



SANDRA CARVALHO ISMAEL MUSSA BARROS

**SURVEY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
THE *Banana bunchy top virus* (BBTV) IN THE SOUTHERN
REGION OF MOZAMBIQUE - CHÓKWÈ DISTRICT**

**LAVRAS - MG
2023**

SANDRA CARVALHO ISMAEL MUSSA BARROS

SURVEY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE *Banana bunchy top virus* (BBTV) IN THE SOUTHERN REGION OF MOZAMBIQUE - CHÓKWÈ DISTRICT

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Barros, Sandra Carvalho Ismael Mussa.

Survey and molecular characterization of the *Banana bunchy top virus* (BBTV) in the southern region of Mozambique - Chóhwè district. / Sandra Carvalho Ismael Mussa Barros. - 2023.

99 p. : il.

Orientador(a): Antonia dos Reis Figueira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Topo em leque da bananeira. 2. PCR. 3. Filogenia. I. Figueira, Antonia dos Reis. II. Título.

SANDRA CARVALHO ISMAEL MUSSA BARROS

SURVEY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE *Banana bunchy top virus* (BBTV) IN THE SOUTHERN REGION OF MOZAMBIQUE - CHÓKWÈ DISTRICT

LEVANTAMENTO E CARATERIZAÇÃO MOLECULAR DO *Banana bunchy top virus* (BBTV) NA REGIÃO SUL DE MOÇAMBIQUE - DISTRITO DE CHÓKWÈ

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2023.

Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dra Claudine Marcia Carvalho	UFLA
Dra. Thais Oliveira Ramalho	FAZU

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

*Aos meus amores José de Barros e José de Barros Júnior, meus pais, meus irmãos, meus avós
(in memoriam),
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força, saúde e determinação para vencer esta etapa.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia pela oportunidade de realização do curso de doutorado e ao Laboratório de Virologia Molecular, por oferecer o espaço e a infraestrutura adequada para a execução deste trabalho.

À Professora Dr^a. Antonia dos Reis Figueira, pela oportunidade, dedicação e ensinamento, sendo exemplo de excelente profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

A Ariane Alvarenga, secretária do PPG Agronomia/Fitopatologia por toda paciência, amizade e carinho.

Aos familiares que me apoiaram e incentivaram em todos os momentos da minha vida, em especial o meu esposo e filho pelo companheirismo e pela compreensão, meus pais Ligia e Suleman e meus irmãos.

Aos amigos do laboratório de Virologia Molecular Sérgio, Jéssica, Minor, Gabriella, Viviane, Marcos e especialmente Thalyta Silveira por todo o apoio e amizade.

Aos colegas da turma 2018/2 Nayane, Sílvia, Carla, Jéssica, Davi que tornaram os momentos de trabalho mais descontraídos e animados, além do companheirismo, amizade e carinho.

Ao grupo Coimbra das universidades Brasileiras, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende com a vida e os humildes.”
(Cora Coralina)

RESUMO GERAL

O topo em leque causado pelo *Banana bunchy top virus* (BBTV) é a doença viral mais devastadora das bananeiras em todo o mundo. O vírus já foi detectado em 36 países ao redor do mundo e no momento se encontra ausente na América Central e América do Sul. Com base na sequência do DNA-R os isolados de BBTV que ocorrem ao redor do mundo foram classificados em dois grupos: o grupo do Oceano Pacífico Índico (PIO) e o do Sudoeste Asiático (SEA). Esses dados auxiliam a inferir sobre a origem geográfica dos isolados, embasando medidas preventivas de controle. Em 2016, o vírus foi detectado pela primeira vez no perímetro irrigado do distrito Chókwè, localizado na primeira zona na região sul de Moçambique, mas não existe nenhum estudo para determinar a sua incidência e as suas características genéticas. O objetivo desse estudo foi realizar inicialmente um levantamento para determinar a incidência e distribuição dos isolados e determinar as suas características genômicas. Uma amostragem foi feita nessa região afetada, coletando-se 175 amostras de plantas com suspeita de infecção em 23 campos de 11 fazendas, sendo 3 comerciais e 8 de produtores familiares nos quatro postos administrativos do distrito. Os resultados do levantamento indicaram que o vírus estava presente em 19 dos 23 campos amostrados em 10 fazendas. A porcentagem média de incidência foi de 54,3% com uma porcentagem mínima de 20% na fazenda 9 e um máximo de 100% na fazenda 2. Na fazenda 6, de produtores comerciais, não foram encontradas amostras infectadas. As sequências de nucleotídeos do DNA-S dos isolados analisados se mostraram bastante conservadas, variando de 97% a 100%. O mesmo foi observado para as sequências do DNA-R que apresentaram a grande maioria das identidades variando entre 98% e 100% entre os isolados de Chókwè, e acima de 90% quando comparadas com os isolados do *GenBank*. A análise filogenética mostrou que esses isolados se comportaram como isolados PIO, apresentando maior proximidade com o isolado JQ820453 do Malawi, sugerindo que poderiam ser provenientes deste país. Esse é o primeiro relato de estudos realizados sobre a incidência e características moleculares dos isolados de *Banana bunchy top virus* em Moçambique, alertando para a necessidade de se tomar medidas urgentes para o controle do BBTV neste país.

Palavras-chave: Incidência. Topo em leque da bananeira. PCR. PIO. SEA. SSA. *Musa spp.* Filogenia. *Nanovirodae*. *Babuvirus*.

GENERAL ABSTRACT

Banana bunchy top disease is the most devastating viral disease of banana trees worldwide and is caused by the *Banana bunchy top virus* (BBTV). This virus has already been found in 36 countries worldwide and is currently absent in Central and South America. Based on the R-DNA sequence, the BBTV isolates around the world were classified into the Pacific Indian Ocean (PIO) group and the Southwest Asian (SEA) group. These data help to understand the geographic origin of the isolates, guiding preventive control measures. In 2016, the virus was detected for the first time in the irrigated perimeter of the Chókwè district, located in the first zone in the southern region of Mozambique. However, there is no study to determine its incidence and genetic characteristics. This study initially aimed to survey the incidence and distribution of isolates and their genomic features. Sampling was made in this area, collecting 175 samples of plants with suspected infection in 23 fields of 3 commercial farms and 8 farms from familiar growers in the four administrative posts of the district. The survey results indicated that the virus was present in 19 of the 23 sampled fields. The average percentage of incidence was 54.3%, with a minimum rate of 20% in farm 9 and a maximum of 100% in farm 2. No infected samples were found on the commercial farm 6. The nucleotide sequences of the S-DNA of the isolates analyzed were quite conserved, ranging from 97% to 100%. The same was observed for the R-DNA sequences, which presented the vast majority of identities ranging between 98% and 100% among Chókwè isolates and above 90% compared with *GenBank* isolates. Phylogenetic analysis showed that these isolates behaved as PIO isolates, showing greater proximity to the Malawi JQ820453 isolates, suggesting that they may have originated in this country. This is the first report of studies conducted on the incidence and molecular characteristics of isolates of the *Banana bunchy top virus* in Mozambique, warning to the need to take urgent measures to control BBTV in this country.

Keywords: Incidence. *Banana bunchy top*. PCR. PIO. SEA. SSA. *Musa spp.* Phylogeny. *Nanovirodae*. *Babuvirus*.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Componentes do genoma de BBTV.	19
Figura 2 - Fotografias de sintomas apresentados pelas plantas de bananeira quando infectadas com o BBTV. A e D: plantas com sintomas de topo em leque, nanismo e cloroses nas margens das folhas; B e C: Estrias verdes ao longo das nervuras foliares; E: Deformação do cacho; F: Estrias no pseudo caule.....	22
Figura 3 - Mapa mundial, com destaque do continente Africano, mostrando a ocorrência regional da doença topo em leque da bananeira.	24
Figura 4 - Mapa do continente Africano mostrando a ocorrência regional da doença topo em leque da bananeira.	25
Figura 5 - Ciclo de vida de <i>Pentalonia nigronervosa</i>	31

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figure 1 - Map of Chókwè district in Gaza province, Mozambique.	49
Figure 2 - Map of surveyed locations in the district of Chókwè (indicated with red dots) where samples were collected.	51
Figure 3 - Electrophoretic analysis of PCR products obtained from BBTV diagnostic tests on DNA samples extracted from banana trees suspected of being infected by the virus, 1- 1Kb marker, line from 2 to 9 samples that tested positive among those analyzed; 10 - Negative control.	56
Figure 4 - Average percentage of diseased (positive) and healthy (negative) plants from banana trees in the PCR test on 11 farms (fields) in the Chóckwè district.	57

ARTIGO 2

Figura 1 - Distribuição geográfica dos isolados de BBTV coletados no distrito de Chókwè (indicados com pontos vermelhos).	73
Figura 2 - Análise eletroforética dos produtos de PCR gerados por gene DNA S de isolados de BBTV em catorze amostras diferentes. 1 - Marcador 1Kb; linha de 2 a 15 amostras que testaram positivas entre as analisadas; 16 - Controle negativo; 17 – Controle positivo.	77
Figura 3 - Análise eletroforética dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA R de	

isolados de BBTV em catorze amostras diferentes. 1: Marcador 1Kb; 2 a 15: padrão de bandas dos isolados amplificados; 16: controle negativo; 17: controle positivo.	78
Figura 4 - Árvore Filogénética construída com base na sequência de nucleotídeos do DNA S de isolados do BBTV coletados no distrito de Chókwè – Moçambique e isolados do <i>GenBank</i> . Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA 7.0 e Neighbor Joining com 2.000 repetições.....	82
Figura 5 - Árvore Filogénética construída com base na sequência de aminoácidos do DNA S de isolados do BBTV coletados no distrito de Chókwè – Moçambique e isolados do <i>GenBank</i> . Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA 7.0 e Neighbor Joining com 2.000 repetições.....	83
Figura 6 - Árvore Filogénética construída com base na sequência de nucleotídeos do DNA R de isolados do BBTV coletados no distrito de Chókwè – Moçambique e isolados do <i>GenBank</i> . Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA 7.0 e Neighbor Joining com 2.000 repetições.....	88
Figura 7 - Árvore Filogénética construída com base na sequência de aminoácidos do DNA R de isolados do BBTV coletados no distrito de Chókwè – Moçambique e isolados do <i>GenBank</i> . Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA 7.0 e Neighbor Joining com 2.000 repetições.....	89

LISTA DE QUADROS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 2

Quadro 1 - Primers empregados para amplificação dos Genes R e S com as respectivas temperaturas de anelamento e fragmento amplificado.	74
Quadro 2 - Isolados do BBTV de DNA R e DNA S e o número de acessos disponíveis no <i>GenBank</i> , usados para comparação com os isolados Moçambicanos.	76
Quadro 3 - Identidade de nucleotídeos do DNA S entre os isolados de BBTV de Moçambique e os isolados disponíveis no <i>Genbank</i>	80
Quadro 4 - Identidade de Aminoácidos do DNA S entre os isolados de BBTV de Moçambique e os isolados disponíveis no <i>Genbank</i>	81
Quadro 5 - Identidade de Nucleotídeos de DNA R entre os isolados de BBTV de Moçambique e os isolados disponíveis no <i>Genbank</i>	85
Quadro 6 - Identidade de aminoácidos de DNA R entre os isolados de BBTV de Moçambique e os isolados disponíveis no <i>Genbank</i>	86

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Distribuição geográfica do BTTV nas diferentes regiões (Continua).	26
---	----

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Table 1 - Geographic coordinates of the 11 sampled farms.	50
Table 2 - Number of diseased (positive) and healthy (negative) banana plants and the respective percentages of positive samples, when analyzed by PCR, in farms (fields) sampled in the district of Chóckwè.	55
Table 3 - Comparison of the results from Kruskal-Wallis test regarding to the incidence of viruses among the studied fields (Continue).	58

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	A Cultura da Bananeira	17
2.2	Etiologia do topo em leque da bananeira	18
2.3	Hospedeiros de BBTv	20
2.4	Sintomas	20
2.5	Origem do BBTv	22
2.6	Distribuição geográfica	24
2.7	Transmissão do BBTv	30
2.8	Medidas de controle.....	32
	REFERÊNCIAS.....	34
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS CIENTÍFICOS	45
	ARTICLE 1 - SURVEY OF THE <i>Banana bunchy top virus</i> (BBTV) IN BANANA CROPS LOCATED IN CHÓCKWÈ DISTRICT, SOUTHERN MOZAMBIQUE	45
	ARTIGO 2 - CARATERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Banana bunchy top virus</i> PROVENIENTES DO DISTRITO DE CHÓKWÈ EM MOÇAMBIQUE.....	67

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A banana é cultivada em 125 países e é considerada como uma das frutas mais antigas e mais consumidas no mundo, atrás apenas da laranja, tornando-se muito importante na dieta das populações, como fonte de carboidratos, vitamina C, potássio e fibras e por ser livre de gordura, colesterol e sódio (DANTAS *et al.*, 2011; GEERING *et al.*, 2005a; HARPER *et al.*, 2002; NOMURA *et al.*, 2013).

A fruta é consumida como alimento básico e serve como fonte de subsistência para mais de 100 milhões de pessoas na África e outros tantos milhões ao redor do mundo. Segundo dados da FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION), em 2020 foram produzidas mais de 116 milhões de toneladas de banana, sendo que a maior produção foi constatada na Ásia, com 62,84 milhões de toneladas, seguida pela África e América do Sul, que produziram mais de vinte milhões de toneladas cada (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAOSTAT, 2020). Como a sua produção se dá durante todo o ano, é uma fonte contínua de renda e gera milhões de empregos por todo o mundo.

As bananeiras cultivadas atualmente são híbridos partenocárpicos, principalmente triploides, derivados apenas de *Musa acuminata* e, às vezes, combinados com *M. balbisiana*. Elas se originaram na Nova Guiné, Indonésia, Filipinas ou Península do Sudeste Asiático, de onde vieram entre 7.000 e 10.000 anos atrás (DENHAM *et al.*, 2003; SARDOS *et al.*, 2022; PERRIER *et al.*, 2011). Supõe-se que diferentes variedades de banana possam ter sido introduzidas e reintroduzidas na África e no sudoeste das Ilhas do Oceano Índico muitas vezes durante o período entre 1500 e 700 anos atrás (LEJJU; ROBERTSHAW; TAYLOR, 2006; RANDRIANJA; ELLIS, 2009).

Em todo o mundo as plantações de banana ficam expostas aos efeitos de pragas, patógenos e fatores ambientais adversos. Os agricultores geralmente usam rebentos jovens removidos das antigas plantações para estabelecer novos campos. Essa prática tem sido uma das principais causas de surtos de várias doenças e pragas da banana em todo o mundo, especialmente os vírus, que se perpetuam junto com o material de plantio (BATIONO *et al.*, 2012; JONES, 2002).

Acredita-se que os vírus se espalharam durante o processo de domesticação de bananas comestíveis para consumo humano. Cerca de 20 espécies de vírus de plantas foram relatadas em banana, entretanto, os mais importantes são o *Banana bunchy top virus* (BBTV), várias

espécies de *Badnavirus*, *Banana bract mosaic virus* (BBrMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV).

O BBTV foi identificado como uma das 100 mais importantes espécies exóticas invasoras pela União Internacional para Conservação da Natureza. Globalmente, esta doença impõe uma grande restrição à produção e, felizmente, não foi ainda encontrada no Caribe e nos países da América Latina (CABI, 2021). Incidências de até 100% do BBTV têm sido registradas em diversos países. Rao *et al.* (2017) reportaram incidências de aproximadamente 70% a 80% em algumas áreas na China e Kumar *et al.* (2011) observaram incidências que variaram de 20% a 100% na África Subsaariana.

As perdas de produção causadas por esse vírus também podem chegar a 100%, dependendo da fase da incidência e da fase do ciclo de vida em que a bananeira foi infectada. O BBTV foi reportado no Paquistão pela primeira vez em 1989, na província de Sindh. Em 1978 a área cultivada com banana em Sindh era de 60.000 ha com uma produção média de 17,6 ton/ha. Na safra 1999/2000 a área cultivada em Sindh foi reduzida para 22.400 ha (AMIN *et al.*, 2008). No período de 2007 a 2010 foram registradas perdas de US \$ 50 milhões na produção anual de banana indiana (CHERIAN *et al.*, 2002; SELVARAJAN; BALASUBRAMANIAN; SASIREKA, 2015).

Em Moçambique, tal como acontece com outros países produtores de banana, esta cultura constitui parte da dieta básica das famílias. Cerca de 20% das bananas cultivadas no país são consumidas e comercializadas localmente, proporcionando assim nutrição e rendimento significativos para os pequenos agricultores que dependem da produção de banana. Assim a banana contribui significativamente para a subsistência rural e segurança alimentar para mais de meio milhão de pessoas.

Nos últimos anos, os investimentos no setor da banana têm aumentado consideravelmente tendo se tornado comum a produção comercial intensiva para a exportação e consumo local. Nesse contexto, salientam-se os investimentos de grandes empresas internacionais de banana que não apenas contribuem para a criação de emprego e estímulo à economia local, mas também para a estabilidade política e o progresso social (GAIN REPORT, 2015). Contudo, a cultura vem enfrentando vários problemas fitossanitários devido à ocorrência de pragas e doenças que têm contribuído negativamente nos rendimentos da mesma.

São várias as pragas e doenças que afetam a cultura da banana em Moçambique nomeadamente, nematoides, a broca da banana, o Mal do Panamá (FocTR4) e a Banana bunchy top disease (BBTD). Dentre estas, a Fusariose ou Mal do Panamá (FocTR4) e a Banana bunchy top disease (BBTD) têm sido as mais importantes.

A virose conhecida como Topo em leque da Bananeira, causada pelo Banana bunchy top virus (BBTV) foi detectada em junho de 2016 numa plantação comercial em Guijá e nas plantações (machambas) de pequenos agricultores do distrito de Chókwè, província de Gaza no sul de Moçambique (MINISTÉRIO DE AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL - MADER, 2018). A fonte de infecção nessas regiões é desconhecida.

