

Identificação e caracterização do tomato chlorotic spot virus em jambu no estado do Pará



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
140**

**Identificação e caracterização do
tomato chlorotic spot virus em
jambu no estado do Pará**

*Alessandra de Jesus Boari
Ayane Fernanda Ferreira Quadros
Caterynne Melo Kauffmann
Elliot Watanabe Kitajima*

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2020

Disponível no endereço eletrônico: <https://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>

Embrapa Amazônia Oriental

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n
CEP 66095-903, Belém, PA
Fone: (91) 3204-1000
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicação

Presidente

Bruno Giovany de Maria

Secretária-Executiva

Luciana Gatto Brito

Membros

Alexandre Mehl Lunz, Alfredo Kingo Oyama Homma, Alysson Roberto Baizi e Silva, Andréa Liliane Pereira da Silva, João Paulo Castanheira Lima Both, Laura Figueiredo Abreu, Luciana Serra da Silva Mota, Narjara de Fátima Galiza da Silva Pastana

Supervisão editorial

Narjara de Fátima Galiza da Silva Pastana

Revisão de texto

Izabel Cristina Drulla Brandão

Normalização bibliográfica

Luiza de Marillac P. Braga Gonçalves

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Tratamento de fotografia e editoração eletrônica

Vitor Trindade Lôbo

Foto da capa

Alessandra de Jesus Boari

1ª edição

Publicação digitalizada (2020)

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 Amazonia Oriental

Identificação e caracterização do tomato chlorotic spot virus em jambu no estado do Pará / Alessandra de Jesus Boari ... [et al.]. — Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2020.

14 p. : il. ; 16 cm x 22 cm. — (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0483; 140).

1. Jambu. 2. *Acmella oleracea* L. 3. Doença. 4. *Orthospovirus*. 5. TCSV. I. Boari, Alessandra de Jesus. II. Embrapa Amazônia Oriental. III. Série.

CDD 21 ed 635.56

Luiza de Marillac P. Braga Gonçalves (CRB 2-495)

© Embrapa, 2020

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	10
Conclusões.....	12
Agradecimentos.....	12
Referências	13

Identificação e caracterização do tomato chlorotic spot virus em jambu no estado do Pará

Alessandra de Jesus Boari¹

Ayane Fernanda Ferreira Quadros²

Caterynne Melo Kauffmann³

Elliot Watanabe Kitajima⁴

Resumo – O jambu (*Acmella oleracea* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas na região Norte do Brasil. Incidência de 60% a 100% de plantas de jambu apresentando sintomas de manchas anelares, necroses e manchas cloróticas, com evidências de perda em produtividade, foi observada em plantios comerciais no município de Santa Izabel, PA. Amostras foliares foram coletadas e processadas em testes biológicos, morfológicos e moleculares para a identificação do agente causal. Inoculações mecânicas de extratos de folhas sintomáticas de jambu reproduziram sintomas similares em jambu cultivar Nazaré. Exames ao microscópio eletrônico de transmissão de secções de folhas de jambu sintomáticas indicaram efeitos citopáticos típicos de infecção por orthospovírus. RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para orthospovírus gerou amplicon de aproximadamente 450 pb, cuja sequência de nucleotídeos mostrou 94% a 98% de identidade com sequências de nucleotídeos correspondentes de isolados do vírus da mancha clorótica do tomate (tomato chlorotic spot virus – TCSV). Este é o primeiro relato da incidência deste vírus em jambu no Pará, e a epidemiologia da doença e medidas de controle estão em estudo.

Termos para indexação: *Acmella oleracea* L., TCSV, *Orthospovirus*.

