

Adaptação de protocolo para visualização de caracteres taxonômicos do ácaro eriofídeo *Aceria tosichella*, Keifer em microscopia eletrônica de varredura

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 238

**Adaptação de protocolo para
visualização de caracteres
taxonômicos do ácaro eriofídeo
Aceria tosichella, Keifer em
microscopia eletrônica de varredura**

M. P. Farias

D. Navia

A. C. G. Araujo

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: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros:

Diva Maria de Alencar Dusi

Luiz Adriano Maia Cordeiro

José Roberto de Alencar Moreira

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Samuel Rezende Paiva

Suplentes:

João Batista Tavares da Silva

Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Foto: Micrografia eletrônica do epigínio de *A. tosichella*, mostrando as elevações longitudinais (b).

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

F 224 Farias, M. P.
Adaptação de protocolo para visualização de caracteres taxonômicos do ácaro eriofídeo *Aceria tosichella*, Keifer em micsocopia eletrônica de varredura. / M. P. Farias; D. Navia e A. C. G. Araújo. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 238).

1. *Aceria tosichella* - ácaro. 2. Microscopia de varredura. I. Navia, D. II. Araújo, A. C. G. III. Série.

595.42 – CDD 21

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Materiais e Métodos	8
Discussão	9
Resultados	9
Referências	10

Adaptação de protocolo para visualização de caracteres taxonômicos do ácaro eriofídeo *Aceria tosichella*, Keifer em microscopia eletrônica de varredura

*M. P. Farias*¹

*D. Navia*¹

*A. C. G. Araujo*¹

Resumo

Aceria tosichella Keifer, ou "Ácaro do Enrolamento do Trigo", pertencente à família Eriophyidae. Trata-se de um ácaro com cerca de 0,2 mm de comprimento. Este ácaro é o único vetor conhecido para os fitovírus *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) e *High plains virus* (HPV), agentes causais de importantes enfermidades de trigo e milho ainda não relatadas no Brasil. As principais características morfológicas utilizadas para distinguir ácaros do gênero *Aceria* é o comprimento das setas escapulares; a ornamentação e presença de um lobo frontal no escudo prodorsal; o número de raios do empódio e o número de elevações longitudinais do epigíneo. Inserido no projeto que visa o desenvolvimento de tecnologias moleculares e de biosegurança para o desenvolvimento do agronegócio no País conduzido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF com apoio da FINEP, este trabalho visa o desenvolvimento e validação de metodologias para permitir a visualização de caracteres taxonômicos importantes para a identificação de ácaros fitófagos utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Aqui está relatada a adaptação de protocolo e a descrição de aspectos ultraestruturais observados em microscopia eletrônica de varredura que permitiram a identificação de ácaros do gênero *Aceria*, em particular de *A. tosichella*.

Palavras chave: ultraestrutura, microscopia de varredura, Eriophyidae, *Aceria*.

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Parque Estação Biológica, Final W3 Norte - Brasília, DF - 70779-900 –

Abstract

Aceria tosichella Keifer, or the "Wheat Curl Mite", belongs to the Eriophyidae family. It refers to a mite presenting around 0.2 mm in length. This mite is only vector known to the phytovirus *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) and *High plains virus* (HPV), causal agents of important wheat and corn diseases, both not yet reported in Brazil. The main morphological characters used to distinguish mites in the genus *Aceria* is the scapular setae length; prodorsal shield ornamentation and presence of a frontal lobe; number of empodium rays and the number of longitudinal ribs on the epigynium. Within the project aiming the development of molecular and biosafety technologies for the development of the Brazilian agribusiness held by Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia-DF and sponsored by FINEP, the present work shows the development and validation of methodologies to allow visualization of important taxonomic characters to the identification of phytophagous mites using scanning electron microscope. Here is reported the adaptation of the protocol and the ultrastructural characteristics observed during analysis using scanning electron microscope which allow the identification of *Aceria* genus mites, especially *A. tosichella*.

