

Boletim de Pesquisa 72
e Desenvolvimento

ISSN 1676 - 1340

Novembro, 2004

**INFECÇÃO POR *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus*
EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES E ESPÉCIES DE
INSETOS**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimárzio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Dietrich Gerhard Quast
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Souza Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 72**

**INFECÇÃO POR *Condylorrhiza vestigialis*
nucleopolyhedrovirus EM DIFERENTES
LINHAGENS CELULARES E ESPÉCIES DE
INSETOS**

**Maria Elita Batista de Castro
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Cláudia Brod Siqueira
Ana Cláudia Batista dos Santos
Marlinda Lobo de Souza
Nilton José Sousa**

Brasília, DF
2004

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61)
340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1^a edição

1^a impressão (2004)

I 43 Infecção por *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* em diferentes linhagens celulares e espécies de insetos / Maria Elita Batista de Castro ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 15 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 72)

1. *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* – vírus de inseto. 2. *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* – infectividade. 3. *Condylorrhiza vestigialis* – praga do álamo. 4. *Condylorrhiza vestigialis* - linhagens celulares de insetos. I. Castro, Maria Elita Batista de. II. Série.

Infecção por *Condylorrhiza vestigialis* *nucleopolyhedrovirus* em diferentes linhagens celulares e espécies de insetos

Maria Elita Batista de Castro¹
Zilda Maria de Araújo Ribeiro²
Cláudia Brod Siqueira³
Ana Cláudia Batista dos Santos⁴
Marlinda Lobo de Souza¹
Nilton José Sousa⁵

¹Bióloga, PhD, Virologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Bióloga, MSc., Fitopatologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³Eng. Agrônoma, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴Graduanda em Biologia, UniCEUB/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵Eng. Florestal, Dr., Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAIS E MÉTODOS	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO	12

INFECÇÃO POR *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES E ESPÉCIES DE INSETOS

RESUMO

Recentemente, um vírus de inseto foi isolado e identificado como patógeno de *Condylorrhiza vestigialis*, uma importante praga do álamo (*Populus*). O vírus foi denominado *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* - CvMNPV (família Baculoviridae). No presente trabalho, estudos foram conduzidos para determinar a infectividade do CvMNPV, usando cinco linhagens celulares de insetos - *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286), *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4), *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE and Sf9), and *Bombyx mori* (BM-5) – e larvas de duas espécies de lepidópteros - *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. As linhagens celulares foram testadas e monitoradas quanto às alterações morfológicas e produção de partículas virais, e os insetos quanto à produção de poliedros (PIB) e porcentagem de mortalidade. Células de cada linhagem de insetos foram semeadas na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/poço (placas de seis poços), e incubadas com hemolinfa de larvas de *Condylorrhiza vestigialis* infectadas com CvMNPV. As células foram examinadas ao microscópio de contraste de fase às 24, 48, 72 e 96 horas após infecção (hp.i.). Duas linhagens, SF-21 e UFL-AG-286, foram permissivas ao CvMNPV, exibindo arredondamento de células, hipertrofia nuclear e formação de poliedros. Entretanto, a linhagem UFL-AG-286 apresentou baixa produção de poliedros e lise celular. As outras linhagens de células não foram produtivas. As células Tn5B1-4 e BM-5 desenvolveram lise após incubação com o CvMNPV, sendo mais intensa nesta última. Não foram observadas alterações morfológicas em células Sf-9. Com relação à infecção dos insetos *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*, em ambos procedimentos, larvas alimentadas com dieta contendo poliedros ou vírus extracelulares (BV) inoculados via hemocele, não ficou evidenciada infecção com base na produção de poliedros. Este trabalho traz um importante resultado no que se refere à susceptibilidade da linhagem celular SF-21 ao baculovírus

CvMNPV, devido ao fato de não se ter disponível , até o momento, uma linhagem estabelecida a partir de seu hospedeiro natural (*C. vestigialis*). Diante disso, essa linhagem constitui uma importante alternativa como hospedeira do vírus CvMNPV para estudos de sua replicação *in vitro*.