¹ Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA

² Engenheira-agrônoma, doutoranda em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

³ Engenheira-agrônoma, mestranda em Fitopatologia na Universidade Nacional de Brasília, Brasília, DF

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, professor na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP

Identification and characterization of the tomato chlorotic spot virus infecting jambu in the state of Pará, Brazil

Abstract – Jambu (*Acmella oleracea* L.) is one of the main vegetables cultivated in the northern region of Brazil. Incidence (60% – 100%) of jambu plants showing symptoms of ring spots, necrosis and chlorotic spots, with evidence of loss in productivity, was observed in commercial crops in the municipality of Santa Izabel, state of Pará. Leaf samples were collected and processed for biological, morphological and molecular assays to identify the causative agent. Mechanical inoculation of extracts from symptomatic jambu leaves reproduced the original symptoms in jambu cultivar Nazaré. Transmission electron microscopy of thin sections of symptomatic jambu leaves revealed cytopathic effects typical of orthospoviruses. RT-PCR with orthospovirus-specific primers generated amplicon of approximately 450 bp, whose nucleotide sequence showed 94% to 98% identity with corresponding nucleotide sequences from tomato chlorotic spot virus (TCSV) isolates. This is the first report of the incidence of this virus in jambu in Pará and the epidemiology of the disease and control measures are being studied.

Index terms: *Acmella oleracea* L., TCSV, *Orthospovirus*.

Introdução

O jambu (*Acmella oleracea* L.), pertencente à família Asteraceae, originário da Bacia Amazônica, é uma das principais hortaliças cultivadas na região Norte do Brasil. A produção de jambu se concentra principalmente nos municípios de Santa Izabel, Santo Antônio do Tauá e na região metropolitana de Belém, no estado do Pará. Considerada uma hortaliça não convencional da Amazônia, é uma planta herbácea perene, semiereta e de ramos decumbentes. O consumo, principalmente das folhas do jambu, no estado do Pará é bastante difundido, compondo diversos pratos, como pato no tucupi, moqueca, caldeirada e tacacá, sendo também muito utilizada em saladas.

O jambu é também conhecido por agrião-do-pará, agrião-do-brasil, agrião-do-norte, jabuaçu, erva-maluca, jaburama, botão-de-ouro, entre outros (Cardoso, 1997; Coutinho et al., 2006). Seu sabor característico se deve à presença das moléculas pertencentes ao grupo alquilamidas, sendo a mais importante o espilantol. A planta é reconhecida como anestésica, diurética, digestiva, sialagoga, antiasmática e antiescorbútica. Em função do potencial terapêutico, essa planta vem sendo cultivada no estado de São Paulo (Coutinho et al., 2006; Borges, 2009).

A produção do jambu pode ser afetada por algumas doenças como: ferrugem (*Puccinia spilanthes*), carvão (*Thecaphora spilanthes*) (Freire et al., 1986), flor-preta (*Alternaria solani*) (Rosa, 2007) e a galha da raiz (*Meloidogyne* sp.) (Sing et al., 2000). Krause-Sakate et al. (2008) relataram a ocorrência da espécie *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) – do gênero *Orthotospovirus*, pertencente à família *Tospoviridae* – no estado de São Paulo em cultivos de jambu destinados à extração do espilantol. No Vietnã, em plantas de outra espécie, *Spilanthes paniculata*, foi relatada a ocorrência do begomovírus *Spilanthes yellow vein virus* (SPYVV) (Ha et al., 2008).

Em plantações de jambu de pequenos produtores no município de Santa Izabel, foram notadas incidências que variaram de 60% a 100% de plantas com sintomas de manchas anelares, necroses, manchas cloróticas e *line pattern* (Figura 1), semelhantes àqueles causados por vírus do gênero *Orthotospovirus*, com possíveis perdas econômicas.

Neste trabalho foram realizados ensaios biológicos, morfológicos e moleculares visando a identificação e caracterização do agente causal da mancha clorótica em jambu.

Fotos: Alessandra de Jesus Boari



Figura 1. Lesões necróticas e cloróticas, e anéis em folhas de jambu infectadas com tomato chlorotic spot virus (TCSV) no estado do Pará.