Key words: ultrastructure, scanning microscopy, Eriophyidae, *Aceria*.

Introdução

O ácaro eriofiídeo *Aceria tosichella*, *Wheat Curl Mite* (wcm) (Keifer, 1969) pertencente à ordem Prostigmata, e família Eriophyidae, e é comumente chamado de Ácaro do Enrolamento do Trigo. Após a infestação da planta com este ácaro, as plantas podem ter seu desenvolvimento comprometido. Entretanto, a maior preocupação é que este ácaro é vetor de viroses ainda não detectadas no Brasil, tais como *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) e *High plains virus* (HPV) agentes causais de importantes doenças de milho e trigo.

O ácaro *A. tosichella* ocorre apresenta ampla distribuição no mundo, especialmente América do Norte, Europa e Ásia e foi detectado pela primeira vez na América do Sul, na Argentina, em 2002 (Navia et al., 2006). Como a dispersão de ácaros ocorre através do vento (MURRAY et al, 2005), a entrada deste ácaro no Brasil já estava sendo aguardada desde o relato da presença do vírus no país vizinho. A acurada identificação dos ácaros eriofiídeos associados ao trigo, milho e diversas outras gramíneas, sejam nativas, cultivadas ou invasoras, é de extrema importância para a definição de estratégias de manejo. O ácaro pode apresentar diversas gramíneas hospedeiras, além dos cereais, os quais podem servir como “ponte verde” para infestação das culturas na estação de plantio seguinte. Têm sido relatadas no mundo cerca de 60 espécies do gênero *Aceria* associadas a gramíneas no mundo (Amrine Jr. & de Lillo, 2003) e algumas espécies são morfológicamente muito próximas, especialmente as do grupo *tenuis*, ao qual pertence *A. tosichella*. Portanto, é extremamente importante dispor de metodologias avançadas que dêem suporte à acurada identificação das espécies de *Aceria* associadas a gramíneas, incluindo microscopia eletrônica de varredura.

Este trabalho teve como objetivo adaptar protocolo e descrever as características ultraestruturais de *A. tosichella* observadas ao microscópio eletrônico de varredura. Esta atividade está inserida em um projeto mais amplo que propõe o desenvolvimento de tecnologias moleculares e de biosegurança para o desenvolvimento do agronegócio no País conduzido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF com apoio da FINEP.

Materiais e Métodos

Folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L) oriundas da Embrapa Trigo (RS) contendo colônias de *A. tosichella* foram enviadas em recipientes apropriados para o Laboratório de Quarentena Vegetal (LQV) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. No LQV, espécimens de *A. tosichella* foram coletados e processadas de três formas diferentes, descritas abaixo. Após a coleta dos ácaros, o restante do material vegetal foi descartado e incinerado.

Parte das amostras foi colocada em microtubos que foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido por 1-2 min para imobilização e fixação física e em seguida cinco indivíduos foram colados em *stubs*, metalizados com uma camada de ouro com aproximadamente 20nm de espessura no Sputter Coater K550 ELMITECH e foram observados.

Outras amostras foram transferidas para outro microtubo contendo tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8 adicionado de glutaraldeído 2,5% por 24h a 4°C. As amostras foram lavadas no mesmo tampão cacodilato e pós-fixadas em tampão cacodilato contendo tetróxido de ósmio 2% (1:1, v/v) por 1h, a temperatura ambiente e no escuro. As amostras foram lavadas com o mesmo tampão e desidratadas em soluções etanólicas em concentração crescente desde 20 até 90% ao longo de 2h e, em seguida, por 1h em etanol 100%. Cinco indivíduos foram montados em cada *stub* e metalizados.