Infection by *Condylorrhiza vestigialis* nucleopolyhedrovirus in different cell lines and insect species

ABSTRACT

Recently an insect virus was isolated and identified as pathogenic for *Condylorrhiza vestigialis*, an important lepidopterous pest of *Populus*. This virus was designated *Condylorrhiza vestigialis* nucleopolyhedrovirus- CvMNPV (*Baculoviridae* Family). In the present work, studies were carried out on the CvMNPV infectivity using five insect cell lines - *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286), *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4), *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE and Sf9), and *Bombyx mori* (BM-5) - and two lepidopteran insects - *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. The cell lines were tested and monitored for morphological alterations and viral particle production, and the insects for production of polyhedra (PIB) and mortality percentage. Cells from each insect line were seeded at $3,0 \times 10^5$ per well (6-well tissue culture plates) and then inoculated with hemolymph from CvMNPV-infected larvae. At 24, 48, 72 and 96 hour post infection (h.p.i.) the cells were examined by phase-contrast microscopy. Two lines, SF-21 and UFL-AG-286, were permissive to CvMNPV exhibiting cellular rounding, nuclear hypertrophy and polyhedra formation. However, the UFL-AG-286 cell line presented low polyhedra production and cell lysis. The other cell lines were not productive. Tn-5B1-4 and BM-5 cells underwent lysis after incubation with CvMNPV, being more intensive in the last. No morphological changes were observed in Sf-9 cells. Regarding to the infection of the *Spodoptera frugiperda* and *Anticarsia gemmatalis* larvae, in both procedures, the insects feed with diet containing polyhedra or the ones in which the budded virus (BVs) were injected by hemocele, the infection was not evidenced based on polyhedra production. This work brings a important result concerning to the susceptibility of the SF-21 cell line to the baculovirus CvMNPV due to the fact of non-availability, until now, of an established cell line from its natural host (*C. vestigialis*). Therefore, this cell line constitutes an important alternative as host to virus CvMNPV for its *in vitro* replication studies.

INTRODUÇÃO

A mariposa-do-álaro (*Condylorrhiza vestigialis*, Guenée, 1854, Lepidoptera:Crambidae) é considerada a principal praga da cultura do Álaro (*Populus*), que no Brasil atualmente é praticada em mais de 4.000 ha para suprir a indústria do fósforo na fabricação de palitos e caixas. Os danos provocados por esta espécie podem comprometer seriamente a produção dos povoamentos, pois o período de desfolhas ocorre na fase de maior crescimento da planta, visto que o surgimento das lagartas coincide com o ressurgimento das folhas (lançamento) na planta, desaparecendo quando as mesmas perdem as folhas em meados do outono. Até o momento seu controle tem sido feito com sucesso, principalmente com a aplicação de inseticidas químicos do grupo dos piretróides. Entretanto, a propensão que este grupo químico tem para o desenvolvimento de resistência, associado às sensíveis condições do ambiente de várzea, onde o álaro é cultivado, têm feito com que pesquisadores e silvicultores envolvidos com esta cultura procurem novas alternativas de controle que causem o menor impacto ambiental possível, e que inibam o desenvolvimento de resistência por parte das lagartas de *C. vestigialis*. Dentro deste contexto, recentemente lagartas com sintomatologia característica de infecção causada por vírus foram detectadas em campo e coletadas para identificação do patógeno. Este material foi analisado em nosso laboratório, por microscopia eletrônica, sendo o patógeno identificado como pertencente à família *Baculoviridae*, gênero *Nucleopolyhedrovirus* (MNPV), e designado então, como *Condylorrhiza vestigialis* múltiplo *nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV) (Castro *et al.*, 2003) Juntamente com a caracterização deste vírus, já foram realizados vários experimentos em laboratório e nos plantios de *Populus*, para determinar a eficiência deste agente sobre as lagartas de *C. vestigialis*, bem como o desenvolvimento de ensaios que visam a criação massal do inseto em laboratório para a produção de soluções virais. Como os resultados destes experimentos têm sido promissores, a busca por outras informações se faz necessária. Assim, este trabalho visa dar continuidade aos estudos de caracterização deste baculovírus, buscando informações sobre a infectividade de

CvMNPV em diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo*, através da identificação de possíveis hospedeiros diferentes de seu hospedeiro natural a lagarta *C. vestigialis*. Para tanto, cinco linhagens celulares e duas espécies de insetos foram testadas principalmente quanto à produção de poliedros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens Celulares, Insetos e Vírus – Células de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286), (SIEBURTH e MARUNIAK, 1988), *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (GRANADOS *et al.*, 1994), *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21AE (VAUGHN *et al.*, 1977), Sf9 (SUMMERS e SMITH, 1987) e *Bombyx mori* BM-5 (GRACE, 1967) foram incubadas a 27°C em meio de cultura (TC 100 ou TNMFH), suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os insetos *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* foram utilizados para testar a infectividade do vírus em estudo.

