



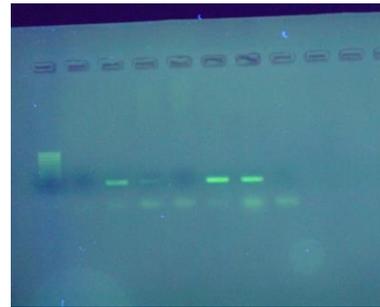
Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal

Departamento de Protecção Vegetal

Licenciatura em Engenharia Agronómica

Projecto final

**Prospecção de Hospedeiros alternativos do vírus de topo em leque da bananeira
(*Banana bunchy Top Virus -BBTV*) nos distritos de Manhiça e Chókwè**



Autor:

Ronaldo Jerónimo Zunguze

Supervisor:

Professor Doutor João Bila (PhD)

Co-Supervisor:

Eng^a. Marília Mazivele Titoce (MSc)

Maputo, Outubro de 2024

Declaração de Honra

Eu, Ronaldo Jerónimo Zunguze declaro por minha honra que este trabalho de culminação de curso é da minha autoria e nunca foi submetido nesta ou em outra instituição para aquisição de qualquer outro grau académico e que ele constitui o resultado do meu trabalho individual e das orientações dos meus supervisores, o seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia final.

Ronaldo Jerónimo Zunguze

Data: ____/____/2004

Por ser verdade, confirmo que o trabalho foi realizado pelo candidato sob minha supervisão,

Professor Doutor João Bila (PhD)

Departamento de protecção vegetal, Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal,
Universidade Eduardo Mondlane

Data: ____/____/2024

Eng^a. Marília Mazivele (MsC)

Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane

Data: ____/____/2024

Maputo, Outubro de 2024

Hospedeiros Alternativos do Vírus de topo em leque da bananeira (*Banana bunchy Top Virus* -BBTV) nos distritos de Manhiça e Chokwe

Trabalho de culminação do curso submetido à Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal (Departamento de Protecção Vegetal) em cumprimento parcial dos requisitos exigidos para obtenção do grau académico de Licenciado em Engenharia Agronómica, sob orientação do Prof. Doutor João Bila e Eng^a. Marília Mazivele Titoce (MsC)

RESUMO

A banana é uma das culturas frutíferas mais importantes economicamente em todo o mundo, contribuindo para a subsistência e nutrição de milhões de pessoas nos trópicos, incluindo Moçambique. No entanto, em 2016, Moçambique relatou o primeiro surto da doença causada pelo *Banana bunchy top virus* (BBTV) na província de Gaza, ameaçando a produção de banana em Moçambique e na região. Desde então, medidas de contenção e quarentena foram implementadas pelo governo e parceiros, mas o esforço não conseguiu conter a doença, com novos surtos sendo progressivamente relatados em novos locais, incluindo a província de Maputo. Este estudo teve como objectivo identificar hospedeiros alternativos da BBTV no Sul de Moçambique. Foram colhidas amostras em campos de produção de banana dos distritos de Manhiça (em Maputo) e Chókwè (em Gaza), em plantas que apresentavam alguns sintomas de infecção viral ou que abrigavam insectos sugadores (como afídios da banana), nas proximidades de plantas de banana infectadas com BBTV. A triagem do vírus BBTV foi realizada utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR). A análise comparativa das sequências foi realizada na base de dados da National Center for Biotechnology Information (NCBI). Um total de 103 espécies de plantas foi identificado, com 42 espécies de 13 famílias em Manhiça e 61 espécies de 18 famílias em Chókwè. Os resultados do diagnóstico por PCR detectaram três espécies de infestantes como hospedeiros do BBTV: *Conyza canadensis* (Asteraceae) e *Corallocarpus sp.* (Cucurbitaceae) em Manhiça, e *Centella asiatica* (Apiaceae) em Chókwè. A análise fenética das sequências dos amplicons apresentou uma baixa cobertura e alta similaridade em comparação com os isolados de outras regiões. A detecção de hospedeiros alternativos do BBTV em Moçambique abre caminho para uma gestão integrada mais sustentável do BBTV, bem como para a taxonomia das estirpes de BBTV que estão a devastar a produção de banana em Moçambique.

Palavras-chaves: *Banana bunchy Top Vírus*, BBTV, BBTV em Moçambique; hospedeiros alternativos da BBTV.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pilares Albano Matsinhe e Flávia Vilanculos pelo amor, educação, orientação, paciência e acima de tudo por acreditarem e apoiarem-me em tudo.

Ao meu falecido avô Pechisso Matsinhe e a minha avó Ermelinda Vilanculos por me ensinarem o amor a agricultura.

Nzi Bonguile!

Aos meus Tios Matsinhes em especial ao Hélder Matsinhe pela motivação, apoio e inspiração.

Aos irmãos, primos e amigos.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A DEUS todo-poderoso “*Eu, o seu Senhor, a seu tempo o farei prontamente*” Isaias-60vs22

Ao Professor Doutor João Bila, pelos ensinamentos, paciência e orientação desde a colecta das amostras, actividades laboratoriais e elaboração do projecto final.

Ao Doutor Valter Nuaila e em especial a Engenheira Marília Mazivele,

Pela paciência, orientação, encorajamento e ensinamentos desde a integração no laboratório, em todas actividades laboratoriais, análise dos resultados. A eles a minha gratidão infinita. A família do CB-UEM, em especial a dr^a. Raquelina, vai o meu muito obrigado pelo acolhimento caloroso e experiência.

Aos Técnicos Ernesto Macamo e Ernesto Boane do Departamento de Biologia que apoiaram na colecta e identificação das infestantes, vai o meu profundo agradecimento.

À Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal (FAEF) da Universidade Eduardo Mondlane (UEM) pelo privilégio de fazer parte da instituição, e a todos os professores que contribuíram para minha formação académica. Ao pessoal do laboratório de Fitopatologia em especial ao Eng^o Amândio, Eng^a Julieta, dona Jordina e a dona Graça pela colaboração, orientação e apoio que foi indispensável para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus Pilares Albano Matsinhe e Flavia Vilanculos, que sempre estiveram presentes em toda minha caminhada e em todos momentos, isso foi possível graças a vocês. Aos meus avós Pechisso e Ermelinda, por inculcaram desde criança o amor ao próximo, respeito, humildade, persistência e o amor a agricultura, esses foram os alicerces que me tornaram o homem e profissional que sou hoje. Aos meus tios (Matsinhes) muito obrigado. As minhas tias, em especial a tia Beatriz é inestimável a gratidão que tenho, aos irmãos e primos muito obrigado.

Aos meus amigos Celso, Adérito, Adolfo, José, Elton, Benvindo, Emídio, Cláudio, Jorge, Sérgio, Ventura, Mateus e Luís pelo apoio incondicional e por terem proporcionado vários momentos de descontração e diversão. As minhas amigas Priscila, Berina, Huneiza, Melanie e em especial a Adélcia, muito obrigado meninas. A Carlota Monjane e Eduardo pela amizade e apoio nos trabalhos laboratoriais. A todos colegas da faculdade que contribuíram directa ou indirectamente para o sucesso da minha formação académica.

Aos sócios Armando Traquino, Amina Bombe e José Brito, muito obrigado pessoal.

ÍNDICE

RESUMO	iv
AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Problema de estudo e justificação.....	2
1.3. Objectivos.....	4
1.3.1. Objectivo geral.....	4
1.3.2. Objectivos específicos	4
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Aspectos gerais da cultura da banana.....	5
2.2. Propagação da bananeira.....	5
2.3. Importância e uso da banana	6
2.4. Produção da banana.....	7
2.4.1. Produção mundial	7
2.4.2. Produção da banana em Moçambique	7
2.5. Factores abióticos e bióticos que afectam a cultura de banana.....	8
2.5.1. Infestantes na cultura de banana	8
2.5.2. Pragas e doenças da cultura da bananeira	9
2.6. <i>Banana Bunchy Top Virus</i>	11
2.6.1. Origem e Distribuição no Mundo	11
2.6.2. Etiologia da doença.....	12
2.6.3. Sintomas da doença.....	12
2.6.4. Transmissão do Vírus	14
2.6.5. Hospedeiros do vírus de BBTV	14
2.6.6. Estratégias de manejo de BBTV	15
2.6.7. Detenção de BBTV	17
III. METODOLOGIA	18
3.1. Identificação de potenciais espécies hospedeiras do BBTV	19
3.2. Diagnóstico molecular de potenciais espécies hospedeiras do BBTV.....	20
3.2.1. Extracção do ADN.....	20

3.2.2.	Detecção do BBTV por PCR	20
3.2.3.	Visualização e Análise do produto de PCR	22
3.3.	Catacterização fenetica das sequências dos amplicons obtidos nos potenciais hospedeiros alternativos	23
3.4.	Análise dos dados.....	23
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1.	Identificação de potenciais espécies hospedeiras do BBTV	24
4.1.1.	Frequência absoluta e relativa das espécies	27
4.2.	Detenção do BBTV pelo método de PCR.....	30
4.3.	Catacterização fenetica das sequências dos amplicons	33
V.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	36
5.1.	Conclusões	36
5.2.	Recomendações.....	36
ANEXOS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: valor nutritivo de diferentes tipos de banana	6
Tabela 2: Principais Países Produtores de Banana em 2023.....	7
Tabela 3: Principais pragas da cultura de banana	9
Tabela 4: Principais doenças da cultura de banana.....	10
Tabela 5: Sequência dos primers utilizados na realização da PCR	21
Tabela 6: Distribuição das espécies por família	24
Tabela 7: Resultado do Blast search das sequências das três (3) amostras que testaram positivo no PCR.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial do vírus do topo em leque da bananeira (Banana bunchy top virus, BBTV).....	11
Figura 2: Sintomas do BBTV:	13
Figura 3: Frequência absoluta e relativa das espécies no distrito de Manhiça.	27
Figura 4: Frequência absoluta e relativa das espécies no distrito de Chókwè.	28
Figura 5: Resultado de PCR gel de agarose (1.5%).....	30
Figura 6: Resultado do PCR.	31

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Lista das espécies levantadas no distrito de Manhiça	45
Anexo 2: Lista das espécies do levantamento efectuado no distrito de Chokwe.....	46
Anexo 3: Protocolo de extracção de ADN em Plantas (segundo Doyle & Doyle, 1986 - modificado).....	47
Anexo 4: Quantificação do ADN extraído das amostras de Manhiça	48
Anexo 5: Quantificação do ADN extraído das amostras de Chokwe	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MASA	Ministério de Agricultura e Segurança Alimentar
MADER	Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural
MAE	Ministério de Administração Estatal
IIAM	Instituto de investigação Agrária de Moçambique
SDAE	Serviços Distritais das Actividades Económicas
UEM	Universidade Eduardo Mondlane
FAEF	Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal
CB	Centro de Biotecnologia
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura.
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization (Organização europeia e mediterrânea para a protecção de plantas)
BBTV	Banana Bunchy top Vírus
BBTD	Banana bunchy top disease
PCR	Reacção em cadeia de Polimerase
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamónio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
DMSO	Dimetilsulfoxido
TAE	Tris-Acetato-EDTA
NCBI	National Center for Biotechnology Information

I. INTRODUÇÃO

1.1. Antecedentes

A Banana é considerada a fruta tropical de maior importância alimentar e económica para muitos países, pois mobiliza grande contingente de mão-de-obra, permite rápido retorno económico ao produtor, movimenta apreciável gama de insumos e é comercializada praticamente o ano todo (Nomura, 2020).

Segundo a Food And Agriculture Organization (FAO) em 2019, a banana foi a sexta cultura alimentar mais produzida no mundo, atrás do milho, arroz, trigo, batata e mandioca. Números exactos sobre a produção global de banana são difíceis de obter já que os pequenos agricultores conduzem informalmente a maior parte do cultivo de banana (FAO, 2022).

Estima-se que as quantidades totais globais de exportação tenham caído de 20,5 milhões de toneladas em 2021 para aproximadamente 19,6 milhões de toneladas em 2022, tendo como os principais factores a escassez de produção causada por condições climáticas adversas e aplicação insuficiente de fertilizantes, custos substancialmente mais elevados de factores de produção, a valorização significativa do dólar, a guerra Rússia-Ucrânia e preocupações em torno da propagação de doenças de plantas (FAO, 2022).

Em Moçambique, a banana ocupa primeira posição das frutas mais produzidas e exportadas, sendo Maputo, Gaza, Nampula e Manica as principais províncias produtoras (MADER, 2020). A capacidade actual de produção do País esta em torno de 800 mil toneladas por ano, com alta contribuição de Maputo Província que conta com mais de 22 empresas privadas que dedicam a produção da banana (MADER, 2021).

A produção nacional da banana tem enfrentado sérios problemas nas fases de produção e pós-colheita, que limitam a sua inserção no mercado internacional (Fioravanço, 2003). Dentre os factores limitantes, inclui-se a qualidade fitossanitária da fruta, onde estão associadas as doenças fúngicas (sigatoka negra e mal do Panamá), virais (doença de topo em leque da bananeira, estria da bananeira e mosaico-das-brácteas) e nemátodos (Tripathi *et al.*, 2004).

Todas variedades comerciais conhecidas são altamente susceptíveis a infecções fúngicas, virais e bacterianas, bem como ataque de pragas e nemátodos (Jones, 2000). A Banana bunchy top disease (BBTD) é causada pelo *Banana bunchy Top Vírus* (BBTV) e é considerada uma das mais devastadoras doenças da bananeira (Hapsari, 2023).

O vírus do topo em leque da bananeira (*Banana bunchy top virus*, BBTV), pertencente ao género *Babuvirus*, da família Nanoviridae, é considerado uma das doenças mais graves da cultura da banana e, uma vez estabelecida, é extremamente difícil de ser erradicada ou controlada (Batista *et al.*, 2002; Thomas (2015) Citados por Embrapa, 2017).

O BBTV pode ser transmitido por meio de material propagativo infectado, reprodutivos e pelo afídeo da bananeira (*Pentalonia nigronervosa* Coquerel), o qual transmite o vírus de forma persistente circulativa e não propagativa (Meissner *et al.*, 2000).

A principal medida de controlo é evitar a introdução desta virose em regiões onde ela ainda não ocorre. Nas áreas onde o vírus já está presente, recomenda-se o plantio de mudas saudáveis, a erradicação das plantas infectadas e o controle químico do vector (Nomura, 2020).

1.2. Problema de estudo e justificação

Nas últimas duas décadas, a doença do topo em leque da bananeira se espalhou por 16 Países da África Subsaariana e em 2007 foi relatado pelo governo da vila de Ulongwe no distrito de Angónia, província de Tete, Oeste de Moçambique, que foi imediatamente erradicada (Gondwe *et al.*, 2007).

Passados 9 anos, em Junho de 2016, o MASA actualmente MADER reportou a ocorrência da mesma na farma da Empresa *African Food Company*, localizada no distrito de Guijá, Província de Gaza, que até o momento do anúncio a empresa já tinha eliminado cerca de 750 plantas suspeitas de estarem infectadas pela doença, correspondendo 0,6 hectare equivalente a 0,2% dos 309 hectares da área total em produção (IPPC, 2016).

Com a rápida evolução da doença, em 2019 foi reportada novos surtos na Província de Maputo precisamente no distrito de Manhiça, na Ilha Josina Machel (Rufasse, 2019).

O MADER, juntamente com os Parceiros e o Governo local, trabalharam na sensibilização dos produtores, sobre os efeitos e impacto da doença, de modo a contribuir na implementação das medidas de contenção, produção e distribuição de panfletos e cartazes, treinamento de técnicos e extencionista, trabalhadores da empresa afectada e produtores do Sector familiar na identificação e manejo da doença (MASA, 2016)

Para enfrentar esse desafio, a Associação de Produtores de Banana de Moçambique, em parceria com o Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural (MADER) e a TechnoServe, implementou um programa abrangente de erradicação do BBTV. Este programa incluía a identificação, abate, remoção e queima de plantas sintomáticas, seguida pela replantação com mudas saudáveis (TechnoServe, 2017). Mesmo diante das medidas implementadas pelo governo e parceiros com perspectivas de contenção para impedir a sua dispersão, a doença tem progredindo de forma rápida causando grandes perdas de áreas. Uma estratégia de manejo eficaz depende da detecção precoce de plantas infectadas, de modo que as plantas potenciais fontes de BBTV possam ser destruídas imediatamente.

Vários Países implementaram medidas estratégicas de monitoramento rigoroso, uma delas é a preocupação com plantas encontradas crescendo perto das plantações de banana que possam ser potenciais hospedeiros alternativos do vector ou vírus (Perez, 2024). Nos últimos anos foram realizados muito poucas pesquisas nacionais para detecção do BBTV nas áreas de produção da banana (Barros *et al.*, 2024). Portanto dos estudos feitos, poucos relatam ou abordam sobre as plantas ou infestantes ao redor da cultura, podendo estes serem potenciais hospedeiros do vírus, é neste contexto que foi realizado o presente trabalho com objectivo de identificar potenciais hospedeiros altaernativos do virus, de forma a servir como base de informação e auxilio nas estratégias de manejo e erradicação da doença.

1.3.Objectivos

1.3.1. Objectivo geral

- Investigar potenciais hospedeiros alternativos do vírus de BBTV nos distritos de Manhiça e Chókwè.

1.3.2. Objectivos específicos

- Identificar as espécies dos potenciais hospedeiros alternativos do vírus de BBTV nos campos de produção de banana nos distritos de Manhiça e Chókwè;
- Rastrear molecularmente potenciais hospedeiros alternativos do vírus do topo em leque da bananeira (BBTV);
- Caracterizar fenéticamente as sequencias dos amplicons obtidos nos hospedeiros alternativos.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da cultura da banana

A bananeira é uma planta monocotiledónea típica das regiões tropicais e subtropicais de baixa e média altitude (Tomekpe & Fondi, 2008). É um vegetal herbáceo completo, pois apresenta raiz, caule, folhas, flores, frutos e sementes. Apresenta caule subterrâneo, denominado de rizoma, de onde são emitidas as raízes primárias e as brotações laterais (filhos ou “rebentos”), que darão origem as novas plantas de bananeiras e a continuidade da produção (Nomura,2020).

A origem da bananeira remota a tempos, actualmente admite-se que seja originária do Sul da China ou indochina (Fornasier, 1998). Em estudos sobre a evolução das bananeiras comestíveis, considera-se que o homem utilizava desde a sua existência e domesticação, as bananas comestíveis são cultivares de espécies *Musa acuminata* (AA) e *Musa balbisiana* (BB), nas suas formas di, tri e tetraplóides e os seus híbridos obtidos entre elas, a maioria das bananeiras com frutos comestíveis são triploide, embora haja algumas variedades diplóides e ainda menos variedades tetraplóides (Embrapa, 2006).

2.2. Propagação da bananeira

A bananeira propaga-se por semente e por muda, sendo mais usual e eficiente a propagação por muda, geralmente usa-se a propagação por semente ou sexuada para programas de melhoramento (Borges *et al.*, 2004).

O método de multiplicação mais usado é a propagação vegetativa à partir de rebentos provenientes de gemas axilares localizadas no rizoma, desta garantindo uma sucessão de plantas novas, cada uma delas proveniente da brotação de uma gema do rizoma (Hartmann & Kester, 1971).

As bananas comerciais não têm reprodução sexuada por serem estéreis, por essa razão, a reprodução é vegetativa através da separação dos rebentos da planta mãe (Soto, 1992). Com a presença constante de problemas relativos a doenças, consequência da propagação vegetativa, que facilita a disseminação de certos patógenos, estimulou o interesse no aperfeiçoamento dos métodos de propagação e no desenvolvimento de novas técnicas capazes de fornecer material de plantio em tempo hábil e em grandes quantidades, como é o caso de propagação *in vitro* (Lameira *et al.*, 1990).

2.3. Importância e uso da banana

A banana é classificada como uma das principais fruteiras mundiais, apresentando-se como um dos componentes básicos na alimentação de milhões de pessoas, o valor calórico, energético, vitamínico e mineral desta fruta é bastante elevado (Bianchi, 2011).

A banana é uma das frutas amplamente cultivadas e consumidas devido ao seu aroma e sabor distinto em todas as partes do mundo, além de ser uma fonte barata de carboidrato e rica em vitaminas (A e C), minerais (potássio, cálcio e ferro), antioxidantes e micronutrientes (Tabela 1) (Penachioni, 2005).

É considerado um alimento básico da população e/ou principal fonte econômica para muitos países. Pode ser consumida *in natura* ou na indústria para obtenção de farinha de banana, cremes, puré, chips, geleia, vinagre, vinho e cerveja (Perucha, 2005).

Tabela 1: Valor nutritivo de diferentes tipos de banana

Elementos	Banana Nanica (%)	Banana Maçã (%)	Banana Prata (%)
Água	74,12	72,84	73,79
Amido	2,95	2,73	2,91
Glicose	2,91	15,63	15,04
Celulose	0,32	0,70	0,21
Cálcio	0,306	0,509	0,107
Magnésio	1,314	1,212	1,720
Potássio	39,68	42,92	41,31
Sódio	1,64	1,21	1,72
Fósforo	8,20	7,43	7,43
Ferro	0,017	0,031	0,008
Vitamina B1	0,40	0,43	0,42
Vitamina B2	0,82	0,83	0,81
Vitamina C	0,150	0,141	0,141

Fonte: NOMURA,2020.

2.4. Produção da banana

2.4.1. Produção mundial

Com base nos dados da plataforma da Atlas Big (Tabela 2), a Índia é o maior produtor de banana do mundo, com uma produção de 33.062.000 toneladas por ano, República Popular da China vem em segundo lugar com produção anual de 12.061.344 toneladas, com 8.741.146,7 toneladas de produção por ano, Indonésia é o terceiro maior produtor de banana, em quarto o Brasil, com 6.811.374 toneladas de produção por ano.

Tabela 2: Principais Países Produtores de Banana em 2023

País	Produção (ton)	Área Cultivada (ha)
Índia	33 062 000	924 000
República Popular da China	12 061 344	360 083
Indonésia	8 741 146,7	145 401
Brasil	6 811 374	453 273
Equador	6 684 916,17	164 085
Filipinas	5 942 214,98	186 460
Angola	4 345 799	169 971

Fonte: Atlasbig, (2023);

2.4.2. Produção da banana em Moçambique

Acredita-se que a banana já era produzida bem antes da chegada dos portugueses, porém, com a chegada dos portugueses houve melhoria na produção que levou a primeira exportação em 1921 (FAO, 2000 citado por Nhantumbo, 2014).

Nos últimos 10 anos, as Províncias de Manica, Nampula, Gaza e Maputo são as principais produtoras da banana (MADER,2020). O País apresentou um aumento significativo das áreas de produção de 32000ha (2008) para 77395ha (2018) em resposta a crescente demanda pela fruta e seus derivados (FAO, 2019).

Actualmente Moçambique tem uma capacidade de produção de 797 628,25 toneladas numa área cultivada de 94684 hectares, com um rendimento de 8424,1kg/há equivalente a 27,64kg de produção por pessoa, ocupando a 13ª posição a nível de África (Atlasbig.com).

2.5. Factores abióticos e bióticos que afectam a cultura de banana

Apesar da vasta diversidade fenológica e genética das bananeiras, existe uma série de factores que podem afectar na qualidade e quantidade do produto (Victor Costa, 2014; Jebakumar *et al.*, 2018). Dentre estes factores têm os que derivam do meio ambiente denominados factores abióticos, os efeitos causados por seres vivos como fungos, bactérias, vírus, nemátodos, insectos, infestantes e o homem são factores bióticos (Jones, 2000).

Embora o cultivo da bananeira seja em diversas condições climáticas, a instalação dos campos deve ter em consideração aspectos como o tipo de solo, o fornecimento de água, a luminosidade e o calor (Cordeiro, 200). Os problemas fitossanitários desenvolvem-se a partir da interacção entre três elementos principais: o ambiente, que inclui condições climáticas como humidade e temperatura; o hospedeiro, que neste caso é a bananeira; e a acção de vectores de doenças, como insectos ou o próprio homem (Cordeiro, 200).

2.5.1. Infestantes na cultura de banana

A cultura da banana é muito sensível à interferência imposta pelas infestantes em virtude da competição pelos elementos essenciais de desenvolvimento, como água, luz, nutrientes e alelopatia, além do facto de serem hospedeiras intermediárias de importantes pragas e doenças da cultura da banana (Cordeiro, 2000).

Segundo Chiconela *et al.* (1999), para além dos efeitos maléficos, as infestantes possuem alguns benefícios para o homem como fonte de alimentos e forragem para os animais, revestimento do solo, abrigo de inimigos naturais, fontes de matéria orgânica e nutrientes na reciclagem, como abrigo na sua rizosfera, para microrganismos benéficos, manutenção da qualidade da água, fonte de pesticidas botânicos, efeito aromáticos e medicinal.

Existem diversas infestantes que se desenvolvem em campos de produção de banana, portanto, é pertinente o reconhecimento prévio das predominantes para melhor escolha e combinação dos métodos de controlo mais eficientes (Carvalho, 2000). As principais infestantes com mais destaque são: *Commelina benghalensis*, *Cyperus sp*, *Brachiaria plantaginea*, *Sida rhombifolia*, *Talinum paniculatum*, *Oxalis*, *Leonorus sibiricus*, *Sonchus oleracea*, *Digitaria horizontalis*, dentre outras (Alves, 2005).

Conhecendo o efeito das infestantes sobre a cultura melhor será a adoção de métodos mais racionais dessa vegetação espontânea, pela contribuição para melhoria das medidas de Maneio integrado de pragas e doenças (MIP/MID) e reciclagem de nutrientes (Carvalho, 2006).

2.5.2. Pragas e doenças da cultura da bananeira

A cultura da bananeira é atacada por uma série de pragas (Tabela 3) que reduzem drasticamente a sua produtividade e rendimento, portanto, de um modo geral, o bananal constitui-se num agro-ecossistema cuja estabilidade propicia a actuação de inimigos naturais e favorece a aplicação de técnicas de controlo biológico, contribuindo para redução populacional de pragas e das perdas por elas provocadas (Borges *et al.*, 2004).

Tabela 3: Principais pragas da cultura de banana

Nome Comum	Nome Científico da praga
Broca do rizoma	<i>Cosmopolites sordidus</i>
Pulgões	<i>Pentalonia nigronervosa</i> Coq, <i>Aphis gossypii</i> glover, <i>Myzus persicae</i>
Tripes	<i>Frankliniella</i> spp, <i>Thrips</i> spp, <i>Caliothrips bicinctus</i> Bagnall, <i>Tryphactothrips lineatus</i> Hood, <i>Hercinothrips sppmm</i>
Traça da bananeira	<i>Opogona sacchari</i>
Lagartas desfolhadoras	<i>Caligo</i> spp, <i>Opsiphanes</i> spp, <i>Antichloris</i> spp

Fonte: Borges *et al.*, 2004

Entre as principais doenças que afectam a cultura da banana (Tabela 4) estão a Sigatoka-negra, a Sigatoka-amarela, o Mal-do-panamá, o Moko, as viroses topo-em-leque, o mosaico-do-pepino e o mosaico-das-estrias (Florentino, 2020). A doença Sigatoka-negra é uma das mais grave actualmente, que pode provocar perdas de 100% na produção de variedades susceptíveis, desde que foi descoberta em 1963, nas ilhas de Fiji, o primeiro relato da doença em África ocorreu no Gabão, em 1978 (Lima, 2010). Embora a Sigatoka-negra (Tabela 4) não mate a planta imediatamente, as perdas na colheita aumentam gradualmente com a idade das plantações, esta doença destrói as folhas da bananeira, o que leva a uma redução no rendimento e ao amadurecimento prematuro dos frutos (Jones, 2000).

Tabela 4: Principais doenças da cultura de banana

Nome Comum da doença	Nome do Agente Patogénico
Sigatoka amarela	<i>Mycosphaerella musicola</i> = <i>Pseudocercospora musae</i>
Sigatoka negra	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> = <i>Paracercospora fijiensis</i>
Mal do Panamá	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>
Moko	<i>Ralstonia solanacearum</i> , raça 2
Podridão mole	<i>Erwinia</i> spp
Nemátodos cavernícola	<i>Radopholus similis</i> , raça bananeira
Nemátodos das galhas	<i>Meloidogyne</i> spp
Topo em leque	<i>Banana bunchy top virus</i> (BBTV)
Mosaico das brácteas	<i>Banana bract mosaic virus</i> (BBrMV)
Mosaico do pepino	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)
Estrias da bananeira	<i>Banana streak virus</i> (BSV)

Fonte: Borges *et al.*, 2004

Outra doença muito importante da bananeira é a murcha de Fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Tabela 4), também conhecida como Mal do Panamá, acredita-se que seja uma das doenças de plantas mais catastróficas, tendo quase paralisado a indústria da banana na América Central (Nozaki, 2003). Da mesma forma, o *Banana bunchy top virus* (BBTV) infligiu efeitos devastadores na indústria da banana australiana no início do século XX (Borges *et al.*, 2004).

2.6. *Banana Bunchy Top Virus*

2.6.1. Origem e Distribuição no Mundo

A doença de BBTV foi relatada pela primeira vez nas Ilhas Fiji no final da década de 1880 e já foram relatados em várias regiões produtoras de banana do mundo, incluindo África, Austrália, Ásia e nas ilhas do Pacífico Sul (Magee, 1927). Na Austrália a disseminação da BBTV ocorreu rapidamente, sendo que em alguns distritos todas as plantações estavam infectadas com 5-90% de ocorrência, consequentemente a área total de produção teve um decréscimo de 90% (Batista *et al.*, 2002). No Paquistão ocorreu uma epidemia severa, tendo decrescido a produção em 55% no período de um ano (Khalid, 1993), segundo o mesmo autor BBTV ocorre no Havai mas não no continente americano.

Em África, o vírus foi relatado por vários países nomeadamente: Angola, Benin, Burundi, Camarões, República Centro-africana, Congo, República Democrática do Congo, Egito, Guiné Equatorial, Eritrea, Gabão, Malawi, Moçambique, Nigéria, Ruanda, África do Sul e Zâmbia (Meissner Filho *et al.*, 2019). Segundo a EPPO (2024) já são 20 países que confirmaram a ocorrência, portanto de 2019 para Janeiro de 2024 teve nomeadamente Tazania, Tongo e Uganda.

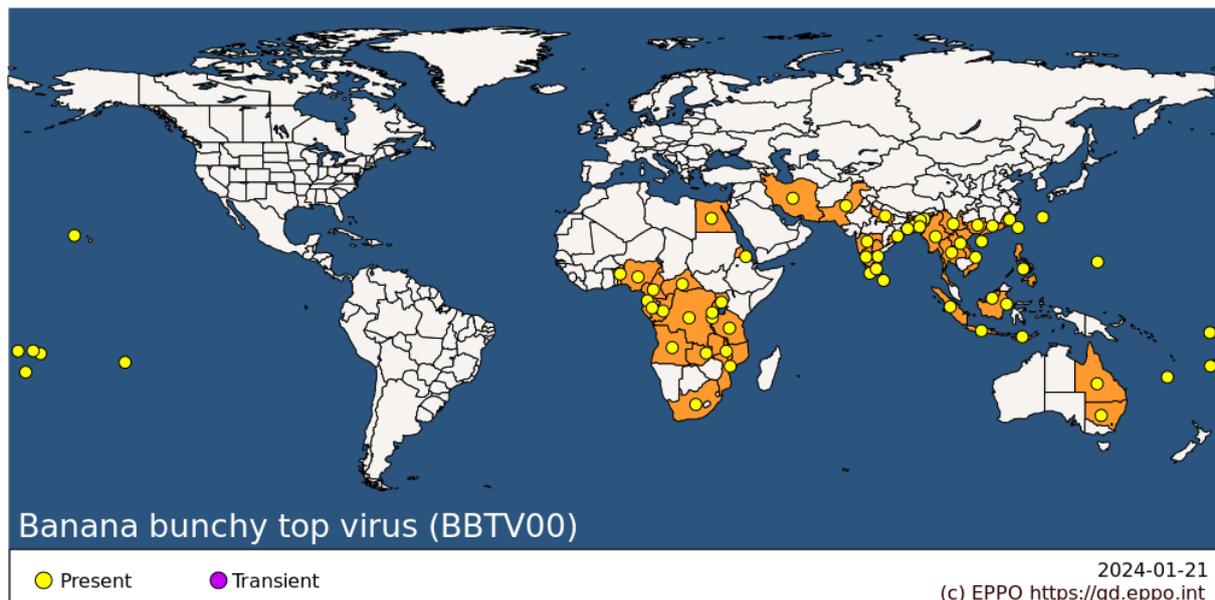


Figura 1: Distribuição mundial do vírus do topo em leque da bananeira (Banana bunchy top virus, BBTV).

Fonte: <https://gd.eppo.int/taxon/BBTV00/distribution>

Em Moçambique, foi reportado a ocorrência de BBTV pela primeira vez na Vila de Ulongwe no distrito de Angônia, província de Tete, oeste de Moçambique, que foi imediatamente erradicada (Gondwe, 2007). Passados 9 anos, em Junho de 2016, (MASA, 2016) actualmente MADER reporta a segunda infecção na farma da Empresa *African Food Company*, localizada no distrito de Guijá, Província de Gaza. Mesmo diante das medidas implementadas pelo governo e parceiros com perspectivas de contenção para impedir a sua dispersão, em 2019 foi reportado a ocorrência em campos de pequenos agricultores na Ilha Josina Machel (Ruface, 2019).

2.6.2. Etiologia da doença

O agente causal da doença de topo em leque da bananeira é a *Banana bunchy top virus* (BBTV), pertencente à família *Nanoviridae*, gênero *Babuvirus*, possui partículas isométricas, medindo de 17 a 20 nm de diâmetro (Meissner Filho *et al*, 2019). Seu genoma é segmentado, composto por seis segmentos de ADN fita simples (ssDNA) circular, de 1.300 nucleotídeos cada de comprimento são nomeados DNA-R, -U3, -S, -M, -C e -N, respectivamente, de acordo com suas supostas funções (Thomas, 2019).

2.6.3. Sintomas da doença

Segundo Magee (1927) o primeiro sintoma da doença é o aparecimento de listras verde-escuras e as manchas são melhor visualizadas a partir da superfície inferior (abaxial). À medida que a infecção progride, os sintomas das estrias tornam-se mais evidentes na lâmina foliar, um dos sintomas característicos da doença é folhas erectas e apinhadas no ápice da planta (Figura 2-A). Cada nova folha é mais estreita e curta que a anterior, dando à planta uma aparência “agrupada” (Figueira *et al.*, 2023).

A planta infectada apresenta o aspecto de um leque fechado podendo não ocorrer a emissão do cacho ou os frutos ficarem distorcidos (Figura 2-D). As folhas tornam-se menores, apresentam clorose marginal e ficam voltadas para cima. O vírus ocasiona estrias verde-escuras nas folhas e nos pecíolos da bananeira (Figura 2-E). Também ocorre estreitamento do limbo foliar e clorose. É preciso muita atenção em locais nos quais o vírus está presente, porque algumas bananeiras infectadas podem apresentar a infecção de forma latente, ou seja, são fonte de inóculo, mas não apresentam sintomas.

Os tipos e a intensidade dos sintomas dependem do estágio em que a planta é infectada, da variedade e das condições do ambiente onde é cultivada (Hapsari & Masrum, 2012, Qazi, 2016).

A infecção pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento da cultura, quando ocorre por material propagativo (mudas) apresentam folhas muito curtas e rijas (Figura 2-C), erectas, estreitas e amontoadas no pseudocaule (Figura 2-B), plantas raquíticas e atrofiadas. Na fase do desenvolvimento da planta apresenta os mesmos sintomas e uma grande dificuldade de produzir novas folhas e não consegue formar cacho (Figura 2-D). Quando ocorre na fase reprodutiva os sintomas são similares das outras fases, os frutos formados são deformados e sem valor comercial (Nelson, 2004).



Figura 2:Sintomas da BBTV: A- Folhas atrofiadas e pouca formação de folhas novas; B- Nanismos, clorose e folhas rijas e amontoadas no pseudocaule; C- Folhas estreitas, nanismo e erectas; D- Deformação do cacho e frutos pequenos; E- Estrias verde-escuras em formato tipo “J”.

2.6.4. Transmissão do Vírus

O BBTV é disseminado durante a multiplicação vegetativa das plantas e pelo afídio vector *Pentalonia nigronervosa*, portanto, é disperso por longas distâncias através da troca de rebentos infectados e /ou através de plântulas derivadas de cultura de tecidos (TC) infectadas por vírus (Thomas, 2008).

A transmissão pelo afídio *P. nigronervosa* ocorre de forma persistente circulativa e não propagativa ou seja, uma vez que o pulgão adquire o vírus, ele é capaz de transmiti-lo durante toda sua vida, mas não é passado para a progénie do insecto, portanto, o vírus não se multiplica no insecto (Qazi, 2016). O afídio necessita de, no mínimo, quatro horas de alimentação na bananeira para adquirir o vírus de uma planta infectada. Para transmiti-lo, o insecto leva de 15 minutos a duas horas em alimentação, mas, antes, ocorre um período de latência de 20-28 horas. Na natureza, o vírus é disseminado de forma lenta pelo seu vector dentro do plantio e na região produtora. O período de incubação, tempo entre a transmissão e os primeiros sintomas, varia entre 25 e 85 dias (Hapsari & Masrum, 2012; Qazi, 2016).

Plantas espontâneas de bananeira perto dos plantios podem servir de fonte de inóculo do vírus. A BBTV não é transmitida mecanicamente ou através de ferramentas usadas para realizar práticas agrícolas (Qazi, 2016).

2.6.5. Hospedeiros do vírus de BBTV

Todas as variedades de bananeiras são susceptíveis ao BBTV, mas há variação na sua reacção e algumas apresentam infecção latente. O vírus pode infectar diferentes espécies de bananeira (*Musa acuminata*, *M. balbisiana*, *M. acuminata* x *M. balbisiana*, *M. coccinea*, *M. jackeyi*, *M. ornata*, *M. velutina*, *M. textilis*, *M. banksii*), *Heliconia* spp., *Hedychium coronarium*, *Ensete ventricosum* (bananeira de jardim), *Ensete superbum* (falsa-bananeira) (Magee, 1927). Há também relatos de hospedeiros alternativos *Alpinia zerumbet* (falso cardamomo), *Alpinia purpurata* (gengibre vermelho), *Colocasia esculenta* (taro) e *Canna indica* (cana da Índia) e *Hedychium*, portanto, o vírus de BBTV deve ser monitorado nessas plantas para evitar sua disseminação e introdução em novas áreas (dias (Hapsari & Masrum, 2012).

Estudo feito por Pinili *et al.* (2013) de transmissão cruzada e novos hospedeiros alternativos de BBTV relata que as espécies de plantas fora da família Musaceae, nomeadamente *Alpinia zerumbet* (casca de gengibre), conhecida como “gettou” em japonês, *Colocasia esculenta* (satoimo) e *Canna indica*.

Alguns artigos sugerem que a BBTV poderia ser transmitida ao pepino (*Cucumis sativus*) através de outras espécies de pulgões, a saber, *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* etc. (Rao, 1998, citado por Patel, 2010), estes relatórios sugerem que a banana pode não ser o único hospedeiro do BBTV e que o vírus pode ser transmitido através de outras espécies de pulgões.

2.6.6. Estratégias de manejo de BBTV

As infecções por vírus levam a perdas substanciais de rendimento em muitas culturas. Os efeitos adversos das infecções por vírus podem ser limitadas se medidas de controlo adequadas, como minimizar a infecção ou supressão do vírus são implementadas, portanto, medidas individuais não são muito benéficas e eventualmente se tornam ineficazes a longo prazo (Xie & Hu, 1995). Uma abordagem melhor é quando estratégias de manejo integrado de controlo de doenças são implementadas resultando em um controle mais eficaz, geralmente estratégias de controlo de doenças de plantas são desenvolvidos com base no conceito de que limitar a disseminação de patógenos resultará em menos plantas doentes, aumentando assim o rendimento das plantas (Hooks *et al.*, 2009).

O MADER, em parceria com a BANANAMOZ e com o apoio financeiro da USDA, implementou um programa abrangente para conter e erradicar a doença. Este programa inclui a identificação, abate e queima das plantas infectadas, controle do vector e estabelecimento de zonas de quarentena para impedir a propagação do material suspeito. Finalmente, o programa envolve a replantação de mudas saudáveis nas áreas afectadas, demonstrando um compromisso eficaz na gestão e mitigação dos impactos da doença (MASA, 2019).

2.6.6.1. Controlo regulatório da BBTV

Uma vez que se estabelece, a doença de topo em leque da bananeira dificilmente é erradicado, porém, pode apenas ser localizado (Qazi, 2016). Para controlar a propagação da doença, são aplicadas medidas rigorosas, incluindo legislação que regula a fonte e a movimentação de material de plantio, emissão de licenças de plantio e exigência de destruição de todas as plantas com sintomas (Hooks *et al.*, 2009).

Em Moçambique, a autoridade Fitossanitária no País (NPPO) é o Departamento de Sanidade Vegetal da DINAS/MASA e tem como missão: Garantir a defesa fitossanitária do país, através da implementação do Regulamento de Inspeção Fitossanitária e Quarentena Vegetal (Decreto nº 5/2009 de 1/6) (MADER, 2024).

2.6.6.2. Controlo cultural da BBTV

O controlo eficaz da doença do topo em leque da bananeira envolve a erradicação de plantas doentes e o uso de material de plantio testado para vírus (Qazi, 2016). Remover as plantas infectadas tem sido reconhecido como benéfico, pois pode contribuir para a recuperação do bananal quando realizado com precisão (Omondi *et al.*, 2020). No entanto, esse processo deve ser executado com extrema cautela para evitar perturbar as colónias de vectores, o que pode resultar em uma maior disseminação do patógeno (Hooks *et al.*, 2009). Portanto, uma estratégia de manejo eficaz depende da detecção precoce de plantas infectadas, de modo que as plantas potenciais fontes de BBTV possam ser destruídas imediatamente (Hooks *et al.*, 2008).

O controlo cultural deve ser implementado em toda a área de produção para evitar a rápida reinfeção do material de plantio por vírus (CABI, 2017).

Diversas práticas agrícolas são implementadas em regiões onde a BBTV ocorre, como utilização de mudas saudáveis, a remoção e destruição de plantas infectadas, portanto a destruição das plantas é eficiente para áreas pequenas, em grandes explorações o controlo cultural deve ser usado em conjuntura com outros métodos de manejo (Donato, 2021).

2.6.6.3. Controlo químico da BBTV

A utilização de insecticidas organofosforados, como o diazinon e o óleo parafínico, tem sido empregada para controlar a disseminação do pulgão da bananeira (Omondi *et al.*, 2020). No entanto, uma limitação dessa abordagem é que os insecticidas aplicados podem não alcançar os pulgões nas partes internas da planta, como a parte interna das folhas e dentro das bainhas das folhas do pseudocaule, onde os pulgões costumam se esconder. Além disso, os pesticidas podem ter efeitos adversos no aplicador e podem resultar na morte de outras espécies. É importante considerar factores como a concentração do tratamento e a idade das folhas, pois o imidaclopride, por exemplo, não é eficaz em folhas jovens (Robson *et al.*, 2007).

2.6.7. Detecção de BBTV

A BBTV pode ser detectada pela sintomatologia apresentada e em laboratório, pelo teste de ELISA, pela Reacção de Polimerase em Cadeia (PCR), por microscopia electrónica, pelo LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) e por PCR em tempo real (Meissner, 2019). A sorologia tem sido indispensável na detecção e identificação de vírus de plantas. As técnicas sorológicas usadas para detectar vírus são baseadas na reacção entre nucleoproteína ou proteína viral e seu anticorpo específico, dois métodos são comumente usado ou seja, ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) e Dot ensaio de imunoligação (Thomas, 2019). Teste ELISA é normalmente utilizado por ser rápido, barato e fácil de automatizar e embora capaz de detectar BBTV em campo, em plantas infectadas e afídio únicos, é menos sensível que PCR (Qazi, 2016). Experimentos comparativos entre métodos sorológicos e moleculares demonstraram que PCR é uma técnica superior e importante para detecção devido à suas maior sensibilidade e flexibilidade na detecção do BBTV em bananeiras infectadas (Xie & Hu, 1995)

III.METODOLOGIA

O estudo foi conduzido em dois distritos de Províncias diferentes, sendo Chókwè de Gaza e Manhiça de Maputo, estes distritos são apontados por vários estudos a ocorrência da doença de topo em leque da bananeira. O estudo focou-se principalmente nos campos de produção de banana pertencentes a agricultores familiares e empresas privadas afectadas pela doença. Nas empresas (Agre-Sul, Motombene e Matobe-Investment) e em campos do sector familiar no distrito de Chókwè, no distrito de Manhiça realizou-se apenas em campos de sector familiar, pois não existe empresas privadas envolvidas na produção de bananeira. Para identificar os campos de produção da banana, contou-se com o auxílio dos técnicos do SDAE. O levantamento foi realizado dentro dos campos que exibiam sintomas típicos da doença, como nanismo, clorose, enrolamento do limbo, clareamento das nervuras, manchas anelares e linhas necróticas.

O trabalho foi realizado em duas fases distintas:

1. Primeira Fase:

- Realizou-se trabalho de campo para identificar as possíveis plantas hospedeiras do vírus nos campos de produção de banana.
- Em seguida, essas plantas foram identificadas.

2. Segunda Fase:

- Realizou-se a extracção do ADN na Clínica Fitossanitária da Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal (FAEF);
- O PCR, visualização e purificação fez-se no Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM);
- O sequenciamento foi realizado na África do sul, Inqaba Biotec;
- Por fim fez-se as análises das sequências.

3.1. Identificação de potenciais espécies hospedeiras do BBTV

Durante o levantamento, focou-se nas plantas de bananeira que apresentavam sintomas da doença. Em seguida, colheu-se amostras das plantas ao redor, dentro de um raio de 5 metros, que apresentavam sintomas semelhantes aos da doença ou que já foram referenciadas por vários autores como hospedeiras do vírus e da *Pentalonia nigronervosa*.

Fez-se a colecta das folhas e armazenou-se em ambiente fresco (colman com gelo) para preservar o material. As plantas colhidas foram identificadas com o auxílio de dois técnicos, utilizando um manual de campo, o aplicativo PlantNet, e as plantas que não puderam ser identificadas no campo foram levadas ao laboratório para identificação posterior pelos técnicos do herbário, onde foram comparadas com exemplares já catalogados. Os procedimentos foram aplicados consistentemente em todos os campos, tanto no distrito de Chókwè quanto em Manhiça.

Para determinar a ocorrência dos potenciais hospedeiros alternativos do vírus em espécies colhidas, calculou-se os seguintes parâmetros: frequência absoluta e relativa.

Frequência absoluta (f_i) – é o valor que representa o número de observações em uma determinada classe ou em um determinado atributo de uma variável qualitativa (Triola, 2005) A soma das frequências simples é igual ao número total dos dados da distribuição.

Frequência relativa (f_r) – é o valor da razão (proporção) entre a frequência absoluta em uma determinada classe e a frequência total da distribuição. A soma das frequências relativas é igual a 1 (100%) (Triola, 2005).

$$f_r = \frac{\text{Frequencia absoluta da especie}}{\text{Total das frequencias}} \times 100\%$$

3.2. Diagnóstico molecular de potenciais espécies hospedeiras do BBTV

Após o levantamento, as amostras foram levadas para a Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal (FAEF) para realizar a extracção do ADN. No laboratório, as amostras foram submetidas a verificação do estado de conservação, atribuição de novos códigos para facilitar as análises e por fim armazenadas a 4°C, para garantir a integridade das mesmas.

3.2.1. Extracção do ADN

Para a extracção do ADN, foi usado o protocolo modificado de Doyle & Doyle (CTAB), conforme descrito no anexo 3. Inicialmente preparou-se o tampão de extracção, composto por 4g de CTAB (2%), 16.36g de NaCl (1.4M), 8ml de EDTA (PH 8.0, 20mM) e 3.15g de Tris HCl, para um volume final de 200ml, que foi posteriormente autoclavado.

Após a centrifugação para precipitar o ADN, o pellet foi cuidadosamente seco e, em seguida, diluído em um volume de 50µl. As amostras foram quantificadas no espectrofotómetro Nanodrop anexo (2 &3), seguindo todas as recomendações para evitar contaminações. Após a quantificação, as amostras foram armazenadas a -25°C para análises posteriores.

Após concluir a extracção e quantificação de todas as amostras, estas foram encaminhadas ao Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM) para proceder com as análises, especificamente o PCR e sua visualização.

3.2.2. Detecção do BBTV por PCR

Após a chegada das amostras no CB, estas foram armazenadas a -20°C e foi realizado o preparo dos primers e outros reagentes necessários para o diagnóstico. Em seguida, dedicou-se esforços para otimizar o protocolo, utilizando amostras positivas como referência. Com o protocolo otimizado estabelecido, procedeu-se ao processamento de todas as amostras.

O processamento das amostras foi feito de forma faseada, isto é, subdividindo o número das amostras para garantir melhor manuseio das amostras de forma consistente e eficiente, evitando erros de pipetagem, contaminações entre outros factores associados ao trabalhar com maior número de amostras.

As amostras de Chókwè, foram um total de 61 amostras, devido a deficiência na conservação e flexibilidade na extracção o número reduziu para 48 amostras, essa redução deve-se a

oxidação que ocorreu em algumas amostras pelos factores acima mencionados. Destas foram subdivididas em dois grupos conforme foi mencionado acima os motivos, o primeiro com 24 amostras, e o segundo com as restantes.

A detecção do BBTV foi conduzida por meio da reacção em cadeia de polimerase (PCR), utilizando o termociclador Bio-Rad (T100 PCR Thermal Cycler). Foi usado um par de primers específicos da desenhados na região do genoma do vírus de BBTV, destinados a amplificar o gene da proteína de revestimento em DNA-R (Tabela 5), projectados para gerar um fragmento amplificado de 349pb. A selecção desses primers baseou-se em estudos prévios que atestam sua eficácia na detecção do vírus (Lestari & Hidayat, 2020).

O PCR foi realizado em um volume final de 15µl contendo 7.5µl Master Mix (H. Fidelity kit), 0.3µl de 10 µM de cada Primer, 0.45ul de DMSO, 2µl de ADN e água de PCR para perfazer o volume final. O protocolo foi o seguinte: Desnaturação inicial a 95 ° C por 5 minutos, 39 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 3 minutos, emparelhamento a 64° C por 30 segundos e extensão a 72 ° C por 1 minuto, e extensão final por 10 minutos a 72 ° C, reduzir a temperatura a 4 ° C por 5 minutos, para over night 12° C.

Tabela 5: Sequência dos primers utilizados na realização da PCR

Target DNA	Primer	Sequence (5' → 3')	Amplicon size
DNA-R	BBT1	CTCGTCATGTGCAAGGTTATGTCG	349 bp
	BBT2	GAAGTTCTCCAGCTATTCATCGCC	

Fonte: Lestari & Hidayat, 2020

3.2.3. Visualização e Análise do produto de PCR

Para a visualização e análise do produto de PCR, realizou-se electroforese em gel de agarose a 1,5% (figura 3b) em tampão Tris-acetato EDTA (TAE-1X). O gel foi pré-corado com brometo de etídio e submetido a uma corrida eletroforética por 45 minutos a 80 volts e 2 amperes (figura 3a). Durante a corrida, um marcador de peso molecular de 1 kb foi utilizado como referência. Após a corrida, as bandas foram visualizadas utilizando um transiluminador (modelo UVT-20SML, Spectroline, Westbury, NY, EUA) (figura 3c) que emite luz ultravioleta, garantindo a visualização das bandas. Por fim, foram tiradas fotografias para documentação.

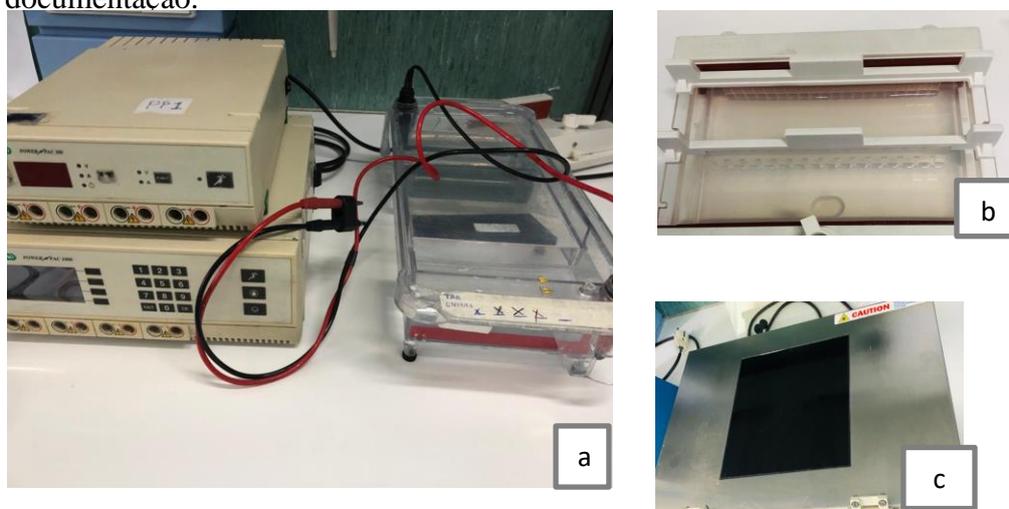


Figura 3: Material usado na visualização do produto de PCR

3.3. Catacterização fenetica das sequências dos amplicons obtidos nos potenciais hospedeiros alternativos

Após a visualização de amostras positivas foi efectuado o corte e purificação das bandas, de seguida enviadas ao Laboratório na vizinha República África do Sul para o sequenciamento das amostras, tendo o resultado foi realizado o *Blast search* com objectivo de identificar e caracterizar a sequência genética obtida, determinando sua similaridade com sequências conhecidas em bancos de dados da *National Center for Biotechnology and information* (NCBI).

3.4. Análise dos dados

As análises gráficas das frequências absolutas e relativas foram feitas com auxílio do pacote estatístico Excel 2013. Para a identificação das espécies de plantas foi usado aplicativo PlantNet e com o auxílio de um manual de campo.

Foi usado o *software* Chromas v.2.6.6 para visualizar as sequências e exporta-las em formato (fasta) para posterior uso no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação de potenciais espécies hospedeiras do BBTV

No levantamento das espécies, foram identificadas um total de 103 plantas em 50 espécies diferentes (Tabela 6), distribuídas em 22 famílias diferentes conforme apresentado abaixo.

Tabela 6: Distribuição das espécies por família

Famílias	Espécies	Nr de espécies
Asteraceae	<i>Sonchus oleraceus, Gnaphalium luteo-album, Bidens pilosa, Eclipta alba, Ageratum conyzoides, Parthenium hysterophorus, Senecio sp, Senecio proprior, Senecio madagascariensis, Nidorella resedifolia, Gnaphalium pensylvanicum, Sphaeranthus indicus, Conyza canadenses, Vernonia sp.</i>	14
Fabaceae	<i>Rhynchosia minima, Vigna sp, Vigna vexillata, Dichrostachys cinérea</i>	4
Malvaceae	<i>Abutilon angulatum, Corchorus aestuans L, Sida rhombifolia</i>	3
Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis, Aneilema sp, Commelina difusa</i>	3
Solanaceae	<i>Solanum nigrum, Capsicum sp</i>	2
Acanthaceae	<i>Justicia flava, Disperma crenatum</i>	2
Poaceae	<i>Imperata cylindrica, Panicum maximum</i>	2
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus, Chenepodium sp</i>	2
Euphorbiaceae	<i>Acalypha indica, Acalypha segetalis</i>	2
Menispermaceae	<i>Cissampelos sp, Cissampelos hirta</i>	2
Cucurbitaceae	<i>Corallocarpus sp, Cucumis sp.</i>	2
Lamiaceae	<i>Leonotis sp, Ocimum sp</i>	2
Araceae	<i>Colocasia esculenta</i>	1
Apiaceae	<i>Centella asiática</i>	1
Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus niruri</i>	1
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i>	1
Oxalidaceae	<i>Oxalis semiloba</i>	1
Musaceae	<i>Musa alba</i>	1
Zygophyllaceae	<i>Tribulus terrestres</i>	1
Rutaceae	<i>Citrus sp</i>	1
Lophiocarpaceae	<i>Corbichonia decumbens</i>	1
Sapindaceae	<i>Cardiospermum halicacabum</i>	1

A família Asteraceae é a mais representada, com 14 espécies, seguida das famílias Fabaceae com 4 espécies, Malvaceae e Commelinaceae com 3 espécies, respectivamente. As restantes famílias com 1 a 2 espécies.

Estudo realizado por Chaúque (2007), no estudo da biodiversidade do distrito de Chókwe, identifica espécies da família Fabaceae como a que mais apresentou o número de espécies, seguida das Poaceae.

Os resultados obtidos corroboram com Lima, *et al.* (2012) no seu estudo da distribuição fitossociológica da comunidade de plantas espontâneas na cultura da banana em Paraíba, onde a família que mais se destacou foi a Asteraceae com cinco espécies, perfazendo um total de 23,80% do número total de espécies amostradas, seguida das famílias Amaranthaceae, Commelinaceae, Fabaceae, Poaceae, Rubiaceae, com dois representantes correspondendo a 9,52% cada, da soma total de indivíduos colectados. As demais famílias apresentaram apenas uma espécie, representando 4,76% das plantas colectadas. Essa congruência nos resultados sugere uma consistência na composição das comunidades de plantas espontâneas em campos de produção de banana.

Do levantamento realizado, foram identificadas 52 espécies diferentes presentes nos campos de produção da banana nos dois distritos. Alves (2005) descreve algumas das espécies mais comuns encontradas nesses campos. Destacam-se, entre elas, a *Commelina difusa*, *Cyperus sp.*, *Brachiaria plantaginea*, *Sida rhombifolia*, *Talinum paniculatum*, *Oxalis* e *Leonorus sibiricus*. Essas espécies foram frequentemente observadas coexistindo com as plantações de banana, impactando o ambiente e a dinâmica dos sistemas agrícolas nas áreas estudadas.

Não obstante, do estudo realizado em Ribeirão Preto-SP Brasil por Kuva *et al.* (2007) durante o estudo da fitossociologia de comunidades de plantas daninhas em agroecossistema na banana descreve: *Cyperus rotundus*, *Cynodon dactylon*, *pomoa hederifolia*, *I. quamoclit*; *I. nil*; *I. grandifolia*; *I. purpurea*; *Merremia cissoides*, *Amaranthus spp*; *Chamaesyce hisiopifolia*; *Croton glandulosus*; *Bidens pilosa*; *Solanum americanum*; *Emilia sonchifolia*; *Tridax procumbens*; *Sida spp.*; *Conyza bonariensis*; *Physalis angulata*; *Commelina benghalensis*; *Euphorbia heterophylla*; *Phylanthus tenellus*; *Cleome affinis*; *Parthenium hysterophorus* *Brachiaria decumbens*; *Brachiaria plantaginea*; *Eleusine indica*; *Panicum maximum*; *Digitaria spp*; *Digitaria insularis*; *Cenchrus echinatus*, *Vernonia polyanthes*; *Cissampelos glaberrima*; *Pyrostegia venusta*; *Talinum paniculatum*; *Mikania cordifolia*;

como as principais espécies dominantes, que são as que originam a maior parte da interferência pelos recursos nomeadamente água, luz nutrientes, espaço e efeitos alopatóicos.

Estudo conduzido por Timberleke *et al.* (1986) sobre levantamento de pastagens e solos de Chókwè, apresentou as seguintes espécies: *Urochloa mosambicensis*, *Panicum maximum*, *Cynodon dactylon*, *Digitaria eriantha*, *Rhynchelytrum repens*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Themeda triandra*, e *Cyperus spp*, como as principais espécies herbáceas que ocorre nas principais unidades de vegetação correspondendo satisfatoriamente aos principais tipos de solos. Especificamente bosque aberto ribeirinho, savana/bosque de folhas largas em areia, savana ou bosque de acácia e pastagem aberta. Podemos associar a factores como ecossistema, tamanho da área de estudo e a diferença temporal entre os estudos como os factores que influenciaram na diferença nos resultados obtidos, pois o presente estudo foi realizado em ecossistema de bananeiras apenas, a área de estudo foram inventariado campos de produção e o ultimo factor tem a ver com os anos que as pesquisas foram realizadas podendo ter ocorrido uma mudança na composição da vegetação.

4.1.1. Frequência absoluta e relativa das espécies

Nos de Manhiça foi observado as espécies *Justicia flava* e *Ageratum conyzoides* apresentaram as maiores frequências absoluta e relativa com 11,9% e 5 respectivamente (Figura 3). Em seguida, as espécies *Sonchus oleraceus* e *Sida rhombifolia* com 7.14% e 3 (Figura 3). As especies *Colocasia esculenta*, *Aneilema sp*, *Panicum maximum*, *Bidens pilosa*, *Centella asiatica* com 4.76% e 2. Por fim, as demais espécies apresentaram uma frequência relativa de 2.38% e 1 de frequência absoluta (Figura 3).

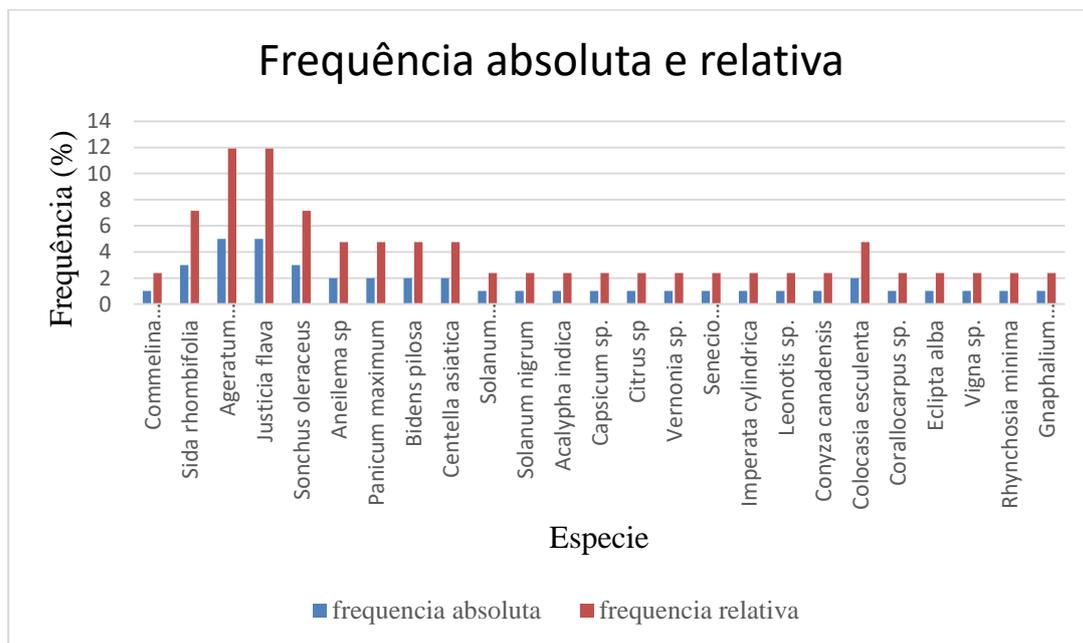


Figura 3: Frequência absoluta e relativa das espécies no distrito de Manhiça.

No distrito de Chókwe, foi observado que a espécie *Sonchus oleraceus* foi a mais prevalente, com uma frequência relativa de 16,39% e uma frequência absoluta de 10 (Figura 4). Em segundo lugar, encontramos a *Solanum nigrum*, com uma frequência relativa de 13,11% e uma frequência absoluta de 8 (Figura 4). Em seguida, a *Senecio proprior* apresentou uma frequência relativa de 4,92% e uma frequência absoluta de 3 (Figura 4), seguida pela *Senecio sp*, *Acalypha segetalis*, *Amaranthus hybridus*, *Phyllanthus niruri*, *Portulaca oleracea*, *Oxalis semiloba* e *Chenepodium sp*, todas com uma frequência relativa de 3,28% e uma frequência absoluta de 2 (Figura 4). Por fim, as demais espécies foram observadas com uma frequência relativa de 1,64% e uma frequência absoluta de 1 (Figura 4).

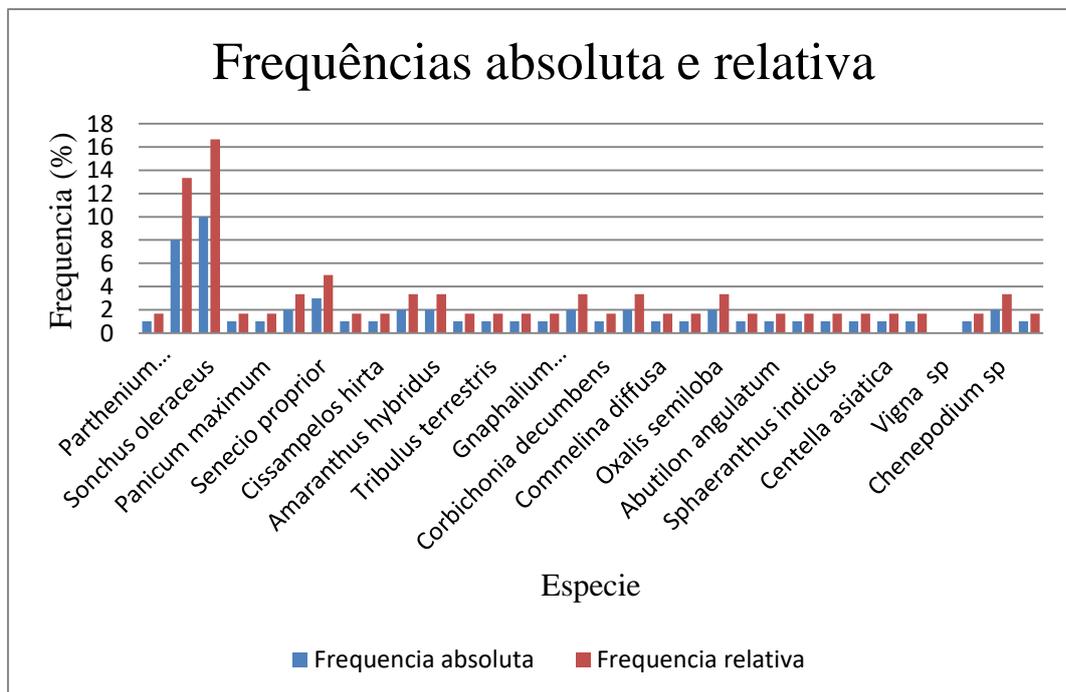


Figura 4: Frequência absoluta e relativa das espécies no distrito de Chókwe.

Dos resultados obtidos do levantamento, as espécies *Sonchus oleraceus*, *Solanum nigrum*, *Justicia flava*, *Ageratum conyzoides* foram as que apresentaram maiores frequências, estudos realizados por Lima, *et al.* (2012) as espécies com maior representatividade foram *Cyperus rotundus* L. (tiririca), seguido da *Alternanthera philoxeroides* e *Ageratum conyzoides* L, essa divergência pode advir de vários aspectos a levar em conta nomeadamente, variação de condições edafo-climáticas, época do estudo, práticas culturais, que influenciam activamente na composição vegetal dos locais.

A *Cyperus rotundus* L é uma espécie predominante em diferentes ambientes e apresenta uma multiplicação rápida, com seus tubérculos actuando como as principais unidades de dispersão ao longo do tempo, permanecendo dormentes no solo por longos períodos. A dormência dos

tubérculos causa emergência irregular, contribuindo para a persistência dos propágulos dessa espécie no solo Jakelaitis *et al.* (2003). Embora a *Cyperus rotundus* L apresente todos esses mecanicismos, não foi observado nos campos inventariados, podendo relacionar o pH do solo e a sua ocorrência, pois a a *Cyperus rotundus* L. é uma planta indicadora de solos ácidos, descoberto, mal arejado e com carência de magnésio.

Myint (1994) descreveu *Commelina sp*, como uma planta infestante herbácea, tolerante à sombra, tufada e rizomatosa, que geralmente se espalha com caules que crescem até 100 cm de altura, rastejando e enraizando nos nós. A *Commelina diffusa* proliferou como a erva daninha dominante nos campos de banana nas Ilhas de Barlavento do Caribe. Das observações a *Commelina sp* apresentou uma frequência baixa em ambos distritos, este facto, pode ser influenciado por vários factores como o uso da infestante para a alimentação do gado especialmente suíno.

As diferenças nos resultados de levantamentos das infestantes em diferentes estudos, podem ressaltar-se pelo facto de cada região e ecossistema ter a sua peculiaridade quanto às infestantes predominantes e a influência das práticas culturais que tendem a apresentar maior ocorrência Pitelli (2000), Moura *et al.* (2015). Portanto, os estudos sobre infestantes tendem a apresentar resultados diferentes dependendo do ecossistema em estudo.

4.2. Detecção do BBTV pelo método de PCR

Com o protocolo otimizado, procedeu-se com análise de todas amostras. A validação do PCR foi verificada com sucesso em todos testes, uma vez que amplificou o controlo positivo e não amplifica o negativo como forma de confirmar se houve contaminações ou não durante os testes, conforme ilustrado (figura 5). Nesta imagem pode se constatar que o resultado foi negativo, pois nenhuma amostra amplificou, em todos testes foi usado um marcador de 1kb, gel de 1.5%, a validação foi aplicada a todas amostras.

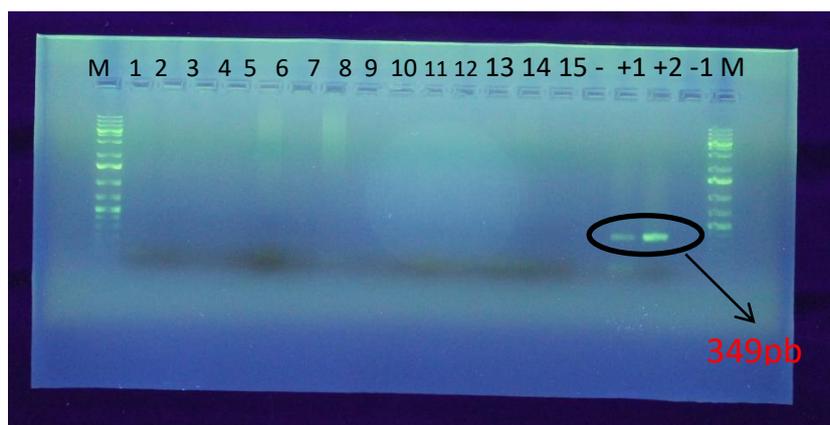


Figura 5: Resultado de PCR gel de agarose (1.5%)

Corado com brometo de etídeo em Tampão TAE mostra o produto de PCR de amostras (1-15) de sem amplificação do produto esperado. Onde 1- *Justicia flava*, 2- *Ageratum conyzoides*, 3,6- *Acalypha indica*, 4- *Sonchus oleraceus*, 5- *Sida rhombifolia*, 7, 14- *Centella asiática*, 8- *Panicum maximum*, 9- *Eclipta alba*, 10- *Gnaphalium luteo-album*, 11- *Colocasia esculenta*, 12- *Vernonia sp*, 13- *Commelina benghalensis*, +1+2- Controlos positivos, -1- Controlo negativo. M- Marcador de 1kb.

Após o rastreio de todas amostras foram observadas amplicons nas espécies *Conyza canadenses* e *Corallocarpus sp* do distrito de Manhiça e *Centella asiática* do distrito de Chókwè.

Amostras que apresentaram amplificação nos testes anteriores foram submetidas a uma nova análise por PCR (figura 6) para confirmar os resultados. Isso é necessário, uma vez que, ocasionalmente podem ocorrer falsos positivos (Oliveira *et al.*, 2005).

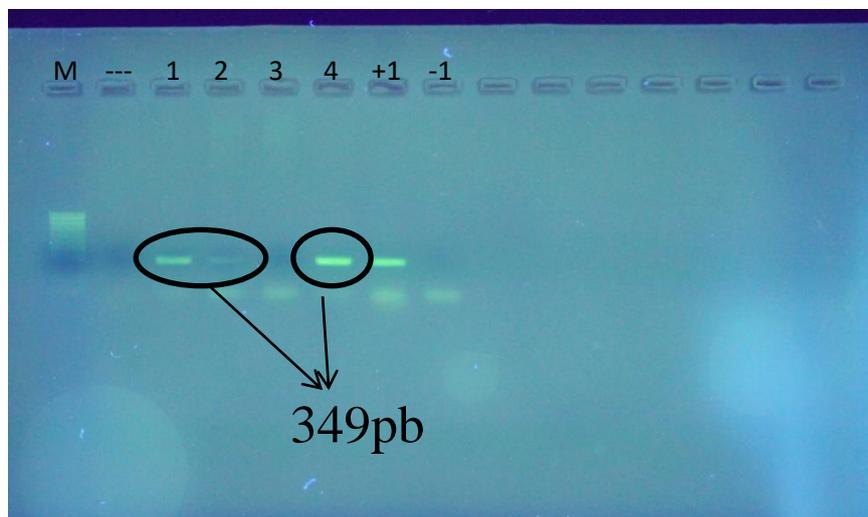


Figura 6: Resultado do PCR.

Das amostras positivas dos testes anteriores que testaram positivos. M- marcador molecular de 1kb, 1- *Conyza canadenses*, 2,3- *Corallocarpus sp*, 4- *Centella asiática*, +1- Controlo Positivo, -1- Controlo negativo.

O estudo identificou três espécies de infestantes como hospedeiros do *Banana bunchy top virus* (BBTV), *Conyza canadenses* (Asteraceae), *Corallocarpus sp* (Cucurbitaceae) e *Centella asiática* (Apiaceae) que ocorrem nos campos de produção da banana nos distritos de Manhiça e Chokwe.

A família Musaceae é bem conhecida como hospedeira do BBTV, sendo a banana uma das plantas mais afectadas. Além disso, outras famílias como Zingiberaceae, Araceae, Cannaceae e Heliconiaceae também foram relatados por Qazi, (2016) como hospedeiras do vírus.

O estudo conduzido por Guyot *et al.* (2023), que investigou a evidência de plantas dicotiledôneas como hospedeiros alternativos do *Banana Bunchy Top Virus* (BBTV) no Sudeste Asiático, oferece uma perspectiva valiosa que sustenta as descobertas de nosso estudo. Ao reconstruir o sequenciamento Illumina dos componentes do viroma de bananeiras infectadas com BBTV e suas plantas vizinhas não bananeiras, eles identificaram a presença do vírus em várias espécies de plantas dicotiledôneas. Em particular, eles encontraram evidências do BBTV e de seus alfassatélites circulares de ssDNA na monocotiledônea *Commelina sp.* (Commelinaceae) e nas dicotiledôneas *Bidens pilosa* e *Chromolaena odorata*

(ambas Asteraceae). Esta descoberta é especialmente relevante, pois confirma a presença do BBTV na família Asteraceae, embora em espécies diferentes das identificadas em nosso estudo. Portanto, a descoberta de Guyot *et al.* (2023), reforça nossa própria pesquisa, destacando a importância de entender a diversidade de hospedeiros do BBTV e seu potencial impacto na agricultura e na segurança alimentar. Estudos futuros podem se beneficiar de uma abordagem integrada que explore ainda mais a diversidade de hospedeiros do BBTV em diferentes regiões geográficas e condições ambientais.

A ausência de relatos que associem as espécies do género *Corallocarpus* como hospedeiras do vírus da BBTV, apesar de sua ampla distribuição em África, Ásia e América, destaca uma lacuna significativa no conhecimento científico. Diante dessa, nossa pesquisa se destaca ao ser pioneira em relatar a possível ocorrência do vírus em *Corallocarpus sp.*, conferindo assim uma nova perspectiva ao estudo dos hospedeiros alternativos do vírus da BBTV. Desta forma emerge a necessidade de investigar essa potencial interação, de modo a trazer um entendimento amplo no que tange a interação do vírus com o meio, fornecendo conhecimentos valiosos para o desenvolvimento de estratégias mais abrangentes e eficazes de controlo e manejo da doença.

Embora foi observado a presença de afídios nas espécies *Colocasia esculenta* e *Cissampelos hirta* durante o levantamento das espécies, não foi detectado o vírus da BBTV nos testes de PCR feitos. Isso contradiz as descobertas feitas por Hapsari & Masrum, (2012) que relata as mesmas espécies como hospedeiros alternativos dos pulgões *P.nigronevosa* e do vírus da BBTV. Boukari *et al.* (2020) defende que factores como a idade da planta, o número de pulgões usados para transmissão, o tempo de alimentação e o período de acesso à inoculação desempenham um papel na transmissão do vírus. Portanto pode-se associar a esses factores como preponderantes aos resultados obtidos no nosso estudo e pode se tratar de outras espécies de afídios pois não foram feitos testes de identificação.

4.3. Catacterização fenetica das sequências dos amplicons

As bandas amplificadas de tamanhos esperados foram cortadas, purificadas e sequenciadas usando o mesmo primer utilizado para a sua amplificação. As sequências geradas foram submetidas ao *Blast search* no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* para confirmação e comparação, conforme a Tabela 7.

Tabela 7: Resultado do Blast search das sequências das três (3) amostras que testaram positivo no PCR

Sample	Query Cover	Per. Ident	Accession
<i>Centella asiática</i> (Apiaceae)	17%	98.74%	KR815823.1
	17%	98.74%	JN204218.1
	17%	98.74%	ON934259.1
	17%	98.74%	KU687062.1
	17%	98.74%	KU687064.1
	17%	98.74%	DQ285570.1
	17%	98.74%	EF584545.1
	17%	98.74%	MW221465.1
	17%	98.74%	ON934282.1
	17%	98.74%	ON934265.1
<i>Conyza canadenses</i> (Asteraceae),	32%	96.72%	DQ656119.1
	32%	97.02%	ON934235.1
	32%	96.69%	KU687079.1
	32%	96.69%	KR815823.1
	32%	96.69%	KU687091.1
	32%	96.69%	JN243751.1
	32%	96.69%	KU687077.1
	32%	96.69%	GU085263.1
	32%	96.69%	JN204218.1
<i>Corallocarpus sp</i> (Cucurbitaceae)	22%	100.00%	JN204218.1
	22%	100.00%	KM607643.1
	22%	100.00%	KU687083.1
	22%	100,00%	KU687079.1
	22%	99,29%	KR815823.1
	22%	100,00%	KU687091.1
	22%	100,00%	KU687077.1
	22%	99,29%	KM607588.1
	22%	99,29%	KM607602.1

Os resultados mostraram um query cover baixo entre as sequências do estudo com as sequências presentes no banco de dados da *NCBI*. Isso sugere que as sequências estudadas podem conter regiões genômicas únicas ou divergentes em relação aos genomas de referência, indicando, potencialmente, a presença de variantes que ainda não foram amplamente caracterizadas. Segundo Jones *et al.* (2020), baixas correspondências em análises de *BLAST* podem estar associadas à descoberta de novas variantes virais ou de variantes menos representadas nos bancos de dados atuais.

Outro factor que pode ter contribuído para a baixa correspondência das sequências é a limitação da base de dados quanto à inclusão de espécies que não são hospedeiros principais. Conforme Simão *et al.* (2015) apontam, muitos genomas de organismos menos estudados, como plantas infestantes, ainda não estão completamente sequenciados ou incluídos nas bases de dados, o que pode resultar em baixas coberturas de consulta nas análises.

A alta variabilidade genética dos vírus de plantas, como o BBTV, pode também explicar a dificuldade em obter altas correspondências em ferramentas como o *BLAST*. Estudos como o de Fargette *et al.* (2006) indicam que a rápida evolução de fitovírus, em resposta a pressões selectivas, pode levar à emergência de variantes virais que são dificilmente detectadas pelos métodos tradicionais de comparação genômica.

Os resultados deste estudo divergem dos resultados obtidos por Barros *et al.*, (2024), que realizaram uma caracterização molecular de isolados da *Banana bunchy top vírus* no distrito de Chókwè, em Moçambique. As identidades de nucleótidos do R-DNA entre os 40 isolados analisados revelaram uma variação máxima de apenas 2% em 38 desses isolados, destacando a alta conservação genética deste gene. Este padrão de conservação foi igualmente observado em estudos realizados na Nigéria e nos Camarões, onde também se reportou uma identidade de nucleótidos de até 100% entre os isolados locais (Barros *et al.*, 2024). Estes resultados trazem uma nova perspectiva ao olhar a diferença nos resultados podendo estarem associados a diferença do hospedeiro, isto é, em hospedeiro principal a variabilidade é reduzida.

Ximba *et al.*, (2021) no estudo da distribuição, relação molecular e estudos de transmissão da BBTV na África do sul relatou que houve muito poucas as diferenças (0,4-2,3%) de sequência de aminoácidos detectadas entre os componentes da BBTV Sul-Africana em comparação com os outros isolados ao longo do grupo Pacífico-Índico (PIO), enquanto a

variação de nucleotídeos foi tão alta quanto 23,8% quando comparado ao grupo do Sudeste Asiático (SEA). A percentagem de identidade das sequências deste estudo em comparação com as sequências de Ximba *et al.*, (2021) disponível na base de dados da NBCI foi de 99,02%. Estes resultados sublinham a estabilidade significativa destes genes independentemente das variações geográficas.

V. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1. Conclusões

- ✓ Foram identificadas 50 espécies diferentes subdivididos em 22 famílias.
- ✓ O teste de PCR deu positivo para três espécies de infestantes tidos como potenciais hospedeiros do *Banana bunchy top virus* (BBTV), *Conyza canadenses* (Asteraceae), *Corallocarpus sp* (Cucurbitaceae) no distrito de Manhica e *Centella asiática* (Apiaceae) no distrito de Chokwe.
- ✓ Do sequenciamento e análise comparativa, a *Centella asiática* apresentou uma query cover de 17%, *Conyza canadense* 32% e a *Corallocarpus sp* uma query cover de 22%. Estes resultados mostram que há variabilidade entre as sequências do estudo com as sequências das outras regiões disponíveis na base de dados da NCBI.

5.2. Recomendações

- Estudos de transmissão nos potenciais hospedeiros do BBTV;
- Investigar a diversidade genética entre os isolados do BBTV que ocorrem nas áreas infectadas.

VI.Referências Bibliográficas

1. Alves, E. (2005). Plantas daninhas na cultura da banana (*Musa sp.*). In: reunião itinerante de fitossanidade do instituto biológico: cultura da banana, Vale do Ribeira.
2. Barros, S.C.I.M; Figueira, A.d.R.; Silveira, A.T.L.(2024). Molecular Characterization of Isolates of the Banana Bunchy Top Virus (BBTV) from the District of Chókwè,Mozambique. *Appl. Sci.* 14, 4291. <https://doi.org/10.3390/app14104291>
3. Borges, A.L. Souza, L.S. Trindade, A. V. (2004). O cultivo da Bananeira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura.
4. Batista, M.F. Morinho, V. A. Miller, R. (2002). Praga Quarentenaria A1 “Bunchy top” da Bananeira “Banana Bunchy top Nanavirus”. Comunicado Técnico 65. Brasília.
5. Bianchi, M. (2011). Banana verde – propriedades e benefícios. Http://www.valemaisalimentos.com.br/material/bananaverdepropriedades_e_beneficios.pdf.
6. Boukari W, Wei C, Tang L, Hincapie M, Naranjo M, Gregg Nuessly, Julien Beuzelin, Sushma Sood and Philippe Rott. (2020) Lack of transmission of Sugarcane yellow leaf virus in Florida from Columbus grass and sugarcane to sugarcane with aphids or mites. *PLOS ONE* 15(3): e0230066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230066>
7. Brammer, S. P. (2002). Atualizações em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa Trigo.
8. Carvalho, J.E.B. Plantas Daninhas. In: CORDEIRO, Z.J.M. (2000). Banana Fitossanidade. EMBRAPA – Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas/BA). Frutas do Brasil, n. 8, p. 83-6.
9. Carvalho, J.E.B. de; Dias, R.C. dos S.; Melo filho, J. F. De. (2006). Produção integrada x convencional – impacto sobre a qualidade do solo. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Comunicado Técnico, 118).
10. Cordeiro, Z.J.M. (2000). Cultivo da banana para o estado de Rondônia. EMBRAPACNPTIA.
11. Chiconela, T., Cugala, D., Santos, L., (1999). Proteção de plantas. Coleção Jovem Agricultor.
12. Costa, m.r.; Moura, E.F (2007). Manual de extração de DNA. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89), 2001.

13. Chaúque, Orácio Pedro. (2007). Estudo da Biodiversidade do Distrito de Chokwe. Tese de Licenciatura. Maputo.
14. Dale JL. (1987) .Banana bunchy top: an economically important tropical plant virus disease. *Advances in Virus Research*,V. 33, 301 – 325pp.
15. Donato, Sérgio Luis Rodrigues. (2021). Banana: do plantio à colheita. Belo Horizonte: EPAMIG. 22ed.
16. EPPO. EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. <https://gd.eppo.int/taxon/BBTV00/distribution> consultado em 21/01/2024.
17. EPPO. EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. PQR (Plant Quarantine data Retrieval system). Disponível em: <<http://www.eppo.org/>>. Acesso em: 10 out. de 2023.
18. EMBRAPA. (2011). Vírus quarentenários para a bananicultura brasileira: Banana bunchy top vírus (BBTV) e Banana bract mosaic virus (BBrMV), Comunicado Técnico 163, Cruz das Almas, BA, Setembro.
19. FAO. (2022).Análise do Mercado de Banana – Resultados Preliminares 2022. Roma.
20. Fioravanco J. C. (2003) Mercado Mundial da Banana: produção, comércio e participação brasileira. *Jornal de Informações Econômicas*. SP, v.33, n.10,. Outubro. Retrieved from <http://www.iea.sp.gov.br/out/publicacoes/pdf/tec2-1003.pdf>.
21. FAO. (2019) Food Outlook - Relatório bienal sobre mercados globais de alimentos - novembro de 2019. Roma. <http://www.fao.org/3/ca6911en/CA6911EN.pdf> Acesso em 26 de Novembro de 2023 às 14h
22. Figueira, A.R. Barros, S.C.I.M. Munguia, M.E.G. (2023). Viral Diseases of field and Horticultural Crops: Chapter 71- Banana bunchy top vírus (BBTV). Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil & Pedagogic University of Maputo/Mozambique, Maputo, Mozambique. 22 de Semtembero.

23. Fornasieri, J.L. (2006). Estudo da bananeira (*Musa sp*) oriunda de cultura de tecido e rizoma cv “Nanicao” e cv “Grande Naine”. Piracicaba. 1998. A cultura da banana / Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. – 3. ed. rev. e amp. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica.
24. Fargette, D., Konate, G., Fauquet, C., Muller, E., Peterschmitt, M., & Thresh, J. M. (2006). Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 44:35-260. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143353>
25. Florentino, J.T. (2020). Pragas e doenças associadas à cultura da bananeira no estado da Paraíba. UFPB/CCA-AREIA.
26. Guyot, V. Sam Ly, N.S. Trieu, T.D. Zhang, T. (2023). Iskra Caruana, M. L. BforBB Consortium; Pooggin, M.M. Evidence for Dicot Plants as Alternative Hosts of Banana Bunchy Top Virus and Its Alphasatellites in South-East Asia. *Pathogens*, 12, 1289. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111289>
27. Gomes, G.L.G.C.; Ibrahim, F.N.; Macedo, G.L.; Nobrega, L.P.; Alves, E. (2010). Cadastramento fitossociológico de plantas daninhas bananicultura. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 28.
28. Quecine, M. C. (2015). Extração de ácidos nucleicos e replicação do ADN. Departamento de Genética 3ª Edição brasileira. Artmed, Porto Alegre.
29. Gondwe, WT, Mwenabanda, BML, Natha, E., Mutale, P., (2007). Doença da banana em cachos em Moçambique e na Zâmbia. *InfoMuse* **16**, 38-39.
30. Hartmann, T.H.; Kester, H.T. (1971). Propagacion de plantas. Mexico: Continental, 810p.
31. Hapsari, L. Masrum, A. (2012). Preliminary screening resistance of *Musa* germplasms for banana bunchy top disease in Purwodadi Botanic Garden, Pasuruan, East Java. *Bulletin Kebun Raya*, v. 15, n. 2.
32. Atlasbig; <https://www.atlasbig.com/pt-br/paises-pela-producao-de-banana>. Acesso no dia 16/01/2024.
33. Hooks, C.R.R., Fukuda, S., Perez, E.A., Manandhar R, Wang K. (2009). Wright MG and Almeida RPP. Aphid transmission of Banana bunchy top virus to bananas after treatment with a bananacide. *Journal of Economic Entomology*.

34. IPPC (2016). Confirmação da ocorrência de Toucinho de Banana em Moçambique <https://www.ippc.int/fr/countries/mozambique/pestreports/2016/12/confirmation-of-ocorrência-de-banana-cacho-top-doença-bbtv-em-moçambique-1/>.
35. Jones, DR. (2000). Sigatoka. In: Doenças da Banana, Abaca e Enset. Pp. 79– 92.
36. Jones, R. A. C. (2020). Future scenarios for plant virus pathogens as climate change progresses. *Frontiers in Plant Science*, 11, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00157>
37. Jebakumar, RM, Balasubramanian, V. e Selvarajan, R. (2018) O título do vírus determina a eficiência de *Pentalonia nigronervosa* (Aphididae: Hemiptera) para transmitir o vírus da casca da banana. *Virus Disease*.
38. Jakelaitis, A. (2003). Effects of management systems on purple nutsedge populations (*Cyperus rotundus*). *Planta Daninha*, v. 21.
39. Khalid, S.; Soomro, M. H.(1993). *Banana bunchy top disease* in Pakistan. *Plant Pathology*, Oxford, UK, v. 42, p. 923-926.
40. Kuva, M.A., Pitelli, R.A., Salgado, T.P. e Alves, P.L.C.A. (2007). fitossociologia de comunidades de plantas daninhas em agroecossistema. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 25, n. 3, p. 501-511.
41. Lia Hapsari, Ruth Feti Rahayuniati, Siti Subandiyah. (2023). Banana Bunchy Top Virus Molecular Confirmation and DNA-S Phylogenetic of some Banana Isolates from Indonesia. *Purwodadi Botanic Garden, Indonesian Institute Of Sciences Jl.Vol. 30 N°.1, January. 53-64.*
42. Lameira, O.A.; Pinto, J.E.B.P.; Pasqual, M.(1990). Propagação in vitro da bananeira prata através da cultura de tecidos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.25.
43. Lima, Ana J. Lucas K. S. Barbosa, Raimundo T. L. da Silva, Raunira da C. Araújo. (2012). *Distribuição fitossociológica da comunidade de plantas espontâneas na bananicultura. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável.* (Mossoró – RN), v. 7, n. 4, p. 59-68, out-dez.
44. Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural (MADER). (2021). Inflorescência da bananeira, processamento e utilização. Maputo. Pdf <https://www.agricultura.gov.mz/agricultura/saude-vegetal/> acesso em Fevereiro de 2024 pelas 19:58
45. Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural (MADER). (2020). Produção actual de banana na província de Maputo. Disponível:

<https://www.agricultura.gov.mz/banana-ocupa-lugar-de-destaque-na-exportacao-de-fruta-na-provincia-de-maputo/> acesso em Dezembro de 2023 pelas 20:45.

46. Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural (MADER). (2024). Produção actual de banana na província de Maputo. Disponível: <https://www.agricultura.gov.mz/agricultura/sanidade-vegetal/> acesso em Agosto de 2024 pelas 15:27.
47. Meissner filho, P. E.; Brioso, P. S. T. Doenças causadas por vírus. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). Banana: fitossanidade. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p.78-81 (Frutas do Brasil, 8).
48. MASA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E SEGURANÇA ALIMENTAR). (2016). Informação sobre a ocorrência da nova doença da banana nos distritos de chókwe e gujá na província de Gaza. Julho
49. Magee, C. J. P. (1927). Investigation on the bunchy top disease of the banana. Melbourne: Council for Scientific and Industrial Research, 86 p.
50. Meissner filho, P.E. Andrade,E.C. Laranjeira, F.F. (2019). Subsídios para a elaboração de um plano de contingência para o Banana bunchy top virus (BBTV) / Paulo Ernesto Meissner Filho, Eduardo Chumbinho de Andrade, Francisco Ferraz Laranjeira – Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura.
51. Mullis, K.; Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods of Enzymology*, v. 55.
52. Myint, A. (1994). *Common weeds of Guyana*, National Agricultural Research Institute, ISBN.
53. Nomura, Edson Shigueaki. Cultivo da Bananeira. Campinas, CDRS, (2020). 178p. 23cm (Manual Técnico, 82).
54. Nelson, S. C. (2004). Banana bunchy top: detailed signs and symptoms. *Knowledge Creation Diffusion Utilization, UH-CTAHR Cooperative Extension Service*,.
55. Nelson, D. L.; Cox, M. M.(2004). Lehninger princípios de Bioquímica. 3a ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda.
56. Nhantumbo, N. A. (2014). Cadeia de valor de banana na zona sul de Moçambique. Trabalhos de Engenharia Agronómica.UERJ. Docsity.11p.

57. Nozaki, Denise Nakada. (2003). Variabilidade genética de *Fusarium* spp. isolados de solos e de bananeiras com sintomas do Mal-do-Panamá. 2003. 7 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas.
58. Omondi, BA, Soko, MM e Nduwimana, I. A eficácia do roguing consistente no manejo da doença do cacho da bananeira na produção de pequenos produtores na África. 2020.
59. Oliveira, CS, Regitano, LCQ, Roese, AD, Anthonisen, DG, Parma, MM, Scagliusi, SMM, Jardim SN. (2007). Fundamentos teórico prático e protocolos de extração e de amplificação de ADN por meio de reação de cadeia da polimerase. São Carlos Embrapa Pecuária Sudeste.
60. Oliveira, M. C. S.; Oliveira-Sequeira, T. C.; Araujo jr., J. P.; Amarante, A.F. T.; Oliveira, H. N. (2005). *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. Veterinary Parasitology.
61. Penachioni, A. (2005). Da Banana Verde, Tudo se Aproveita. Revista Valor Setorial - Refeições Coletivas, Nov.
62. Perucha, V.R. (2005). Propriedades Funcionais da Banana Verde. Revista Nutrição – Saúde e Performance, Anuário de Alimentos Funcionais.
63. Perez, N. A. M., Mendoza, J.-V. S., & Thomas, J. E. (2024). Alternative hosts of banana bunchy top virus (BBTV) in the Philippines and the first evidence of seed transmission of BBTV. *Frontiers in Plant Science*. Disponível em: <https://www.frontiersin.org>.
64. Pitelli, R. A. (2000). Estudos fitossociológicos em comunidades infestantes de agroecossistemas. J. Conserb, V. 1.
65. Qazi, J. (2016). Banana bunchy top vírus and the bunchy top disease. *Journal of General Plant Pathology*, v. 82.
66. Ruface, Celso. (2019). Conferência Internacional de Controlo da Banana na África. (Coordenador do projecto Banana Bunchy Top Virus). Novembro.

67. Robson, JD, Wright, MG e Almeida, RPP. (2007). Efeito do tratamento foliar com imidaclopride e da idade da folha de bananeira na sobrevivência de *Pentalonia nigronervosa* (Hemiptera, Aphididae). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*.
68. Rao, M., & Edmunds, J.E. (1980). Intercropping bananas with sweet potatoes. *Windward Islands Banana Growers Association (WINBAN) Research and Development Division Advisory Bulletin* 17.
69. Lima, Elizabethe. (2010). Diagnóstico Da Produção De Bananas, cultivadas em Sistema Convencional e Orgânico No Município De Bananeiras. Programa de Iniciação Científica e Tecnológica. Universidade Federal da Paraíba. Bananeiras.
70. Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31, 3210-3212.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>
71. Soto Ballesteros, M. Bananos. (1992). Cultivo y comercialización costa rica, 649p.
72. Shamloul, A. M.; Hadidi, A., Madkour, M. A. ; Makkouk, K. M. (1999). Sensitive detection of banana bunchy top and faba bean necrotic yellows viruses from infected leaves, in vitro tissue cultures, and viruliferous aphids using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology, Guelph*, v. 21.
73. Tripathi, L., Tripathi, J. N., Tushemereirwe W. K., (2004). Strategies for resistance to bacterial wilt disease of bananas through genetic engineering. *Afr J Biotechnol* N.3, V.12, 688-692 p.
74. Timberlake, J. Jordão, C. Serno, G. (1986). Levantamento de Pastagens e Solos de Chókwè. Comunicação Nº 50 (Série Terra e Água). INIA, Maputo.
75. Triola, Mario F. (2005). Introdução a Estatística. Rio de Janeiro LTC.
76. Technoserve. (2017). Banana Industry Grants Facility. Business solutions to poverty.
77. Tomekpe K. and Fondi E. 2008. Directrices de regeneração: bananeira. In: Dullo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CDROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 9 pp.

78. Thomas J. Topo de banana. Em: Jones D, ed. (2019). Manual de Doenças da Bananeira, Abacá e Enset. Wallingford, Oxfordshire, Reino Unido: CAB International.
79. Thomas J. E. (2008). Banana Bunchy Top Vírus *Enciclopédia de Virologia*. (BWJ Mahy e MHV Van Regenmortel, Editores). Oxford (Reino Unido): Elsevier.
80. Victor Costa Castro-Alves. (2014). O efeito da proximidade do fragmento florestal de Mata Atlântica sobre a área de cultivo no amadurecimento de bananas (*Musa acuminata* AAA cv.Nanicao) e nos compostos fenolicos das folhas de bananeiras. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Universidade de São Paulo.
81. Xie, W. S. ; Hu, J. S. (1995). Molecular cloning, sequence analysis, and detection of banana bunchy top virus in Hawaii. *Phytopathology*, St. Paul, MN, v. 85.
82. Ximba, S.P.F; Gubba, A; Jooste, A.E.C. (2021) Monitoring the distribution of Banana bunchy top virus in South Africa: a country-wide survey. *Plant Pathology*, Agricultural Research Council, 3 Rivier Street, Nelspruit, Mpumalanga 1200, South Africa.
83. Whitfield, A. E., Falk, B. W. and Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*.

ANEXOS

Anexo 1: Lista das espécies levantadas no distrito de Manhiça

Genero/Especie	Familia
<i>Commelina benghalensis</i>	Commelinaceae
<i>Sida rhombifolia</i>	Malvaceae
<i>Solanum panduriforme</i>	Solanaceae
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae
<i>Acalypha indica</i>	Euphorbiaceae
<i>Sida rhombifolia</i>	Malvaceae
<i>Capsicum sp.</i>	Solanaceae
<i>Citrus sp</i>	Rutaceae
<i>Aneilema sp</i>	Commelinaceae
<i>Vernonia sp.</i>	Asteraceae
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae
<i>Senecio Madagascariensis</i>	Asteraceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Justicia flava</i>	Acanthaceae
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae
<i>Justicia flava</i>	Acanthaceae
<i>Sida rhombifolia</i>	Malvaceae
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae
<i>Justicia flava</i>	Acanthaceae
<i>Imperata cylindrica</i>	Poaceae

<i>Panicum maximum</i>	Poaceae
<i>Justicia flava</i>	Acanthaceae
<i>Leonotis sp.</i>	Lamiaceae
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae
<i>Panicum maximum</i>	Poaceae
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae
<i>Aneilema sp</i>	Commelinaceae
<i>Conyza canadensis</i>	Asteraceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae
<i>Colocasia esculenta</i>	Araceae
<i>Justicia flava</i>	Acanthaceae
<i>Corallocarpus sp.</i>	Cucurbitaceae
<i>Eclipta alba</i>	Asteraceae
<i>Vigna sp.</i>	Fabaceae
<i>Centella asiatica</i>	Apiaceae
<i>Rhynchosia minima</i>	Fabaceae
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae
<i>Gnaphalium luteo-album</i>	Asteraceae
<i>Centella asiatica</i>	Apiaceae
<i>Colocasia esculenta</i>	Araceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae

Anexo 2: Lista das espécies do levantamento efectuado no distrito de Chokwe

Genero/Especie	Familia
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Asteraceae
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Musa alba</i>	Musaceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Panicum maximum</i>	Poaceae
<i>Senecio sp</i>	Asteraceae
<i>Senecio proprior</i>	Asteraceae
<i>Senecio madagascariensis</i>	Asteraceae
<i>Cissampelos hirta</i>	Menisperm aceae
<i>Acalypha segetalis</i>	Euphorbiac eae
<i>Acalypha segetalis</i>	Euphorbiac eae
<i>Amaranthus hybridus</i>	Amaranthac eae
<i>Corchorus aestuans</i>	Malvaceae
<i>Tribulus terrestris</i>	Zygophylla ceae
<i>Nidorella resedifolia</i>	Asteraceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Gnaphalium pensylvanicum</i>	Asteraceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Phyllanthus niruri</i>	Phyllanthac eae
<i>Senecio proprior</i>	Asteraceae
<i>Corbichonia decumbens</i>	Lophiocarp aceae
<i>Portulaca oleracea</i>	Portulacace

	ae
<i>Commelina diffusa</i>	Commelina ceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Vigna vexillata</i>	Fabaceae
<i>Oxalis semiloba</i>	Oxalidacea e
<i>Cardiospermum halicacabum</i>	Sapindacea e
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Abutilon angulatum</i>	Malvaceae
<i>Senecio proprior</i>	Asteraceae
<i>Senecio sp</i>	Asteraceae
<i>Dichrostachys cinerea</i>	Fabaceae
<i>Sphaeranthus indicus</i>	Asteraceae
<i>Disperma crenatum</i>	Acanthacea e
<i>Centella asiatica</i>	Apiaceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Phyllanthus niruri</i>	Phyllanthac eae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae
<i>Oxalis semiloba</i>	Oxalidacea e
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae
<i>Portulaca oleracea</i>	Portulacace ae
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae
<i>Vigna (macapa)</i>	
<i>Solanum panduriforme</i>	Solanaceae

<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae
<i>Chenopodium sp</i>	Amarantha ceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Conyza canadensis</i>	Asteraceae
<i>Cissampelos sp</i>	Menisperm aceae
<i>Ocimum</i>	Lamiaceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Chenopodium sp</i>	Amaranthac

	eae
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae
<i>Amaranthus hybridus</i>	Amaranthac eae
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae

Anexo 3: Protocolo de extração de ADN em Plantas (segundo Doyle & Doyle, 1986 - modificado)

Preparação do CTAB buffer (200ml)

Item	Concentração	Gramas/volume
CTAB	2%	4g
NaCl	1.4M	16.36g
EDTA pH8	20mM	8ml de 0.5M
Teis- HCl	100mM	3.5g
Água destilada	-----	192ml

1. Pesar 500mg de material vegetal e colocar num almofariz contendo 3ml de tampão CTAB e uma pitada de PVP (ponta de uma espátula). Macerar até formar uma mistura homogenia;
2. Transferir 1.5 -2ml do macerado para um tubo de igual volume usando pipetas de Pasteur. Se o material for muito compacto pode-se adicionar 1ml do tampão CTAB e homogeneizar antes de transferir;
3. Incubar por 20 minutos a 65°C, com mix. Centrifugar por 15min a 13200rpm;
4. Transferir 1ml do sobrenadante para um tubo de 2ml;
5. Adicionar 1ml de Cloroformio-alcool-isoamilico (24:1). Este passo deve ser realizado no fluxo laminar;
6. Vortexar e centrifugar por 15 minutos a 13200rpm;

7. Colectar a fase aquosa (cerca de 750ul) pipetando devagar e transferir para um novo tubo de 1.5ml. Nenhum clorofórmio deve ser levado. Este passo deve ser realizado no fluxo laminar;
8. Adicionar 1ml de isopropanol gelado e misturar imediatamente invertendo o tubo;
9. Vortexar e centrifugar por 15 minutos a 13200rpm;
10. Descartar o sobrenadante tomando cuidado de não perder o pellet de ADN;
11. Adicionar 1ml de etanol a 70%. Lavar o ADN invertendo cuidadosamente o tubo;
12. Vortexar e centrifugar por 10 minutos a 13200rpm e eliminar o sobrenadante. Se o ADN não estiver limpo deve se repetir os passos 11 e 12 com 750ul de etanol;
13. Secar o pellet a temperatura ambiente na bancada invertendo o tubo num papel limpo;
14. Após secar, adicionar 20ml de água e incubar por 30 minutos a 37°C. Fazer a quantificação.

Anexo 4: Quantificação do ADN extraído das amostras de Manhiça

Genero/Especie	Absorvância	ABS
<i>Commelina benghalensis</i>	1019.4	2.59
<i>Sida rhombifolia</i>	633.6	2.4
<i>Solanum panduriforme</i>	669.2	2.39
<i>Solanum nigrum</i>	750.5	2.32
<i>Acalypha indica</i>	243.3	2.32
<i>Sida rhombifolia</i>	635.7	2.5
<i>Capsicum sp.</i>	127.1	2.03
<i>Citrus sp</i>	109.5	1.81
<i>Aneilema sp</i>	922.2	2.42
<i>Vernonia sp.</i>	187.9	2.41
<i>Ageratum conyzoides</i>	508.1	2.47
<i>Senecio Madagascariensis</i>	1054.4	2.48
<i>Sonchus oleraceus</i>	724	2.35
<i>Justicia flava</i>	254.3	1.88

<i>Ageratum conyzoides</i>	680.4	2.33
<i>Justicia flava</i>	109.5	2.41
<i>Sida rhombifolia</i>	641.2	2.08
<i>Ageratum conyzoides</i>	691.2	2.60
<i>Justicia flava</i>	213.9	2.71
<i>Imperata cylindrica</i>	399.5	2.51
<i>Panicum maximum</i>	94.2	2.24
<i>Justicia flava</i>	680.4	2.33
<i>Leonotis sp.</i>	760	2.32
<i>Bidens pilosa</i>	714	2.31
<i>Panicum maximum</i>	649.1	2.31
<i>Ageratum conyzoides</i>	284.7	2.46
<i>Aneilema sp</i>	749	2.41
<i>Conyza canadensis</i>	600.7	2.19
<i>Sonchus oleraceus</i>	875.4	2.31
<i>Ageratum conyzoides</i>	102.8	2.35
<i>Colocasia esculenta</i>	815.4	2.52
<i>Justicia flava</i>	204.1	2.22

<i>Corallocarpus sp.</i>	581.8	2.30
<i>Eclipta alba</i>	399.5	2.51
<i>Vigna sp.</i>	254.3	1.88
<i>Centella asiatica</i>	508.1	2.47
<i>Rhynchosia minima</i>	127.1	2.03
<i>Bidens pilosa</i>	714	2.31

<i>Gnaphalium luteo-</i> <i>album</i>	700.2	2.19
<i>Centella asiatica</i>	542.5	2.80
<i>Colocasia esculenta</i>	820.5	2.62
<i>Sonchus oleraceus</i>	845.5	2.8

Anexo 5: Quantificação do ADN extraído das amostras de Chokwe

Género/Espécie	Absorvânci a	ABS
<i>Parthenium hysterophorus</i>	1560	1.560
<i>Solanum nigrum</i>	1390	1.390
<i>Sonchus oleraceus</i>	3238	1.295
<i>Musa alba</i>	1015	1.015
<i>Senecio proprior</i>	3027	3.027
<i>Senecio madagascariensis</i>	172.8	0.171 0
<i>Acalypha segetalis</i>	1831	1.831
<i>Acalypha segetalis</i>	246.6	0.247
<i>Amaranthus hybridus</i>	809.3	0.809
<i>Corchorus aestuans</i>	84.42	0.977
<i>Tribulus terrestris</i>	1004	1.004
<i>Nidorella resedifolia</i>	535.8	0.536
<i>Sonchus oleraceus</i>	510.8	0.510
<i>Gnaphalium pensylvanicum</i>	695.2	0.460

<i>Sonchus oleraceus</i>	3726	1.490
<i>Phyllanthus niruri</i>	619	0.619
<i>Senecio proprior</i>	729.6	0.730
<i>Corbichonia decumbens</i>	550.4	0.550
<i>Portulaca oleracea</i>	692.5	0.693
<i>Commelina diffusa</i>	100.1	0.010
<i>Sonchus oleraceus</i>	1291	1.291
<i>Vigna vexillata</i>	219	0.219
<i>Cardiospermum halicacabum</i>	509.7	0.510
<i>Sonchus oleraceus</i>	571.2	0.571
<i>Abutilon angulatum</i>	1179	1.179
<i>Senecio proprior</i>	204.9	0.205
<i>Dichrostachys cinerea</i>	1083	1.080
<i>Sphaeranthus indicus</i>	3562	1.425
<i>Disperma crenatum</i>	5162	2.065
<i>Centella asiatica</i>	144.7	0.145

<i>Phyllanthus niruri</i>	5830	2.33
<i>Sonchus oleraceus</i>	2316	0.927
<i>Solanum nigrum</i>	25.6	0.026
<i>Ageratum conyzoides</i>	5475	2.190
<i>Portulaca oleracea</i>	634.9	0.635
<i>Solanum nigrum</i>	1343	1.343
<i>Vigna (macapa)</i>	386	0.36
<i>Solanum panduriforme</i>	2366	0.046
<i>Solanum nigrum</i>	1034	1.034
<i>Chenopodium sp</i>	553.9	0.554
<i>Sonchus oleraceus</i>	60.1	0.06

<i>Conyza canadensis</i>	260	0.260
<i>Cissampelos sp</i>	226.6	0.227
<i>Asteraceae</i>	137.7	0.137
<i>Chenopodium sp</i>	1804	1.721
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1515	1.515
<i>Solanum nigrum</i>	500.2	0.500
<i>Sonchus oleraceus</i>	27,6	0.028
<i>Solanum nigrum</i>	689	0.689
<i>Solanum nigrum</i>	53.4	0.053