O restante das amostras foi transferido para outro microtubo imediatamente imerso em nitrogênio líquido e fixados em solução de tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8 adicionado de glutaraldeído 2,5% por 24h a 4°C. As amostras foram lavadas no mesmo tampão cacodilato e pós-fixadas em tampão cacodilato (contendo tetróxido de ósmio 2% (1:1, v/v) por 1h, a temperatura ambiente e no escuro. As amostras foram lavadas com o mesmo tampão e desidratadas em soluções etanólicas em concentração crescente desde 20 até 90% ao longo de 2h e, em seguida, por 1h em etanol 100%, seguida de secagem utilizando o ponto crítico. Os indivíduos foram montados em *stubs* e metalizados. Observações e captação de imagens foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 962.

Resultados

Análises das amostras de microácaros da espécie *A. tosichella* em microscópio eletrônico de varredura, onde etapas de imobilização, ou de secagem ao ponto crítico precedida de fixação e desidratação não apresentaram contraste suficiente para formação de imagem e mostraram um colapamento generalizado do escudo dorsal e do opistossoma.

Já as amostras imobilizadas, fixadas e pós-fixadas quimicamente, desidratadas, secas ao ponto crítico e metalizadas permitiram a visualização de características ultraestruturais com importância taxonômica para identificação de *A. tosichella* (Figs. 1, 2, 3, 4), tais como os 8 raios do empódio (ramo central bifurcado) (Fig. 1); epigínio, apresentando 12 elevações longitudinais; ornamentação do escudo dorsal, com linha mediana estendendo-se até a metade do escudo e demais aspectos do escudo dorsal (Fig. 2, 3). A preservação morfológica do escudo dorsal e prodorsal permitiram a visualização da estrutura do empódio, do tarso, do solenídeo, da tíbia, do genu, dos dois pares de pernas, da seta femoral, e tarsal e parte do gnatossoma (Fig. 4). Detalhes do lobo frontal, ornamentado com linhas longitudinais e marginais sinuosas; o escudo prodorsal e as setas escapulares puderam ser observados no dorso do ácaro (Fig. 5).

Discussão

Algumas espécies de ácaros podem ser diretamente montadas para observação em microscópio eletrônico de transmissão sem processamento prévio ou permitem a omissão de etapa como a de secagem ao ponto crítico.

Neste trabalho mostramos que tanto a imobilização, fixação, desidratação e secagem são etapas fundamentais para preservação de características morfológicas com importância taxonômica em *A. tosichella*. A inclusão da etapa de imobilização dos ácaros por meio de congelamento em nitrogênio líquido associado ao processamento provou ser uma adaptação metodológica que impede o colapamento generalizado da amostra.

As características ultraestruturais aqui descritas, principalmente a presença de oito raios do empódio, as linhas longitudinais presentes no escudo genital e a ornamentação do escudo prodorsal estão de acordo com aquelas presentes em *A. tosichella* segundo a descrição de Keifer (1969) e que permitem a distinção desta espécie das demais espécies do gênero *Aceria* (Keifer, 1969).

Agradecimentos

FINEP, EMBRAPA, CNPq.

Referências

AMRINE JUNIOR, J. W.; DE LILLO, E. **A database on *Eriophyoidea* of the world**. Michigan: West Virginia University, 2003. File Maker 4.0.

KEIFER, H.H. **Eriophyid studies C-2. Agricultural Research Service**. Washington: United States Department of Agriculture, 1969. 20p.

LAU, D. **Potencial ameaça ao cultivo de trigo no Brasil: o Wheat streak mosaic virus, agente causal da virose conhecida como mosaico estriado, promove prejuízos em várias regiões tritícolas do mundo**. Disponível em:

<<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=27177>> . Acesso em: 03 dez. 2008.

MURRAY, M. G ; KNIHINICKI, D. ; WRATTEN, K. ; EDWARDS, J.. **Wheat streak mosaic and the wheat curl mite**. 2005. Disponível em: <http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0017/44027%20Wheat_streak_mosaic_and_the_wheat_curl_mite_-_Primefact_99.pdf> . Acesso em: 02 Dez. 2008.