O vírus *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV), objeto deste trabalho, foi gentilmente cedido pelo Dr. Nilton J. Souza da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para a obtenção de estoques virais foram utilizadas lagartas de *Condylorrhiza vestigialis* infectadas pelo vírus.

Produção de estoque viral - Vírus extracelulares e poliedros foram obtidos a partir da multiplicação de CvMNPV em seu hospedeiro natural (*Condylorrhiza vestigialis*) de acordo com o seguinte procedimento: lagartas sadias foram colocadas em copos plásticos de 50mL com dieta artificial inoculada com uma suspensão viral de 2×10^8 PIB/ml e mantidas em temperatura, umidade e fotoperíodo controlados ($T=28^{\circ}\text{C}$; UR=70% e FP=14horas). Quatro dias após a infecção, parte da amostragem de lagartas foi usada para obtenção de hemolinfa e então uso em sistemas de infecção *in vitro*. A hemolinfa foi coletada e adicionada a uma solução de meio de cultura, sem soro, contendo cisteína. Para cada 500µl de hemolinfa foram adicionados 450µl de meio com 50µl de cisteína 0,1M para impedir o processo de melanização. A outra amostragem de lagartas foi mantida em incubadora para progressão da infecção e então morte das lagartas.

As lagartas mortas foram então coletadas e armazenadas no freezer (-20°C), para posterior uso de poliedros como fonte de infecção *in vivo*.

Infecção por CvMNPV: (a) *In vitro* - Cinco linhagens celulares UFL-AG-286, Tn5B1-4, IPLB-SF-21AE e Sf9, e BM-5 foram testadas e monitoradas com relação a alterações morfológicas e produção de partículas virais. Células de cada linhagem foram semeadas em placas de seis poços em uma concentração de 3×10^5 células/poço e incubadas por 1 hora com $150\mu\text{l}$ de hemolinfa acrescida de $450\mu\text{l}$ de meio de cultura sem soro. Em 24, 48, 72, 96 e 144 horas pós-infecção as células foram examinadas ao microscópio de contraste de fase; (b) *In vivo* - Lagartas sadias de *S. frugiperda* e de *A. gemmatalis*, no 4º estágio, foram alimentadas com dieta artificial contendo o inóculo viral em sua superfície e mantidas em temperatura, umidade e fotoperíodo controlados ($T=28^{\circ}\text{C}$; UR=70% e FP=14horas). Os ensaios consistiram de um total de sessenta lagartas de cada espécie de insetos, distribuídas em copos plásticos de 50mL, sendo 1 lagarta/copo (no caso de *S. frugiperda*, devido ao canibalismo) e 3 lagartas/copo (de *A. gemmatalis*). Os inóculos utilizados foram respectivamente de $1,5 \times 10^8$ PIBs e $2,0 \times 10^8$ PIBs. Diariamente, até a formação de pupas, foram feitas observações quanto à mortalidade. Sete dias após inoculação, lagartas foram maceradas e visualizadas ao microscópio de contraste de fase, para verificação da produção de poliedros.

Um outro ensaio foi conduzido, diferindo do anterior quanto à inoculação das lagartas. Um total de 60 lagartas de *S. frugiperda* foram inoculadas, via hemocele, com $3\mu\text{L}$ de sobrenadante de células SF-21 infectadas com CvMNPV contendo vírus extracelulares (BV)], e distribuídas em copos contendo dieta artificial, sendo colocada 1 lagarta/copo e incubadas conforme já descrito. Após três dias foram iniciadas observações, diariamente, quanto à mortalidade e presença de PIB nas lagartas mortas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos citopáticos induzidos pelo baculovírus CvMNPV – Entre as linhagens celulares testadas, apenas duas foram permissivas ao CvMNPV, respectivamente, SF-21 e UFL-AG-286, exibindo arredondamento celular, hipertrofia nuclear e formação de poliedros no núcleo das células (Fig.1 e Fig.2). Entretanto, houve diferença entre as linhagens testadas. No caso das células UFL-AG-286 observou-se baixa produção de poliedros e grande quantidade de lise. As linhagens Tn-5B1-4 e BM-5 também mostraram lise (Fig.3 e Fig.4). Células Sf9 não apresentaram alteração morfológica detectável ao microscópio de contraste de fase.

