Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Período mínimo para a aquisição do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) por *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiros e identificação de sítios de aquisição do vírus

Rodrigo Solci Toloy

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2015

Rodrigo Solci Toloy
Biólogo

Período mínimo para a aquisição do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) por *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiros e identificação de sítios de aquisição do vírus

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Toloy, Rodrigo Solci
Período mínimo para a aquisição do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) por *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiros e identificação de sítios de aquisição do vírus / Rodrigo Solci Toloy. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
46 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Begomovirus 2. *Solanum lycopersicum* 3. hibridização *in situ* I. Título

CDD 635.642
T653p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico a meus pais, Ricardo e Sonia, e a meu irmão Diego.

A minha noiva Carolina por todo amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Jorge Alberto Marques Rezende, por todos os ensinamentos e sua sábia orientação.

Ao professor Francisco Tanaka, pela colaboração, confiança e amizade.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP, por todo o conhecimento transmitido.

À colega de laboratório, Tatiana Mituti, um obrigado muito especial pela amizade, ajuda, companheirismo nos últimos meses de experimentos.

Aos amigos Nelson Arno Wulff e Mateus de Almeida Santos, pelos meus primeiros passos em Fitopatologia.

Ao grande amigo, Guilherme Frare, por toda ajuda durante os anos de mestrado, tanto pessoal quanto acadêmica. O meu muito obrigado por tudo, ainda é pouco.

Aos amigos do laboratório de Virologia Vegetal, por todos os momentos bons, alegres, cafés e regas. Muchas gracias a Pedro, Viviana y Arnaldo. Muito obrigado a Debora, Michel, Rafa e Marina. Ao técnico do laboratório Edivaldo Buriolla.

A todos os amigos que foram inspirações para que eu prosseguisse sempre: Abrahão, Fernando, Renato, Roberto, Roberta, Montesino e Haroldo.

Aos colegas de republica: Alexandre, Isaías, Luis Cauz e Cassia.

A CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

“O que eu sou,
Eu sou em par.
Não cheguei sozinho.”
Lenine.

SUMÁRIO

RESUMO..... 11
ABSTRACT..... 13
1 INTRODUÇÃO..... 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 17
2.1 Tomateiro..... 17
2.2 *Begomovirus*..... 18
2.3 *Tomato severe rugose virus*..... 20
2.4 *Bemisia tabaci*..... 21
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 25
3.1 Fonte de inóculo..... 25
3.2 Colônia de *Bemisia tabaci* biótipo B..... 25
3.3 Detecção do ToSRV..... 25
3.3.1 Extração de DNA total de *B tabaci* biótipo B..... 25
3.3.2 Extração de DNA total de tomateiros..... 26
3.3.3 Reação de PCR..... 26
3.3.4 Purificação do amplicon e sequenciamento de nucleotídeos..... 27
3.4 Determinação do período mínimo de acesso à aquisição do ToSRV..... 27
3.5 Transmissão após períodos mínimos de acesso à aquisição do ToSRV..... 28
3.6 Microscopia de luz de epifluorescência - hibridização *in situ*..... 29
4 RESULTADOS..... 31
4.1 Aquisição do ToSRV em curtos períodos de alimentação..... 31
4.2 Confirmação da identidade viral..... 32
4.3 Microscopia de luz de epifluorescência - hibridização *in situ*..... 33
5 DISCUSSÃO 35
6 CONCLUSÃO..... 39
REFERÊNCIAS..... 41

RESUMO

Período mínimo para a aquisição do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) por *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiros e identificação de sítios de aquisição do vírus

O Brasil atualmente ocupa a nona posição entre os maiores produtores de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) do mundo. O desenvolvimento das plantas e a produção dos tomateiros, no entanto, podem ser afetados por diversos problemas fitossanitários, entre os quais aqueles causados por vírus. Atualmente, entre as viroses que mais tem se destacado estão aquelas causadas por espécies dos gêneros *Begomovirus*, *Crinivirus* e *Tospovirus*. Entre os begomovirus, especial atenção tem sido dada ao *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), pois tem sido a espécie prevalente na maioria das regiões produtoras de tomate no país. Esse begomovirus, que até o momento foi relatado somente no Brasil, é transmitido pelo aleirodídeo ("mosca branca") *Bemisia tabaci* biótipo B, numa relação persistente circulativa. 8Estudos da relação do ToSRV com esse aleirodídeo indicaram períodos mínimos de acesso à aquisição e inoculação de 5 minutos. Esse trabalho teve como objetivos: a) identificar o menor tempo de alimentação da *B. tabaci* biótipo B para a aquisição do ToSRV em tomateiros e b) identificar possíveis sítios de aquisição do ToSRV em tecido foliar de tomateiro via microscopia de luz de epifluorescência por hibridização *in situ.* Insetos livres de vírus foram confinados em folha de tomateiro infectado com o ToSRV durante 1, 3 e 5 minutos e 24 h (controle) para a aquisição do vírus. Parte dos insetos foi utilizada para a detecção do vírus no vetor, enquanto a outra parte foi usada em testes de transmissão do ToSRV para tomateiros. A detecção do vírus no inseto e nos tomateiros foi feita por PCR. *B. tabaci* biótipo B foi capaz de adquirir o ToSRV nos diferentes tempos de alimentação. Os insetos foram capazes de transmitir o vírus para tomateiros, com eficiência de 33% a 100%. Análises de cortes histológicos longitudinais na região das nervuras de folhas de tomateiro infectados com o ToSRV, em microscopia de luz de epifluorescência por hibridização *in situ*, revelaram vários pontos de fluorescência localizados nas células do parênquima do floema, incluindo as células companheiras e nas células da epiderme. Essa fluorescência não foi constatada em tecido sadio. A localização do ToSRV em células do parênquima foliar do tomateiro, associada ao conhecimento de que esse aleirodídeo efetua picadas de prova intracelulares, de curta duração, durante o processo de penetração intercelular do estilete, podem explicar a aquisição deste begomovirus durante curtíssimos períodos de alimentação.

Palavras-chave: Begomovirus; *Solanum lycopersicum*; Hibridização *in situ*

SUMMARY

Minimum time for the acquisition of *Tomato severe rugose virus (ToSRV)* by *Bemisia tabaci biotype B* in tomato plants and identification of virus acquiring sites

Brazil currently ranks ninth position among the largest tomato (*Solanum lycopersicum* L.) producers in the world. Several diseases, including those caused by virus, however, can affect plant growth and yield of tomatoes. Currently, among the most important virus diseases are those caused by species of the Genus *Begomovirus*, *Crinivirus* and *Tospovirus*. Among the begomoviruses, especial attention has been given to *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), because it has been the prevalent species in most of the tomato producing regions of the country. This begomovirus, which so far has only been reported in Brazil, is transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* biotype B, in a persistent circulative relationship. Studies on the virus-vector relationship indicated five minutes as the minimum period of access for virus acquisition and inoculation by the vector. This study aimed to: a) identify the shortest feeding period of *B. tabaci* biotype B for acquisition of ToSRV in tomato plants, and b) identify possible ToSRV acquisition sites in infected leaf tissue via epifluorescence light microscopy by *in situ* hybridization. Virus free insects were confined in tomato leaf infected with ToSRV during 1, 3 and 5 minutes and 24 hours (control) for virus acquisition. Part of the insects was used for virus detection in the vector, while the other part was used on ToSRV transmission tests for tomato plants. Virus detection in both, insect tomato plants, was carried out by PCR. *B. tabaci* biotype B was capable to acquire the ToSRV on the different feeding times. The insects were capable to transmit the virus to the tomato plants, with efficiency of 33% to 100%. Analysis of longitudinal histological cuts of ToSRV infected leaves, in epifluorescence light microscopy by *in situ* hybridization, revealed several fluorescence spots located in phloem parenchyma cells, including the companion and the epidermal cells. Fluorescence was not verified on healthy tissue. The location of ToSRV in parenchyma cells of tomato leaf, associated with the knowledge that this insect performs very short intracellular feeding probes, during the process of intercellular penetration of the stylet, may explain the acquisition of this begomovirus during very short feeding periods.

Keywords: Begomovirus; *Solanum lycopersicum*; *In situ* hybridization

1 INTRODUÇÃO

O Brasil produziu, em 2013, aproximadamente 4.017.106 toneladas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sendo que os principais estados produtores foram Goiás e São Paulo, produzindo aproximadamente 1.300.000e 640.000 toneladas. Desta forma, o país ocupou o nono lugar na lista dos maiores produtores de tomate do mundo (AGRIANUAL, 2012). Para atingir essa posição no mercado mundial, o Brasil teve que superar inúmeros problemas fitossanitários que atingem a produção de tomate, desde inúmeras pragas como pulgões, tripes, traça-do-tomateiro etc., juntamente com as várias doenças causadas por vírus, fungos e bactérias (BOITEUX; CLEMENTE, 2012).