NAVIA, D.; Truol, G.; Mendonça, R.S.; Sagadin, M. *Aceria tosichella keifer* (Acari: Eriophyidae) from wheat streak mosaic virus-infected wheat plants in Argentina. **International Journal of Acarology**, Oak Park, US, v. 32, n. 2, p. 189-193, 2006.

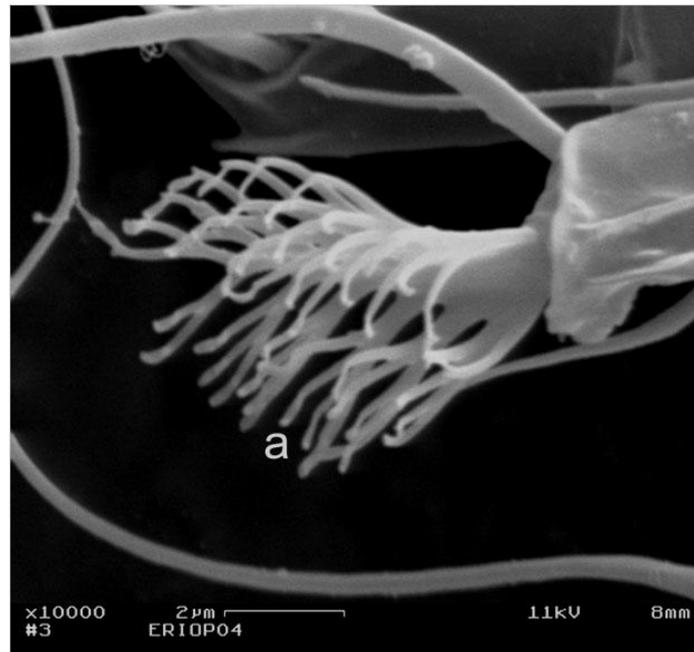


Figura 1: Micrografia eletrônica, mostrando os 8 raios do empódio (a) do ácaro *Aceria tosichella*.

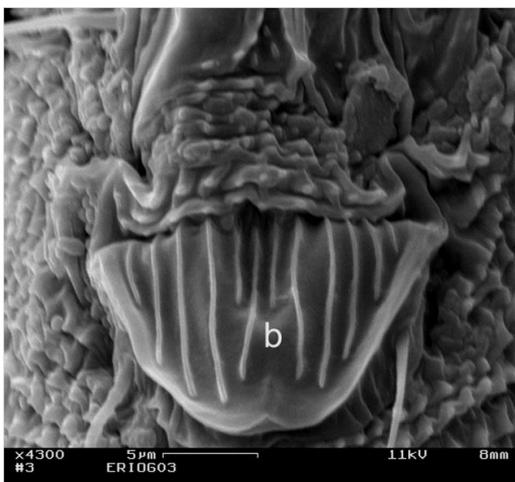


Figura 2: Micrografia eletrônica do epigínio de *A. tosichella*, mostrando as elevações longitudinais (b).

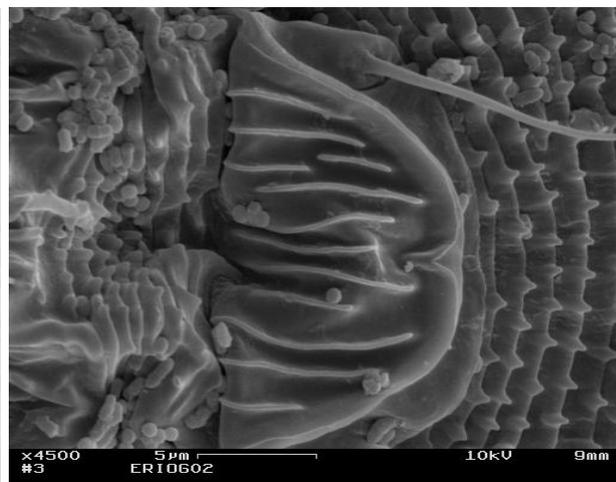


Figura 3: Micrografia eletrônica do epigínio de *A. tosichella*, mostrando as elevações longitudinais (b).

