fine. $\times 960$.
- FIG. 15. Larve du 4^e stade ayant rejeté normalement son exuvie sans blessure apparente mais présentant des taches de mélanisation. $\times 6$.
- FIG. 16. Larve L4 avec caillot en formation au niveau d'une zone de blessure dans la région abdominale. $\times 6$.
- FIG. 17. Aspect en coupe histologique de la zone de blessure cicatrisée. On remarque, en surface, l'importante masse d'hémolymphe coagulée et mélanisée. Coloration hémalun-picro-indigocarmin. $\times 140$.
- FIG. 18. Pullulation d'éléments mycéliens dans l'hémolymphe et les tissus de l'hôte au-dessous d'une zone cicatricielle mélanisée. Coloration Azan. $\times 290$.
- FIG. 19. Larve L4 chez laquelle l'exuvie est restée fixée sur le tégument abdominal au niveau d'une zone cicatricielle. $\times 5,5$.
- FIG. 20. Zone de fixation de l'exuvie sur le tégument de la L4 venant de muer. Coloration hémalun-picro-indigocarmin. $\times 28$.

14



15



16



17



18



19



20



Conclusion

Les observations relatées montrent que *B. bassiana* traverse le tégument des larves du 3^e stade de *L. decemlineata* en prémue, colonise le liquide exuvial sous forme d'hyphes et de blastospores, contamine le nouveau tégument en formation, et provoque une lyse localisée de l'hypoderme. Il s'en suit des déchirures de la paroi du corps de la jeune larve du 4^e stade au cours de sa sortie hors de l'exuvie.

Le processus de réinfection des larves au cours de la mue s'effectue donc à partir des éléments cryptogamiques développés dans l'espace exuvial et ce, suivant deux modalités :

— d'une part, une contamination secondaire à travers le tégument en formation suivant le schéma classique de l'infection primaire des larves en intermue;

— d'autre part, une contamination massive à travers les zones de blessures tégumentaires qui constituent des voies de pénétration pour le champignon mais aussi, accidentellement, pour des bactéries pouvant entraîner la mort de l'hôte par septicémie.

Ainsi, la mise en évidence des zones cicatricielles chez les larves du 4^e stade nous indique pourquoi la mue ne bloque pas toujours le processus infectieux ou n'en retarde pas le terme plus longtemps.

En conclusion, il est vrai que la barrière tégumentaire constitue l'obstacle majeur à l'infection par les Deutéromycètes entomopathogènes (MÜLLER-KÖGLER, 1965), et que chez les larves de doryphore les mues sont autant de facteurs de résistance de l'hôte qui diffèrent la mortalité (FARGUES, 1972). Cependant, l'existence même de cette

PLANCHE 4

FIG. 21. Détail de la zone d'attache de l'exuvie; on remarque : la mélanisation intense de l'exuvie et du tégument, qui présentent une structure perturbée, et l'accumulation d'hémocytes en position interne. Coloration hémalun-picro-indigocarmin. $\times 290$.

FIG. 22. Présence de quelques éléments mycéliens dans la zone de fixation de l'exuvie. Coloration Azan. $\times 140$.

FIG. 23. Éléments mycéliens (m) dans l'hémolymphe d'une larve du 4^e stade. Inclusion dans l'Épon. Coupe semi-fine. $\times 720$.

FIG. 24. Développement de *B. bassiana* dans l'hémolymphe d'une larve L4 présentant des zones cicatricielles; légères pénétrations du tissu adipeux. Coloration hémalun-picro-indigocarmin. $\times 290$.

FIG. 25. Individu contaminé en L3 dont la mortalité a été différée au 4^e stade en prénymphe. $\times 6$.

FIG. 26. Mortalité différée à la fin du développement nymphal après contamination au 3^e stade larvaire. $\times 3,5$.

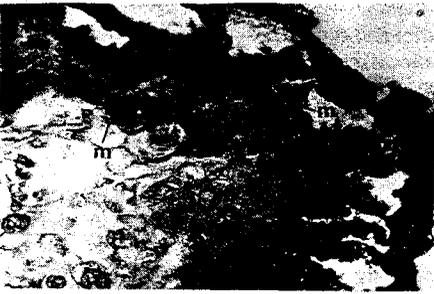
21



24



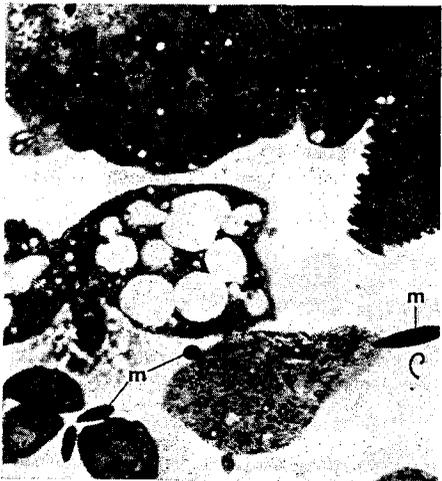
22



25



23



26



mortalité différée chez les individus contaminés est une preuve que l'exuviation n'est pas un mécanisme parfait de rejet du champignon. L'étude histopathologique explicite donc les résultats des infections expérimentales, en démontrant comment un germe qui pénètre par la voie tégumentaire peut se maintenir sur son hôte malgré le rejet des téguments contaminés.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mme GUILLAUMIN du Laboratoire d'Évolution des Êtres organisés de l'Université de Paris VI pour son assistance technique en microscopie électronique à balayage et Mme AMARGIER de la Station de Recherches de Cytopathologie de Saint-Christol-les-Alès pour sa participation aux travaux d'histologie.