No momento, essa doença está circunscrita à província de Gaza, Maputo e Zambézia, mas, devido à sua importância e pelo enorme impacto na economia nacional, na renda dos produtores e na segurança alimentar, há necessidade de se realizar uma pesquisa em todas as plantações de banana no país, em particular na província de Gaza (distrito de Chókwè). Neste contexto os objetivos com este estudo foram: i) coletar amostras nas principais lavouras de cultivo da banana no distrito de Chókwè para determinar a incidência e distribuição dos isolados de BBTV que ocorrem nesse distrito em Moçambique; ii) Analisar o genoma do DNA R e do DNA S, visando classificar e fornecer subsídios para o manejo da doença no campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura da Bananeira

A bananeira, gênero *Musa*, é uma das mais antigas culturas, sendo o seu fruto conhecido e consumido em todo o mundo (DANTAS *et al.*, 2011; GEERING *et al.*, 2005b; HARPER *et al.*, 2002).

As cultivares de bananeiras são derivadas de duas espécies selvagens da família *Musaceae*, *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, que possuem o genoma A e B respectivamente (PRICE, 1995). Atualmente, existem em todo o mundo cultivares com genoma diploide, triploide ou tetraploide, resultando nos seguintes grupos: AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB E ABBB (ALVES, 1999).

Em Moçambique pode-se encontrar um grande número de variedades de bananeiras (willams, dwarf cavendish, robusta, lacatan, apple banana, prata/monkey, SH 3640, FHA 17 e 23) que possuem as características desejáveis como porte da planta, produtividade, tolerância a pragas, doenças, seca e frio, o que pode ou não favorecer a produção e a comercialização. Esta grande variação permite que o produtor possa escolher variedades que sejam da preferência do consumidor em relação à aparência e ao sabor da fruta (MADER, 2018) e que mantenham um bom desempenho agrônômico em relação à sua adaptabilidade às condições climáticas locais e à tolerância a doenças. Cerca de 80% das frutas produzidas em plantações maiores são exportadas para a África do Sul, Oriente Médio e Japão, com um valor total de US \$ 70 milhões por ano, tornando Moçambique o terceiro maior exportador de bananas na África depois da Costa do Marfim e Camarões (BANANALINK, 2022). Estima-se que 20% das bananas cultivadas no país são consumidas e comercializadas localmente, proporcionando assim uma nutrição e rendimento significativos para os pequenos agricultores que dependem da produção de banana (MADER, 2018). As quatro principais variedades de banana mais produzidas em Moçambique, incluem:

- a) Bananas Cavendish, cultivadas principalmente por produtores de grande escala para exportação internacional e mercados sul-africanos. As cultivares neste grupo incluem Dwarf Cavendish, Cavendish Chinês, Grand Naine, Williams e ASDIA. “Anão Cavendish”, cultivada em todo o país, é o cultivar de escolha para fins comerciais. “Grand Naine” e “ASDIA” são cultivadas em fazendas perto da Represa Pequenos

Libombos na Província de Maputo, enquanto que “Williams” é a cultivar escolhida no norte de Moçambique;

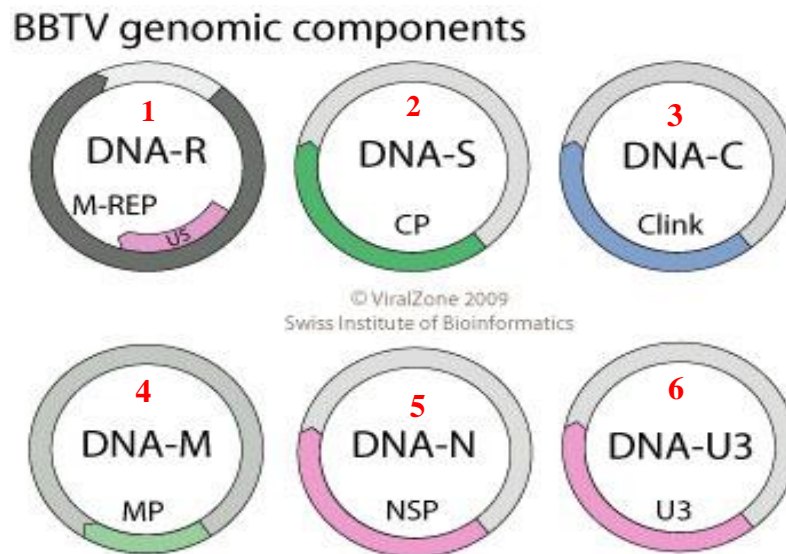
- b) A banana “Macua”, do tipo Bluggoe, é cultivada pelos habitantes locais no Norte;
- c) A banana “Maçã” (Silk), é uma fruta pequena, de bom gosto, que estraga facilmente;
- d) A “Pisang Awak”, é outra banana de sobremesa doce cultivada principalmente para o consumo local.

2.2 Etiologia do topo em leque da bananeira

O BBTV, que causa a doença topo em leque da bananeira, também conhecida como banana bunchy top (BBTD- banana bunchy top disease), pertence ao Domínio *Monodnaviria*, Reino *Shotokuvirae*, Filo *Cresnaviricota*, Classe *Arfiviricetes*, Ordem *Mulpavirales* Família *Nanoviridae* e Gênero *Babuvirus*, com genoma de ssDNA subdividido em seis partículas icosaédricas, com cerca de 18 a 20 nm de diâmetro. Cada segmento do genoma é monocistrônico, contendo apenas uma única ORF (*open reading frame*) constituída por ssDNA circular com aproximadamente 1,1kb, com exceção do DNA-R, para o qual tem sido proposta uma segunda ORF (BEETHAM; HARDING; DALE, 1999; DIJKSTRA; KHAN, 2006).

Os componentes do BBTV são denominados DNA-R, DNA-S, DNA-C, DNA-M, DNA-N e DNA-U3, sendo que anteriormente eram denominados de DNA-1 a DNA-6, respectivamente (KING *et al.*, 2011). A maioria das proteínas do BBTV tem sido bem caracterizadas: o DNA-R codifica uma proteína associada à replicação (Rep), o DNA-S uma proteína capsídial (CP), o DNA-C uma proteína de ligação à célula (Clink), o DNA-M uma proteína de movimento (MP), o DNA-N uma proteína de transporte nuclear (NSP) (FIGURA 1) (KING *et al.*, 2011). Apenas a proteína codificada pelo DNA-U3 ainda não foi devidamente caracterizada. A proteína Rep é também chamada de mestre Rep (MRep), uma vez que ajuda na replicação *Trans* de todos os outros componentes do BBTV (HORSER *et al.*, 2001). Alguns poucos isolados também possuem um DNA satélite, que codifica uma proteína homóloga à proteína Rep (HORSER *et al.*, 2001).

Figura 1 - Componentes do genoma de BBTv.



Fonte: ViralZone (2009).

Em geral, a diversidade genética de isolados de BBTv dentro dos países é muito baixa. Isso tem se confirmado por diversos autores: na Índia (SELVARAJAN *et al.*, 2010; VISHNOI; RAJ; PRASAD, 2009), no Paquistão (AMIN *et al.*, 2008), na África (ADEGBOLA *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2011) e na Oceânia (STANTON *et al.*, 2012). No entanto, na Índia, uma diversidade relativamente maior de BBTv foi observada na região nordeste (BANERJEE *et al.*, 2014), que é ponto de acesso da biodiversidade e possui diversos germoplasmas de banana (silvestre e cultivada) (BANERJEE *et al.*, 2014; KARAN; HARDING; DALE, 1994, SELVARAJAN *et al.*, 2010, VISHNOI; RAJ; PRASAD, 2009). Apenas duas sequências completas do genoma da BBTv (compreendendo todos os seis componentes) foram relatadas na Índia, uma do norte (Lucknow) e outra do sul (Tamil Nadu). No entanto, pouco se sabe sobre as características moleculares do BBTv ocorrendo no Nordeste da Índia, exceto as informações preliminares sobre a CP (SELVARAJAN *et al.*, 2010).

Com base na sequência do DNA-R do BBTv, os isolados foram inicialmente classificados em dois grupos: Grupo do Pacífico Sul e Grupo Asiático (KARAN; HARDING; DALE, 1994). Algum tempo depois, Yu *et al.* (2012) revisaram essa classificação considerando as mudanças na distribuição do vírus. Dessa forma, os isolados da China, Indonésia, Japão, Filipinas, Taiwan, Sumatra e Vietnam foram alocados no grupo por eles denominado de grupo do Sudoeste Asiático (SEA) e os países Austrália, Egito, Camarões, Gabão, República Democrática do Congo, Angola, Havaí, Índia, Myanmar, Paquistão, Sri Lanka e Tonga foram colocados no grupo dos Oceanos Pacífico-Indico (PIO).

Diversos estudos têm corroborado o agrupamento dos isolados do BBTv nesses dois

subgrupos, de acordo com a região de origem (HYDER *et al.*, 2011; ISLAM *et al.*, 2010; WICKRAMAARACHCHI *et al.*, 2016). Entretanto, existem também estudos nos quais foi encontrado uma grande variabilidade no gene R, além da ocorrência de mutantes e recombinantes intra e inter espécies (BALDODIYA *et al.*, 2019; BANERJEE *et al.*, 2014; HEYDER *et al.*, 2011; ISLAM *et al.*, 2010; NIYONGERE *et al.*, 2015; RAO *et al.*, 2017; STANTON *et al.*, 2012; SU; WU; TSAO, 2003).

Os estudos baseados no genoma viral também estão fornecendo pistas sobre a origem e o padrão da difusão do BBTV. Por exemplo, a análise da sequência do DNA-R de isolados de BBTV da África Subsaariana (SSA) mostrou que, quando agrupados, eles formam uma sublinhagem única dentro do grupo PIO, sugerindo uma origem comum para os isolados da SSA (KUMAR *et al.*, 2011).

2.3 Hospedeiros de BBTV

Todas as espécies e cultivares de *Musa* são hospedeiros potenciais para o BBTV. Até o momento, nenhum cultivar resistente foi identificado, mas foram relatadas diferenças varietais na suscetibilidade (ESPINO *et al.*, 1993; GEERING; THOMAS, 1997; HOOKS *et al.*, 2009; STOVER, 1972). As cultivares do subgrupo *Cavendish* são severamente afetadas. O *Ensete ventricosum* foi infectado experimentalmente.

Canna indica (PINILI *et al.*, 2013; SU; WU; TSAO, 1993), *Hedychium coronarium* (SU; WU; TSAO, 1993), *Alpinia zerumbat* e uma seleção de *Colocasia esculenta* (PINILI *et al.*, 2013) foram relatadas como hospedeiros experimentais de BBTV usando isolados do subgrupo asiático do vírus. As tentativas de confirmar esses resultados não tiveram sucesso com isolados de subgrupos do Pacífico Sul (GEERING; THOMAS, 1997; HU *et al.*, 1996; MANICKAM *et al.*, 2002). Não há relatos de infecções naturais em hospedeiros fora da *Musaceae*.

2.4 Sintomas

Os sintomas típicos do topo em leque da bananeira são facilmente distinguidos daqueles causados por outras viroses da banana. Eles dependem da época do ciclo de vida em que planta foi infectada, sendo que os sintomas observados em plantas infectadas no campo são diferentes dos sintomas das plantas propagadas via mudas infectadas.

Os sintomas em plantas infectadas naturalmente no campo geralmente, via vetor, aparecem na segunda folha após a inoculação e consistem em poucas estrias verde-escuras nas nervuras menores na porção superior da lâmina foliar. As estrias podem ser melhor visualizadas a partir da parte inferior da folha quando observadas contra a luz (FIGURA 2B). Pequenas pontuações também podem ser vistas no pecíolo. Posteriormente a folha pode exibir listras esbranquiçadas ao longo das nervuras secundárias quando ainda estiver enrolada, tornando-se verde-escuras à medida que a folha se desenrola. As folhas seguintes tornam-se menores, tanto no comprimento como na largura, e frequentemente têm margens cloróticas recurvadas (FIGURA 2A e 2D). Além disso, tornam-se secas e quebradiças e ficam mais eretas do que o normal, conferindo à planta o aspecto de roseta e de superbrotamento do topo (*bunch top*) (FIGURA 2A e 2D). Estrias necróticas podem ser visualizadas ao longo do pseudo caule (FIGURA 2F) (THOMAS; ISKRA-CARUANA; JONES, 1994).

As plantas infectadas são raramente capazes de produzir um cacho e não frutificam nos anos subsequentes. Às vezes no final do ciclo de crescimento podem frutificar uma vez, porém, o pedúnculo e os frutos formados são pequenos e deformados (FIGURA 2E). Quando as plantas são infectadas muito tarde (planta adulta), elas apresentam sintomas, algumas faixas escuras nas pontas das brácteas florais, as folhas ficam rijas, erectas, estreitas, amontoadas no topo e dificilmente conseguem produzir novas folhas. Como consequência não se espera que a planta consiga formar o cacho (THOMAS; ISKRA-CARUANA; JONES, 1994) (FIGURA 2A e 2D).

Em alguns cultivares de banana das espécies do género *Musa* observam-se sintomas leves da doença. No subgrupo Cavendish a presença de plantas com folhas verde-escuras e estrias nos pecíolos que podem ser raras ou ausentes, são diagnosticas e características de infecção dos cultivares (MAGEE, 1953). Em algumas plantas de “Veimama” (AAA, subgrupo Cavendish), foi observada capacidade de recuperação das plantas, chegando mesmo a apresentar poucos ou nenhum sintomas, após sintomas graves iniciais. Na família *Musaceae* onde se encontra inserida a cultura da banana, o BBTV é particularmente conhecido por infectar uma variedade de espécies do género *Musa*, cultivares no Eumusa (derivado principalmente de *M. acuminata*, *M. acuminata* x *M. balbisiana*) e Australimusa (derivado principalmente de *M. maclayi*, *M. lolodensis* e *M. peekelii*) série de banana comestível e, *Ensete ventricosum* (enset). As espécies do género *Musa* susceptíveis incluem *M. balbisiana* (ESPINO *et al.*, 1993; MAGEE, 1948), *M. acuminata* ssp. *banksii*, *M. textilis* (abacá) (MAGEE, 1927), *M. velutina* (DIETZGEN; THOMAS, 1991), *M. uranoscopos*, *M. jackeyi*, *M. ornata* e *M. acuminata* ssp. *Zebrina*. Até o momento, não há nenhuma informação confirmada sobre a imunidade de qualquer espécie *Musa* ao BBTV. Porém, existem indicações que reportam a observação

frequente da existência de diferenças na suscetibilidade entre cultivares submetidas a infecções experimentais ou de campo (ESPINO *et al.*, 1993; NGATAT *et al.*, 2017).

Figura 2 – Fotografias de sintomas apresentados pelas plantas de bananeira quando infectadas com o BBTV. A e D: plantas com sintomas de topo em leque, nanismo e cloroses nas margens das folhas; B e C: estrias verdes ao longo das nervuras foliares; E: deformação do cacho; F: estrias no pseudo caule.



Fonte: Da autora (2020).

2.5 Origem do BBTV

Os primeiros surtos registrados de doenças causadas pelo *Banana bunchy top virus* foram encontrados em bananais nas Ilhas Fiji em 1889, embora relatos e fotografias tiradas nessa época deixem poucas dúvidas de que a doença estivesse presente lá em 1879 (DARNELL-SMITH, 1924; MAGEE, 1953). O interesse pela doença só pode ter surgido devido aos seus efeitos sobre a nova indústria de exportação, que iniciou a produção em 1877 e foi baseada em cultivares no subgrupo Cavendish (AAA). Embora os surtos tenham sido observados pela primeira vez em plantações comerciais de cultivares Cavendish, o padrão de disseminação da doença e os sintomas severos nas cultivares de banana de cozinha locais levaram a considerar

improvável que o topo achatado tenha se originado em Fiji (MAGEE, 1953).

A indústria alcançou um pico de produção de 788.000 cachos em 1892, mas em 1895 havia caído para 147.000 cachos, principalmente por causa da doença. As recuperações temporárias na indústria ocorreram por volta de 1896, possivelmente devido ao plantio de cultivar 'Gros Michel' (AAA) e de 1912 a 1916, em grande parte por causa da abertura de novas plantações. Outros registros iniciais da doença incluem o Egito em 1901 (FAHMY, 1924; MAGEE, 1927), a origem da infecção desconhecida, e a Austrália e o Sri Lanka em 1913, ambos surtos provavelmente resultantes da importação de material de plantio infectado de Fiji (MAGEE, 1953). O top bunchy foi relatado pela primeira vez na Austrália no distrito de Tweed de New South Wales (NSW) (MAGEE, 1927). A rápida expansão da indústria da banana ocorreu na década seguinte e, com ela, a disseminação inadvertida da doença.

Um surto grave do topo em leque da banana ocorreu no Paquistão no início dos anos 90 (KAHLID; SOOMRO; STOVER, 1993). A área de terra em produção caiu 55% em um ano como resultado direto da doença e, em algumas plantações, a incidência foi de 100% (ANNUAL REPORT - ANON, 1992). A doença também apareceu no Haváí, causando muitos danos (FERREIRA; TRUJILLO; OGATA, 1989). Na Índia entre 2007 e 2010 os surtos de doenças causaram perdas anuais de U\$ 50 milhões (SELVARAJAN; BALASUBRAMANIAN, 2014).