Dentre as pragas que atingem o tomateiro encontra-se uma espécie de aleirodídeo, *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae), cosmopolita e polífaga que se alimenta de seiva do floema, introduzida no Brasil na década de 1990 (GALLO et al., 2002). Possui a capacidade de transmitir diversas espécies de vírus, além de causar desordem fisiológica decorrente de sua alimentação e sua secreção com um alto teor de açúcares favorece a colonização de fungos (*Capnodium* sp., fumagina) que interferem na fotossíntese e no desenvolvimento da planta (FONTES; COLOMBO; LOURENÇÃO, 2012). Outros danos decorrentes da alimentação de *B. tabaci* são o amadurecimento irregular dos frutos e a "isoporização" das paredes internas destes, que ficam esbranquiçadas devido à injeção de toxinas (BOITEUX; CLEMENTE, 2012).

As doenças viróticas, por sua vez apresentam grande importância na tomaticultura brasileira, sendo responsáveis por danos e perdas significativas. Entre elas encontram-se doenças causadas por vírus dos gêneros: *Potyvirus, Cucumovirus, Tobamovirus, Tospovirus, Crinivirus* e *Begomovirus* (MÂCEDO, 2011). Atualmente, as viroses que mais tem se destacado são aquelas causadas por espécies dos gêneros *Begomovirus, Crinivirus* e *Tospovirus*, sendo que as espécies de *Begomovirus* e *Crinivirus* são transmitidas por *B. tabaci* biótipo B (FREITAS, 2012).

O primeiro relato de *Begomovirus* infectando tomateiro no Brasil foi feito em meados da década de 1960, no estado de São Paulo e também na região Nordeste do Brasil. Na época, foi identificado o vírus do mosaico dourado do tomateiro (*Tomato golden mosaic virus,* TGMV*)* (FLORES; SILBERSCHIMIDIT; KRAMER, 1960). Atualmente, já foram constatadas 11 espécies de *Begomovirus* causando danos em tomateiros, sendo que destas, o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) tem sido a espécie prevalente na maioria das regiões produtoras de tomate no país (ROCHA et al., 2013). A

primeira detecção no Brasil do ToSRV foi em meados de 1999 no estado de Minas Gerais, e logo se espalhou pelas principais regiões produtoras dessa hortaliça no território brasileiro (BARBOSA et al., 2009; FERNANDES et al., 2008).

Os principais sintomas causados pelo ToSRV são clorose de nervuras, clorose internerval, mosaico amarelo, enrolamento e encarquilhamento foliar, diminuição das folhas e nanismo de plantas (BOITEUX; CLEMENTE, 2012).

A transmissão do ToSRV por *B. tabaci* é do tipo persistente-circulativa. Marubayashi (2009) constatou que os períodos mínimos de acesso à aquisição (PAA) e à inoculação (PAI) do ToSRV por *B. tabaci* biótipo B foram de 15 minutos, em testes efetuados com plantas de tomate. Freitas (2012) repetiu a análise das relações do ToSRV com esse aleirodídeo e encontrou períodos mínimos de acesso à aquisição e inoculação de 5 minutos.

Esse trabalho teve como objetivos: a) identificar o menor tempo de alimentação da *B. tabaci* biótipo B para a aquisição do ToSRV em tomateiros e b) identificar possíveis sítios de aquisição do ToSRV em tecido foliar de tomateiro via microscopia de luz de epifluorescência por hibridização *in situ.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família Solanaceae, cujo centro de origem das espécies selvagens localiza-se nas regiões andinas, com aproximadamente 800 a 1000 metros de altitude. Sua domesticação é relatada no México e sua difusão pela Europa se deu aproximadamente no ano de 1500, de onde esta hortaliça se difundiu para o resto do mundo (NAIKA et al., 2006).

A importância e o elevado consumo de tomate no mundo estão relacionados com seu alto valor nutritivo. Constituído de aproximadamente 93% de água e 7% de matéria sólida, possui uma grande quantidade de vitaminas A, C e K, além de pigmentos essenciais com propriedades antioxidantes como o licopeno, sendo este o principal carotenóide carregado pelo sangue (SILVA; GIORDANO, 2006).

O tomate é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas em todo o mundo. No Brasil foram produzidos, em 2011, aproximadamente 4.000.000 toneladas de tomate, sendo que os maiores produtores foram os estados de Goiás com aproximadamente 1.325.00 t, aproximadamente São Paulo com 642.000 t e Minas Gerais com 400.000 t. A área ocupada por esta hortaliça foi totalizada em 63.218 hectares sendo os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais responsáveis por aproximadamente 35.000 hectares (AGRIANUAL, 2013). Com essa produção, o Brasil ficou em 9° lugar na produção mundial, sendo que os principais produtores foram: China com 29% da produção mundial, Estados Unidos com 9%, e Índia com 8% (AGRIANUAL, 2013; www.faostat.fao.org).

Na cadeia produtiva do tomate podem ser destacados dois sistemas de cultivos. O primeiro, no qual o tomateiro de crescimento indeterminado é conduzido com auxílio de estacas na posição vertical, gerando um grande volume de empregos durante o ciclo da cultura. Os principais tipos de tomate *in natura* são: Santa Cruz, Italiano (saladete) e Cereja (MÂCEDO, 2011). O segundo, realizado com o plantio de tomateiro rasteiro, sendo este, utilizado principalmente para consumo na indústria e exigindo cada vez mais tecnologia e mão-de-obra especializada, já que esta possui uma intensa utilização de maquinários em todas as suas fases. Estimativas apontam que para o preparo do solo até a colheita são utilizadas em média 4 a 5 pessoas por hectare, desta forma gerando em média 106.290 postos de trabalho. A produção brasileira de tomates para processamento

industrial em 2010 foi de 1.816 milhões de toneladas tornando o Brasil o 5° maior produtor de tomate para esse fim (BOITEUX; CLEMENTE, 2012).

O consumo de tomate *in natura* no Brasil teve uma queda de 1,7% nos anos de 2002 até 2008, o de massa de tomate reduziu 27%, porém o consumo de molho de tomate obteve uma alta de 56% no mesmo período (BOITEUX; CLEMENTE, 2012).

Atualmente, a presença de altas populações de *B. tabaci* biótipo B, associada à infecção por vírus, principalmente *Begomovirus* e *Crinivirus*, tem se mostrado um dos fatores limitantes na produção de tomate, tanto para consumo *in natura* como para processamento industrial (ORIANI; VENDRAMIM; VASCONCELOS, 2011; BOITEUX; CLEMENTE, 2012).

2.2 *Begomovirus*

As espécies do gênero *Begomovirus*, cujo nome é derivado da espécie *Bean golden mosaic virus* (BGMV), família *Geminiviridae*, atualmente constituem um dos principais problemas fitossanitários em decorrência da possibilidade de infectarem inúmeras culturas de elevados valores comerciais. Dentre elas destacam-se no mundo as culturas do tomateiro, feijoeiro, mandioca, pimentão, algodoeiro, entre outras (NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHES-CAMPOS, 2011; ASSUNÇÃO et al., 2006).

As espécies do gênero *Begomovirus* possuem genoma constituído por uma ou duas moléculas de DNA circular, de fita simples. A maioria das espécies, entre as quais o ToSRV, possui genoma bipartido (DNA-A e DNA-B), com tamanho de 2,5 a 2,6 kb cada um. O DNA-A codifica seis proteínas e o DNA-B, outras duas. As sequências são bem diferentes entre si, com exceção de uma região intergênica de aproximadamente 200 nucleotídeos quase idênticas, possuindo uma região conservada de nove nucleotídeos (TAATATT/AC) (KING et al., 2012).

O DNA-A, no sentido senso, codifica a proteína capsidial (CP, ORF AV1/V1), que protege as moléculas de DNA e pode estar envolvida no movimento do vírus, e a proteína V2 (ORF AV2/V2) que também está envolvida no movimento do vírus. A fita complementar do DNA-A codifica as proteínas associadas com a replicação viral (Rep, AC1/C1), transativadora de transcrição (TrAP, AC2/C2), fator de amplificação da replicação (REn, AC3/C3) e a proteína C4 (ORF AC4/C4). O DNA-B codifica a proteína de movimento nuclear (NSP, ORF BV1) no sentido senso e a proteína de movimento no sentido complementar da molécula (MP, ORF BC1) (KING et al., 2012). A proteína

capsidial também possui grande importância na interação vírus-vetor, já que a simples troca dessa proteína do *African cassava mosaic virus* (ACMV), que é transmitido por mosca branca, pela proteína capsidial do *Beet curly top virus* (BCTV), transmitido por cigarrinha, resultou na transmissão do primeiro begomovirus por cigarrinha (MÂCEDO, 2011).

As espécies de begomovirus são transmitidas principalmente por espécies ou biótipos de *B. tabaci*, de maneira persistente circulativa, não propagativa. Para que ocorra a transmissão, o vírus é inicialmente adquirido durante a alimentação do inseto no floema da planta. Depois disso deve passar pelo canal alimentar, localizado no feixe vascular, esôfago, câmara filtrante até o intestino, sendo então incorporado à hemolinfa do inseto de onde é transportado até as glândulas salivares, para posteriormente ser inoculado em plantas sadias durante o processo de salivação (GÖTZ et al., 2012). Muitos estudos vêm sendo realizados com o begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) de modo a elucidar estas etapas. Ghanim, Morin e Czosnek. (2000), realizaram estudos para monitorar o movimento do TYLCV nas diferentes regiões do corpo do vetor, por meio da detecção do DNA viral por PCR. Dez minutos após aquisição o vírus foi detectado na região da cabeça do inseto; 40 minutos após aquisição ele já estava presente no trato digestivo do vetor e após 90 minutos foi encontrado na hemolinfa do inseto. O vírus foi encontrado nas glândulas salivares do inseto aproximadamente 6 horas depois da primeira detecção na hemolinfa.