SUMMARY

Means of infection of the larvae of *Leptinotarsa decemlineata* by *Beauveria bassiana* during the moult

The histopathological study of the infectious process of larvae of *L. decemlineata* by *B. bassiana* was carried out on moulting larvae infected experimentally. The experiments showed that the differed mortality among this type of insect with a short larval cycle, interrupted by close successive moults, depends on the interaction between the penetration of the fungus and the throwing out of the infected integument.

The penetration of *B. bassiana* into the larvae at the ecdysial stage was characterized by invasion of the moulting fluid: infection of the integument in formation and hypodermical histolysis. The disturbance of the tissues was followed by ntegumental ruptures of the young larva during the emergence from the ecdysis.

A double infectious process, of larvae in the moulting stage was shown. On one hand, an infection of the intermoult-integument occurred. On the other hand, the injured regions were routes for massive penetration of hyphal bodies in the hemolymph. Such injuries, also allowed the entrance of bacteria from the moulting fluid to the hemolymph and then caused a septicemia.

Larvae after ecdysis, with blackened integumentary patches or with cicatrices, showed hyphal bodies in the hemolymph, which may explain the differed mortality caused by the fungus.

BIBLIOGRAPHIE

- BAO, LI-LI & YENDOL, W. G. — 1971. Infection of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (KOLLAR) with the fungus *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILL. — *Entomophaga*, 16, 343-352.
- DELMAS, J. C. — 1973. Influence du lieu de contamination tégumentaire sur le développement de la mycose à *Beauveria tenella* (DELACR.) SIEMASZKO [*Fungi imperfecti*] chez les larves du Coléoptère *Melolontha melolontha* L. — *C. R. Acad. Sci. Paris*, 277, série D, 433-435.

- FARGUES, J. — 1972. Étude des conditions d'infection des larves de doryphore *Leptinotarsa decemlineata* SAY, par *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL. [*Fungi imperfecti*]. — *Entomophaga*, 17, 319-337.
- 1973. Sensibilité des larves de *Leptinotarsa decemlineata* SAY [*Col. Chrysomelidae*] à *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. [*Fungi imperfecti*, Moniliales] en présence de doses réduites d'insecticide. — *Ann. Zool.-Ecol. anim.*, 5, 231-246.
- FERRON, P. — 1967. Étude au laboratoire des conditions écologiques favorisant la mycose à *Beauveria tenella* du ver blanc. — *Entomophaga*, 12, 257-293.
- GÖTZ, P. & VEY, A. — 1974. Humoral encapsulation in *Diptera* [*Insecta*]: defence reactions of *Chironomus* larvae against fungi. — *Parasitologie*, 68, 1-13.
- KÜNCKEL D'HERCULAIS. — 1899. De la mue chez les insectes considérée comme moyen de défense contre les parasites végétaux ou animaux. Rôles spéciaux de la mue trachéale et de la mue intestinale. — *C. R. Acad. Sc. Paris*, 128, 620-622.
- MADÉLIN, M. F. — 1963. Diseases caused by Hyphomycetous fungi. In: *Insect Pathology. An advanced treatise. Vol. 2* (E. A. STEINHAUS ed.). — *Academic Press*, New York & London, 233-271.
- MC CAULEY, V. J. E., ZACHARUK, R. Y. & TINLINE, R. D. — 1968. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of *Elateridae* [*Coleoptera*]. — *J. Invertebr. Pathol.*, 12, 444-459.
- MÜLLER-KÖGLER, E. — 1965. Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. — *P. Parey*, Berlin & Hamburg, 444 p.
- PRATSERPHON, S. & TANADA Y. — 1968. The formation and circulation, in *Galleria*, of hyphal bodies of entomophthoraceous fungi. — *J. Invertebr. Pathol.*, 11, 260-280.
- SANNASI, A. — 1969. Studies of an insect mycosis. I. Histopathology of the integument of the infected queen of the mound-building termite *Odontotermes obesus*. — *J. Invertebr. Pathol.*, 13, 4-10.
- VAGO, C. — 1956. L'enchaînement des maladies chez les Insectes. — *Ed. spéc. Comm. Sericic. intern.*, 63, 184 p.
- VEY, A. — 1968. Réactions de défense cellulaire dans les infections de blessures à *Mucor hiemalis* WEHMER. — *Ann. Epiphyties*, 19, 695-702.
- ZACHARUK, R. Y. — 1970. Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval *Elateridae* [*Coleoptera*]. III. Penetration of the host integument. — *J. Invertebr. Pathol.*, 15, 372-396.
- 1971. Ultrastructural changes in tissues of larval *Elateridae* [*Coleoptera*] infected with the fungus *Metarrhizium anisopliae*. — *Can. J. Microbiol.*, 17, 281-289.
- 1973. Penetration of the cuticular layers of *Elaterid* larvae [*Coleoptera*] by the fungus *Metarrhizium anisopliae*, and notes on a bacterial invasion. — *J. Invertebr. Pathol.*, 21, 101-106.