Desde 1990, o BBTV emergiu como um grande obstáculo à produção de banana na África Central e do Sul (NEWAG, 2009). O primeiro registro de BBTD na África continental foi do Egito em 1901, onde a disseminação economicamente prejudicial da doença ocorreu em 1953 (DALE, 1987). A BBTD foi descoberta pela primeira vez na África Subsaariana na década de 1950, na região de Kisangani, onde hoje é a República Democrática do Congo (RDC) (WARDLAW, 1961). Entre 1960 e 1980, a doença foi observada nos países vizinhos da República do Congo, Gabão, Burundi, República Centro-Africana, Guiné Equatorial e Ruanda (JEGER *et al.*, 1995; MANSER, 1982, THOMAS *et al.*, 2000). Na década de 1990, epidemias de BBTD foram relatadas no Malawi (KENYON; BROWN; KHONJE, 1997) e na Zâmbia. Uma década depois, a BBTD foi relatada em Angola (KUMAR *et al.*, 2009; PILLAY *et al.*, 2005) e mais recentemente nos Camarões (OBEN *et al.*, 2009). A BBTD também foi relatada como um problema sério no Burundi, na República Democrática de Congo (RDC) e em Ruanda. Embora não houvesse estimativas precisas de perdas de rendimento, em plantas severamente infectadas de cultivares altamente suscetíveis 100% de perda de rendimento foi relatado nas regiões afetadas (TUSHEMEREIRWE *et al.*, 1998).

Segundo Kumar *et al.* (2015) na África Subsaariana a doença se espalha de forma

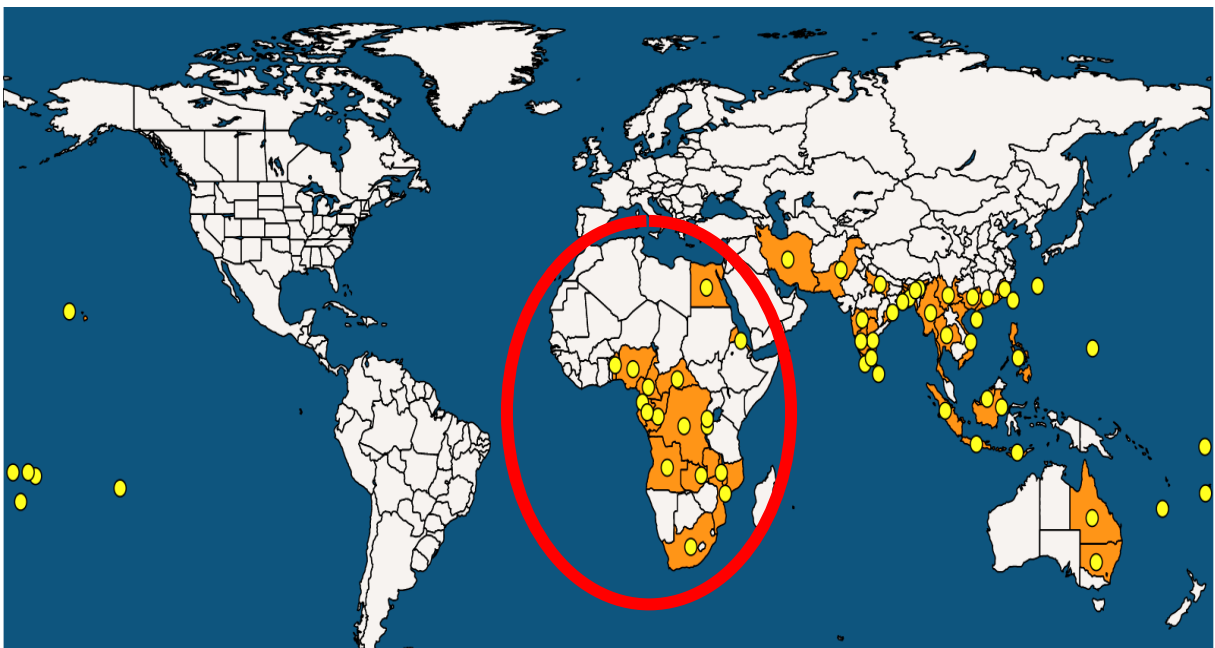
inabalável em muitos países, com incidência média nas áreas afetadas entre 5-70%, mas em alguns casos até 95%. O aumento dos surtos de BBTV na SSA desde meados da década de 1990 garantiu maiores investimentos na mitigação dos impactos negativos da doença e restringiu a sua propagação a outros países da SSA. Este estudo também mostrou que o BBTV ocorre na RDC, Angola, Camarões, Gabão e Malawi. Em 2015, a doença foi registrada pela primeira na África do Sul (JOOSTE; WESSELS; VAN DER MERWE, 2016) e em 2016 foi confirmada em Moçambique (FAO, 2016).

2.6 Distribuição geográfica

A doença, topo em leque da bananeira, ocorre em 36 países (TABELA 1), distribuídos na região sul e sudeste da Ásia/Pacífico e em vários países africanos (FIGURA 3) (AMIN *et al.*, 2008; KAVINO *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2011; SELVARAJAN *et al.*, 2010). Significativamente, os países exportadores de banana da região da América Latina e do Caribe estão livres da doença, embora o vetor pulgão esteja presente.

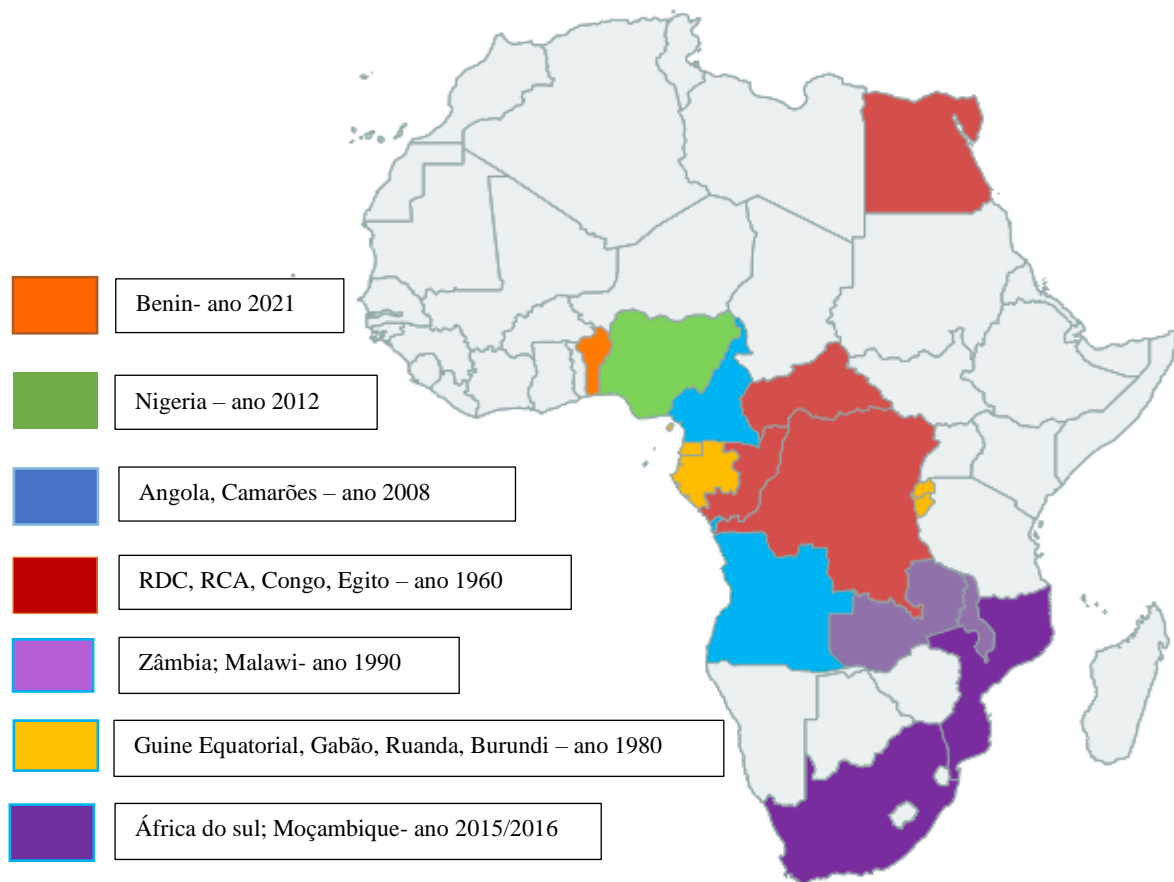
Os países Africanos para os quais existem registros da ocorrência da doença do topo em leque da bananeira são mostrados na Figura 4.

Figura 3 - Mapa mundial, com destaque do continente Africano, mostrando a ocorrência regional da doença topo em leque da bananeira.



Fonte: EPPO (2021).

Figura 4 - Mapa do continente Africano mostrando a ocorrência regional da doença topo em leque da bananeira.



Fonte: EPPO (2021).

Tabela 1 - Distribuição geográfica do BTTV nas diferentes regiões (Continua).

Continente/ País/Região	Distribuição	Invasiva	Referência
ÁFRICA			
ANGOLA	Presente, Localizada		Kumar <i>et al.</i> (2009)
BENIN	Presente, Localizada		Lokossou <i>et al.</i> (2012)
BURUNDI	Presente	Invasiva	Thomas <i>et al.</i> (1994)
CAMARÕES	Presente, Localizada		Oben <i>et al.</i> (2009)
REPUBLICA CENTRO AFRICANA	Presente	Invasiva	Thomas <i>et al.</i> (1994)
REPUBLICA DEMOCRATICA DE CONGO	Presente, Difundida	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
REPUBLICA DE CONGO	Presente	Invasiva	Thomas <i>et al.</i> (1994)
EGIPTO	Presente, Localizada	Invasiva	Magee (1927)
GUINÉ EQUATORIAL	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
ERITREA	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
GABÃO	Presente, Localizada	Invasiva	Fouré e Manser (1982)
MALAWI	Presente, Difundida	Invasiva	Kenyon <i>et al.</i> (1997)
MOCAMBIQUE	Presente, Localizada	Invasiva	Gondwe <i>et al.</i> (2007)
NIGÉRIA	Presente, Localizada	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
RUANDA	Presente	Invasiva	Thomas <i>et al.</i> (1994)
ÁFRICA DO SUL	Presente, Localizada		CABI/EPPO (2013)
TOGO	Ausente, Erradicada		Kolombia <i>et al.</i> (2021)
ZÂMBIA	Presente, Localizada		Gondwe <i>et al.</i> (2007)
ÁSIA			
CHINA	Presente, Localizada	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-Fujian	Presente	Invasiva	Zhou e Xie (1992)
-Guangdong	Presente	Invasiva	Zhou e Xie (1992)
-Guangxi	Presente	Invasiva	Zhou e Xie (1992)

Tabela 1 – Distribuição geográfica do BTTV nas diferentes regiões (Continua).

Continente/ País/Região	Distribuição	Invasiva	Referência
-Hainan	Present	Invasiva	Feng, Wang e Liu (2010)
-Yunnan	Present	Invasiva	Zhou e Xie (1992)
- Hong kong	Ausente, Registro de presença não confirmada		EPPO (2021)
BANGLADESH	Presente		CABI/EPPO (2013)
ÁSIA – cont.			
CAMBODJA	Ausente, Registro de presença não confirmada		EPPO (2021)
INDIA	Presente, Localizada	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-Andhra Pradesh	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-Assam	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-Karnataka	Presente	Invasiva	Sharma (1988)
-Kerala	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-Maharashtra	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-Meghalaya	Presente		CABI/EPPO (2013)
-Odisha	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-Tamil Nadu	Presente	Invasiva	Govindaswamy, Padmanaban e Alagianagalingam (1977)
-Uttar Pradesh	Presente	Invasiva	Khurana (1971)
-West Bengal	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
INDONESIA	Presente	Invasiva	Sulyo e Muharam (1985)
-Irian Jaya	Ausente, anteriormente presente	Invasiva	EPPO (2021)
-Java	Presente	Invasiva	Sulyo e Muharam (1985)
-Lesser Sunda Islands	Presente		CABI/EPPO (2013)
-Sumatra	Presente		EPPO (2021)
IRÃ	Presente, Localizada		CABI/EPPO (2013)

Tabela 1 – Distribuição geográfica do BTTV nas diferentes regiões (Continua).

Continente/ País/Região	Distribuição	Invasiva	Referência
JAPÃO	Presente, Localizada	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-Bonin Islands	Presente	Invasiva	Gadd (1926)
-Ryukyu Islands	Presente, Localizada	Invasiva	Kawano e Su (1993)
LAOS	Ausente registro de presença não confirmada.	Invasiva	EPPO (2021)
MALASIA	Present, Localized	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-Peninsular Malaysia	Ausente, Ateriormente presente		CABI/EPPO (2013)
-Sabah	Ausente, Registro de presença não confirmada		EPPO (2021)
-Sarawak	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
ASIA – cont.			
MYANMAR	Presente		CABI/EPPO (2013)
NEPAL	Ausente, Registro de presença inválido		CABI/EPPO (2013)
PAQUISTÃO	Presente, Localizada	Invasiva	Kahlid <i>et al.</i> (1993)
FILIPINAS	Presente, Localizada	Invasiva	Castillo e Martinez (1961)
COREIA DO SUL	Ausente, Registro de presença não confirmada		CABI/EPPO (2013)
SRI LANKA	Presente	Invasiva	Bryce (1921)
TAIWAN	Presente	Invasiva	Sun (1961)
TAILÂNDIA	Presente		CABI/EPPO (2013)
VIETNÃ	Presente	Invasiva	Vakili (1969)
AMERICA DO NORTE			
ESTADOS UNIDOS	Presente, Localizada	Invasiva	Ferreira, Trujillo e Ogata (1997)
-Hawaii	Presente	Invasiva	Dietzgen e Thomas (1991)
OCEANIA			
SAMOA AMERICANA	Presente	Invasiva	CABI/EPPO (2013)

Tabela 1 – Distribuição geográfica do BTTV nas diferentes regiões (Conclusão).

Continentes/ Países/Região	Distribuição	Invasiva	Referência
AUSTRALIA	Presente, Localizada	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
-New South Wales	Presente, Localizada	Invasiva	Magee (1927)
-Queensland	Presente, Localizada	Invasiva	CABI/EPPO (2013)
ESTADOS FEDERADOS DA MICRONESIA	Ausente, Registro de presença não confirmada		EPPO (2021)
FIJI	Presente	Invasiva	Pearson e Grisoni (2002)
POLINESIA FRANCESA	Presente, Localizada		EPPO (2021)
GUAM	Presente	Invasiva	Pearson e Grisoni (2002)
KIRIBATI	Ausente, registro de presença inválido		Pearson e Grisoni (2002)
NOVA CALEDÔNIA	Presente, Localizada	Invasiva	Kagy <i>et al.</i> (2001)
ILHAS MARIANA DO NORTE	Ausente, Registro de presença inválido		CABI/EPPO (2013)
PALAU	Ausente, Registro de presença inválido		CABI/EPPO (2013)
PAPUA NOVA GUINÉ	Ausente, Registro de presença inválido		EPPO (2021)
SAMOA	Presente	Invasiva	Pearson e Grisoni (2002)
TONGA	Presente	Invasiva	Pearson e Grisoni (2002)
TUVALU	Presente	Invasiva	Pearson e Grisoni (2002)
WALLIS E FUTUNA	Presente	Invasiva	Pearson e Grisoni (2002)
AMÉRICA DO SUL			
BRASIL	Ausente, Interceptado na barreira Fitossanitária		Oliveira <i>et al.</i> (2002)

Fonte: EPPO (2021).

2.7 Transmissão do BBTV

Um dos principais meios de transmissão do BBTV ocorre através da ação humana, pelo transporte e plantio de mudas contaminadas (plantas filhas ou mudas produzidas em culturas de tecidos), que podem ocorrer até de um continente para o outro (CHEN; HU, 2013; DALE, 1987; HOOKS *et al.*, 2009; MAGEE, 1927; QAZI, 2015). Depois de introduzido no campo, o BBTV é eficientemente disseminado por meio do pulgão preto da bananeira, *Pentalonia nigronervosa* Coquerel (Hemiptera: *Aphididae*) (ANHALT; ALMEIDA, 2008; BRESSAN; WATANABE, 2011; HOOKS *et al.*, 2009; HU *et al.*, 1996; SINGH; KURZ; BOITEAU, 1996; WATANABE; GREENWELL; BRESSAN, 2013).

Pentalonia nigronervosa é o único inseto até então identificado no campo como vetor do vírus. A transmissão experimental pelo vetor *Pentalonia caladii* van der Goot (Hemiptera: *Aphididae*) foi observada por Watanabe, Greenwell e Bressan (2013), entretanto, esse vetor não tem sido observado no campo e não deve ser importante na sua disseminação. A transmissão pelo vetor é feita de forma persistente circulativa, sendo que o tempo mínimo requerido para adquirir o vírus é de pelo menos 4 horas de alimentação na planta doente e o tempo necessário para transmitir é de pelo menos 15 minutos de alimentação na planta susceptível (HOOKS *et al.*, 2009).

A espécie *Pentalonia nigronervosa* Coq. (Hemíptera: *Aphididae*) foi descrita pela primeira vez no século XIX por Coquerel, num campo de bananeiras nas ilhas Reunião (ROBSON; WRIGHT; ALMEIDA, 2007). Hoje a espécie encontra-se amplamente distribuída, na sua maioria em zonas tropicais e subtropicais com elevada predominância da Família *Musaceae* (HALBERT; BAKER, 2015).

Pentalonia nigronervosa é um inseto (do grupo dos afídeos) de tamanho reduzido, quase microscópico, com comprimento máximo de aproximadamente 3 mm (MESQUITA; COELHO JÚNIOR, 1983). Possui um corpo amolecido ladeado por antenas alongadas e paralelas a este. Com uma forma piriforme, este inseto possui aparelho bucal do tipo picador-sugador constituído por dois pares de estiletos flexíveis responsáveis pela sucção contínua da seiva floemática na planta hospedeira.

A forma de reprodução do *P. nigronervosa* é exclusivamente partenogenética, portanto as fêmeas desenvolvem, por viviparidade, novos indivíduos sem o acasalamento (ROBSON; WRIGHT; ALMEIDA, 2007). Segundo Doniseti (2004) a fecundidade do *P. nigronervosa* pode ser influenciada pelo fator ambiental, favorecendo assim a reprodução sexual. Nesse caso, os indivíduos alados tornam-se responsáveis pela geração em tempos desfavoráveis.