Para que o vírus possa circular pelo interior do corpo do inseto, ele necessita transpor pelo menos duas barreiras, do epitélio do trato digestivo para a hemolinfa e entrar e sair da glândula salivar. De acordo com Morin et al. (1999) há evidências experimentais de que uma proteína homóloga a GroEL, normalmente produzida pela bactéria *Buchenera* sp. em afídeos, está envolvida na transmissão do begomovirus TYLCV. Esses autores propuseram que a GroEL de *B. tabaci* protege o vírus da destruição durante a sua passagem através da hemolinfa. Posteriormente Gottlieb et al. (2010) demonstraram que a proteína GroEL de *B. tabaci* biótipo B, que atua na transmissão do TYLCV, é produzida pela bactéria *Hamiltonella*, que é um endossimbionte secundário. Estudos recentes de microscopia eletrônica de transmissão com imuno-marcação mostraram que o TYLCV entra nas células epiteliais do intestino médio do vetor *B. tabaci*, mas não da espécie não vetora *Trialeurodes vaporariorum*. Nas células epiteliais do intestino médio de *B. tabaci* o vírus foi localizado em estruturas vesiculares, sugerindo um mecanismo de entrada por endocitose. Estes resultados

sugerem fortemente que um passo crítico para determinar a especificidade de inseto vetor desse begomovírus é a entrada do vírus nas células epiteliais do intestino médio (UCHIBORI et al., 2013).

Atualmente, são relatadas 192 espécies de *Begomovirus*, além de mais 94 espécies tentativas. Destas, 56 espécies foram constatadas infectando tomateiro (KING et al., 2012). Há no momento 11 espécies de begomovírus apenas encontradas em território brasileiro, infectando naturalmente tomateiros no campo. São elas: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMlMV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), e *Tomato golden vein virus* (TGVV). Há sete outros begomovírus distintos associados com doenças em tomateiro, mas ainda não foram completamente caracterizados (ROCHA et al., 2013).

2.3 *Tomato severe rugose virus*

Nos últimos anos o ToSRV tem sido a espécie prevalente e mais importante na cultura do tomateiro nas principais regiões produtoras do Brasil (FERNANDES et al., 2008). Essa espécie também já foi encontrada em tomatais nos estados de PE, RJ, GO, DF, SP e MG (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; CONTRIM et al., 2007; FERNANDES et al., 2008; LIMA et al., 2006; REZENDE et al., 1997). Estudos sobre a ocorrência de begomovírus na região Centro-oeste do Brasil, no período de 2002 a 2004, indicaram a prevalência do ToSRV (FERNANDES et al., 2008). Nesse estudo foram analisadas amostras de 2295 plantas sintomáticas de tomate para a indústria e para a mesa. Trinta e um por cento estava infectada com begomovírus. Dessas, 61% estava infectada com o ToSRV.

O ToSRV possui partículas geminadas, de morfologia icosaédrica, contendo duas moléculas de DNA de fita simples, circulares. O DNA-A possui 2592 nucleotídeos e 5 ORFs e o DNA-B possui 2568 nucleotídeos e 2 ORFs (BARBOSA et al., 2011).

Além do tomateiro, o ToSRV já foi detectado em pimenta “dedo-de-moça” (*C. baccatum* var. *pendulum*), em Petrolina de Goiás (BEZERRA-AGASIE et al., 2006), em pimentão (NOZAKI et al., 2006) e em batateira (SOUZA-DIAS, et al., 2008). No campo, além dessas solanáceas cultivadas, esse begomovírus já foi relatado infectando plantas de

Nicandra physaloides (BARBOSA et al., 2009) e *Phaseolus vulgaris* (BARBOSA et al., 2011). Além disso, foi transmitido experimentalmente para as seguintes espécies vegetais: *Amaranthus spinosus*, *Emilia sonchifolia*, *Chenopodium album*, *C. ambrosioides*, *Euphorbia heterophylla*, *Phaseolus vulgaris*, *Capsicum annuum*, *Datura stramonium*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana clevelandii*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* cvs. TNN, Havana, Xanthi, White Burley, *N. debney*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *Solanum americanum* e *S. tuberosum* (FERNANDES et al., 2006; LIMA et al., 2006; BARBOSA et al., 2011).

O primeiro estudo de transmissão do ToSRV por *B. tabaci* biótipo B, realizado por Marubayashi (2009), indicou que os períodos mínimos de acesso à aquisição (PAA) e à inoculação (PAI) do vírus foram de 15 minutos, em plantas de tomate. No entanto, quando o vírus foi adquirido de plantas infectadas de pimentão e transmitido para plantas sadias de tomate, o PAI foi de 30 minutos. Freitas (2012) também estudou as relações do ToSRV com esse vetor, porém encontrou períodos mínimos de acesso à aquisição e à inoculação de 5 minutos. O inseto reteve o vírus por até 25 dias. Não foi estudado o período de latência. Sabe-se que a eficiência de transmissão aumenta à medida que se aumentam o PAI e/ou o PAA (MUNIYAPPA et al., 2000; SANTOS; ÁVILA; RESENDE, 2003; FREITAS, 2012). Santos, Ávila e Resende (2003), estudando a interação de um begomovírus de tomateiro, filogeneticamente relacionado com o ToSRV, com *B. tabaci* biótipo B, constataram que para um PAA de 72 horas, o percentual médio de transmissão aumentou com o tempo do PAI. Insetos virulíferos que se alimentaram por 30 minutos para inoculação do vírus, infectaram 19% das plantas. Aqueles que tiveram o PAI de 24 horas infectaram 66,7% dos tomateiros. Não há conhecimento do período de latência do ToSRV em *B. tabaci* biótipo B. No entanto, é possível que seja semelhante ao de outros begomovírus que ocorrem no Brasil, como o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), cuja latência é de 16 horas (SANTOS; ÁVILA; RESENDE, 2003; FIRMINO et al., 2009).

2.4 *Bemisia tabaci*

O aleirodídeo *B. tabaci* pertence à ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha, dentro da superfamília Aleyrodoidea, família Aleyrodidae. São insetos pequenos com quatro asas membranosas, recobertas com uma substância pulverulenta, a qual designa o nome comum da espécie (mosca branca). Possui reprodução por partenogênese arrenótoca, onde fêmeas virgens dão origens a machos e quando ocorre a fecundação,

podem dar origem a novas fêmeas. Os ovos são pedunculados e fixos a face abaxial da folha, podendo estar envoltos por uma cera branca (GALLO et al., 2002). Seu desenvolvimento hemimetabólico possui quatro fases de ninfa, sendo que a primeira inicialmente se locomove e fixa-se permanentemente para sugar a folha de forma semelhante às cochonilhas e os demais estágios permanecem fixos até a emergência do adulto. O adulto possui aproximadamente um milímetro de comprimento e seu aparelho bucal é do tipo sugador labial e se apresenta bem desenvolvido desde o primeiro estádio de ninfa até a fase adulta (LIMA; LARA; DOS SANTOS, 2001).

B. tabaci foi primeiramente descrita no ano de 1889, na Grécia, se alimentando em folhas de tabaco, recebendo o nome de *Aleyrodes tabaci*. No ano de 1897, foi observada em plantas de batata doce nos Estados Unidos e recebeu o nome de *Aleyrodes inconspicua.* Em 1928, foi descrita no Brasil em plantas de *Euphorbia hitella* e recebeu o nome de *B. costalimai* Bondar (OLIVEIRA; HENNEBERRY; ANDERSON, 2001). No Brasil, foi responsável por inúmeros danos a agricultura com ocorrência de grandes surtos populacionais em culturas de algodoeiro em 1968 e, também, em culturas de soja e feijoeiro no estado do Paraná e na região de Ourinhos, no estado de São Paulo, nos anos de 1972 e 1973 (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994).

A partir de 1991, foi observado um aumento da população de mosca branca tanto em plantas ornamentais como em hortaliças como tomateiro, brócolis, berinjelas e aboboreiras nos municípios de Paulínia, Holambra, Jaguariúna e Artur Nogueira, estado de São Paulo. Em Paulínia, houve uma infestação em plantas de tomateiros estaqueados, sendo comum o sintoma de folhas secas e necrosadas e o amadurecimento irregular do fruto. Já em Artur Nogueira, a cultura do algodoeiro fora infestada por *B. tabaci* e nas cidades de Holambra e Jaguariúna, houve uma grande infestação em plantas ornamentais (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994).