Material e Métodos

Amostras foliares de jambu apresentando sintomas de mancha anelar necrótica, manchas cloróticas e *line patterns* foram coletadas em cultivos dessa hortaliça em Santa Izabel e levadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental (Belém, PA) para diagnose. Uma parte das amostras frescas foi preservada no freezer a -80°C .

Extrato de folhas de uma planta de jambu sintomática foi preparado em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio 0,01 M e inoculado mecanicamente, com auxílio do abrasivo Carborundum, em seis plantas das seguintes indicadoras: *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum* 'Xanthi', 'Turkish' e 'TNN', *N. glutinosa*, *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Physalis floridana*, *Datura stramonium*, *Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*, *Cucurbita pepo* 'Caserta', *Nicandra physaloides*, *Capsicum annuum*). Também foram inoculadas plantas de jambu 'Nazaré' e de um jambu selvagem ardido, o qual possui folhas e inflorescência menores que da cultivar Nazaré. Como controle sadio foram inoculadas seis plantas de cada indicadora com a solução tampão acrescida do Carborundum. As plantas inoculadas foram mantidas em condições de estufa agrícola por um período de 30 dias para observação de sintomas.

Fragmentos de folhas de jambu infectado foram fixados em solução modificada de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído v/v, 2,5% paraformaldeído

(v/v), 0,001 M de CaCl_2 em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2), pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (p/v) no mesmo tampão, corado com 0,5% de acetato de uranila (p/v), desidratado em acetona e embocado com resina Spurr. Secções ultra-finas foram obtidas com navalha de diamante em um ultramicrotomo Reichert Ultracut T e examinadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011 e as imagens registradas digitalmente.

Foi realizada a purificação parcial do vírus a partir de folhas de jambu infectadas conforme protocolo de Lane (1992). Quatro gramas de folhas infectadas foram maceradas em almofariz gelado com 15 mL de tampão citrato de amônio 0,5 M, pH 6,4, adicionados de 100 μL de 0,1 M de iodoacetamida e 0,1 M de NaDIECA. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 8.000 rpm por 10 minutos. Foram transferidos 15 mL do sobrenadante para cada tubo de policarbamato e homogeneizado com 1 mL de triton-X. Posteriormente, foi feito o colchão de sacarose a 20% e ultracentrifugação a 30.000 rpm durante 150 minutos. Ao pellet foram adicionados 500 μL de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,2 e armazenado por uma noite na geladeira para ressuspensão das partículas virais. Em seguida, a solução viral foi centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. A extração de RNA viral foi feita a partir do vírus purificado conforme protocolo de Sambrook et al. (1989). O RNA viral foi utilizado na RT-PCR com dois oligonucleotídeos específicos para orthotospovírus: TospoBR65 - 5' ATC AAG CCT TCT GAA AGT CAT 3' e TospoBR60 - 5' AGA GCA ATC GTG TCA 3' (Eiras et al. 2001), que amplifica parte do gene N da capa proteica e parte da região não-traduzida do RNA S. Para a transcrição reversa e síntese do cDNA foram utilizando 0,5 μL da transcriptase reversa AMV, 3 μL do RNA viral, 0,5 μL do oligonucleotídeo reverso TospoBR60 e 16 μL de água ultrapura. Em seguida, foi realizada a PCR com 5 μL do cDNA, 6 μL do tampão de reação 5X, 3 μL de MgCl_2 (25 mM), 0,5 μL de dNTP mix (10 mM), 0,3 μL da Taq DNA polimerase, 0,5 μL dos oligonucleotídeos TospoBR65 e TospoBR60 e 34,7 μL de água ultrapura. O regime do termociclador foi de 30 ciclos de 94 °C por minuto, 48 °C por minuto e 72 °C por minuto, além de uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados via eletroforese em gel de agarose (0,8%), corados com GelRed (Biotium, Inc.) e visualizados sob luz UV em fotodocumentador.

Amplicons foram então purificados com o *kit* Wizard PCR (Promega) e enviados para sequenciamento de nucleotídeos. A sequência de nucleotídeos foi comparada com as disponíveis no GenBank por meio do programa BLAST (Altschu et al., 1997) e CLUSTALW (Thompson et al., 1994).