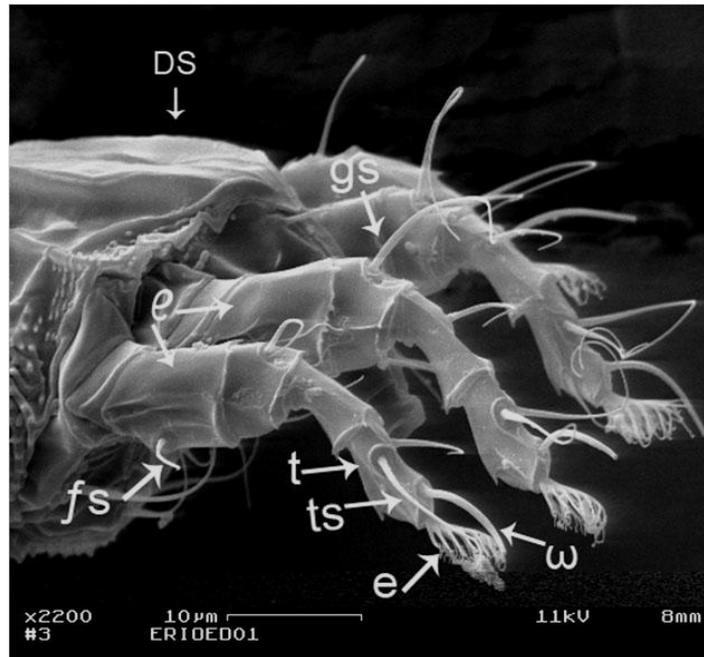


Figura 4: Micrografia eletrônica mostrando o escudo dorsal (DS), pernas I e II (l), empódio (e), tarso (t), seta tarsal (ts), seta do gênu (gs), seta femoral (fs) e solenídio (w) do ácaro *Aceria tosichella*.

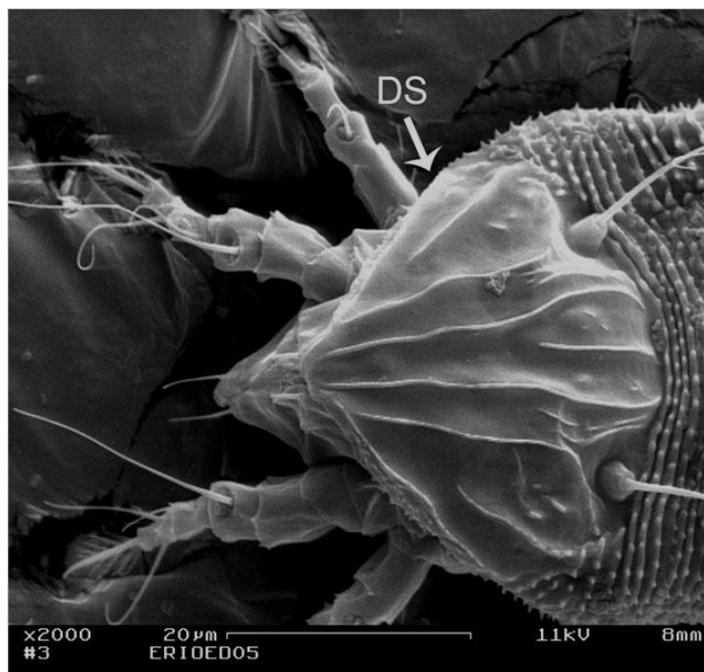


Figura 5: Micrografia eletrônica, onde pode-se ver a ornamentação do escudo dorsal (DS) do ácaro *A. tosichella*.