Com a ocorrência de severos ataques por *B. tabaci* tanto no Brasil como em outros países, foram realizados experimentos nos Estados Unidos para verificar a presença de novos biótipos de *B. tabaci*. Com os resultados obtidos, foram detectados dois tipos diferentes de *B. tabaci*, sendo o tipo A (algodão) que possui uma baixa taxa de reprodução e apresenta o padrão isoenzimático de esterase A, e o tipo B possui uma alta taxa de reprodução e padrão B isoenzimático de esterase. O biótipo B induziu sintoma característico de folha prateada quando se alimentou em aboboreiras (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994).

Diferentemente do biótipo A, o biótipo B possui a capacidade de sobrevivência e disseminação muito maior, conseguindo colocar em média 300 ovos por fêmeas, enquanto que o biótipo A consegue colocar 110 ovos (GALLO et al., 2002).

B. tabaci biótipo B possui ampla gama de plantas hospedeiras com aproximadamente 600 espécies. Além de possuir a capacidade de causar prejuízos pela alimentação e retirada de seiva, induzir o amarelecimento foliar e o amadurecimento irregular do fruto do tomateiro, sua excreta ("honeydew") favorece o aparecimento de fungos capazes de colonizar a superfície das folhas, prejudicando a fotossíntese e o desenvolvimento (FONTES; COLOMBO; LOURENÇÃO, 2012).

Além dos danos causados por sua alimentação e excreção, *B. tabaci* biótipo B ainda possui a capacidade de transmitir aproximadamente 120 fitoviroses. Entre esses estão espécies dos gêneros *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Ipomovirus*, *Torradovirus* e *Carlavirus*. A transmissão dos begomovírus ocorre de maneira persistente circulativa, na qual o vírus adquirido por alguns minutos ou horas de alimentação passa de seu aparato bucal para a hemolinfa, na qual pode sobreviver por dias e até mesmo toda vida do inseto (NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHES-CAMPOS, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fonte de inóculo

Foi utilizada uma fonte de inóculo do ToSRV mantida em tomateiros da variedade Santa Cruz Kadá, em casa de vegetação no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP. Os tomateiros infectados foram mantidos em gaiolas protegidas com tecido voil e renovadas frequentemente.

3.2 Colônia de *Bemisia tabaci* biótipo B

Colônias de *B. tabaci* biótipo B livres de vírus foram obtidas a partir de adultos provenientes de colônias pré-existentes do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP. Estas colônias foram mantidas em plantas de couve (*Brassica oleraceae* L.) em gaiolas protegidas com tecido *voil* e mantidas na casa de vegetação.

3.3 Detecção do ToSRV

3.3.1 Extração de DNA total de *B. tabaci* biótipo B

O DNA total de *B. tabaci* biótipo B foi extraído com o protocolo adaptado de Idris, Smith e Brown (2001). Foram amostrados cerca de 20 insetos por tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Os insetos foram macerados com pistilos plásticos e em seguida acrescentados 84 µL de tampão de lise (5 mM Tris-HCl e 0,05 mM EDTA), 2,4 µL de proteinase K (50 µg/mL) e 36 µL de Triton X-100 1,7%. A solução foi incubada a 65°C por 20 minutos e centrifugada a 9000 g por 30 segundos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo. Como controles, foram usados aleirodídeos que se alimentaram em plantas de tomateiro sadias. O DNA após extraído, foi utilizado para a reação de PCR.

3.3.2 Extração de DNA total de tomateiros

O DNA total de plantas de tomate foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990).

Aproximadamente 1 mg de tecido fresco de folha de tomateiro foi macerado em um microtubo de centrífuga de 2 mL com auxílio de um pistilo de plástico. Em seguida, foram adicionados 600 µL do tampão de extração CTAB 2% (NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl pH 8 100 mM Polyvinylpyrrolidone 1%), acrescido de 0,2% de β-mercaptoetanol. Depois de homogeneizada, a suspensão foi incubada à 65°C, por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e a mistura foi centrifugada a 12000 g por 12 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 50 µL de CTAB 5%. Após a homogeneização, foram novamente adicionados 500 µL de clorofórmio e álcool isoamílico e, em seguida, foi realizada uma nova centrifugação a 12000 g por 12 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e logo depois foi adicionado igual volume de isopropanol gelado a -20°C. A mistura foi homogeneizada e mantida a -20°C por 30 minutos e, após este período, foi centrifugada a 13000 g por 15 minutos para a precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% e diluído em 50 µL de água Mili-Q. O DNA foi armazenado a -20°C até ser utilizado em reação de PCR.

3.3.3 Reação de PCR

A reação de PCR para detecção do ToSRV foi feita com uma mistura de 5uL do tampão (200 mM Tris-HCL pH 8.4 e 500 mM KCL 1X), 1 uL de dNTPs (0,2 Mm), 1,5 uL de $MgCl_2$, 2,5 uL dos oligonucleotídeo iniciador senso e anti-senso (0,5 mM), 0,5 µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen)) (5U/ µL), 5 µL de DNA total e o volume final ajustado com água Mili-Q para 50 µL. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ToSRV 1f e ToSRV 2r descritos por Fernandes, Albuquerquer e Inoue-Nagata (2010), que amplifica um fragmento de 820 bp.

O regime do termociclador para essa reação foi de 94°C por 3 minutos e 35 ciclos de amplificação de 45 segundos a 95ºC, 30 segundos a 55ºC e 90 segundos a 72ºC, com uma etapa final de 2 minutos a 72ºC. O produto desta amplificação foi submetido a eletroforese convencional em gel de agarose 1% com TBE [0,5X] (TBE: Tris, ácido

bórico e EDTA) e visualizados em transiluminador de luz UV após corado com SYBR Safe (Life Technologies), comparando-o com marcador de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

3.3.4 Purificação do amplicon e sequenciamento de nucleotídeos

Alguns amplicons foram aleatoriamente escolhidos para sequenciamento de nucleotídeos para confirmação da identidade do vírus. Para isso, foi utilizado o protocolo do kit comercial de limpeza e purificação PureLink® PCR purification Kit (Invitrogen), sendo utilizados 50 µL de água Mili-Q na etapa de eluição. Após a purificação, os amplicons foram encaminhados para sequenciamento de nucleotídeos na empresa Macrogen (Coréia). As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas para obtenção do consenso e alinhadas usando os programas Electropherogram quality analsis (Embrapa) (http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph/) e ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). A identidade das sequências obtidas foi definida usando BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) ferramenta disponibilizada pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information) que permite a comparação com sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank.

3.4 Determinação do período mínimo de acesso à aquisição do ToSRV

Uma folha sintomática e expandida da região mediana do tomateiro infectado foi colocada em uma placa de Petri de plástico de 5 cm de diâmetro. Na tampa foi feito um pequeno orifício na parte superior (Figura 1). Por meio de um sugador bucal (Figura 2), um adulto por vez de *B. tabaci* biótipo B foi transferido para o interior da placa de Petri para aquisição do vírus na folha de tomateiro. Tão logo notava-se o início da alimentação do inseto na folha, iniciava-se a contagem de tempo por cronômetro manual. O procedimento foi repetido para os períodos de acesso à aquisição (PAA) de 1, 3 e 5 minutos e 24 h (controle). Transcorrido o PAA, os insetos foram retirados das folhas e colocados em tubos de eppendorf de 2 mL, de acordo com o PAA, e armazenados em grupos destintos em freezer para posterior extração de DNA e detecção do vírus por PCR.

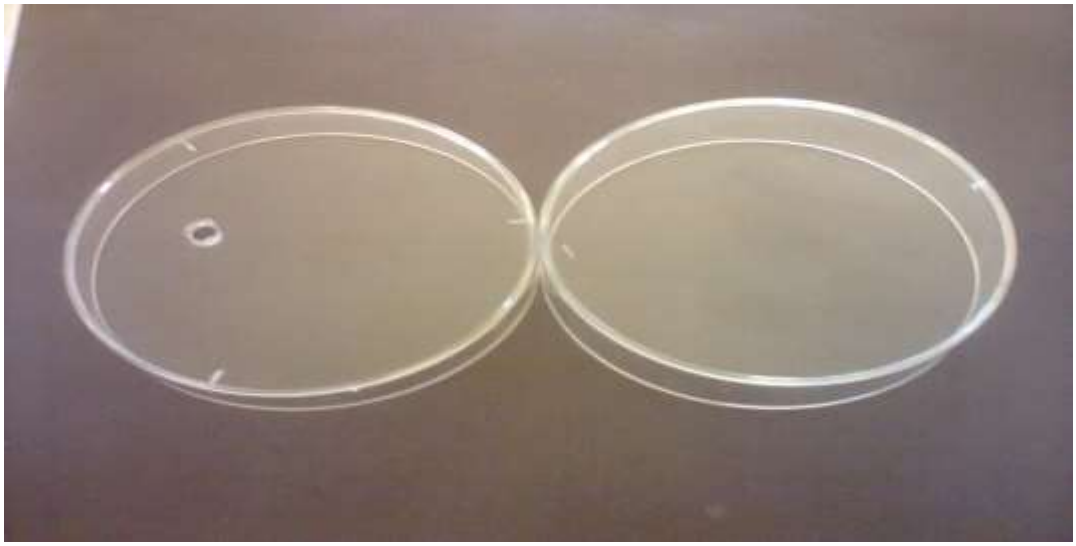

Figura 1. Placa de Petri de 5 cm de diâmetro utilizada em teste de aquisição do ToSRV durante curtos períodos de alimentação, sendo observado o orifício na parte superior da tampa.