Resultados e Discussão

Plantas de jambu ‘Nazaré’ inoculadas mecanicamente exibiram sintomas semelhantes aos observados em plantas no campo. Nenhuma planta de jambu selvagem ardido manifestou sintomas. Plantas de *Datura stramonium*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* ‘TNN’, ‘Turkish’ e ‘Havana 425’, *N. grustica* e *N. clevelandii* exibiram lesões necróticas sistêmicas, seguida de morte das plantas. Em plantas de *C. amaranticolor*, *C. quinoa* e *G. globosa* observaram-se formação de lesões locais necróticas na folhas inoculadas. Plantas de *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* mostraram lesões circulares cloróticas

nas folhas inoculadas. O restante das plantas inoculadas não mostrou sintomas.

Exames de secções ultrafinas de tecidos de folhas de jambu sintomáticas indicam a presença consistente de partículas de perfil circular ou oval, de 80 nm–100 nm de diâmetro, em cavidades do retículo endoplasmático e, em muitas ocasiões, de massas densas estriadas no citoplasma adjacente (Figura 2). Esse tipo de efeito citopático é característico de infecção de orthotospovírus: as partículas contidas no retículo endoplasmático representam os vírions, e, as massas densas, a nucleoproteína viral que não foi envolvida pela membrana durante a morfogênese (Kitajima et al., 1992).

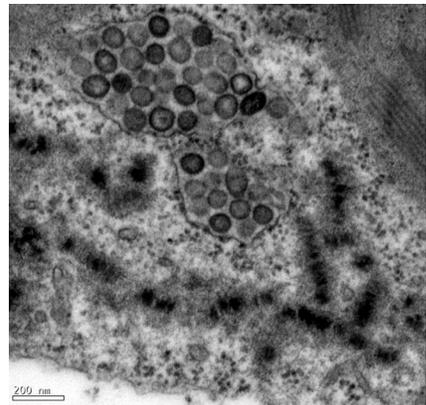


Foto: Elliot Watanabe Kitajima

Figura 2. Micrografia eletrônica de secções ultrafinas de lesões em folha de jambu (*Acmella oleraceae* L.) causadas pela infecção com o vírus da mancha clorótica do tomate (tomato chlorotic spot virus – TCSV). Partículas virais de perfil circular estão presentes na cisterna do retículo endoplasmático. No citoplasma adjacente notam-se massas densas, representantes da nucleoproteína viral, que não completaram a morfogênese.

Na RT-PCR foi amplificado um fragmento de aproximadamente 450 pb (Figura 3) como esperado para uma espécie de orthospovírus. A sequência de nucleotídeos do amplicon mostrou identidade de 94% a 98% com sequências de nucleotídeos correspondentes de isolados do TCSV disponíveis no GenBank, sendo de 98% com o isolado de jambu encontrado no estado de São Paulo (GenBank Access No. AM887766) (Krause-Sakate et al., 2008).

No Brasil, já foram relatados diferentes espécies de vírus pertencentes ao gênero

Orthospovirus infectando naturalmente plantas de diversas espécies, cultivadas ou da vegetação espontânea: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), TCSV, *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Zucchini lethal chlorotic virus* (ZLCV e *Iris yellow spot virus* (IYSV) (Resende et al., 1996).

O TCSV foi relatado pela primeira vez no Brasil em 1990 em tomateiro (Ávila et al., 1990), mas também ocorre em várias outras culturas como pimentão, alface, fumo (Colariccio et al., 1995) e jiló (Rabelo et al., 2002). Esse vírus é transmitido eficientemente pelas espécies de tripes *Frankliniella occidentalis* e *Frankliniella schultzei* (Wijkamp et al., 1995; Borbon; Garcia, 1996). Ambos os insetos são prevalentes em países de regiões tropicais e subtropicais (Wijkamp et al., 1995). No estado de São Paulo, TCSV e GRSV são predominantemente transmitidos pelo tripe *F. schultzei* (Pavan et al., 1993).