Com relação à infecção dos insetos *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*, larvas alimentadas com dieta contendo $1,5 - 2,0 \times 10^8$ PIB em sua superfície não apresentaram sintomas de infecção produtiva durante todo o período larval e, em ambas espécies, ocorreram mortes. Com o intuito de testar um diferente procedimento de inoculação que proporcionasse maior eficácia, larvas de *S. frugiperda* foram inoculadas com infecção intra-hemocélica de 3 μ l de vírus extracelulares (BV), e novamente não ficou evidenciada a produção de PIB nessas lagartas, embora tenha tido ocorrência de larvas mortas com suspeita de vírus.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que entre as linhagens que se apresentaram permissivas ao CvMNPV (SF-21 e UFL-AG-286), SF-21 foi a mais suscetível e produtiva a esse baculovírus, fato que merece destaque por se tratar de uma linhagem derivada de *Spodoptera frugiperda*, espécie diferente da hospedeira natural.

Referências Bibliográficas

CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, Z. M. A.; SOUZA, M. L.; SOUSA, N. J.; MOSCARDI, F. **Identificação do baculovírus da lagarta-do-álamo *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Pyralidae)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 3 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 87).

GRACE, T. D. Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombyx mori*. **Nature**, London, v. 216, p. 613, 1967.

GRANADOS, R. R.; GUOXUN, L.; DERSKSEN, A. C. G.; MCKENNA, K. A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 64, p. 260-266, 1994.

SIEBURTH, P. J.; MARUNIAK, J. E.; Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, US, v. 24, p. 195-198, 1988.

SUMMERS, M. D.; SMITH, G. E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. **Bulletin/Texas Agricultural Experiment Station**, College Station, US, n. 1555, p. 1-56, 1987.

VAUGHN, J. L.; GOODWIN, R. H.; TOMPKINS, G. J.; MCCAWLEY, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro**, v. 13, p. 213-217, 1977.

Apoio Financeiro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Universidade Federal do Paraná; FUPEF DO PARANÁ; Indústria Andrade Latorre S/A e Swedisch Match do Brasil S/A

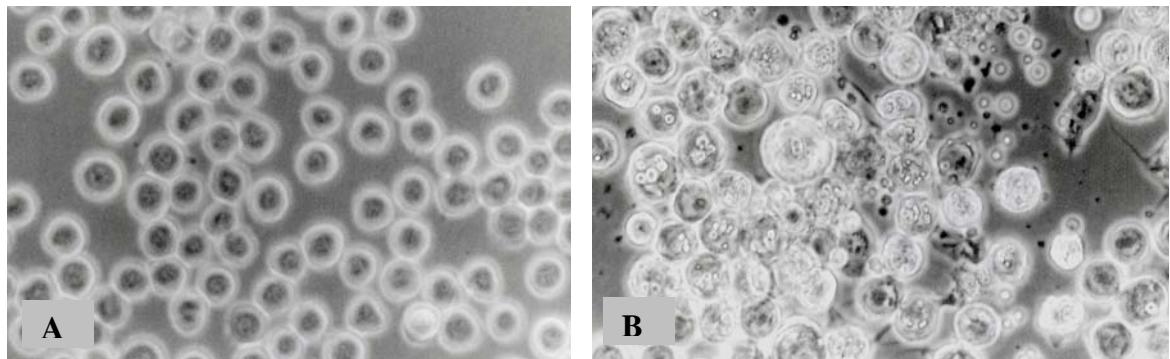


Fig.1- Células de *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE) infectadas por CvMNPV.
A- células não-infectadas, B- células infectadas (144hp.i.).