3.5 Transmissão após períodos mínimos de acesso à aquisição do ToSRV

A aquisição do ToSRV foi realizada como descrita em 3.4. Decorrido o período de aquisição, o inseto foi foi coletado com auxílio do um sugador bucal e imediatamente transferido para a planta-teste a ser inoculada. Foram transferidos aproximadamente 30 insetos por tomateiro para cada PAA. Os tomateiros sadios continham apenas as folhas cotiledonares ou no máximo duas folhas verdadeiras não expandidas. Os insetos foram confinados em pequenas gaiolas confeccionadas com tubos de centrífuga do tipo "Falcon" de 50 mL, de aproximadamente 15 cm, mantendo uma extremidade aberta e a outra fechada com tecido *voil* e um orifício na área lateral feito com auxílio de um pedaço de metal aquecido (Figura 2).

O período de acesso à inoculação foi de 24 h. Depois disso as plantas foram colocadas em câmara fria a uma temperatura de 4°C por aproximadamente 15 minutos, mantendo os insetos em condição de inatividade. As gaiolas foram retiradas e os insetos coletados com sugador bucal para que fosse verificada a presença do vírus após a transmissão.

Após a realização dos experimentos, as plantas foram mantidas em gaiolas dentro de estufas protegidas (Figura 3) no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP. Após um período de aproximadamente 30 dias, as plantas tiveram seus DNAs extraídos e foi realizada a análise por PCR para verificação de presença do vírus.

Figura 2. Sugador bucal utilizado para coleta de insetos e gaiolas preparadas com tubos "Falcon" e *voil*.

Figura 3. Plantas utilizadas para teste de transmissão protegidas com gaiolas confeccionadas com tubos "Falcon".

3.6 Microscopia de luz de epifluorescência – hibridização *in situ*

Para a localização do ToSRV em células do tecido foliar, foram utilizadas folhas de tomateiro cv. Santa Cruz Kadá, com aproximadamente 60 dias após inoculação, apresentando sintomas típicos, e a infecção, confirmada por PCR. Como controle, foram utilizadas folhas de plantas sadias da mesma variedade e idade.

Aproximadamente 30 cortes das folhas, na região das nervuras, foram obtidos com o auxílio de lâminas de barbear (tipo gilete) prensadas em medula de pecíolo de embaúba como guia e, imediatamente, fixadas por 24 horas a 4ºC em solução modificada de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), segundo técnicas usuais no NAP/MEPA-ESALQ/USP. Após a fixação, os cortes foram desidratados durante 15 minutos em série etílica de concentrações crescentes (30, 70, 90, 100%).

Para a realização da técnica de hibridização '*in situ*' por fluorescência ("fluorescence *in situ* hybridization" - FISH), foi utilizado o método descrito por Kliot et al. (2014) com algumas modificações. Os cortes foram hibridizados com 500 µL de tampão de hibridização (20 mM TRIS-HCL pH 8.0; 0.9 M NaCl; 0.01% SDS; 30% Formamida), acrescidos de 10 pMol da sonda, que corresponde a uma sequência de oligonucleotídeos para a região codificadora da proteína capsidial do ToSRV (5' CTC AGC GGC CTT GTT ATA TTT 3') (FERNANDES et al., 2010), marcada com o fluoróforo cinanina 3 (Cy3), cuja excitação ocorre em comprimento de onda de 512-550 nm e emissão a 570-615 nm. Os cortes de tecido foram incubados com a sonda no escuro, durante 12 horas à temperatura ambiente, e em seguida lavados por 3 vezes com tampão de hibridização. Os cortes hibridizados foram montados em lâminas histológicas contendo tampão de hibridização e DAPI (0,1 mg/mL), e cobertas com lamínula.

Os tecidos hibridizados foram então analisados em microscópio de luz (Zeiss Axioskop 2), do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária – NAP/MEPA - ESALQ/USP, utilizando-se a luz ultravioleta para excitação do fluoróforo, com filtro adequado para o comprimento de onda de emissão. As imagens foram registradas em computador, utilizando-se o programa 'Axiovision 4.0'.

4 RESULTADOS

4.1 Aquisição do ToSRV em curtos períodos de alimentação

Na tabela 1 estão apresentados os resultados de 5 experimentos independentes de transmissão do ToSRV por *B. tabaci* biótipo B após PAA de 1, 3 e 5 minutos e 24 h (controle).

Tabela 1 - Transmissão do ToSRV por *B. tabaci* biótipo B após diferentes períodos de acesso à aquisição (PAA) do vírus e 24 h de acesso à inoculação (PAI) em tomateiros.

PAA	Experimento I		Experimento II		Experimento III		Experimento IV		Experimento V		Média (%)
	PCR*	%	PCR	%	PCR	%	PCR	%	PCR	%	
1 min	3/5	60	2/5	40	3/4	75	5/5	100	5/5	100	75
3 min	2/2	100	1/4	25	2/5	40	5/5	100	5/5	100	73
5 min	3/4	75	1/4	25	1/3	33	5/5	100	5/5	100	67
24 h	4/4	100	1/1	100	1/1	100	1/2	50	2/2	100	90
Sadio	0/1		0/1		0/1		0/1		0/1	0	0

*Número de plantas positivas na PCR (N° de plantas infectadas/ N° de plantas inoculadas).

A figura 4 ilustra o resultado da detecção do vírus por PCR em insetos que adquiriram o ToSRV nos intervalos de tempo de 1, 3 e 5 minutos e 24 horas, depois de efetuarem a alimentação em tomateiros para a transmissão do vírus.

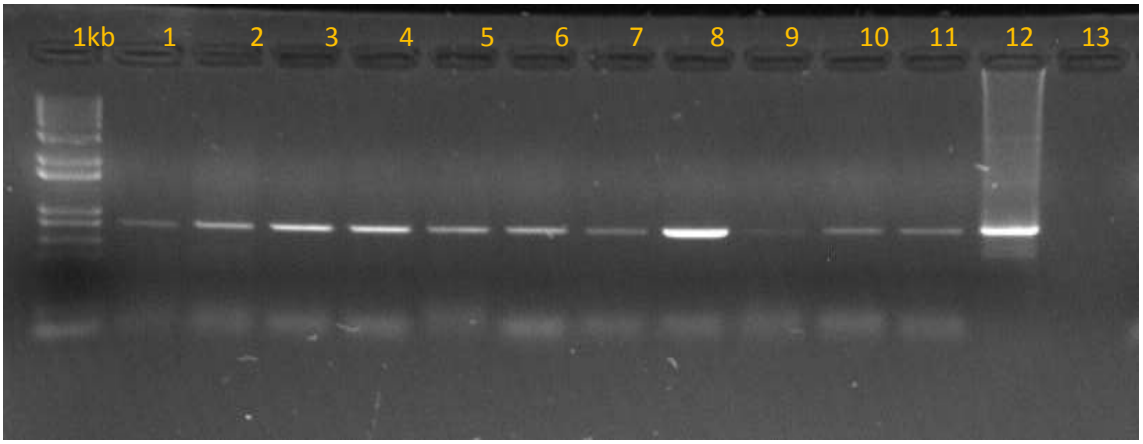

Figura 4. Detecção do ToSRV em *B. tabaci* biótipo B após diferentes períodos de aquisição: 1-4: PAA de 1 minutos; 5-8: PAA de 3 minutos; 9-11: PAA de 24 horas; 12: tomateiro infectado com ToSRV; 13: Inseto livre de vírus.

A figura 5 ilustra resultado da detecção do vírus por PCR em tomateiros inoculados com *B. tabaci* biótipo B que adquiriram o ToSRV nos intervalos de tempo de 1, 3 e 5 minutos e 24 horas. O período de inoculação foi de 24 h.