Vírus do gênero *Orthospovirus* podem causar prejuízos econômicos em plantios de alface de 30% a 100%, principalmente no verão na região Sudeste (Moraes et al., 1988). Giampan et al. (2009) verificaram uma redução de

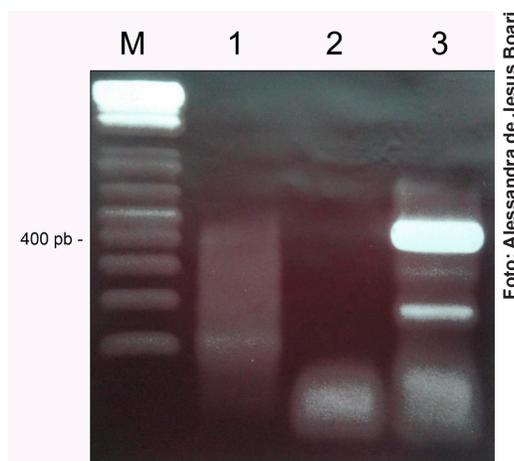


Foto: Alessandra de Jesus Boari

Figura 3. Padrão eletroforético em gel de agarose (9%) dos fragmentos do RNA S do tomate chlorotic spot virus (TCSV) amplificados por RT-PCR, em que M é marcador molecular 1 kb ladder; 1 e 3, amostra de jambu sadio e infectado por TCSV; e 2, controle de água.

78,5% na produção de frutos comerciais de abobrinha de moita provenientes de plantas infectadas pelo ZLCV.

Este é o primeiro relato da incidência do TCSV em plantas de jambu no estado do Pará. Embora as observações sugiram perda na produção, tanto qualitativa como quantitativa, não há dados de avaliação de danos na produção causados pelo TCSV.

Os orthospovírus podem infectar plantas de inúmeras espécies, incluindo hortaliças, ornamentais e plantas invasoras, que podem se constituir em importantes fontes de inóculo. As doenças causadas por orthospovírus podem ser manejadas por meio de práticas culturais e de controle do vetor, entretanto, é de fundamental importância que novos acessos de jambu sejam introduzidos nos programas de melhoramento visando resistência ao TCSV. Atualmente, há apenas a cultivar Nazaré registrada no banco de cultivares no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), e não há relato da existência de um Banco Ativo de Germoplasma de jambu no Brasil.

Trabalhos estão em andamento para avaliação mais precisa da incidência do TCSV nas regiões produtoras de jambu, compreensão da epidemiologia da doença, incluindo a identificação do tripses vetor, e estabelecimento de medidas de controle, incluindo *screening* de cultivares visando programas de melhoramento para resistência. O fato de as plantas de jambu selvagem ardido não terem sido infectadas nos ensaios de transmissão experimental indica potencial como fonte de resistência a ser explorada no programa de melhoramento genético.

Conclusões

O agente causal das manchas cloróticas, anéis cloróticos e necróticos em folhas de jambu no estado do Pará foi identificado como um isolado do vírus da mancha clorótica do tomate (tomato chlorotic spot virus – TCSV).

Agradecimentos

À Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), pelo financiamento das ações da pesquisa.