A espécie possui quatro estágios ninfais, que diferem em tamanho, forma e principalmente coloração (FIGURA 5). As ninfas do primeiro instar medem cerca de 0,1 mm, são ovais, de coloração castanho-avermelhada e suas antenas possuem quatro segmentos. O segundo instar difere do primeiro somente no tamanho que é de 0,7 mm. O terceiro instar mede cerca de 0,9 mm e a sua forma é ligeiramente mais alongada, a coloração é mais castanho-clara e possui antena com cinco segmentos. O quarto instar mede cerca de 1mm, possui coloração acastanhada-escura, e possui seis segmentos de antenas (CAPINERA, 2008).

O adulto mede cerca de 1-2 mm, coloração castanha muito escura com tendência a preto com brilho característico, possui seis segmentos de antenas de comprimento proporcional ao do corpo. As formas aladas são, portanto, responsáveis pela dispersão da espécie de uma planta hospedeira para outra, e geralmente desenvolvem-se depois de 7-10 gerações dos indivíduos ápteros (CAPINERA, 2008).

As ninfas possuem um ciclo de 9-16 dias desde o nascimento até a fase adulta e os adultos por sua vez possuem um ciclo de vida de 8-26 dias. Os adultos podem gerar 4 afídeos por dia, sendo que a reprodução inicia um dia depois de o afídeo atingir a maturidade e pode atingir até 30 gerações por ano (CAPINERA, 2008).

Figura 5 - Ciclo de vida de *Pentalonia nigronervosa*.



Fonte: International Institute of Tropical Agriculture (IITA, 2021).

2.8 Medidas de controle

Uma vez estabelecida, a doença é difícil de erradicar e controlar. A prevenção e controle da doença do BBTV é feita com base em diversas medidas que incluem o controle regulatório, uso de plantas resistentes, controle cultural e controle químico.

Apesar de se acreditar que a BBTD tenha sido eliminada de certos distritos produtores de banana na Austrália, julga-se que a mesma nunca tenha sido erradicada de nenhum país onde ela ocorre. Naquele país a doença é mantida sob controle, mercê da rigorosa legislação do governo do estado, que permite controlar não somente a fonte e o movimento do material de plantio, como também a emissão de licenças de plantio e obriga a destruição de plantas selvagens e de todas as plantas com sintomas (THOMAS; ISKRA-CARUANA; JONES, 1994).

Por outro lado, os inspetores de banana têm por obrigação policiar esses regulamentos e localizar plantas doentes e selvagens. Naquele país está sendo implementado um ambicioso programa de erradicação do BBTV, baseado na substituição de plantações onde a doença ocorre regularmente. Para tal estão sendo usados como substitutos materiais produzidos por cultura de tecidos e indexados para BBTV (THOMAS; ISKRA-CARUANA; JONES, 1994). Uma outra iniciativa para controlar a disseminação do BBTV, denominada ALLIANCE, para o controle do BBTV na África se encontra em andamento. Ela visa conter a disseminação do BBTV de áreas afetadas pela doença para novas regiões isentas por meio de regulamentações de quarentena e a recuperação da produção da banana pela eliminação de plântulas filhas infectadas e replantio com plantas sadias (KUMAR *et al.*, 2015).

Outra abordagem tem sido a procura de resistência ao BBTV em diversos tipos de genótipos de bananeira. Inicialmente acreditava-se que todas as cultivares eram suscetíveis, embora algumas levassem mais tempo para desenvolver sintomas e outras fossem capazes de escapar da infecção por causa das preferências dos afídeos ou dos fatores morfológicos do hospedeiro. No entanto, trabalhos na Austrália sugeriram que *Musa coccinea*, uma espécie selvagem, e a cultivar Kluai Teparot (ABBB/ABB) podem ter resistência fisiológica (ELAYABALAN; SUBRAMANIAM; SELVARAJAN, 2015).

Estudos realizados para avaliar genótipos de *Musa* para resistência e/ou tolerância ao BBTV encontraram plantas como a “Gros Michel” sem sintomas e desempenho quase normal de plantas infectadas por vírus, ou ainda atraso na expressão dos sintomas, observado na “Dwarf Apple”, também conhecida como “Santa Catarina”, além de outras difíceis de infectar, como a “Fugamou” (NGATAT *et al.*, 2017; NIYONGERE *et al.*, 2011). Outra possibilidade que têm se mostrado bastante promissora é a obtenção de plantas transgênicas resistentes ao BBTV

(ELAYABALAN; SUBRAMANIAM; SELVARAJAN, 2015; SHEKHAWAT; GANAPATHI; HADAPAD, 2012).

Medidas culturais para controlar o topo em leque da bananeira envolvem a erradicação e substituição de plantas doentes por material de plantio indexado. Além disso, medidas como pulverização das plantas doentes com querosene ou inseticida para matar todos os pulgões virulíferos, destruição de todas as plântulas filhas, incluindo os rizomas e todas as partes vegetativas associadas, por desenraizamento e corte em pequenos pedaços ou por tratamento com herbicidas para evitar que o vírus se dissemine para outras hospedeiras alternativas. Esse controle deve ser empregado em toda a área de produção, para evitar a rápida reinfecção do material sadio plantado (KUMAR *et al.*, 2015; THOMAS; ISKRA-CARUANA; JONES, 1994).

REFERÊNCIAS

- ADEGBOLA, R. O. *et al.* First report of Banana bunchy top virus in banana and plantain (*Musa spp.*) in Nigeria. **Plant Disease**, [United States], v. 97, n. 2, p. 290-290, Feb. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30722330/>. Acesso em: 19 set. 2019.
- ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1999. 585 p.
- AMIN, I. *et al.* Molecular characterisation of Banana bunchy top virus (BBTV) from Pakistan. **Virus Genes**, [Dordrecht], v. 36, n. 1, p. 191-198, Feb. 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11262-007-0168-y>. Acesso em: 19 set. 2019.
- ANHALT, M. D.; ALMEIDA, R. P. P. Effect of temperature, vector life stage and plant access period on transmission of Banana bunchy top virus to banana. **Phytopathology**, [St Paul], v. 98, n. 6, p. 743-748, June 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18944300/>. Acesso em: 20 jun. 2019.
- ANON - ANNUAL REPORT. **Annual Report 1992 - Bananas, Plantains and INIBAP**. Montpellier: INIBAP, 1992. 64 p. Disponível em: <https://www.usakochan.net/download/annual-report-1992-banana-plantains-and-inibap/>. Acesso em: 14 out. 2020.
- BALDODIYA, G. M. *et al.* Molecular characterization and sequence analyses of Banana bunchy top virus infecting banana cultivar Jahaji (Dwarf Cavendish) in Assam, India. **3 Biotech**, [Heidelberg], v. 9, n. 3, p. 1-10, Feb. 2019. Disponível em: <https://europepmc.org/article/PMC/PMC6395470>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- BANANALINK. **All about bananas - And Why Bananas Matter...** 2022. Disponível em: <http://www.bananalink.org.uk/mozambique-banana-exports-increase>. Acesso em: 23 maio 2022.
- BANERJEE, A. *et al.* Identification and characterization of a distinct banana bunchy top virus isolate of Pacific-Indian Oceans group from North-East India. **Virus Research**, [Amsterdam], v. 183, p. 41-49, Apr. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170214000318>. Acesso em: 25 jan. 2020.
- BATIONO, A. *et al.* Waswa Knowing the African soils to improve fertilizer recommendations. In: KIHARA, J. *et al.* (eds.). **Improving Soil Fertility Recommendations in Africa Using the Decision Support System for Agrotechnology Transfer**. Heidelberg: Springer, 2012. p. 19-42.
- BEETHAM, P. R.; HARDING, R. M.; DALE, J. L. Banana bunchy top virus DNA-2 to 6 are monocistronic. **Archives of Virology**, [Wien], v. 144, n. 1, p. 89-105, July 1999. Disponível em: <https://www.deepdyve.com/lp/springer-journals/banana-bunchy-top-virus-dna-2-to-6-are-monocistronic-IuT0LSTJKR>. Acesso em: 23 set. 2019.

- BRESSAN, A.; WATANABE, S. Immunofluorescence localisation of Banana bunchy top virus (family Nanoviridae) within the aphid vector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct from aphid-transmitted luteoviruses. **Virus Research**, [Amsterdam], v. 155, n. 2, p. 520-525, Feb. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21167229/>. Acesso em: 22 jan. 2019.
- BRYCE, G. **The bunchy top plantain disease**. Department of Agriculture Ceylon, Leaflet 18. 1921. 2 p. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/abstract/20057002196>. Acesso em: 20 jun. 2020.
- CABI. **Banana bunchy top virus (bunchy top of banana)**. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford: UKCAB Int, 2021. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/8161>. Acesso em: 26 ago. 2021.
- CABI. **Distribution Maps of Plant Diseases 2013, map 19**. 6 ed. Wallingford: UKCAB Int, 2013. Disponível em: <https://www.cabi.org/ISC/abstract/20133421488>. Acesso em: 08 ago. 2021.
- CAPINERA, J. L. **Encyclopedia of entomology**. 2. ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 2008. 4346 p.
- CASTILLO, B.; MARTINEZ, A. **Occurrence of bunchy top disease of banana in the Philippines**. *FAO Plant Prot. Bull.*, 1961. 9 v. p. 74–75.
- CHEN, Y.; HU, X. High-throughput detection of banana bunchy top virus in banana plants and aphids using real-time TaqMan (R) PCR. **Journal of Virological Methods**, [Amsterdam], v. 193, n. 1, p. 177-183, Oct. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166093413002279>. Acesso em: 21 set. 2020.
- CHERIAN, K. A. *et al.* Effect of banana bract mosaic disease on yield of commercial banana varieties in Kerala. In: **Proceedings of global conference on banana and plantain**. Bangalore, 2002. p. 28-31.
- DALE, J. L. Banana bunchy top: an economically important tropical plant virus disease. **Advances in Virus Research**, [Amsterdam], v. 33, p. 301–325, Jan. 1987. Disponível em: <http://europepmc.org/article/MED/3296696>. Acesso em: 12 set. 2019.
- DANTAS, J. L. L. *et al.* Melhoramento genético do mamoeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO DO PAPAYA BRASILEIRO, 5., 2011, Porto Seguro. **Anais [...]** Porto Seguro: Embrapa, 2011. p. 1-11.
- DARNELL-SMITH, G. P. "Bunchy top" disease in banana. **Queensland Agricultural Journal**, [New Zealand], n. 21, p. 169-179, 1924. Disponível em: <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=13319>. Acesso em: 7 maio 2019.
- DENHAM, T. P. *et al.* Origins of agriculture at Kuk Swamp in the highlands of New Guinea. **Science**, [New York], v. 301, p. 189-193, July 2003. Disponível em: <http://faculty.washington.edu/plape/pacificarchaut12/Denham%20et%20al%202003.pdf>. Acesso em: 20 set. 2019.

- DIETZGEN, R. G.; THOMAS, J. E. Properties of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Hawaii, Indonesia and Tonga. **Australasian Plant Pathology**, [Austrália], v. 20, n. 4, p. 161-165, 1991. Disponível em: <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=2643>. Acesso em: 23 jan. 2021.
- DIJKSTRA, J.; KHAN, J. A. Description of single-stranded DNA viruses. In: KHAN, J. A.; DIJKSTRA, J. (eds.). **Handbook of Plant Virology**. New York: Food Products Press, 2006. p. 419-429.
- DONISETI, M. **Levantamento preliminar de pulgões no estado do Amapá**. Macapá, 2004. Circular Técnica 32. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAF-AP/8418/1/Circular200432.PDF>. Acesso em: 20 set. 2019.
- ELAYABALAN, S.; SUBRAMANIAM, S.; SELVARAJAN, R. Banana bunchy top disease (BBTD) symptom expression in banana and strategies for transgenic resistance: A review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, [United Arab Emirates], v. 27, n. 1, p. 55-45, Jan. 2015. Disponível em: <https://www.ejfa.me/index.php/journal/article/view/643>. Acesso em: 12 jun. 2020.
- EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Global Database. **Banana bunchy top vírus (BBTV00)**. EPPO, 2021. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/BBTV00/distribution>. Acesso em: 15 jul. 2021.
- ESPINO, R. R. C. *et al.* **Evaluation of Philippine banana cultivars for resistance to bunchy-top and fusarium wilt**. Taiwan: ASPNET Book Series, 1993. p. 89-102.
- FAHMY, T. **A banana disease caused by a species of Heterodera**. Nairobi: Government Press, 1924. 2 p.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Occurrence of Banana Bunch Top Disease (BBTV) in Mozambique, international plant protection convention**. Rome: FAO, 2016. Disponível em: <https://www.ippc.int/en/countries/mozambique/pestreports/2016/12/confirmation-of-occurrence-of-banana-bunch-top-disease-bbttv-in-mozambique/>. Acesso em: 25 set. 2019.
- FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT statistical database**. FAOSTAT, 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/statistics/en/>. Acesso em: 10 dez. 2021.
- FENG, T.; WANG, J.; LIU, Z. Cloning and sequencing of genome of *banana bunchy top virus* Haikou isolate. **Acta Phytopathologica Sinica**, [New York], v. 40, p. 40-50, 2010.
- FERREIRA, S. A.; TRUJILLO, E. E.; OGATA, D. Y. **Banana Bunchy Top Virus**. College of Tropical Agriculture & Human Resources University of Hawaii at Manoa (CTAHR), 1997. 4 p. Disponível em: <http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-12.pdf>. Acesso em: 21 maio 2021.
- FERREIRA, S. A.; TRUJILLO, E. E.; OGATA, D. Y. **Bunchy top disease of bananas**. 1989. 2 p. Disponível em: <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/CFS-BAN-4A.pdf>. Acesso em: 20 set. 2019.

- FOURÉ, E.; MANSER, P. D. Note sur l'apparition au Gabon d'une grave maladie virale des bananiers et plantains: le bunchy top. **Fruits**, Paris, v. 37, n. 6, p. 409-414, Jan. 1982. Disponível em: <https://agritrop.cirad.fr/414190/>. Acesso em: 20 set. 2020.
- GADD, C. H. Bunchy top disease of Plantains. (A review). **Tropical Agriculturist**, [United States], v. 66, n. 1, p. 3–20, 1926. Disponível em: <https://www.cabi.org/ISC/abstract/19261100690>. Acesso em: 20 set. 2020.
- GAIN REPORT. **Agricultural economic fact sheet**. USDA Foreign Agricultural Service. Pretoria, South Africa, 2015. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/south-africa-agricultural-economic-fact-sheet-3>. Acesso em: 12 set. 2021.
- GEERING, A. D. W. *et al.* Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. **Journal of General Virology**, [England], v. 86, n. 10, p. 511-520, Feb. 2005a. Disponível em: <https://experts.umn.edu/en/publications/banana-contains-a-diverse-array-of-endogenous-badnaviruses>. Acesso em: 21 set. 2019.
- GEERING, A. D. W. *et al.* Banana contains a diverse array of endogenous *Badnaviruses*. **Journal of General Virology**, [London], v. 86, v. 2, p. 511-520, Jan. 2005b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15659772/>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- GEERING, A. D. W.; THOMAS, J. E. Search for alternative hosts of banana bunchy top virus in Australia. **Australasian Plant Pathology**, [Austrália], v. 26, p. 250-254, Dec. 1997. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1071/AP97040>. Acesso em: 8 set. 2019.
- GONDWE, W. T. *et al.* Banana bunchy top disease in Mozambique and Zambia. **Infomusa**, [New York], v. 16, n. 1/2, p. 38–39, 2007. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/abstract/20093155499>. Acesso em: 13 jan. 2021.
- GOVINDASWAMY, C. V.; PADMANABAN, P.; ALAGIANAGALINGAM, M. N. Studies on bunchy top disease of banana. **Madras Agricultural Journal**, [Madras], v. 64, n. 3, p. 205–206, 1977. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19781344925>. Acesso em: 12 set. 2020.
- HALBERT, S. E.; BAKER, C. A. *Banana bunchy top virus* and its vector *Pentalonia nigronervosa* (Hemiptera: Aphididae). **Pathology Circular**, [Florida], v. 417, n. 8, p. 1-7, 2015. Disponível em: <https://www.fdacs.gov/content/download/70059/file/Banana%20bunchy%20top%202015%20circular1.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2021.
- HARPER, G. *et al.* Detection of Banana streak virus in field samples of bananas from Uganda. **Annals of Applied Biology**, [Malden], v. 141, n. 3, p. 247-257, Aug. 2002. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/abstract/20033000050>. Acesso em: 20 set. 2019.
- HOOKS, C. R. R. *et al.* Comparative susceptibility of two banana cultivars to Banana bunchy top virus under laboratory and field environments. **Journal of Economic Entomology**, [Lanham], v. 102, n. 3, p. 897-904, June 2009. Disponível em: <https://gms.ctahr.hawaii.edu/gs/handler/getmedia.ashx?moid=3935&dt=3&g=12>. Acesso em: 3 jul. 2018.

HORSER, C. L. *et al.* Additional Rep-encoding DNAs associated with banana bunchy top virus. **Archives of Virology**, [Wien], v. 146, n. 1, p. 71-86, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11266219/>. Acesso em: 7 maio 2019.

HU, J. S. *et al.* Use of polymerase chain reaction (PCR) to study transmission of banana bunchy top virus by the banana aphid (*Pentalonia nigronervosa*). **Annals of Applied Biology**, [Malden], v. 128, p. 55-64, 1996. Disponível em: <https://www.deepdyve.com/lp/wiley/use-of-polymerase-chain-reaction-pcr-to-study-transmission-of-banana-zWh3Gi8ufu>. Acesso em: 20 fev. 2019.

HYDER, M. Z. *et al.* Evidence of recombination in the Banana bunchy top virus genome. **Infection Genetics and Evolution**, [Amsterdam], v. 11, n. 6, p. 1293–1300, Aug. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21539936/>. Acesso em: 13 maio 2019.

IITA - INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE. **Africa's leading partner for research for development**. 2021. Disponível em: <https://www.iita.org/home-replace/>. Acesso em: 23 jul. 2021.

ISLAM, N. *et al.* Genetic Diversity and possible evidence of recombination among Banana Bunchy Top Virus (BBTV) Isolates. **International Research Journal of Microbiology**, [New York], v. 1, n. 1, p. 1–12, Mar. 2010. Disponível em: <https://www.interestjournals.org/articles/genetic-diversity-and-possible-evidence-of-recombination-among-banana-bunchy-top-virus-bbttv-isolates.pdf>. Acesso em: 11 maio 2020.

JEGER, M. J. *et al.* Banana Diseases. In: GOWEN, S. (ed.). **Bananas and Plantains**. London: Chapman and Hall, 1995. p. 317-381.

JONES, D. R. Risk of spread of banana diseases in international trade and germplasm exchange. In: ACORBAT. MEMORIAS XV REUNIÓN, 27., 2002, Cartagena de Indias. **Anais [...]**. Cartagena de Indias, 2002.

JOOSTE, A. E. C.; WESSELS, N.; VAN DER MERWE, M. First report of *Banana bunchy top virus* in Banana (*Musa* spp.) from South Africa. **Plant Disease**, [United States], v. 100, n. 6, p. 1251, Mar. 2016. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-12-15-1422-PDN>. Acesso em: 8 abr. 2021.

KAGY, V. *et al.* First record of banana bunchy top disease in New Caledonia. **Australasian Plant Pathology**, [Austrália], v. 30, n. 71, p. 1, 2001. Disponível em: <https://rd.springer.com/content/pdf/10.1071/AP00065.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2020.

KAHLID, S., SOOMRO, M. H.; STOVER, R. H. First report of banana bunchy top virus in Pakistan. **Plant Disease**, [United States], v. 77, p. 101, 1993. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1993Abstracts/PD_77_101A.htm. Acesso em: 12 jun. 2020.

KARAN, M.; HARDING, R. M.; DALE, J. L. Evidence for two groups of banana bunchy top virus isolates. **Journal of General Virology**, [England], v. 75, n. 12, p. 3541-3546, Dec. 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7996145/>. Acesso em: 20 set. 2021.

- KAVINO, M. *et al.* Enhancement of growth and Panama wilt resistance in banana by in vitro co-culturing of banana plantlets with PGPR and endophytes. *In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL AND SUBTROPICAL FRUITS*, 1024., 2011. **Anais [...]**. ISHS, 2011. p. 277-282.
- KAWANO, S.; SU, H. Occurrence of banana bunchy top virus in Okinawa. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, [Japan], v. 59, p. 53, 1993. Disponível em: <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=16018>. Acesso em: 20 set. 2020.
- KENYON, L.; BROWN, M.; KHONJE, P. First report of banana bunchy top virus in Malawi. **Plant Disease**, [United States], v. 81, n. 9, p. 1096-1096, Sept. 1997. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/1997/September/Pages/81_9_1096.1.aspx. Acesso em: 12 jul. 2021.
- KHURANA, S. M. P. Occurrence of the banana aphid and its relation with banana bunchy top disease in Gorakhpur (U.P.). **Indian Journal of Horticulture**, v. 28, n. 2, p. 167-168, Jan. 1971. Disponível em: <http://indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijh&volume=28&issue=2&article=015>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- KING, A. *et al.* **Virus taxonomy**. London: Academic Press, 2011. 1338 p.
- KOLOMBIA, Y. *et al.* First report of banana bunchy top virus in banana (*Musa* spp.) and its eradication in Togo. **Plant Disease**, [United States], Apr. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33904335/>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- KUMAR, P. L. *et al.* *Banana bunchy top virus* in sub-Saharan Africa: investigations on virus distribution and diversity. **Virus Research**, [Amsterdam], v. 159, n. 2, p. 171-182, Aug. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170211001572>. Acesso em: 25 ago. 2019.
- KUMAR, P. L. *et al.* Biology, etiology, and control of virus diseases of banana and plantain. **Advances in Virus Research**, [Amsterdam], v. 91, p. 229-269, Dec 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25591881/>. Acesso em: 15 set. 2019.
- KUMAR, P. L. *et al.* First report of *Banana bunchy top virus* in banana and plantain (*Musa* spp.) in Angola. **Plant Pathology**, [Malden], v. 58, n. 2, p. 402-403, Apr. 2009. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2008.01974.x>. Acesso em: 20 ago. 2019.
- LEJJU, B. J.; ROBERTSHAW, P.; TAYLOR, D. Africa's earliest bananas? **Journal of Archaeological Science**, [London], v. 33, n. 1, p. 102-113, Jan. 2006. Disponível em: https://www.academia.edu/7647290/Africas_earliest_bananas. Acesso em: 12 set. 2020.
- LOKOSSOU, B. *et al.* Occurrence of Banana bunchy top virus in banana and plantain (*Musa* sp.) in Benin. **New Disease Reports**, [New York], v. 25, p. 13, Mar. 2012. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/132686505.pdf>. Acesso em: 12 maio 2020.

MADER - MINISTERIO DE AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL. **Indústria da banana em Moçambique - situação de Foc TR4 e BBTV**. Moçambique: MADER, 2018.

MAGEE, C. J. Investigation on the bunchy top disease of bananas. **Bulletin of the Council for Scientific and Industrial Research**, [Australia], n. 30, p. 1-88, 1927. Disponível em: <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=12192>. Acesso em: 15 set. 2018.

MAGEE, C. J. P. Some aspects of the bunchy top disease of banana and other *Musa* spp. **Journal and Proceedings of the Royal Society**, [New South Wales], 1953.

MAGEE, C. J. Transmission of bunchy top to banana varieties. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, [Australia], v. 14, p. 18-24, 1948. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Transmission-of-bunchy-top-to-banana-varieties.-Magee/37cf8e0045eb94401ac081390053771ccab6098e>. Acesso em: 12 set. 2018.

MANICKAM, K. *et al.* Early detection of banana bunchy top virus in India using polymerase chain reaction. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, [Hungary], v. 37, n. 1-3, p. 9-16, 2002. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/4795863>. Acesso em: 20 out. 2020.

MANSER, P. D. Bunchy top disease of plantain. **FAO Plant Protection Bulletin**, [s.l.], v. 30, p. 78-79, 1982. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Bunchy-top-disease-of-plantain.-Manser/edb6beb52940a4d552841f34de6edc5e5cb0ab61>. Acesso em: 25 jun. 2020.

MESQUITA, A. L. M.; COELHO JÚNIOR, E. **Biologia do pulgão da bananeira, pentalonía nigrónervasa cop., I forma aptera**. Brasília: EMBRAPA-CNPMF, 1983. 16 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/638019>. Acesso em: 02 out. 2020.

NEWAG. **Rearing its ugly head – bunchy top disease**. New Agriculturist, 2009. Disponível em: <https://www.new-ag.info/09/01/focuson/focuson5.php>. Acesso em: 20 set. 2021.

NGATAT, S. *et al.* Relative susceptibility of *Musa* genotypes to banana bunchy top disease in Cameroon and implication for disease management. **Crop Protection**, [Oxford], v. 101, p. 116-122, Nov. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219417302156>. Acesso em: 30 out. 2020.

NIYONGERE, C. *et al.* Screening *Musa* genotypes for banana bunchy top disease resistance in Burundi. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 897, n. 897, p. 439-447, May 2011. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/299848>. Acesso em: 20 set. 2020.

NIYONGERE, C. *et al.* Towards understanding the diversity of banana bunchy top virus in the Great Lakes region of Africa. **African Journal of Agricultural Research**, [Nigeria], v. 10, n. 7, p. 702–709, Jan. 2015. Disponível em: <https://www.rtb.cgiar.org/publications/towards-understanding-the-diversity-of-banana-bunchy-top-virus-in-the-great-lakes-region-of-africa/>. Acesso em: 12 jun. 2020.

NOMURA, E. S. *et al.* Desenvolvimento e produção da bananeira ‘Grande Naine’ sob diferentes densidades de plantio em região com ocorrência natural de Sigatoka-Negra. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 437-445, jun. 2013. Disponível em: <https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2016/09/banana-sigatoka.pdf>. Acesso em: 23 set. 2019.

OBEN, T. T. *et al.* Occurrence of banana bunchy top disease caused by the banana bunchy top virus on banana and plantain (*Musa* sp.) in Cameroon. **Plant Disease**, [United States], v. 93, n. 10, p. 1076-1077, Oct. 2009. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2009/October/Pages/93_10_1076.3.aspx. Acesso em: 30 out. 2020.

OLIVEIRA, M. R. V. *et al.* **Quarantine information and transit of plant propagation material**. Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, 2002. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/abstract/20023098869>. Acesso em: 20 set. 2020.

PEARSON, M. N.; GRISONI, M. Records of plant viruses for the Pacific Islands. **Australasian Plant Pathology**, [Austrália], v. 31, n. 1, p. 15–26, Jan. 2002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/225488019_Records_of_plant_viruses_for_the_Pacific_Islands. Acesso em: 20 set. 2020.

PERRIER, X. *et al.* Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [Washington], v. 108, n. 28, p. 11311-11318, 2011. Disponível em: <https://research.monash.edu/en/publications/multidisciplinary-perspectives-on-banana-musa-spp-domestication>. Acesso em: 13 dez. 2018.

PILLAY, M. *et al.* Presence of *Banana bunchy top* virus in Angola. **InfoMusa**, [s.l.], v. 14, p. 44-45, 2005.

PINILI, M. S. *et al.* Cross-transmission and new alternate hosts of *Banana bunchy top* virus. **Tropical Agriculture and Development**, [Africa], v. 57, n. 1, p. 1-7, Sept. 2013. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Cross-Transmission-and-New-Alternate-Hosts-of-top-Pinili-Nagashima/48cc91ae318208380c7ac8a3d0afae06a6cd9b5d>. Acesso em: 15 set. 2021.

PRICE, N. S. The origin and development of banana and plantain cultivation. *In*: GOWEN, S. (ed.). **Bananas and Plantains**. Dordrecht: World Crop Series. Springer, 1995.

QAZI, J. Banana bunchy top virus and the bunchy top disease. **Journal of General Plant Pathology**, [Tokyo], v. 82, n. 1, p. 2-11, Dec. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-015-0642-7>. Acesso em: 21 set. 2020.

RANDRIANJA, S.; ELLIS, S. **Madagascar: A Short History**. Chicago: University of Chicago Press, 2009.

RAO, X. Q. *et al.* Genetic diversity of banana bunchy top virus isolates from China. **Acta Virologica**, [Bratislava], v. 61, n. 2, p. 217–222, Jan. 2017. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/28523929>. Acesso em: 12 jun. 2020.

ROBSON, J. D.; WRIGHT, M. G.; ALMEIDA, R. P. P. Biology of *Pentalonia nigronervosa* (Hemiptera, Aphididae) on Biology of *Pentalonia nigronervosa* (Hemiptera, Aphididae) on Banana using different rearing methods. **Environmental Entomology**, [Lanham], v. 36, n. 1, p. 46-52, Feb. 2007. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/699240>. Acesso em: 12 jun. 2020.

SARDOS, J. *et al.* Hybridization, missing wild ancestors and the domestication of cultivated diploid bananas. **Frontiers in Plant Science**, [Lausanne], v. 13, p. 1-17, Oct. 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.969220/full>. Acesso em: 20 jan. 2023.

SELVARAJAN, R.; BALASUBRAMANIAN, V. Host–virus interactions in banana-infecting viruses. In: GAUR, R. K.; HOHN T.; SHARMA, P. (eds.). **Plant virus–host interaction molecular approaches and viral evolution**. United States: Elsevier Academic Press, 2014. p. 57-58.

SELVARAJAN, R.; BALASUBRAMANIAN, V.; SASIREKA, T. A simple, rapid and solvent free nucleic acid extraction protocol for detection of banana bunchy top virus by polymerase chain reaction and loop-mediated isothermal amplification. **European Journal of Plant Pathology**, [Dordrecht], v. 142, p. 389-396, Feb. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-015-0604-0>. Acesso em: 12 jan. 2020.

SELVARAJAN, R. *et al.* Molecular characterization of geographically different *banana bunchy top virus* isolates in India. **Indian Journal of Virology**, [Hisar], v. 21, n. 2, p. 110-116, Oct. 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13337-010-0020-1>. Acesso em: 20 set. 2020.

SHARMA, S. R. Banana bunchy top virus. **International Journal of Tropical Plant Diseases**, [New Delhi], v. 6, n. 1, p. 19-41, 1988.

SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R.; HADAPAD, A. B. Transgenic banana plants expressing small interfering RNAs targeted against viral replication initiation gene display high-level resistance to banana bunchy top virus infection. **Journal of General Virology**, [England], v. 93, n. 8, p. 1804-1813, Aug. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22552945/>. Acesso em: 19 set. 2019.

SINGH, R. P.; KURZ, J.; BOITEAU, G. Detection of stylet-borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, [Amsterdam], v. 59, n. 1-2, p. 189-196, May 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8793847/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

STANTON, D. *et al.* Evidence of inter-component recombination, intra-component recombination and reassortment in banana bunchy top virus. **Journal of General Virology**, [England], v. 93, n. 5, p. 1103-1119, May 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22278830/>. Acesso em: 20 set. 2019.

STOVER, R. H. **Banana, plantain and abaca diseases. Banana, plantain and abaca diseases**. Kew: Aspergillus & Aspergillosis, 1972. Disponível em: https://www.aspergillus.org.uk/books_and_theses/banana-plantain-and-abaca-diseases/. Acesso em: 18 set. 2020.

SU, H. J. *et al.* Biological and molecular categorization of strains of Banana bunchy top virus. **Journal of Phytopathology**, [Malden], v. 151, n. 5, p. 290-296, May 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0434.2003.00721.x>. Acesso em: 16 set. 2020.

SU, H. J.; WU, R. Y.; TSAO, L. Y. **Ecology of banana bunchy top virus disease**. In: PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT DEVELOPMENTS IN BANANA CULTIVATION TECHNOLOGY, 1993, Pingtung. **Anais [...]**. Pingtung, 1993. p. 308-312.

SUN, S. K. **Studies on bunchy top disease of banana**. 1961. 10 v. p. 82-109. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/abstract/19781344925>. Acesso em: 21 set. 2020.

SULYO, Y.; MUHARAM, A. Present status of banana bunchy-top disease in Indonesia. In: **Proceedings of the regional conference on plant quarantine support for agricultural development**. Malaysia, 1985. p. 10-12. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/abstract/19871328235>. Acesso em: 12 set. 2019.

THOMAS, J. E. *et al.* Bract mosaic. In: JONES, D. R. (ed.). **Diseases of Banana, Abacá and Enset**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. p. 253–256

THOMAS, J. E.; ISKRA-CARUANA, M. L.; JONES, D. R. **Musa disease fact sheet No 4 Banana bunchy top disease**. Montpellier: INIBAP, 1994.

TUSHEMEREIRWE, W. *et al.* Repaso de la distribución de las enfermedades y el estado de plagas en Africa. In: WORKSHOP ON BANANA IPM, NELSPRUIT (ZAF), 11., 1998, Nelspruit. **Anais [...]**. Nelspruit, 1998. p. 23-28.

VAKILI, N. G. Bunchy top disease of Bananas in the Central Highlands of South Vietnam. **Plant Disease Reporter**, [St. Paul], v. 53, p. 634-638, 1969. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19701100217>. Acesso em: 20 set. 2020.

VIRALZONE. **BBTV, genomic components**. 2009. Disponível em: https://viralzone.expasy.org/564?outline=all_by_species. Acesso em: 25 set. 2019.

VISHNOI, R.; RAJ, S. K.; PRASAD, V. Molecular characterization of an Indian isolate of *Banana bunchy top virus* based on six genomic DNA components. **Virus Genes**, [Dordrecht], v. 38, n. 2, p. 334-344, Feb. 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11262-009-0331-8>. Acesso em: 28 fev. 2019.

WARDLAW, C. W. **Banana diseases including plantain and abaca**. London: Longmans, Green, 1961. 648 p.

WATANABE, S.; GREENWELL, A. M.; BRESSAN, A. Localization, concentration, and transmission efficiency of *Banana bunchy top virus* in four asexual lineages of *Pentalonia aphids*. **Viruses**, [Basel], v. 5, n. 2, p. 758–776, Feb. 2013. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/5/2/758>. Acesso em: 23 jan. 2020.

WICKRAMAARACHCHI, W. A. R. T. *et al.* Molecular characterization of banana bunchy top virus isolate from Sri Lanka and its genetic relationship with other isolates. **VirusDisease**, [New York], v. 27, n. 2, p. 154–160, June 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27366766/>. Acesso em: 20 set. 2020.

YU, N. T. *et al.* Cloning and sequence analysis of two *Banana bunchy top virus* genomes in Hainan. **Virus Genes**, [Dordrecht], v. 44, n. 3, p. 488-494, June 2012. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2497060](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2497060). Acesso em: 25 set. 2019.

ZHOU, Z.; XIE, L. Status of banana diseases in China. **Fruits**, [Paris], v. 47, n. 6, p. 715–721, 1992. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/?target=%2fcabdirect%2fabstract%2f19952306285>. Acesso em: 12 set. 2019.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS CIENTÍFICOS**ARTICLE 1 - SURVEY OF THE *Banana bunchy top virus* (BBTV) IN BANANA CROPS LOCATED IN CHÓCKWÈ DISTRICT, SOUTHERN MOZAMBIQUE**

Artigo elaborado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2018).

Sandra Carvalho I. Mussa Barros¹, Antonia dos Reis Figueira^{2*}, Antônia Thalyta Lopes
Silveira², Edson A. Pozza²

¹Research Department in Agricultural Sciences, Pedagogical University of Maputo (UP-Maputo), Maputo, Mozambique.

²Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras, Minas Gerais State, Lavras, 37200-000, Brazil

*Corresponding author:

Antonia dos Reis Figueira

E-mail: antonia@ufla.br

ABSTRACT

With the recent introduction of the *Banana bunchy top virus* (BBTV) in Mozambique, where the banana crop is highly important, this country faces one of its biggest challenges to maintain the economic viability of this crop. BBTV is a very destructive virus and is considered one of the 100 most important pests globally. Despite its importance, research on BBTV in the region is still incipient, requiring a collective effort to support the adoption of efficient control measures. In this study, the surveys were made in four administrative areas in the district of Chóckwè, Gaza Province, to determine the distribution and incidence of the virus. The samples were collected from two banana cultivars in 23 production fields with the characteristic symptoms of banana bunchy top. DNA was extracted from these samples at the Laboratory of Biotechnology of Eduardo Mondlane University in Mozambique and transported to the Laboratory of Molecular Virology of the Federal University of Lavras in Brazil, where it was subjected to PCR for the diagnosis of BBTV. The PCR results showed an overview of the infection status in the surveyed fields, confirming the virus presence in 19 of the 23 sampled fields. The mean percentage of infection was 54.3%, with a minimum percentage of 20% (in the fields of farm 9) and a maximum percentage of 100% (in the fields of farm 2). No infected plants were found in the fields of Farm 6. The results highlighted the urgency to initiate the control of BBTV in Mozambique.

Keywords: BBTV incidence. BBTV distribution. PCR. Plant disease.

1 INTRODUCTION

The banana is great socioeconomic importance for Mozambique, not only because it generates income and jobs but also as a food source. According to the Ministry of Agriculture and Rural Development (MADER), Mozambique produces approximately 500,000 tons/year of banana, and this production comes from two sectors: the family sector, which accounts for 74.5%, and the commercial sector, which accounts for 25.5% (DIÁRIO ECONÔMICO, 2021).

Several factors can reduce banana production, especially viral diseases. Among them, banana bunchy top disease (BBTD) is one of the most economically important diseases in banana-producing areas of Africa, Asia and the South Pacific (FURUYA; KAWANO; NATSUAKI, 2005; HOOKS *et al.*, 2009). Due to the high destructive potential of the disease, the *Banana bunchy top virus* (BBTV) was listed as one of the 100 worst invasive species in the world and is one of the pathogens that is subjected to rigorous quarantine measures by the International Plant Protection Convention (IPPC) (GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE - GISD, 2020; IPPC, 2010; KUMAR *et al.*, 2011).

In the period from 1913 to 1920, the banana fields of Australia were completely destroyed by this disease (HOOKS *et al.*, 2009; MAGEE, 1927). In the 1990s, the first severe BBTD epidemic in Africa caused a drastic reduction in banana production in the Nkhatabay and Nkhotakota districts in Malawi, whose planted areas ranged from 3,500 ha to approximately 800 ha (KUMAR *et al.*, 2011; SOKO *et al.*, 2009). In 2016, this disease was discovered in Mozambique, in the district of Chókwè in the area called the First Zone, located within an irrigated region. Although there are no precise estimates of yield losses in Mozambique, approximately 90% yield loss was reported among susceptible cultivars such as AAA-Cavendish with high BBTD severity.

The propagation of BBTV over long distances occurs through infected planting material (suckers or seedlings from tissue culture), which introduced the pathogen to new areas, both within and among countries and continents. At short distances, dissemination can occur through both infected propagules and the banana aphid *Pentalonia nigronervosa* Coquerel (Hemiptera, *Aphididae*) (ANHALT; ALMEIDA, 2008; BRESSAN; WATANABE, 2011; HOOKS *et al.*, 2009; HU *et al.*, 1996; MAGEE, 1940; QAZI, 2016; WATANABE; GREENWELL; BRESSAN, 2013). Although *P. nigronervosa* was initially reported in association with species belonging to the families *Zingiberaceae* and *Araceae*,

morphological and morphometric studies confirmed that the aphids found on these plants are associated with other species (BHADRA; AGARWALA, 2010). This aphid is considered to have high specificity for *Musa* spp. hosts and has been found in almost all banana-producing countries (KUMAR *et al.*, 2011).

In Mozambique, information on BBTD has not yet been reported, making it necessary to conduct a survey to identify and determine its epidemiology in the region, aiming to develop more effective management strategies in the context of the small-scale agriculture system. In this study, BBTV was detected by polymerase chain reaction (PCR), and the incidence and distribution of the disease in Gaza Province (Chókwè district) was determined.

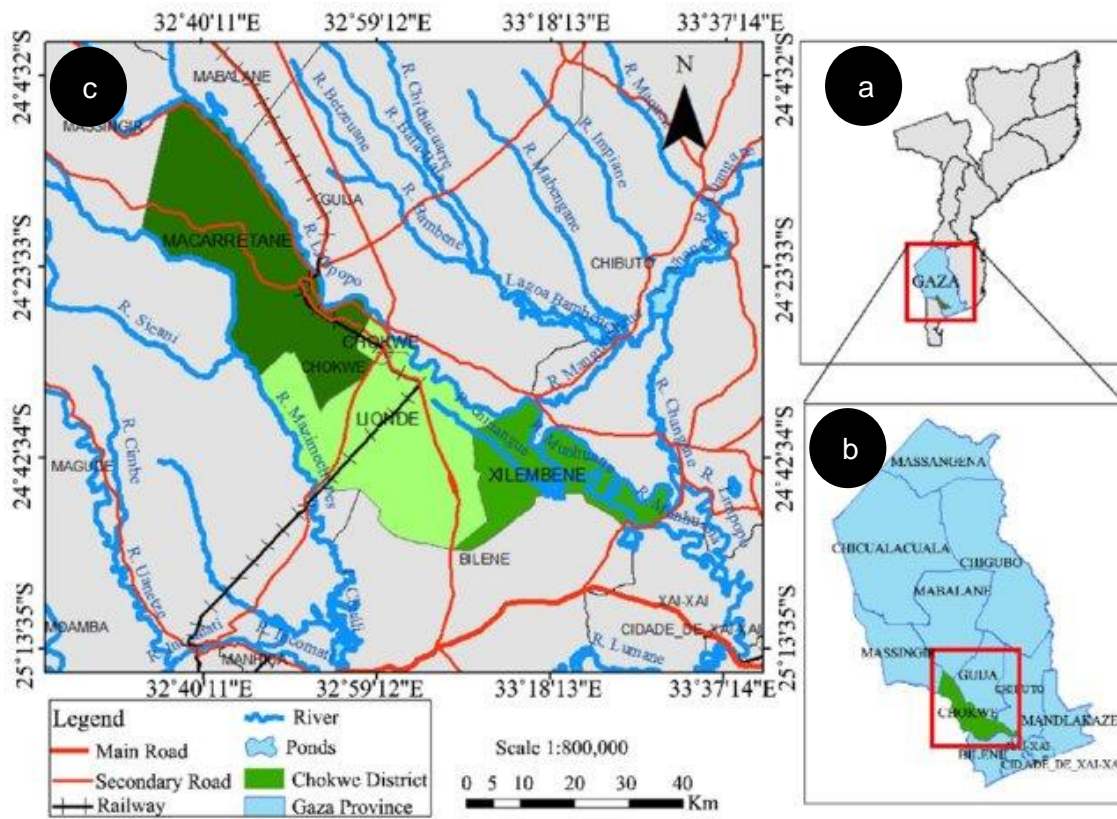
2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Sample collection

Samples, consisting of young leaves with suspected BBTV symptoms, were collected in 23 fields located on 11 farms in the 4 administrative areas of the district of Chókwè, Gaza Province, Mozambique (FIGURE 1), in January 2020. The district of Chókwè is located in the south of Gaza Province (FIGURE 1c), near the middle reaches of the Limpopo River, with the following geographical coordinates: 24°05' to 24°48' south latitude and 32°33' to 33°35' east longitude (UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME - UNDP, 2007). This province is bounded to the north by the Limpopo River, which separates it from the districts of Massingir, Mabalane and Guijá; to the south by the district of Bilene and the Mazimuchope River; to the east by the district of Chibuto; and to the west by the districts of Magude and Massingir.

The geographical coordinates of each sampled site were recorded using a portable GPS (TABLE 1 and FIGURE 2). In each field, an average of ten samples were collected; the samples were placed in Ziplock bags containing silica gel for preservation and transported to the laboratory of the Biotechnology Center of the Eduardo Mondlane University of Mozambique (UEM) for DNA extraction.

Figure 1 - Map of Chókwe district in Gaza province, Mozambique.



Note (a) Map of Mozambique; (b) District where the survey was carried out; (c) Administrative posts of the district where the samples were collected.

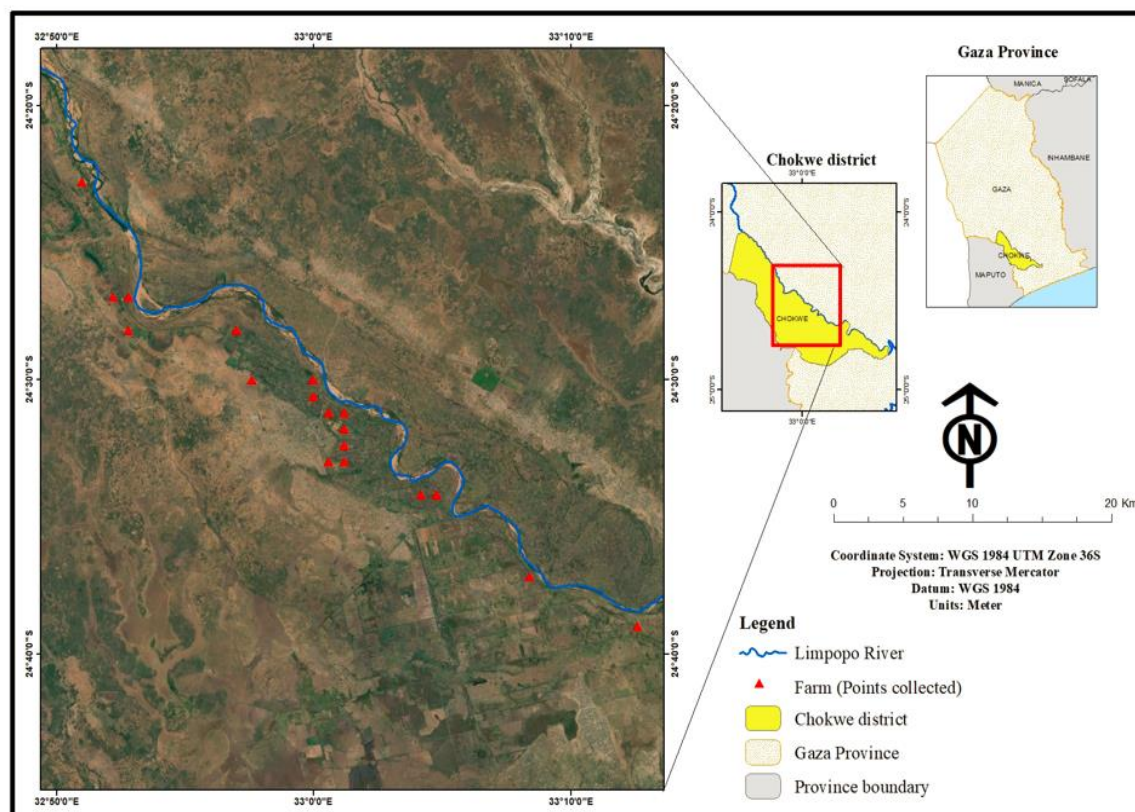
From: Sousa *et al.* (2020).

Table 1 - Geographic coordinates of the 11 sampled farms.

Farms	Fields	Coordinates	
		Latitude	Longitude
Farm 1	1	24°31'10.9"S	33°01'06.8"E
	2	24°33'04.8"S	33°01'19.4"E
	3	24°31'11.0"S	33°01'05.5"E
Farm 2	1	24°34'15.0"S	33°04'38.3"E
	2	24°34'12.5"S	33°04'36.8"E
	3	24°34'13.4"S	33°04'37.3"E
	4	24°34'17.2"S	33°04'23.3"E
Farm 3	1	24°31'58.6"S	33°01'11.8"E
	2	24°32'15.6"S	33°01'15.0"E
Farm 4.1	1	24°22'50.0"S	32°50'45.0"E
Farm 4.2	1	24°22'50.0"S	32°50'45.0"E
Farm 5	1	24°29'51.0"S	32°57'36.0"E
Farm 6.1	1	24°27'02.0"S	32°52'35.0"E
Farm 6.2	1	24°27'02.0"S	32°52'35.0"E
Farm 7	1	24°27'56.0"S	32°52'43.0"E
Farm 8	1	24°30'41.7"S	33°00'17.2"E
Farm 9	1	24°37'16.4"S	33°08'41.7"E
Farm 10	1	24°39'14.4"S	33°12'32.9"E
	2	24°39'14.4"S	33°12'32.9"E
	3	24°28'08.6"S	32°56'59.4"E
Farm 11	1	24°29'59.7"S	32°59'51.1"E
	2	24°30'01.1"S	32°59'51.9"E
	3	24°30'05.3"S	32°59'54.4"E

Source: From the author (2021).

Figure 2 - Map of surveyed locations in the district of Chókwe (indicated with red dots) where samples were collected.



Source: From the author (2021).

2.2 BBTV detection methodology

To confirm the identity of the virus, PCR was used, with primers specifically designed to flank the region of the S gene encoding the protein coat (forward: BBTV 67SF 5', CGTTTAGATGGGTTTGGG 3'; reverse: BBTV 784SR 5', CGTTTAGATGGGTTTGGG 3').

2.2.1 DNA extraction

To extract the DNA in the UEM laboratory, the protocol described by Lodhi *et al.* (1994) with minor modifications was used: 0.35 g of fresh plant tissue was macerated in the presence of liquid nitrogen, and then 1.5 mL of 2% cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA; 1.4 M NaCl; 80 mM Na₂SO₃; 2% Polivinilpirrolidona PVP-10 and 2% CTAB) containing 0.2% β mercaptoethanol was

added to the mixture. The macerated tissue was then transferred to a 1.5 ml sterilized microcentrifuge tube, and 750 μ l of extraction buffer with 2% PVP was added. Then, the mix were incubated at 60 °C for 30 minutes, and the tubes were mixed by immersion every ten minutes. A total of 750 μ l of chloroform: isoamyl alcohol solution (24:1) was then added, and the tubes were centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes at 23 °C.

The aqueous phase (supernatant) was transferred to new Eppendorf tubes, and the DNA was precipitated by adding 0.6 volumes of isopropanol and incubating at -20 °C for one hour. After centrifugation at 12,000 rpm for 10 minutes, the supernatant was discarded, and DNA was washed with 500 μ l of 70% ethanol and resuspended in 100 μ l of 1X Tris-EDTA Buffer. The tubes containing the extracted DNA were placed on dry ice and transported to Brazil to the Laboratory of Molecular Virology, Department of Phytopathology, Federal University of Lavras (UFPA), for further studies.

2.2.2 Polymerase chain reaction (PCR)

The DNA amplification reaction was performed with 2.5 μ l of 10X PCR buffer containing 15 mM MgCl₂, 2.0 μ l of 10 mM dNTPs, 1.0 μ l of the forward primer and 1.0 μ l of the reverse primer at a concentration of 10 μ M, 0.25 μ l of Taq DNA polymerase (Sigma, USA), 1.0 μ l of DNA and sufficient water for a total of 25 μ l of reaction. The amplification was performed in a Master Cycler Thermocycler (Eppendorf, Germany). The amplified products were analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel and contrasted with Gel Red (Biotium). The bands were visualized and documented using an Alpha Imager (Alpha Innotech Corp., USA).

2.3 Sampling scheme

To create a representative sample, BBTV focal sites were chosen in the four administrative areas of the Chóckwè district (Macarretane, Chókwé-Sede, Lionde and Xilembene) (FIGURE 1c) in the province of Gaza according to data from the MADER of Mozambique

To calculate the number of samples per location in each administrative area, Equation 1 was used:

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{d^2 \cdot (N-1)} + Z^2 \cdot p \cdot q \quad (\text{Equation 1})$$

where:

n is the number of samples to be collected;

Z is the tabulated value, referring to the abscissa of the standard normal curve, with a 90% confidence level, in this case 1.65;

p is 0.6, an estimate of the probability of finding BBTV in the sample, as determined by the virology laboratory of the Federal University of Lavras;

q is equal to 1-p;

N is the population size or total number of plants of the banana producers' fields in the administrative areas of the Chóckwè district, according to MADER data;

and d is the sampling error, i.e., the error attributed to the probability of finding or not finding a BBTV in the collected sample.

The estimated variable was disease incidence.

2.4 Data analysis

Microsoft Excel[®] software was used to organize the data, create tables, and calculate the mean incidence of the disease (Equation 2).

$$ID = \frac{UI}{UO} \cdot 100\% \quad (\text{Equation 2})$$

where:

DI is the incidence of disease (%);

IU is the number of units infested by the disease; and

UO is the total number of units observed.

The assumptions of the analysis of variance were evaluated from the residuals of the three assays; the residuals did not present a normal distribution according to the Shapiro–Wilk test ($P < 0.05$), and the homogeneity of variances was violated. Nonhomogeneous residuals ($P < 0.05$) were identified by the `ncvTest` function and by the Durbin-Watson independence test, where the residuals were correlated and there was no independence (P

<0.05). The analysis was performed with the `dwttest` function of the `lmttest` package for the R statistical program.

In the present study, the nonparametric Kruskal–Wallis test was performed using the `kruskal.test` function in the statistical program R (R CORE TEAM, 2021). This test allows the comparison of three or more groups of independent samples and is used in cases where ANOVA requirements are not met (KRUSKAL; WALLIS, 1952).

The histograms and maps of the 11 farms in the Chóckwè district were created with the `ggplot2` package for the R statistical program. For multiple comparisons (`compare_means`) between farms, the `ggpubr` package for R was used.

3 RESULTS

3.1 Detection of *Banana bunch top virus* (BBTV) in collected samples

The research was done in the south of Mozambique (Chóckwè district), where the BBTV outbreak was confirmed. This region consists of rural farmers practicing subsistence agriculture, harvesting bananas for their needs, and commercial producers. A total of 175 plant samples were collected from 11 farms. The symptoms of BBTV were observed in all the collected samples. Independent of the presence of symptoms, all of the samples collected, during field research, were investigated via PCR, and the positive samples produced an amplification of 718 bp, confirming the presence of the virus.

The infection level by farm varied from just a few infected plants to a complete infection of all plants.

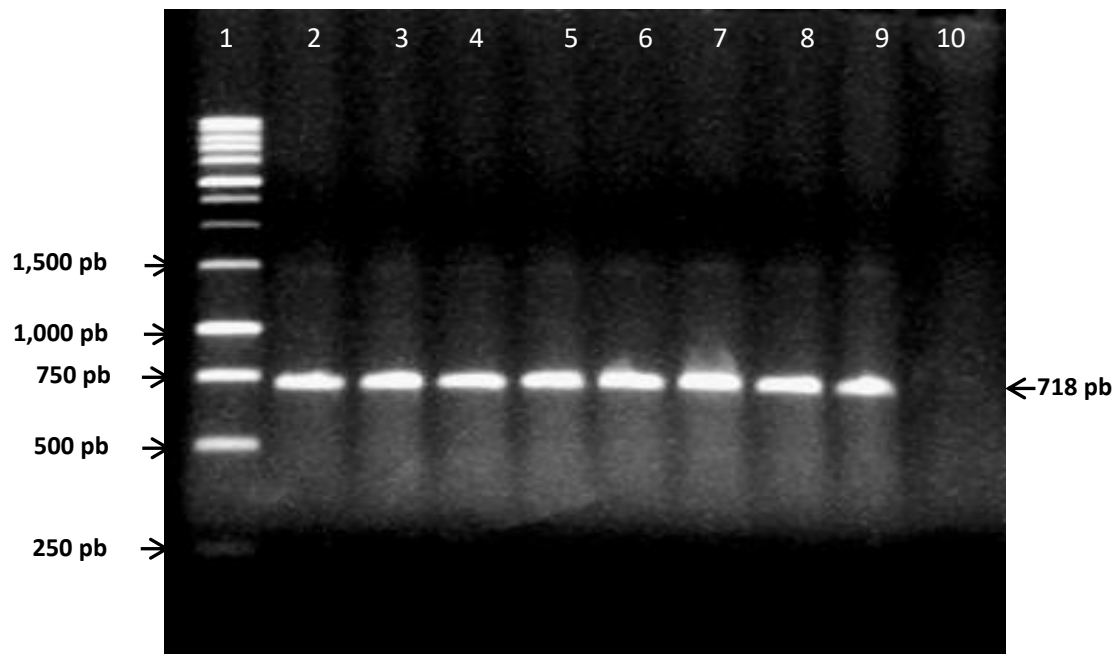
The results are listed in Table 2, and the PCR analysis in agarose gel is shown in Figure 3.

Table 2 - Number of diseased (positive) and healthy (negative) banana plants and the respective percentages of positive samples, when analyzed by PCR, in farms (fields) sampled in the district of Chóckwè.

Farms	Fields	N° of samples collected	Number of samples		Percentage (%) of sample		Total (%)
			Positive	Negative	Positive	Negative	
Farm 1	1	10	7	3	70	30	100
	2	10	10	0	100	0	100
	3	6	5	1	83,3	16,7	100
Average					84,4	15,6	100
Farm 2	1	10	10	0	100	0	100
	2	10	10	0	100	0	100
	3	6	6	0	100	0	100
	4	10	10	0	100	0	100
Average					100,0	0,0	100
Farm 3	1	9	5	4	55,6	44,4	100
	2	10	10	0	100	0	100
Average					77,8	22,2	100
Farm 4	B1	8	4	4	50	50	100
	B10	4	0	4	0	100	100
Average					25,0	75,0	100
Farm 5	1	10	8	2	80,0	20,0	100
Average					80,0	20,0	100
Farm 6	BI.1	7	0	7	0	100	100
	BII.1	3	0	3	0	100	100
Average					0,0	100,0	100
Farm 7	1	3	2	1	66,7	33,3	100
Average					66,7	33,3	100
Farm 8	1	10	3	7	30,0	70,0	100
Average					30,0	70,0	100
Farm 9	1	10	2	8	20,0	80,0	100
Average					20,0	80,0	100
Farm 10	1	10	4	6	40	60	100
	2	2	1	1	50	50	100
	3	3	0	3	0	100	100
Average					30	70	100
Farm 11	1	10	8	2	80	20	100
	2	10	7	3	70	30	100
	3	4	4	0	100	0	100
Average					83,3	16,7	100
Total	23	175	116	59			
Averages					54,3	45,7	100

Source: From the author (2021).

Figure 3 - Electrophoretic analysis of PCR products obtained from BBTV diagnostic tests on DNA samples extracted from banana trees suspected of being infected by the virus, 1- 1Kb marker, line from 2 to 9 samples that tested positive among those analyzed; 10 - Negative control.



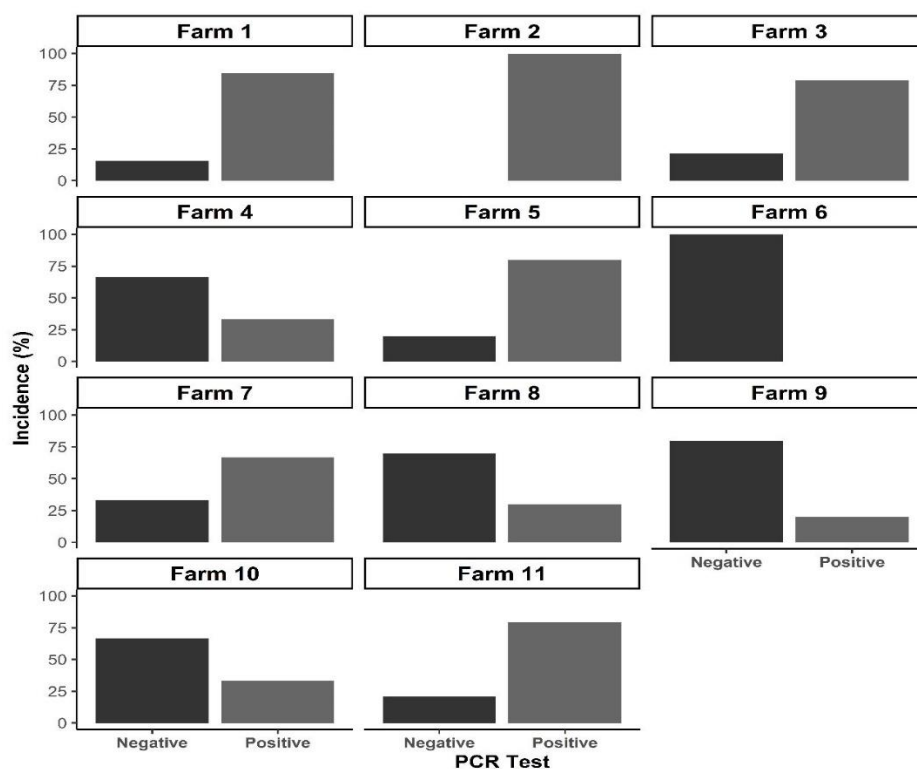
Source: From the author (2021).

3.2 Incidence and distribution of BBTV

The family producer's farms had a more significant number of positive samples (101 of 116 samples collected), with BBTV being detected in all the sampled areas. However, in commercial farms, the virus was found in two out of three properties tested (Farms 4 and 5), while the third farm's (6) land was the only one with no positive cases detected.

The higher incidence of positive samples was registered in Farm 2 (100%), followed by Farm 1 (84.4%), Farm 11 (83.3%), Farm 5 (80%), and Farm 3 (77.8%). The remaining Farms showed incidence levels below 70%, the lowest being Farm 9 (20%) (FIGURE 4).

Figure 4 - Average percentage of diseased (positive) and healthy (negative) plants from banana trees in the PCR test on 11 farms (fields) in the Chóckwè district.



Source: From the author (2021).

Based on the Kruskal-Wallis test results, the virus incidence was statistically different between most farms ($p < 0.05$) when compared in pairs (TABLE 3). This significant difference was found in 28 combinations, while 23 were not significant, with similar incidence levels. The more significant differences in incidence ($p\text{-value} < 0.0001$) were observed between Farms: 1 x 6, 2 x 4, 2 x 6, 2 x 8, 2 x 9, 2x 10, and 6 x11. According to the Kruskal-Wallis tests, when Farm 6 was compared to Farms 4, 8, 9, and 10, there was no statistical significance in their differential incidences.

It is interesting to note that Farm 6, where BBTv was not detected, is a commercial area with higher productivity, in which intense control methods are used, like roguing and establishing planted areas with indexed seedlings guaranteed to be healthy. On the other hand, the other sampled sites that presented more significant incidences belong to small farmers (rural) that do not use the proper technologies to manage the diseases in the field.

Table 3 - Comparison of the results from Kruskal-Wallis test regarding to the incidence of viruses among the studied fields (Continue).

Farms		Valor-p
Farm 1	Farm 2	0,0165*
Farm 1	Farm 3	0,6395 ^{ns}
Farm 1	Farm 4	0,0019**
Farm 1	Farm 5	0,7636 ^{ns}
Farm 1	Farm 6	< 0,0001**
Farm 1	Farm 7	0,4771 ^{ns}
Farm 1	Farm 8	0,0018**
Farm 1	Farm 9	0,0003**
Farm 1	Farm 10	0,0011**
Farm 1	Farm 11	0,6302 ^{ns}
Farm 2	Farm 3	0,0049**
Farm 2	Farm 4	< 0,0001**
Farm 2	Farm 5	0,0075**
Farm 2	Farm 6	< 0,0001**
Farm 2	Farm 7	0,0008**
Farm 2	Farm 8	< 0,0001**
Farm 2	Farm 9	< 0,0001**
Farm 2	Farm 10	< 0,0001**
Farm 2	Farm 11	0,0048**
Farm 3	Farm 4	0,0134*
Farm 3	Farm 5	0,9739 ^{ns}
Farm 3	Farm 6	0,0001**
Farm 3	Farm 7	0,6928 ^{ns}
Farm 3	Farm 8	0,0121*
Farm 3	Farm 9	0,0029**
Farm 3	Farm 10	0,0087**
Farm 3	Farm 11	1,0000 ^{ns}
Farm 4	Farm 5	0,0357*
Farm 4	Farm 6	0,0545 ^{ns}
Farm 4	Farm 7	0,3506 ^{ns}
Farm 4	Farm 8	0,9025 ^{ns}
Farm 4	Farm 9	0,5219 ^{ns}
Farm 4	Farm 10	1,0000 ^{ns}
Farm 4	Farm 11	0,0083**
Farm 5	Farm 6	0,0004**
Farm 5	Farm 7	0,7290 ^{ns}
Farm 5	Farm 8	0,0318*
Farm 5	Farm 9	0,0101*
Farm 5	Farm 10	0,0271*
Farm 5	Farm 11	0,9785 ^{ns}

Table 3 – Comparison of the results from Kruskal-Wallis test regarding to the incidence of viruses among the studied fields (Conclusion).

Farms		Valor-p
Farm 6	Farm 7	0,0104*
Farm 6	Farm 8	0,0767 ^{ns}
Farm 6	Farm 9	0,1675 ^{ns}
Farm 6	Farm 10	0,0500*
Farm 6	Farm 11	< 0,0001**
Farm 7	Farm 8	0,3173 ^{ns}
Farm 7	Farm 9	0,1706 ^{ns}
Farm 7	Farm 10	0,3268 ^{ns}
Farm 7	Farm 11	0,6685 ^{ns}
Farm 8	Farm 9	0,6506 ^{ns}
Farm 8	Farm 10	0,8909 ^{ns}
Farm 8	Farm 11	0,0076**
Farm 9	Farm 10	0,4984 ^{ns}
Farm 9	Farm 11	0,0016**
Farm 10	Farm 11	0,0050**

Source: From the author (2021).

This table reports p-values or the probability of two-by-two comparisons in the PCR test on farms in Chókwe district, Gaza province in Mozambique. The significance is also reported for the following levels: *p<0.05; **p<0.01

4 DISCUSSION

The presence of BBTv in Mozambique, as shown in this work, represents a significant threat to banana cultivation in the country, especially in the currently affected south region. In this study, the virus was identified via PCR, using primers especially designed to flank the S gene region, in practically all the sampled areas, except for one specific commercial farm.

Although no statistical difference was identified when the results from Farm 6 were compared to Farms 4, 8, 9, and 10 via the Kruskal-Wallis test, it should be considered that BBTv was not present at Farm 6 and was present in the other farms, in an average incidence between 20% to 30%. Therefore, the epidemiologic significance cannot be considered equal. That is because, in Farm 6, there will be no virus spreading as long as it is not introduced there. So, as aphids transport the virus, the incidences equal or superior to 20% constitute an essential source of inoculum that can be disseminated through the whole farm in a short

period, meaning an imminent risk for the producer (ALMEIDA *et al.*, 2009; DATO *et al.*, 2021; QAZI, 2016).

The high incidence in Farms 2, 1, 11, 5, 3, and 7 might be related to the fact that these areas have some semi-commercial fields more predominant, where taller varieties are exclusively produced (with restrictions) instead of smaller varieties (William). Robson *et al.* (2006) believe that the vector *Pentalonia nigronervosa* prefers smaller varieties, where it is mainly found. The rise of monoculture in these places might have favored its settlement (MEDEIROS *et al.*, 2011).

In turn, the low incidences of other farms (4, 8, 9, and 10) might be associated with the fact that its fields present at least two varieties of banana trees, one smaller (William) and the other taller (Cavendish), as well as being surrounded by other crops, especially leafy vegetables. In addition to the use of taller banana trees, unfavorable to the vector, the aphids are one of the main plagues of the vegetables in that region. Therefore, it is likely that the producer, when carrying out the control of these insects in the vegetables by way of defensive chemicals, can cause a spreading to banana groves in neighboring areas (ZAWADNEAK *et al.*, 2015).

Different scenarios can be proposed for the introduction of BBTV in Mozambique. First, the virus might have been disseminated by aphids from neighboring countries with which Mozambique is bordered. A second scenario is vegetative propagation, which enhances dissemination via infected seedlings. Therefore, the disease incidence in the Chókwè district might be associated with the fact that some local producers acquire banana seedlings with questionable health conditions, mainly from neighboring countries that have registered the disease occurring before (EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION - EPPO, 2021).

Thus, the exchange of propagation material, generally common among local producers, might cause the high incidence levels observed in the district, increased by the vector's participation in transmitting the virus. This movement of infected material from one area to the other may have significantly contributed to the rise in the disease's incidence in many places where BBTV was detected (DJAILO *et al.*, 2016; KOLOMBIA *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2015; MAGEE, 1927; QAZI, 2016), as it constitutes the primary source of inoculum for the dissemination through long distances, favoring the disease's spread (WALL, 2016).

The main socio-economic factors that contribute to the dissemination of the disease

are the lack of necessary financial funds to buy chemical products for the control of the pest *Pentalonia nigronervosa*; the resistance from local family producers in starting the proper removal of infected plant material; high costs related to the workforce and lack of resources; the time needed to eradicate a large number of plants and the scarcity of workers to answer the seasonal calendar. These factors generally do not affect large producers in commercial farms, as they are more likely to adopt effective management strategies involving chemical control of vectors and infected plant roguing. For small farmers to recover the productive yield of banana crops, there is a need for competent authorities to divulge the efficacy of consistent roguing and disease management (OMONDI *et al.*, 2020).

Niyongere *et al.* (2013) investigated the dissemination of BBTV from the banana crops of small farmers from Burundi, established by the offspring of mother plants and seedlings produced in fabric cultures from different cultivars, from areas localized in different distances from the inoculum's sources. They observed that nine months after the planting, in the crops established inside camps affected with BBTD, the incidence of the virus varied between 21.8% and 56%, getting more prominent with the diminishing inoculum distance. These same authors observed that the BBTD incidence was growing for two years, 2007 to 2009, having varied in intensity according to the cultivar.

Other than that, according to Murhububa *et al.* (2021), studies made in the Democratic Republic of the Congo showed that banana plants infected with BBTV, independent from genotype, were attractive to the wingless and winged aphids of *P. nigronervosa*, that could carry a more significant viral load. The plantains, which are a triploid hybrid (AAB) belonging to the species *Musa paradisiaca*, derived from the mixing *M. acuminata* x *M. balbisiana*, have also been more attractive than the dessert bananas, a strict triploid (AAA) belonging to the species *Musa acuminata*, independently of infection stage. According to these authors, the more considerable attraction of aphids by different varieties of bananas might be because of the larger quantities of volatile organic compounds (VOCs) expelled by different genotypes, independent from the plant's infection stage. In the same study, *P. nigronervosa* preferred to settle in infected banana trees (apparently, less susceptible to BBTV) than the Cavendish dessert banana (HOOKS *et al.*, 2009; SU; WU; TSAO, 1993). Indeed, dessert bananas are susceptible to many diseases due to their narrow genetic base (MURHUBUBA *et al.*, 2021).

This shows that, once present in the tillage, dissemination of the virus in the field is hard to be contained, even with intense practices of roguing, and once established, BBTD

was never completely eradicated from any country (JONES, 2009). However, if severe measures are not taken, banana cultivation is impracticable when this disease establishes itself in a particular region.

This way, for more effective control of BBTD, roguing must be accompanied by good practices, like monitoring plantings and using planting materials free of viruses.