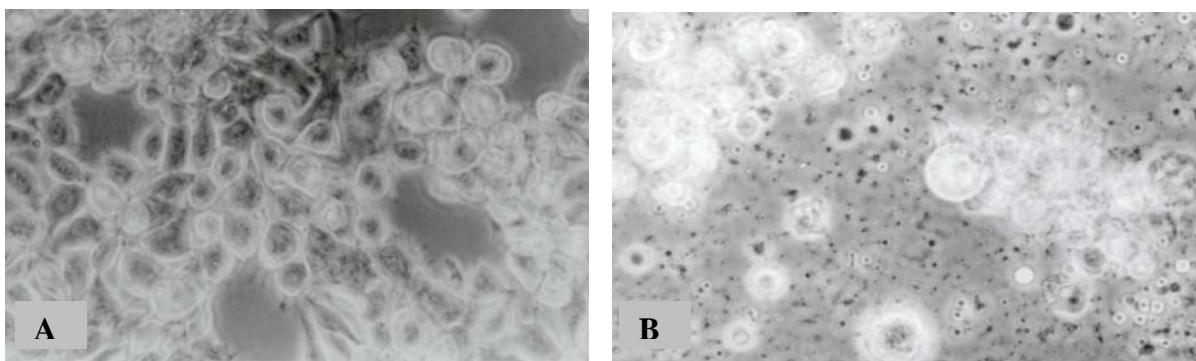


Fig. 2- Células de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286) infectadas por CvMNPV.
A- células não infectadas, B- células infectadas (144hp.i.).

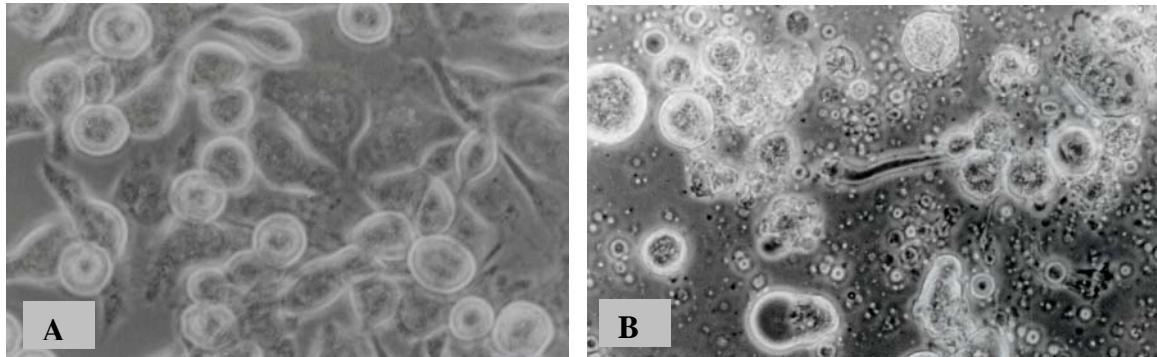


Fig. 3- Células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) infectadas por CvMNPV.
A- células não infectadas, B- células infectadas (144hp.i.).

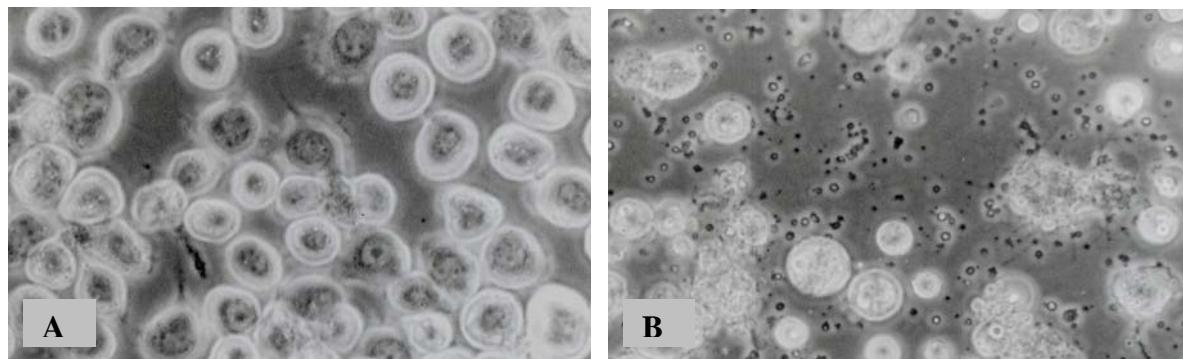


Fig. 4- Células de *Bombyx mori* (BM-5) infectadas por CvMNPV.
A- células não-infectadas, B- células infectadas (144hp.i.).