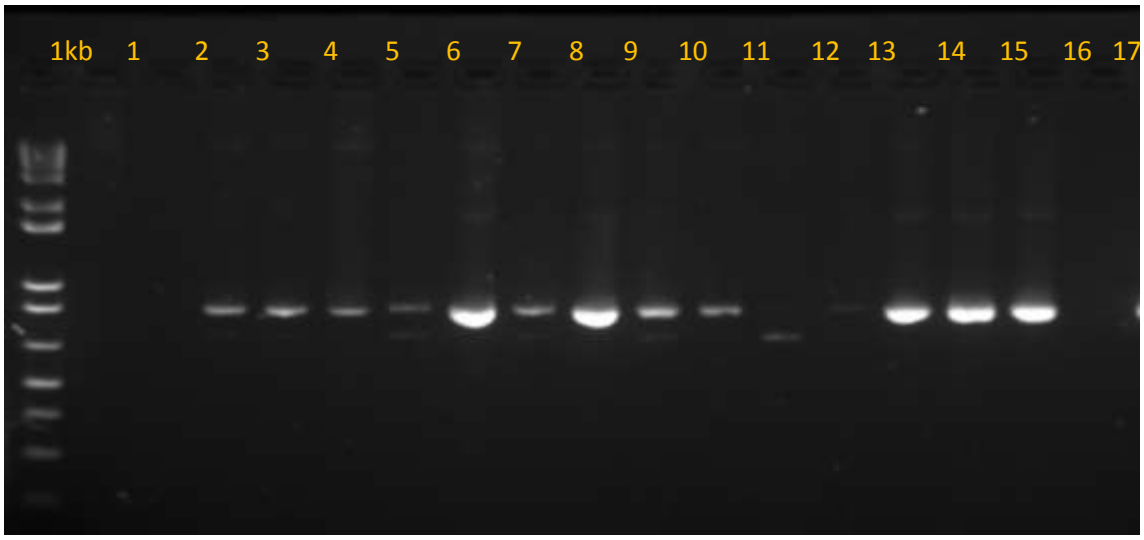

Figura 5. Detecção do ToSRV em tomateiros inoculados com *B. tabaci* biótipo B após diferentes períodos de aquisição do vírus: 1-5: PAA de 1 minuto; 6-7: PAA de 3 minutos; 8-10: PAA de 5 minutos; 11-14 PAA de 24 horas; 15-16: plantas fonte ToSRV+; 17: tomateiro sadio.

4.2 Confirmação da identidade viral

Na tabela 2 são apresentadas as porcentagens de identidade das sequências de nucleotídeos de alguns amplicons obtidos por PCR de tomateiros inoculados com insetos que tiveram diferentes períodos de acesso a aquisição do ToSRV, bem como dos próprios insetos após a inoculação do vírus em tomateiros. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com as sequências correspondentes do isolado do ToSRV depositado no GenBank número de acesso EU 600238.

Tabela 2. Porcentagens de identidades de sequências de nucleotídeos do isolado do ToSRV presente em tomateiros e adultos de *B. tabaci* biótipo B utilizados em alguns testes de transmissão após curtos períodos de acesso à aquisição (PAA).

Amostras	PAA	% de identidade
Tomateiro	1 min	98%
Tomateiro	1 min	97%
Tomateiro	3 min	98%
Tomateiro	3 min	99%
Tomateiro	3 min	98%
Tomateiro	5 min	97%
Tomateiro	5 min	98%
Tomateiro	5 min	98%
Tomateiro	24 h	99%
Tomateiro	24 h	99%
Tomateiro (fonte do ToSRV)		98%
B. tabaci biótipo B	1 min	93%
B. tabaci biótipo B	3 min	98%

4.3 Microscopia de luz de epifluorescência – hibridização *in situ*

Cortes histológicos longitudinais na região das nervuras de folhas de tomateiro sadios e infectados com o ToSRV foram analisados ao microscópio de luz (Figuras 6A), para registro de imagens do material para localização do tecido analisado ao ultravioleta.

Posteriormente os cortes foram analisados à luz ultravioleta para emissão de fluorescência do material preparado por hibridização *in situ*. Nos cortes de tecidos de folhas de plantas sadias não foram observadas fluorescências (Figuras 6B e C). Em alguns casos, a concentração de substâncias outras na região basal dos tricomas emitiu fluorescência, no entanto, a posição e intensidade como ocorrem, são distintas ao padrão observado em cortes de tecidos infectados com o begomovírus.

Nos cortes de tecidos de folhas de plantas infectadas com o ToSRV foram constatados vários pontos de fluorescência localizados nas células do parênquima de floema, incluindo as células companheiras (Figuras 6 G e H). Não foi observada fluorescência nos elementos de tubo crivado.

As células do parênquima clorofiliano não apresentaram fluorescência em nenhum dos cortes. No entanto, as células da epiderme de todos os cortes apresentaram fluorescência (Figura 6 E e F). A fluorescência observada nas células epidérmicas é mais intensa que as observadas no parênquima de floema. Em ambos os casos, a fluorescência está concentrada em um ponto adjacente às paredes, assemelhando-se ao núcleo das células, geralmente posicionado na região periférico-central das células.

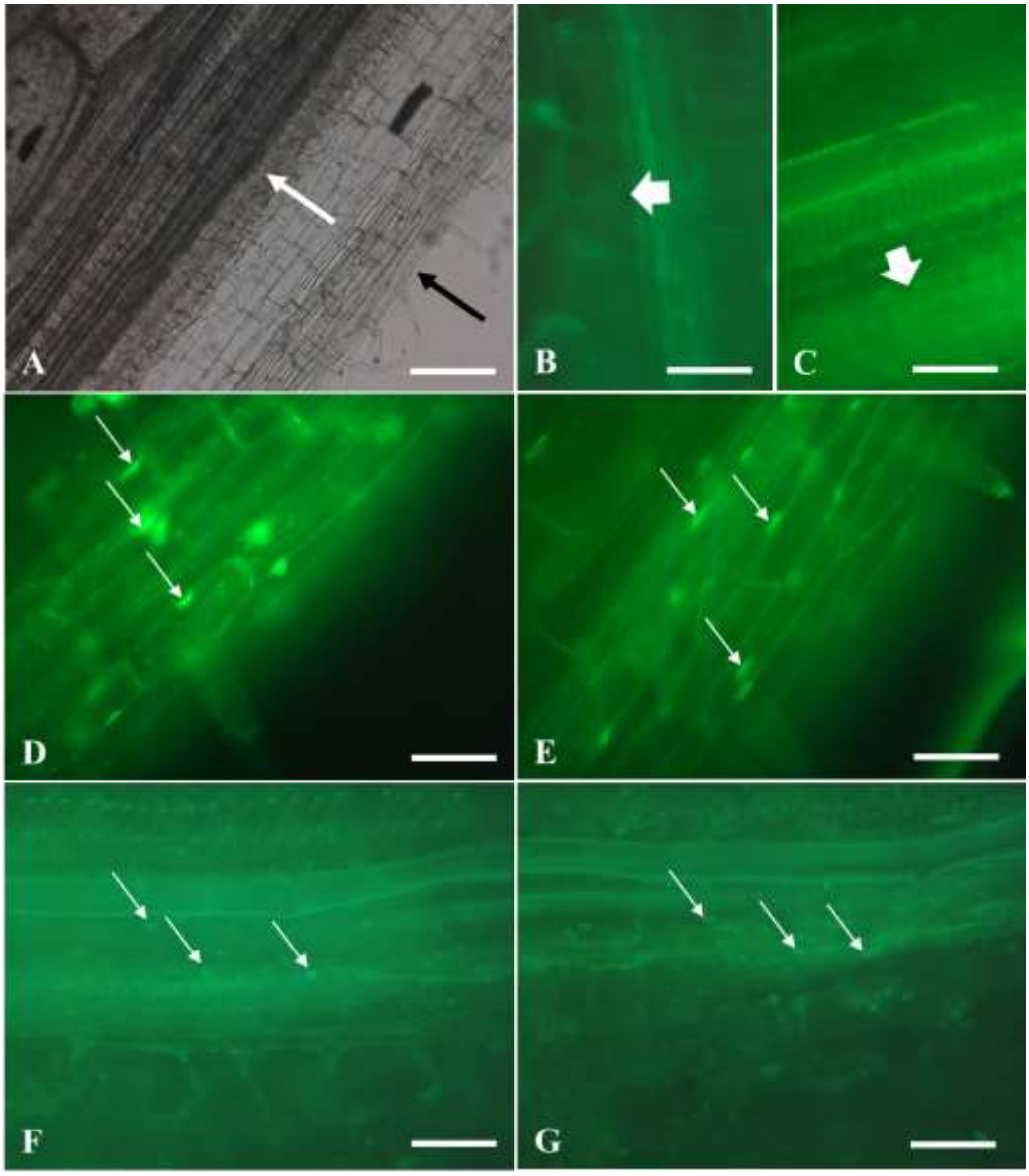

Figura 6. Microscopia de luz de epifluorescência por hibridização *in situ* do ToSRV em células foliares do tomateiro. A - Corte longitudinal da nervura da folha de tomateiro sadio em luz transmitida; floema (seta branca) e epiderme (seta preta); barra = 48 µm. B - Epiderme da nervura da folha sadia em luz UV – sem fluorescência no citoplasma (seta); barra = 24 µm. C - Região do floema da nervura da folha sadia – sem fluorescência no citoplasma (seta); barra = 24 µm. D, E - Epiderme da nervura de folha infectada com fluorescência no núcleo (setas); barra = 24 µm. F, G - Região da nervura de folhas infectadas com fluorescência no núcleo (setas); barra = 24 µm.

5 DISCUSSÃO

O gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae* é o maior entre os vírus de plantas com relação ao número de espécies (BROWN et al., 2015). São transmitidos pelo aleirodídeo *B. tabaci* de maneira persistente circulativa e causam doenças de importância econômica em espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas. A interação das espécies de begomovirus com o vetor é complexa, com algumas controversas quanto à replicação do vírus no vetor, transmissão transovariana e efeito na fecundidade e longevidade do inseto. Para a aquisição e transmissão do vírus, o inseto insere o estilete na epiderme foliar (intra ou intercelular) e move-o intercelularmente até atingir o floema (STAFFORD; WALKER; ULLMAN, 2012). Os períodos mínimos de acesso à aquisição (PAA) e à transmissão (PAI) são ligeiramente variáveis em função da espécie estudada. Estudos com o isolado Middle Eastern do TYLCV revelaram PAA de 15 a 60 minutos e PAI de 15 a 30 minutos (GHANIM, 2014). Para um isolado do TYLCV da região da Sardinia na Itália, o PAA foi de 1 a 2 h e o PAI de 0 a 15 minutos (CACIAGLI; BOSCO; AL-BITAR, 1995). Brown e Nelson (1988), ao estudarem a interação de um isolado do *Chino del tomate virus* (CdTV) de Sinaloa, México, com a *B. tabaci* identificaram PAA e PAI de 1 h e 2 h, respectivamente. Resultados de estudos para identificação do PAA e do PAI para espécies de begomovirus que ocorrem no Brasil também já foram relatados e são semelhantes aos encontrados para begomovirus de outros países. Marubayashi (2009) constatou que o PAA e o PAI de um isolado do ToSRV de pimentão foram de 15 minutos, exceto quando o inseto adquiriu o vírus em planta infectada de pimentão e a transmissão foi efetuada para tomateiro. Nesse caso o PAI mínimo foi de 30 minutos. Estudos semelhantes foram conduzidos com o ToRMV (SANTOS; ÁVILA; RESENDE, 2003) e o ToYVSV (FIRMINO et al., 2009). No primeiro caso os tempos mínimos para a aquisição e a inoculação do vírus por *B. tabaci* foram de 15 e 30 minutos, respectivamente; enquanto para o ToYVSV os valores foram de 30 minutos e 10 minutos, respectivamente. Freitas (2012), em estudos mais recentes da interação entre o ToSRV e a *B. tabaci* biótipo B encontrou PAA e PAI mínimos de 5 minutos, portanto inferiores aos relatados por Marubayashi (2009). A autora constatou ainda que adultos de *B. tabaci* biótipo B que se alimentaram em plantas infectadas por períodos de 1, 3 e 5 minutos foram capazes de adquirir o ToSRV, pois este foi detectado no inseto por PCR, porém não efetuou testes de transmissão.

Os resultados do presente trabalho confirmam aqueles obtidos por Freitas (2012) quanto à capacidade de adultos de *B. tabaci* biótipo B de adquirirem o ToSRV durante períodos curtíssimos de alimentação (1, 3 e 5 minutos) em tomateiros infectados. Mostraram ainda que após a aquisição durante estes períodos de tempo e decorrida a latência, os insetos foram capazes de transmitir o ToSRV para tomateiros. A eficiência de transmissão variou de 33% a 100% (Tabela 1).

O tempo necessário para a aquisição do vírus pelo vetor está diretamente relacionado com a localização do vírus no tecido foliar, bem como o processo de alimentação do inseto. A replicação das espécies de begomovirus parece estar confinada ao núcleo da célula. Em plantas infectadas, as partículas virais se acumulam quase exclusivamente no núcleo, quer como agregados irregulares, ou matrizes cristalinas hexagonais. As espécies de begomovirus que possuem genoma monopartido (DNA-A) estão limitadas aos tecidos do floema (TIMMERMANS; PREM DAS; MESSING, 1994), enquanto aquelas com genoma bipartido podem ficar limitadas aos tecidos do floema ou serem encontradas na maioria dos tipos de células, incluindo córtex, mesofilo e epiderme (KIM; SHOCK; GOODMAN, 1978; RUSHING et al., 1987; MORRA; PETTY, 2000). Ressalta-se ainda que apenas as espécies com genoma bipartidos são mais facilmente transmissíveis mecanicamente, o que pode refletir a sua capacidade de infectar as células epidérmicas (TIMMERMANS; PREM DAS; MESSING, 1994; MORRA; PETTY, 2000). Análises de cortes histológicos longitudinais na região das nervuras de folhas de tomateiro sadios e infectados com o ToSRV, em microscopia de luz de epifluorescência por hibridização *in situ*, revelaram pontos de fluorescência localizados nas células do parênquima de floema, incluindo as células companheiras (Figura 6 D e E) e também, nas células da epiderme (Figura 6 F e G).

A fluorescência observada nas células epidérmicas foi mais intensa do que aquela no parênquima de floema. Em ambos os casos, a fluorescência está concentrada em um ponto adjacente à parede, em cada uma das células observadas, provavelmente o núcleo que contém o ácido nucléico viral.

Análises de tecidos de *N. benthamiana* infectada com o begomovirus *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), tratado com azure-A, em microscópio de luz, indicaram a presença de inclusões em todos os tipos de células, exceto na epiderme. Estudos ao microscópio eletrônico de transmissão confirmaram que células do parênquima vascular e do mesofilo continham grande número de agregados de partículas virais (RUSHING et al., 1987). Morra e Petty (2000), por meio de hibridização *in situ* confirmaram as

observações de que o TGMV invade células do mesofilo. Além disso, utilizando clones infecciosos recombinantes entre o TGMV e o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), este restrito ao floema, os autores demonstraram experimentalmente que o tipo de tecido invadido por begomovirus é controlado pelo genoma viral.

Outro fato que corrobora a localização do ToSRV nas células epidérmicas é a sua transmissão mecânica. Nozaki (2007) teve sucesso na transmissão mecânica do isolado ToSRV (PJU) de *Nicotiana benthamiana* para *Capsicum annuum* cv. Magda e *Nicandra physaloides*. Há relatos de transmissão mecânica de outras espécies de begomovirus de genoma bipartido, tanto no Brasil (SANTOS et al., 2004; RIBEIRO et al., 2007) como em outros países (STENGER; DUFFUS; VILLALON, 1990). Deve-se apontar que em todos esses trabalhos a transmissão mecânica foi errática e diretamente relacionada com as espécies fontes de inóculo e aquelas inoculadas.

Outro fator importante para a aquisição do vírus em curtos períodos de tempo de alimentação é o processo de alimentação do vetor. *B. tabaci* alimenta-se preferencialmente nas nervuras na região abaxial das folhas. Durante o processo de penetração do estilete nas células da epiderme foliar, há evidências conflitantes se ela ocorre inter ou intracelularmente. No entanto, após passar pela epiderme, há consenso de que a penetração do estilete é intercelular. O caminhamento do estilete é tortuoso e o inseto efetua “picadas de prova” intracelulares, porém em menor número do que os afídeos. A maioria destas picadas de prova tem duração inferior a 10 segundos, porém algumas poucas podem durar 22,5 segundos. Após salivação nas células condutoras do floema, o inseto inicia a ingestão de seiva do floema, que pode durar de minutos a horas. O aleirodídeo é capaz de estabilizar a ingestão do suco celular do floema em 16 min, embora a maioria dos insetos exige mais de uma hora para atingir o floema depois de colocado sobre uma planta (STAFFORD; WALKER; ULLMAN, 2012).

Estes autores sugerem que o reduzido número de picadas de prova intracelulares pode explicar porque esse aleirodídeo transmite somente 2-3 vírus de maneira não persistente. Por outro lado, essa característica no processo de alimentação da *B. tabaci*, juntamente com a localização do ToSRV em células do parênquima foliar de tomateiro, podem explicar a aquisição deste begomovirus durante período de alimentação de um minuto, como constatada no presente trabalho.

6 CONCLUSÃO

A *B. tabaci* biótipo B adquiriu o ToSRV durante um minuto de alimentação em folha de tomateiro infectada.

A aquisição do vírus ocorre nas células do parênquima e da epiderme.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio (Brasil), 2013.

ASSUNÇÃO, I.P.; LISTIK, A.F.; BARROS, M.C.S.; AMORIM, E.P.R.; SILVA, S.J.C.; IZAEL, O.S.; RAMALHO-NETO, C.E.; LIMA, G.S.A. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na região nordeste. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, p. 239-244, 2006.

BARBOSA, J.C.; BARRETO, S.S.; INOUE-NAGATA, A.K.; MARCELO, S.R.; FIRMINO, A.C.; BERGAMIM FILHO, A.; REZENDE, J.A.M. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, Tokio, v. 75, p. 440-443, 2009.

BARBOSA, J.C.; BARRETO, S.S.; INOUE-NAGATA, A.K.; REZENDE, J.A.M. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe rugose virus.* **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, p. 644-646, 2011.

BEZERRA-AGASIE, I. C.; FERREIRA, G. B.; ÁVILA, A. C.; INOUE-NAGATA, A. K. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease,** Saint Paul, v.90, p. 114, 2006.

BOITEUX, L.S.; CLEMENTE, F.M.V.T. **Produção de tomate para processamento industrial.** Embrapa, Brasília, 2012.

BROWN, J.K.; NELSON, M.R. Transmission, host range, and virus-vector relationship of *Chino del tomate virus*, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 72, p. 866-869, 1988.