Referências

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AVILA, A. C.; HUGUENOT, R.; RESENDE, R. de O.; KITAJIMA, E. W.; GOLDBACH, R. W.; PETERS, D. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. **Journal General of Virology**, v. 71, pt.12, p. 2801-2807, 1990.
- BORBON, C. M.; GRACIA, O. *Frankliniella schultzei* (Tribom), eficiente vector de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) en cultivo de lechuga en Mendoza, Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 423, 1996. Abstract.
- BORGES, L. da S. **Biomassa, teores de nutrientes, espilantol e atividade antioxidante em plantas de jambu (*Acmella ciliata* Kunth) sob adubações mineral e orgânica**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.
- CARDOSO, M. O. (Coord.). **Hortalças não convencionais da Amazônia**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Manaus: Embrapa-CPAA, 1997. 150 p.
- COLARICCIO, A.; ROGGERO, P.; CHAGAS, C. M.; EIRAS, M.; CÉSAR, E. P. G. Identificação serológica do *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) em alface, pimentão e fumo no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 347, 1995.
- COUTINHO, L. N.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. Galls and deformation on jambu (*Spilanthes oleraceae*) caused by *Tecaphora spilanthes* (Ustilaginales). **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 283-285, 2006.
- EIRAS, M.; RESENDE, R. O.; MISSIAGGIA, A. A.; ÁVILA, A. C. de. RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 170-175, 2001.
- FREIRE, F. das C. O. Carvão do jambú (*Spilanthes oleraceae* L.), uma doença nova para a Região Amazônica brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 543-555, 1986.
- GIAMPAN, J. S.; REZENDE, J. A. M.; PIEDADE, S. M. de S. Yield loss caused by *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) on zucchini squash 'Caserta'. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 223-225, 2009.
- HA, C.; COOMBS, S.; REVILL, P.; HARDING, R.; VU, M.; DALE, J. Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: additional evidence that the New World geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. **Journal of General Virology**, v. 89, pt.1, p. 312-326, 2008.
- KRAUSE-SAKATE, R.; NOZAKI, D. N.; ROSA, R. A.; SUZUKI, G. S.; PAVAN, M. A. First Report of *Tomato chlorotic spot virus* Infecting *Spilanthes oleracea* in Brazil. **Plant disease**, v. 92, n. 5, p. 834, 2008.
- KITAJIMA, E. W.; AVILA, A. C. de; RESENDE, R. de O.; GOLDBACH, R. W.; PETERS, D. Comparative cytological and immunogold labelling studies of different isolates of tomato spotted wilt virus. **Journal of Submicroscopic Cytology**, v.24, n.1, p. 1-14, 1992.
- LANE, L. C. A general method for detecting plant viruses. In: MARAMOROSH, K. (Ed). **Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin**. New Delhi: Oxford & IBH Publishing, 1992. p. 1-15.

- MORAES, G. J.; WANDERLY, L. J.; COSTA, A. S. Surto de vira-cabeça na cultura de alface em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, v. 6, n. 2, p. 24-25, 1988.
- PAVAN, M. A.; COSTA, A. S.; KUROSAWA, C.; FORTI, L. C.; GUIMARÃES, A. M. Colonização do tomateiro e ervas daninhas pelo tripses vetor do vira-cabeça do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 122-125, 1993.
- RABELO, L. C.; PEDRAZZOLI, D.S.; NOVAES, Q.; NAGATA, T.; REZENDE, J.; KITAJIMA, E. Alta incidência de *Tomato chlorotic spot virus* em jiló no estado de São Paulo. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, n. 1, p. 105-105, 2002.
- RESENDE, R. de O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I. C.; LIMA, M. I.; KITAJIMA, E. W.; ÁVILA, A. C. de. New Tospoviruses Found in Brazil. Proceedings of the International Symposium on Tospovirus and Thrips of Floral and Vegetable Crops. **Acta Horticulturae**, v. 431, n.1, p.78-89, 1996.
- ROSA, D. Podridão floral em jambu branco (*Spilanthes acmella*) causado por *Alternaria solani*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5., 2007, Recife. **Programas e resumos**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2007. AG-082.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1626 p.
- SINGH, Y. P.; SULTAN, Z.; KHAN, S. N.; JOSHI, D. N. *Spilanthes acmella* and *Spilanthes oleracea*: new hosts of root-knot nematode. **Annals of Forestry**, v. 8, n. 2, p. 282-284, 2000.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- WIJKAMP, I.; ALMARZA, N.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathology**, v. 85, p. 1069-1074, 1995.



Amazônia Oriental

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL