



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa **15** Desenvolvimento

ISSN 1676-1340
Dezembro, 2001

FOL 05433
2001
FL-05433

Receptibilidade de diferentes
linhagens celulares de insetos ao
Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia
gemmatalis*

República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Bonifacio Hideyuki Nakasu
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luiz Antonio Barreto de Castro
Chefe-Geral

Arthur da Silva Mariante
Chefe-Adjunto de Administração

Clara Oliveira Goedert
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral Sousa Dias
Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

FOL 05433

19318

Embrapa

ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2001

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 15**

**Susceptibilidade de diferentes
linhagens celulares de insetos
ao Nucleopoliedrovirus de
*Anticarsia gemmatalis***

Maria Elita Batista de Castro
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Marlinda Lobo de Souza

Brasília, DF
2001

Susceptibilidade de diferentes linhagens celulares de insetos ao Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis*

Maria Elita Batista de Castro¹

Zilda Maria de Araújo Ribeiro²

Marlinda Lobo de Souza¹

Resumo

O baculovirus AgMNPV, Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis*, tem sido aplicado no Brasil como bioinseticida para controlar a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*. Embora esse vírus seja muito específico para seu hospedeiro natural, cultura de células tem sido requerida para selecionar sistemas produtivos e desenvolver estudos sobre regulação gênica. Neste trabalho a susceptibilidade de diferentes células ao AgMNPV foi investigada. Os efeitos citopáticos induzidos pelo vírus e a produção de partículas virais foram examinados e comparados nas seguintes linhagens celulares: *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286), *Trichoplusia ni* (Tn-5B1-4 e Tn-368), *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE e SF9), *Lymantria dispar* (Ld652Y) e *Bombyx mori* (BM-5). Células foram cultivadas em meio TNMFH suplementado com soro bovino fetal, a 27°C. Foram semeadas $2,5 \times 10^6$ células em placas de cultura 60mm² e inoculadas com vírus em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 pfu por célula. Em diferentes tempos após infecção (0, 12, 24, 48, 72 e 96 h p.i.) as células foram examinadas por microscópio de contraste de fase. Em geral, a 12 h p.i. já se observava arredondamento celular e hipertrofia nuclear. Algumas protusões celulares foram detectadas 24 h p.i. porém desapareceram após 72 horas de infecção. Corpos poliédricos de inclusão (PIBs) foram então observados em torno de 48 h p.i. e aumentaram em número durante os períodos subsequentes da infecção. Contudo poliedros não foram visualizados em células

¹ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Bióloga, M.Sc. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Embrapa

Unidade	Embrapa
Via de aquisição	
Data aquisição	2002
N.º N. Fiscal	
Fornecedor	
N.º OCS	
Projeto	Doacas
N.º do projeto	FOL 05433

Ld652Y e BM-5. Além disso, células BM-5 sofreram intensa lise após incubação com AgMNPV. Em 96 horas de infecção, 70% dessas células estavam lisadas. Análise por microscopia de luz, 96 h p.i., mostrou que o número de células produzindo poliedros alcançou 95% a 100% em ambas células Tn-5B1-4 e UFL-AG-286. Células SF-21, Tn-368 e SF9 também alcançaram 70%, 40% e 25%, respectivamente. Medidas de títulos virais (BV) pelo método da diluição final mostraram que células Tn-5B1-4, UFL-AG-286 e SF21 foram altamente produtivas, com valores de TCID₅₀ em torno de 10⁷ IU/ml, 48 h p.i. Por outro lado, células SF9 e Tn368 apresentaram títulos virais de 10⁶ IU/ml, consistentes com a baixa formação de poliedros observada. Como esperado, a medida dos títulos virais em células Ld652Y e BM-5 foi similar a dos níveis basais (10⁴ a 10⁵ IU/ml).

Susceptibility of different insect cell lines to *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus

Abstract

The *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) has been applied, in Brazil, as a biopesticide to control the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). Although it is known that the virus is very specific to its natural host, cell culture has been required to select productive systems and to improve studies on gene regulation. The susceptibility of different lepidopteran cell lines to AgMNPV was investigated. The cytopathic effects induced by the virus and the production of viral particles were examined and compared in the following cell lines: *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286), *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4 and Tn368), *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE and SF9), *Lymantria dispar* (Ld652Y) and *Bombyx mori* (BM-5). Cells were propagated in TNM-FH medium supplemented with fetal bovine serum. They were seeded at 2.5x10⁶ in 60mm² plates, inoculated with virus at a multiplicity of infection (MOI) of 10 pfu per cell and incubated at 27°C. At several times post infection (0, 12, 24, 48, 72 e 96 h p.i.) they were examined by phase-contrast microscopy. In general, cellular rounding and nuclear hypertrophy were shown already at 12 h p.i. Some cellular protusions were detected at 24 h p.i. and then disappeared at 72-96 h p.i. Polyhedral inclusion bodies (PIBs) were then observed by 48 h p.i. and increased during the subsequent periods of the infection. However polyhedra were not visualized in Ld652Y and BM-5 infected cells. In addition BM-5 cells underwent extensive lysis after incubation with AgMNPV, being 70% of them already lysed at 96 h p.i. Analysis by optical microscopy, at 96 h p.i., showed that the number of cells producing polyhedra

reached 95% to 100% in both Tn5B1-4 and UFL-AG-286 cells. It also reached 70%, 40% and 25% in SF21, Tn368 and SF9 cells, respectively. In parallel, measurement of viral titers (budded virus) by endpoint dilution method showed that Tn5B1-4, UFL-AG-286 and SF21 cells were highly productive. Their TCID₅₀ values, at 48 h p.i., were about 10⁷ IU/ml. Besides, in consistence with the lower formation of polyhedra, the viral titers values in SF9 and Tn368 cells were 10⁶ IU/ml. As expected, the viral titers in Ld652Y and BM-5 cells were similar to basal levels (10⁴ to 10⁵ IU/ml).

Introdução

O Nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) têm sido aplicado, no Brasil, como bioinseticida no controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Embora esse vírus seja conhecido pela sua alta especificidade ao seu hospedeiro natural, a identificação e seleção de diferentes sistemas produtivos utilizando cultura de células têm sido requeridos para determinação de faixa de hospedeiro, estudos de interações vírus-célula e regulação gênica e até mesmo para a obtenção de vírus modificados geneticamente.

Durante o ciclo de infecção dos nucleopoliedrovírus (NPVs), duas formas infecciosas, morfológicamente distintas, são produzidas, as quais são o vírus extracelular (ECV), também conhecido como "budded virus" (BV), e o vírus ocluso (OV), também conhecido como poliedro (PIB). Os BVs provenientes de hemolinfa de inseto ou de cultura de células são altamente infecciosos para disseminação da infecção por todo o inseto e em cultura de células, enquanto os PIBs são responsáveis pela transmissão do vírus de inseto para inseto.

Trabalhos anteriores têm mostrado uma variabilidade substancial na permissibilidade de linhagens celulares à replicação viral (revisões de Bilimoria et al., 1992; Castro et al., 1998) e ao próprio AgMNPV (Castro et al., 1997). Baseando-se nestes dados, procuramos investigar a suscetibilidade de diferentes linhagens celulares de lepidópteros ao AgMNPV verificando os efeitos citopáticos induzidos pelo vírus e a produção de partículas virais. Sete linhagens celulares, *A. gemmatalis* (UFL-AG-286), *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4 e Tn-368), *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE e SF-9), *Lymantria dispar* (Ld 652Y) e *Bombyx mori* (BM-5) foram examinadas e comparadas após infecção com AgMNPV.

Material e Métodos

Linhagens celulares

As linhagens *Anticarsia gemmatalis* UFL-AG-286 (Sieburth & Maruniak, 1988), *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (Granados et al., 1994), Tn 368 (Hink, 1970), *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21AE (Vaughn, 1977), SF-9 (Summers & Smith, 1987), *Lymantria dispar* Ld 652Y (Goodwin et al., 1978) e *Bombyx*

mori BM-5 (Grace, 1967) foram crescidas a 27°C em meio de cultura TNMFH (Gibco BRL), ou TC-100 (Gibco BRL), suplementado com soro bovino fetal 10%.

Produção de vírus estoque

Estoques de *A. gemmatalis* NPV (AgMNPV-2D) foram multiplicados *in vitro* em células BTI-Tn-5B1-4. Vírus BV foram obtidos do sobrenadante de células infectadas e titulados pelo método TCID₅₀ ("tissue culture infectious dose-50") – O'Reilly et al. (1992). O título do estoque de suspensão viral utilizado nos experimentos foi de 3,54x10⁷ UI (unidades infecciosas)/ml.

Infecção viral

Células foram semeadas numa densidade de 2,5x 10⁶ células por placas de 60mm² e incubadas de 2 a 12 horas para aderirem à parede do frasco. Em seguida, as culturas foram inoculadas com AgMNPV-2D em uma multiplicidade de infecção (MOI) igual a 10 pfu (unidades formadoras de placa). Os controles não continham vírus. Após adsorção viral por 1 hora, células foram lavadas e incubadas em meio de cultura completo a 27°C. Em tempos pré-determinados pós-infecção (0, 12, 24, 48, 72 e 96 h p.i.) as células foram observadas por microscopia de contraste de fase para monitoramento dos efeitos citopáticos. Para avaliar a infecção nos diferentes sistemas, no que concerne à produção de poliedros, a porcentagem de células infectadas a 96 h p.i. foi calculada em relação ao número total de células.

Determinação de título viral (TCID₅₀)

Os títulos de BVs dos sobrenadantes coletados a 0 e 48 h p.i. foram determinados pelo método da diluição final "end point dilution" (TCID₅₀) (Reed & Muench, 1938) adaptado para baculovirus por Knudson (1979). Oito diluições seriadas de vírus foram preparadas (10⁻¹ a 10⁻⁸). Alíquotas de 100µl de cada diluição foram então distribuídas em cada uma das dez cavidades por fileira de uma placa de 96 cavidades. Cada cavidade continha 50µl de uma suspensão celular (2x10⁶ de células/ml) tendo a linhagem Tn-5B1-4 como indicadora. Após 5 dias de incubação a 27°C, as cavidades que apresentavam células contendo PIBs foram consideradas positivas.

Resultados e Discussão

Efeitos citopáticos e produção de PIBs em células infectadas por AgMNPV

Os efeitos citopáticos típicos de infecção com baculovirus foram observados durante o processo de infecção na maioria dos diferentes sistemas estudados (UFL-AG-286, Tn-5B1-4, Tn 368, SF-21, SF-9). Dessa forma, foram visualizadas alterações tais como arredondamento celular e hipertrofia nuclear (a partir de 12 h p.i.) e formação de protusões celulares em 24 h p.i., que regrediram no decorrer da infecção e desapareceram após 72 horas de infecção. Corpos de oclusão (PIBs) foram também observados em 48 h p.i. com progressivo aumento nos períodos subsequentes da infecção (Fig. 1 A-E). Contudo, poliedros não foram visualizados nos sistemas de infecção Ld652Y/AgMNPV e BM-5/AgMNPV (Fig.1 F, G). Além disso, células BM-5 infectadas com AgMNPV sofreram intensa lise, sendo 70% de células lisadas após 96 horas de incubação. Análise por microscopia ótica mostrou que células Tn-5B1-4 e UFL-AG-286 após 96 h de incubação com o vírus apresentavam-se totalmente infectadas, tendo 95% a 100% de seus núcleos com poliedros (Fig. 1 A, B e Fig. 2). Nas linhagens celulares SF-21, Tn-368 e SF-9 as porcentagens de núcleos com PIBs foram de 70%, 40% e 25% respectivamente (Fig. 2).

CÉLULAS NÃO-INFECTADAS



Foto: Elita Castro

Tn-5B1-4

CÉLULAS INFECTADAS

A

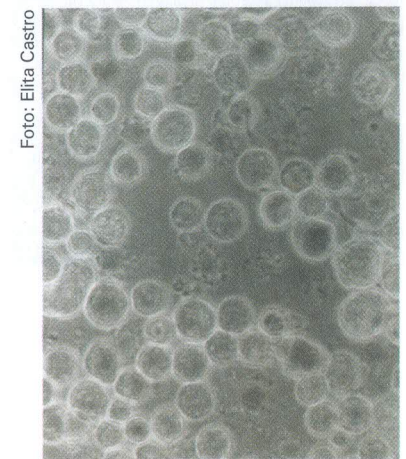
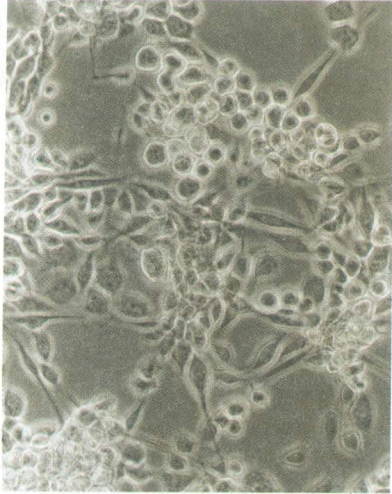


Foto: Elita Castro

Tn-5B1-4 + AgMNPV

CÉLULAS NÃO-INFECTADAS

Foto: Elita Castro



UFL-AG-286

CÉLULAS INFECTADAS

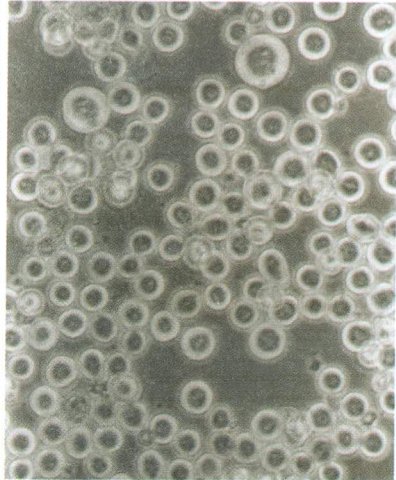
B

Foto: Elita Castro



UFL-AG-286 + AgMNPV

Foto: Elita Castro



SF-21

C

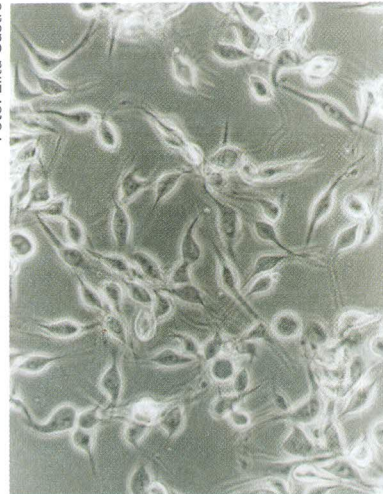
Foto: Elita Castro



SF-21 + AgMNPV

CÉLULAS NÃO-INFECTADAS

Foto: Elita Castro



Tn-368

CÉLULAS INFECTADAS

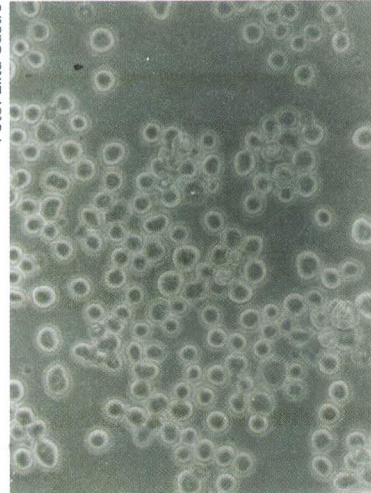
D

Foto: Elita Castro



Tn-368 + AgMNPV

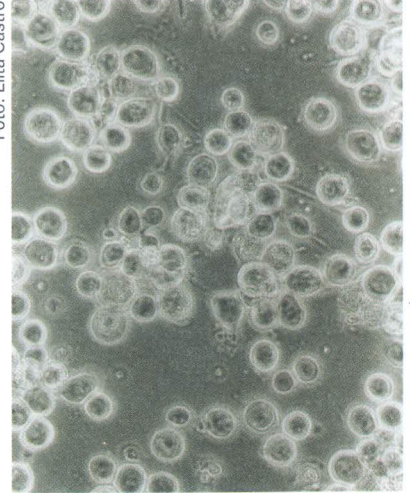
Foto: Elita Castro



SF-9

E

Foto: Elita Castro



SF-9 + AgMNPV

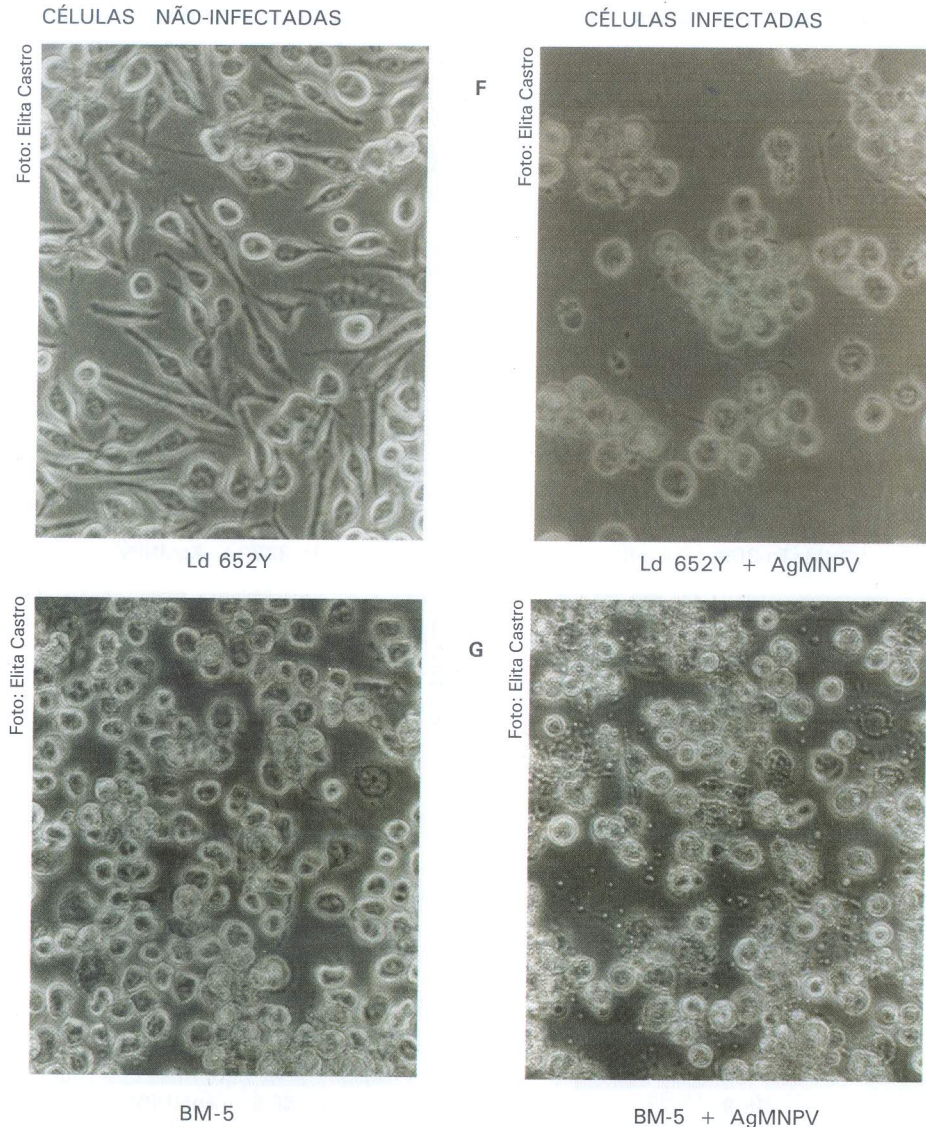


Fig. 1. Micrografias de contraste de fase de células de insetos não infectadas e infectadas com AgMNPV em 96 h p.i. (320x).

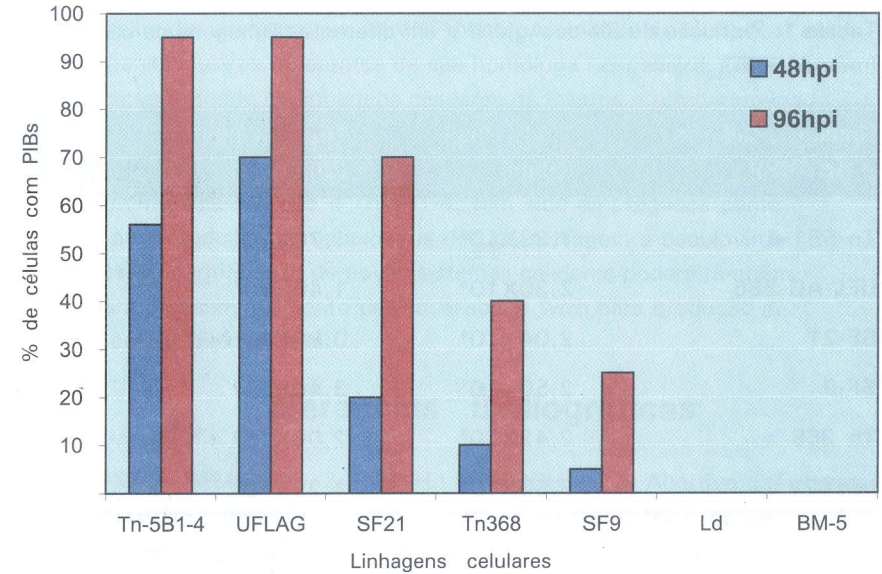


Fig. 2. Produção de poliedros (PIBs) em diferentes linhagens celulares de insetos infectadas com AgMNPV.

Produção de partículas virais BV em células incubadas com AgMNPV

A estimativa de partículas virais produzidas até 48 h p.i. foi obtida pela determinação dos títulos virais dos sobrenadantes das linhagens celulares testadas com o vírus AgMNPV. A tabela 1 apresenta títulos virais em torno de 10^7 UI/ml para sistemas que neste estudo já se mostravam infectivos quando observados por microscopia de luz. Portanto, células Tn-5B1-4, UFL-AG-286 e SF-21 são altamente susceptíveis ao vírus AgMNPV, mediante ao grande número de partículas infecciosas (BVs e PIBs) formadas. Por outro lado, os títulos virais obtidos dos sobrenadantes de células SF-9 e Tn-368 foram de 10^6 UI/ml, consistentes com a baixa formação de poliedros observada. Também como esperado, o título viral em células Ld652Y foi similar aos níveis basais, indicando que pouco, ou nenhum, BV foi produzido nestas células durante a infecção (Tabela 1 e Fig. 3).

Tabela 1. Produção de BV de AgMNPV em diferentes linhagens de células (método TCID₅₀)

Linhagens Celulares + AgMNPV	Título, 0hpi (UI/ml)	Título, 48hpi (UI/ml)
Tn-5B1-4	7,23X10 ³	1,70X10 ⁷
UFL-AG-286	2,30X10 ⁴	1,40X10 ⁷
SF-21	2,04X10 ⁴	0,90X10 ⁷
SF-9	2,50X10 ⁴	3,40X10 ⁶
Tn 368	2,42X10 ³	2,06X10 ⁶
Ld652Y	5,50X10 ³	1,29X10 ⁵

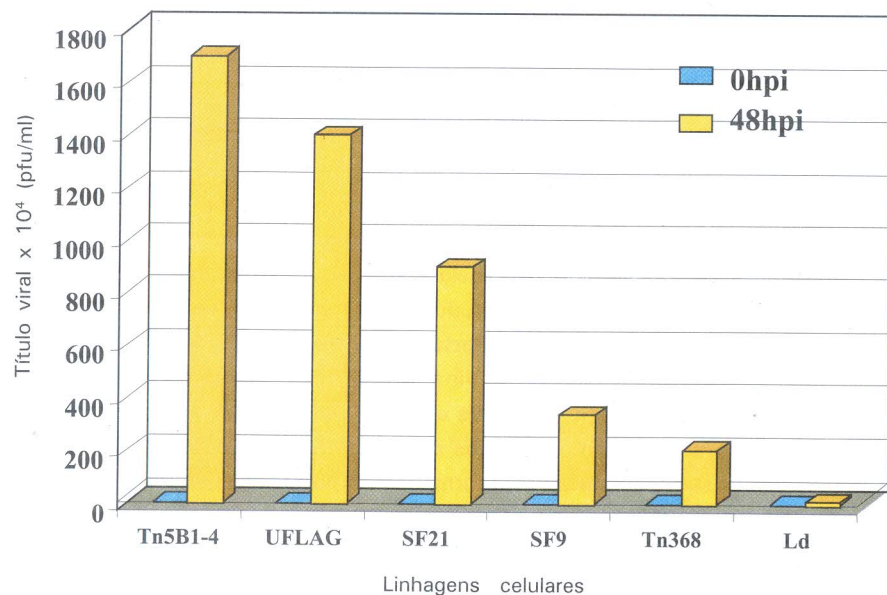


Fig. 3. Títulos virais de sobrenadantes de células infectadas por AgMNPV

Esses resultados demonstram que AgMNPV tem capacidade de multiplicar em outras linhagens celulares, diferentes de sua homóloga hospedeira. Diferenças quanto à susceptibilidade de linhagens celulares de insetos a um determinado vírus têm favorecido na investigação de alguns eventos importantes como replicação viral, regulação gênica e apoptose. Além disso, sistemas altamente produtivos, como UFL-AG-286 e Tn-5B1-4, têm sido empregados como indicadores para produção de baculovirus do tipo selvagem e baculovirus recombinante. A identificação de novos sistemas celulares poderá também contribuir para o desenvolvimento de processos *in vitro* para produção de baculovirus como bioinseticida.

Referências Bibliográficas

BILIMORIA, S. L.; DEMIRBAG, Z.; NG, H.; REINISCH, A. J. Abortive cell culture infections of nuclear polyhedrosis viruses as model systems for host specificity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.123-141, 1992

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; ARAÚJO, S.; BILIMORIA, S. L. Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. **Journal Invertebrate Pathology**, v.69, p.40-45, 1997.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M. Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1733-1761, 1998.

GOODWIN, R. H.; TOMPKINS, G. J.; MCCAWLEY, P. Gypsy moth cell lines divergent in viral susceptibility. **In Vitro**, v.14, p.485-494, 1978.

GRACE, T. D. C. Establishment of line of cells from the silkworm *Bombyx mori*. **Nature**, 216:613, 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 Invertebrate Pathology**, v.64, p.260-266, 1994.

HINK, W. F. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Nature**, v.226, p.466-467, 1970.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. Salt Lake City, Utah: W. H. Freeman and Co., 1992.

REED, L.; MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.493-497, 1938.

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

SUMMERS, M. D.; SMITH, G. E. **A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures**. [S.I.]: Texas Agricultural Experiment Station: College Station, 1987. (Bulletin, 1555).

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.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

Susceptibilidade de ...
2001

FL-05433



CENARGEN- 19318-1