BROWN, J.K.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J.C.F.; FIALLO-OLIVÉ, E.; BRIDDON, R.W.; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; MALATHI, V.G.; MARTIN, D.P.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; UEDA, S.; VARSANI, A. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology,** Vienna, v. 160, p. 1593-1619, 2015.

CACIAGLI, P.; BOSCO, D.; AL-BITAR, L. Relationship of the Sardinian isolate of *Tomato yellow leaf curl* geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci* Gen. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, p. 163-170, 1995.

CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 1985-1989, 2008.

CONTRIM, M. A.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M.; PAVAN, M.A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 33, p. 300-303, 2007.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithesburg, v. 12, p. 13-15, 1990.

FAO. **FAOSTAT.** Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 03 de jul. de 2015.

FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADES, E.C.; BROMMONSCHENKEL, H.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infectin begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, p. 513-522, 2006.

FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GUIORDANI, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K. Diversity and prevalence of Brasilian bipartite begomovirus species associated to tomato. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 36, p. 241-258, 2008.

FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUER, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K. Development of a species-species detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. 43-47, 2010.

FIRMINO, A.C.; YUKI, V.A.; MOREIRA, A.G.; REZENDE, J.A.M. *Tomato yellow vein streak virus*: relationship with *Bemisia tabaci* biotype B and Host range. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 793-799, 2009.

FLORES, E.; SILBERSCHMIDIT, K.; KRAMER, M. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. O Biológico, **Campinas**, v. 26, p. 65-69, 1960.

FONTES, F.V.H.M.; COLOMBO, C.A.; LOURENÇÃO, A.L. Structure of genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations in Brazilian crops and locations. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 69, p. 47-57, 2012.

FREITAS, D.M.S. ***Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV): relação com a *Bemisia tabaci* biótipo B e eficiência de um inseticida no controle da transmissão do ToSRV.** 2012, 74 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI, F.O.E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**, Piracicaba: FEALQ, 2002.

GHANIM, M. A review of the mechanisms and components that determine thetransmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* (Geminiviridae: Begomovirus) by its whitefly vector. **Virus Research,** Amsterdam, v. 186, p. 47-54, 2014.

GHANIM, M.; MORIN, S.; CZOSNEK, H. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 188-196, 2000.

GÖTZ, M.; POPOVSKI, S.; KOLLENBERG, M.; GOROVITS, R.; BROWN, J.K.; CICERO, J.M.; CZOSNEK, S.W.; GHANIM, M. Implication of *Bemisia tabaci* heat shock protein 70 in Begomovirus-whitefly interactions. **Journal of Virology**, London, v. 86, p. 13241-13252, 2012.

GOTTLIEB, Y.; ZCHORI-FEIN, E.; MOZES-DAUBE, N.; KONTSEDALOY, S.; SKALJAC, M.; BRUNIM, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H.; VAVRE, F.; FLEURY, F. The transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. **Journal of Virology**, London, v. 84, p. 9310–9317, 2010.

IDRIS, A.M.; SMITH, S.E.; BROWN, J.K. Ingestion, transmission, and persistence of *Chino del tomate virus* (CdTV), a New World begomovirus, by Old and New World biotypes of the whitefly vector *Bemisia tabaci*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 139, p. 145-154, 2001.

KARNOVSKY, M.J.A. Formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, Harvard, v. 27, p. 127-137, 1965.

KIM, K.S.; SHOCK, T.L.; GOODMAN, R.M. Infection of *Phaseolus vulgaris* by *Bean golden mosaic virus*: ultrastructural aspects. **Virology,** London, v. 89, p. 22-33, 1978.

KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. **Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, San Diego, 2012.

KLIOT, A.; KONTSEDALOV, S.; LEBEDEY, G.; BRUMIN, M.; BRITTO, K.; MARUBAYASHI, J.M.; SKALJAC, M.; BALUSOV, E.; CZOSNEK, H.; GHANIM, M. Fluorescence in situ hybridizations (FISH) for the localization of viruses and endosymbiotic bacteria in plant and insect tissues. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, v. 84, 2014.

LIMA, A.C.S.; LARA F.M.; DOS SANTOS, E.J.M. Morfologia da mosca branca, *Bemisia tabaci* bótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae), encontrada em Jaboticabal, SP, com base em eletron-micrografias de varreduras. **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, Madri, v. 27, p. 315-322, 2001.

LIMA, A.T.; PEREIRA, C.O.; ALFENAS-ZERBINI, P.; PAULA, M.B.; MELLO, R.N.; ZERBINI, F.M. Primeiro relato de infecção pelo vírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 224-224, 2006.

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 53, p. 53-59, 1994.

MÂCEDO, M.A. **Estudos de fatores que influenciam a predominância do begomovírus *Tomato severe rugose virus* no Brasil.** 2011, 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MARUBAYASHI, J.M. **Interação de *Tomato severe rugose virus* com *Bemisia tabaci* biótipo B, a acessos de *Capsicum* spp. e ocorrência de espécies de mosca-branca no Estado de São Paulo.** 2009, 109 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2009

MORIN, S.; GHANIM, M.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H.; VERBEEK, M.; VAN DEN HEUVELT, J.F.J.M. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of *Tomato yellow leaf curl virus.* **Virology**, New York, v. 256, p. 75-84, 1999.

MORRA, M. R.; PETTY, I. T. D. Tissue specificity of gemininivirus infection is genetically determinated. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 12, p. 2250-2270, 2000.

MUNIYAPPA, V.; VENKATESH, H.M.; RAMAPPA, H.K., KULKARNI, R.S.; ZEIDAN, M.; TARBA, C.Y.; GHANIM, M.; CZOSNEK, H. *Tomato leaf curl virus* from Bangalore (ToLCV-Ban-4): sequence comparison with Indian ToLCV isolated, detection in plants and insect, and vector relationships. **Archives of Virology.** New York, v. 145, p. 1583-1598, 2000.

NAIKA, S.; JEUDE, J.V.L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B. **Agrodok 17: a cultura do tomate; produção, processamento e comercialização.** Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 2006.

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 219-248, 2011.

NOZAKI, D.N.; KRAUSE-SAKATE, R.; HASAGAWA, J.M.; CEZAR, M.A.; DZIUBA, P.H.; PAVAN, M.A. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 321, 2006.

NOZAKI, D. N. **Estudos biológicos e moleculares de begomovirus infectando pimentão (*Capsicum annuum*) no Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2007. 94 p.

OLIVEIRA, M.R.V.; HENNEBERRY, T.J.; ANDERSON P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. **Crop Protection**, Gildford, v. 20, p.709-723, 2001.

ORIANI, M.A.G.; VENDRAMIM, J.D.; VASCONCELOS, C.J. Biology of *Bemisia tabaci* (Genn.) B biotype (Hemiptera, Aleyrodidae) on tomato genotypes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, p.37-41, 2011.

REZENDE, W. L.; MILITÃO NETO, V.; GOULART, L. R.; GIOVANINI, M. P.; JULIATTI, F. C.; FERNANDES, J. J. Mixed infection by geminiviruses in tomato plants, detected by LIS-SSCP-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 338-339, 1997.

RIBEIRO, S. G., MARTIN, D. P., LACORTE, C., SIMÕES, I. C., ORLANDINI, D. R. S., AND INOUE-NAGATA, A. K. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 97, p. 702-711, 2007.

ROCHA, C.S.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; LIMA, A.T.M.; SILVA, F.N.; XAVIER, C.A.D.; HORA-JUNIOR, B.T.; BESERRA-JUNIOR, J.E.A.; MALTA, A.W.O.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZERBINi, M. F. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology,** New York, v. 87, p. 5784-5799, 2013.

RUSHING, A.E.; SUNTER, G.; GARDINER, W.E.; DUTE, R.R.; BISARO, D.M. Ultrastructural aspects of *Tomato golden mosaic virus* infection in tobacco. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p. 1231-1236, 1987.

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Estudo da interação de um Begomovírus
isolado de tomateiro com a mosca branca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 664-673, 2003.

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; RESENDE, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 450-455, 2004.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. Sistemas de Produção. **Embrapa hortaliças**, versão eletrônica. 2ª Edição, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/index.htm>. Acesso em: 07 de jul. de 2015.

SOUZA-DIAS, J.A.C.; SAWAZAKI, H.E.; PERNAMBUCO-FO, P.C.A.; ELIAS, L.M.; MALUF, H. *Tomato severe rugose virus*: another begomovirus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 487-487, 2008.

STAFFORD, C.A.; WALKER, G.P.; ULLMAN, D.E. Hitching a ride: Vector feeding and virus transmission. **Communicative & Integrative Biology**, Riverside, v. 5, p. 43-49, 2012.

STENGER, D.C.; DUFFUS, J.E.; VILLALON, B. Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 704-709, 1990.

TIMMERMANS, M.C.P.; PREM DAS, O.; MESSING, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto, v. 45, p. 79-112, 1994.

UCHIBORI, M.; HIRATA, A.; SUZUKI, M.; UGAKI. M. *Tomato yellow leaf curl virus* accumulates in vesicle-like structures in descending and ascending midgut epithelial cell of the vector whitefly, *Bemisia tabaci*, but not in those of nonvector whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokio, v. 79, p. 115-122, 2013.