The results of this study show that there was a uniform distribution of BBTV in Chókwè farms, alerting for the potential that BBTD has to spread geographically through all the regions that produce bananas in Mozambique. At the moment, the disease is circumscribed to the provinces of Maputo, Gaza, and Zambezia. Therefore, in addition to eliminating sick plants from the Chókwè region, the development and enforcement of educational programs by extension practitioners, as well as the use of indexed plants proven to be free of viruses and belonging to acceptable varieties by the local farmers are essential means of avoiding fast dissemination of BBTV. The data provided by this study, beyond allowing an update of the information about the occurrence and distribution of BBTV in banana crops from Mozambique, represents an essential contribution to the management actions that must be taken by extension practitioners, technicians, and local banana farmers.

5 CONCLUSIONS

BBTV was found in 116 samples from 10 farms in the Chókwè district, confirming its presence in more than 82% of the sampled fields. The mean percentage of infection was greater than 54%, with percentages varying between 20% and 100%. BBTV was absent only in banana fields located at Farm 6.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Coimbra group of Brazilian universities, the Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), the Pedagogical University of Mozambique and the Ministry of Agriculture and Rural Development of Mozambique (Department of Plant Health).

We also thank the students, technicians and professors of the Epidemiology and Plant Virology laboratories of the Federal University of Lavras (UFLA) and the Biotechnology Laboratory of the Eduardo Mondlane University of Mozambique for their assistance in

performing the analyses.

REFERENCES

- ALMEIDA, R. P. P. *et al.* Spread of an introduced vector-borne banana virus in Hawaii. **Molecular Ecology**, [Malden], v. 18, n. 1, p. 136-146, Jan. 2009. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19037897/>. Access at: 20 june 2019.
- ANHALT, M. D.; ALMEIDA, R. P. P. Effect of temperature, vector life stage and plant access period on transmission of *Banana bunchy top virus* to banana. **Phytopathology**, [St Paul], v. 98, n. 6, p. 743-748, June 2008. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18944300/>. Access at: 20 june 2019.
- BHADRA, P.; AGARWALA, B. K. A comparison of fitness characters of two host plant-based congeneric species of the banana aphid, *Pentalonia nigronervosa* and *P. caladii*. **Journal of Insect Science**, [Tucson], v. 10, n. 1, p. 140, 2010. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20883136/>. Access at: 30 sept. 2019.
- BRESSAN, A.; WATANABE, S. Immunofluorescence localisation of Banana bunchy top virus (family Nanoviridae) within the aphid vector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct from aphid-transmitted luteoviruses. **Virus Research**, [Amsterdam], v. 155, n. 2, p. 520-525, Feb. 2011. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21167229/>. Access at: 22 jan. 2019.
- DATO, K. M. G. *et al.* Spatial parameters associated with the risk of banana bunchy top disease in smallholder systems. **PloS One**, [San Francisco], v. 16, n. 12, p. e0260976, Dec. 2021. Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0260976>. Access at: 23 sept. 2022.
- DIÁRIO ECONÔMICO. **Moçambique Reforça Produção da Banana**. DE, 2021. Available in: <https://www.diarioeconomico.co.mz/2021/04/05/negocios/agronegocios/mocambique-reforca-producao-da-banana/>. Access at: 05 oct. 2021.
- DJAILO, B. D. *et al.* Systemicity of banana bunchy top viral infection in the Kisangani region of the Democratic Republic of Congo. **African Journal of Agricultural Research**, [Nigeria], v. 11, n. 7, p. 527-532, 2016. Available in: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/74522>. Access at: 24 june 2020.
- EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Global Database. **Banana bunchy top virus (BBTV00)**. EPPO, 2021. Available in: <https://gd.eppo.int/taxon/BBTV00/distribution>. Access at: 15 july 2021.

FURUYA, N.; KAWANO, S.; NATSUAKI, K. T. Characterization and genetic status of *Banana bunchy top virus* isolated from Okinawa, Japan. **Journal of General Plant Pathology**, [Tokyo], v. 71, n. 1, p. 68-73, Feb. 2005. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-004-0162-3>. Access at: 23 sept. 2019.

GISD - GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE. **100 of the World's Worst Invasive Alien Species**. GISD, 2020. Available in: http://www.iucngisd.org/gisd/100_worst.php. Access at: 17 aug. 2022.

HOOKS, C. R. R. *et al.* Comparative susceptibility of two banana cultivars to *Banana bunchy top virus* under laboratory and field environments. **Journal of Economic Entomology**, [Lanham], v. 102, n. 3, p. 897–904, June 2009. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19610400/>. Access at: 03 july 2018.

HU, J. S. *et al.* Use of polymerase chain reaction (PCR) to study transmission of *banana bunchy top virus* by the banana aphid (*Pentalonia nigronervosa*). **Annals of Applied Biology**, [Malden], v. 128, n. 1, p. 55-64, Feb. 1996. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.1996.tb07089.x>. Access at: 20 feb. 2019.

IPPC - INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONVENTION. **Banana Bunchy Top Virus, Available**. IPPC, 2010. Available in: <https://www.ippc.int/en/search/?q=&type=ippc.PestReport>. Access at: 20 june 2021.

JONES, D. R. Disease and pest constraints to banana production. **Acta Horticult ISHS**, [s.l.], v. 828, p. 21–36, May 2009. Available in: https://www.actahort.org/books/828/828_1.htm. Access at: 20 june 2020.

KOLOMBIA, Y. A. *et al.* First report of *banana bunchy top virus* in banana (*Musa* spp.) and its eradication in Togo. **Plant Disease**, [St Paul], v. 105, n. 10, p. 3312, Oct. 2021. Available in: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-03-21-0473-PDN>. Access at: 20 mar. 2022.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, [Alexandria], v. 47, n. 260, p. 583-621, Apr. 1952. Available in: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.1952.10483441>. Access at: 05 june 2021.

KUMAR, P. L. *et al.* *Banana bunchy top virus* in sub-Saharan Africa: investigations on virus distribution and diversity. **Virus Research**, [Amsterdam], v. 159, n. 2, p. 171-182, Aug. 2011. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170211001572>. Access at: 25 aug. 2019.

KUMAR, P. L. *et al.* Biology, etiology, and control of virus diseases of banana and plantain. **Advances in Virus Research**, [San Diego], v. 91, p. 229-269, Dec. 2015. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25591881/>. Access at: 15 sept. 2019.

LODHI, M. A. *et al.* Simple and efficient method for DNA extraction from grape vine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, [New York], v. 12, n. 1, p. 6–13, Mar. 1994. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02668658>. Access at: 05 june 2020.

MAGEE, C. J. Investigation on the bunchy top disease of bananas. **Bulletin of the Council for Scientific and Industrial Research**, [*s.l.*], v. 30, p. 1-88, 1927. Available in: <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=12192>. Access at: 20 june 2021.

MAGEE, C. J. P. Transmission studies on the banana bunchy-top virus. **The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, [Australia], v. 6, n. 2, p. 109-110, 1940. Available in: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19410500254>. Access at: 12 sept. 2018.

MEDEIROS, M. A. de *et al.* **Princípios e práticas ecológicas para o manejo de inseto-praga na agricultura**. Emater, 2011. Available in: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/888524/principios-e-praticas-ecologicas-para-o-manejo-de-insetos-praga-na-agricultura>. Access at: 05 sept. 2019.

MURHUBUBA, I. S. *et al.* Banana tree infected with banana bunchy top virus attracts *Pentalonia nigronervosa* aphids through increased volatile organic compounds emission. **Journal of Chemical Ecology**, [Dordrecht], v. 47, n. 8, p. 755-767, Sept. 2021. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34463893/>. Access at: 20 sept. 2022.

NIYONGERE, C. *et al.* Understanding banana bunchy top disease epidemiology in Burundi for an enhanced and integrated management approach. **Plant Pathology**, [Malden], v. 62, n. 3, p. 562-570, June 2013. Available in: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2012.02676.x>. Access at: 22 sept. 2019

OMONDI, B. A. *et al.* The effectiveness of consistent roguing in managing banana bunchy top disease in smallholder production in Africa. **Plant Pathology**, [Malden], v. 69, n. 9, p. 1754–1766, Dec. 2020. Available in: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.13253>. Access at: 22 sept 2020.

QAZI, J. *Banana bunchy top virus* and the bunchy top disease. **Journal of General Plant Pathology**, [Tokyo], v. 82, n. 1, p. 2-11, Jan. 2016. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-015-0642-7>. Access at: 21 sept. 2020.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, 2021. Available in: <https://www.scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2631126>. Access at: 20 june 2021.

ROBSON, J. D.; WRIGHT, M. G.; ALMEIDA, R. P. P. Within-plant distribution and binomial sampling of *Pentalonia nigronervosa* (Hemiptera: Aphididae) on banana. **Journal of Economic Entomology**, [Lanham], v. 99, n. 6, p. 2185–2190, Dec. 2006. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17195692/>. Access at: 20 mar. 2021.

SOKO, M. M. *et al.* Banana bunchy top disease survey reports, previous control efforts and the way forward. **Bvumbwe Agricultural Research Station**, [s.l.], v. 5748, p. 171–182, 2009.

SOUSA, L. S. de *et al.* Water flow and sediment flux forecast in the Chókwe Irrigation Scheme, Mozambique. **Journal of Water Resource and Protection**, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 1089-1122, Dec. 2020. Available in:
<https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=106314>. Access at: 20 june 2022.

SU, H. J.; WU, R. Y.; TSAO, L. Y. Ecology of banana bunchy top virus disease. *In: Proceedings of the international symposium on recent development in banana cultivation technology*. Philippines: INIBAPASPNET, 1993. p. 308–312.

UNDP - UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME. **MDG Achievement Fund – Environment and Climate Change Thematic Window**. MDG-F Terms of Reference. Madrid: MDG-F, 2007. Available in:
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.462.1402&rep=rep1&type=pdf>. Access at: 20 june 2021.

WALL, G. **Banana bunchy top virus prevention and control**. Western Pacific Tropical Research Center. University of Guam, 2016. Available in: <https://cnas-re.uog.edu/wp-content/uploads/2016/06/Banana-Bunchy-Top-Virus-Prevention-and-Control-1.pdf>. Access at: 20 june 2021.

WATANABE, S.; GREENWELL, A. M.; BRESSAN, A. Localization, concentration, and transmission efficiency of banana bunchy top virus in four asexual lineages of pentalonina aphids. **Viruses**, [Basel], v. 5, n. 2, p. 758–775, Feb. 2013. Available in:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23435241/>. Access at: 23 jan. 2020.

ZAWADNEAK, M. A. C. *et al.* **Olericultura: pragas e inimigos naturais**. SENAR–PR, 2015.

ARTIGO 2 - CARATERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Banana bunchy top virus* PROVENIENTES DO DISTRITO DE CHÓKWÈ EM MOÇAMBIQUE

Sandra Carvalho I. Mussa Barros¹, Antonia dos Reis Figueira^{1*}, Antonia Thalyta Lopes
Silveira¹

¹Departamento de fitopatologia (DFP), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras
37.200-900, Brasil.

*Autor correspondente:

Antonia dos Reis Figueira

E-mail: antonia@ufla.br

RESUMO

A doença denominada de topo em leque da bananeira, causada pelo *Banana bunchy top virus* (BBTV), foi recentemente detectada em Moçambique e, aparentemente, se encontra circunscrita às províncias de Gaza, Maputo e Zambézia. Entretanto tem grande potencial para se disseminar para outras províncias, devido ao sistema de cultivo adotado pelos produtores familiares, responsáveis por mais de 70% da produção no país. Apesar da sua importância, pouco se sabe sobre os isolados de BBTV que ocorrem em Moçambique, carecendo de pesquisas que possam oferecer suporte às medidas de manejo que devem ser tomadas com urgência. Com base na sequência do DNA-R os isolados de BBTV que ocorrem ao redor do mundo foram classificados em dois grupos: o grupo do Oceano Pacífico Índico (PIO) e o do Sudoeste Asiático (SEA). Esses dados auxiliam a inferir sobre a origem geográfica dos isolados, embasando medidas preventivas de controle. Neste trabalho a sequência dos genes S e R de 40 isolados escolhidos como representantes das amostras coletadas anteriormente em onze fazendas dos 4 postos administrativos do distrito de Chóckwè, província de Gaza, foram sequenciados e analisados. As sequências de nucleotídeos do DNA-S dos isolados analisados se mostraram bastante conservadas, variando de 97% a 100%. O mesmo foi observado para as sequências do DNA-R que apresentaram a grande maioria das identidades variando entre 98% e 100% entre os isolados de Chóckwè, e acima de 90% quando comparadas com os isolados do GenBank. A análise filogenética mostrou que esses isolados se comportaram como isolados PIO, apresentando maior proximidade com o isolado JQ820453 do Malawi em relação aos isolados dos países subsaarianos, que se agruparam num subclado distinto. Esse é o primeiro relato de estudos realizados com a finalidade de determinar as características moleculares dos isolados de *Banana bunchy top virus* presentes em Moçambique.

Palavras-chave: Nanovirus. Oceano Pacífico Índico (PIO). Sudoeste Asiático (SEA). Filogenia. DNA S. DNA R. Isolados da África Subsaariana (SSA).

ABSTRACT

The banana tree's so-called banana bunchy top disease, caused by the *Banana bunchy top virus* (BBTV), was recently detected in Mozambique, and is confined to the provinces of Gaza, Maputo, and Zambezia. Even so, it has great potential to spread to other provinces due to the cultivation system adopted by family producers, who are responsible for more than 70% of production in the country. Despite its importance, little is known about BBTV isolates occurring in Mozambique, lacking research supporting management measures that should be taken urgently. Based on the R-DNA sequence, the BBTV isolates that appear worldwide were classified into the Pacific Indian Ocean (PIO) group and the Southwest Asian (SEA) group. These data help to understand the geographic origin of the isolates, guiding preventive control measures. In this work, the sequence of the S and R genes of 40 isolates chosen as representatives of the samples previously collected in eleven farms of the 4 administrative posts of the Chóckwè district, Gaza province, were sequenced and analyzed. The S-DNA nucleotide sequences of the isolates analyzed were quite conserved, ranging from 97% to 100%. The same was observed for the R-DNA sequences, which presented the vast majority of identities ranging between 98% and 100% among Chóckwè isolates and above 90% compared with GenBank isolates. Phylogenetic analysis showed that these isolates behaved as PIO isolates, showing greater proximity to the Malawi JQ820453 isolates in relation to isolates from sub-Saharan countries, which were grouped into a distinct subclade. This is the first report of studies conducted to determine the molecular characteristics of the Banana bunchy top virus isolates in Mozambique.

Keywords: Nanovirus. Pacific Indian Ocean (PIO). Southwest Asia (SEA). Phylogeny. S-DNA. R-DNA. Sub-Saharan Africa (SSA) isolates.

1 INTRODUÇÃO

Bananas e plátanos constituem importante cultura alimentar e fonte diária de carboidratos para pelo menos 100 milhões de pessoas no continente africano (DOTTO; MATEMU; NDAKIDEMI, 2018; PERRIER *et al.*, 2011; SHARROCK; FRISON, 1998). A maior relevância da banana como alimento básico é exemplificada pela Uganda, onde o consumo per capita atinge cerca de 223 kg por pessoa por ano. Dos 20 milhões de toneladas de bananas produzidas nas regiões da África Oriental e Austral, apenas 1% é exportado, principalmente por Zimbabwé, Uganda e África do Sul. Cerca de 4% dos 11 milhões de toneladas produzidas na África Ocidental e Central é exportada, principalmente pela Costa do Marfim e Camarões (KARAMURA *et al.*, 1999; VILJOEN *et al.*, 2004).

Na África a produção de bananas e plátanos é frequentemente prejudicada por restrições biológicas e ambientais. Muitas pragas e doenças foram introduzidas no continente através de material de plantio infectado. Com a extensão da indústria da banana nos países africanos, essas doenças e pragas se espalharam para várias áreas novas. Em muitas áreas, patógenos causadores de doenças já se formaram em proporções epidêmicas. Os enormes custos envolvidos no controle de algumas dessas doenças tornam quase impossível continuar a produção de banana em áreas severamente afetadas (CHABI *et al.*, 2018).

Em Moçambique, bananas (*Musa spp.*) são produzidas principalmente em fazendas de pequena escala, no entanto, algumas fazendas em grande escala são encontradas em torno das províncias de Maputo-província, Gaza, Nampula e Manica. Essas fazendas cultivam principalmente variedades Cavendish e abastecem as grandes cidades como Maputo e Beira e os mercados da África do Sul, Botswana e Reino de eSwathini. Atualmente, as plantações (fazendas) de banana ocupam 62.000 ha em Moçambique, com uma estimativa de produção de 470.000 mil toneladas por ano (MINISTÉRIO DE AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL - MADER, 2018).

A produção nas fazendas de pequena escala no sul de Moçambique (província de Maputo e província de Gaza) é em média 45 toneladas por ha para uma área de produção de 3216 ha e é dificultada por várias pragas (nematóides e gorgulhos) e doenças (Sigatoka, Fusariose ou Mal do Panamá - Foc TR4 e atualmente o Topo em Leque da Bananeira), falta de conhecimento de produção, falta de variedades de alto desempenho, baixa fertilidade do solo e longos períodos de seca (particularmente no sul do país) (MADER, 2018). Dentre estas, a Fusariose ou Mal do Panamá (FocTR4) e o Topo em Leque da Bananeira (BBTD)

têm sido as mais importantes.

O topo em leque da bananeira, cujo agente etiológico é o *Banana bunchy top virus*, (BBTV) foi introduzido e relatado pela primeira vez na África Subsaariana (SSA) na década de 1960 na República Democrática do Congo (KUMAR *et al.*, 2011). Desde então, a disseminação do BBTV foi confirmada em 16 países nas regiões da África Central, Austral e Ocidental, tendo sido registrada pela primeira vez na África do Sul em 2015 (JOOSTE; WESSELS; VAN DER MERWE, 2016) e em Moçambique em junho de 2016, no perímetro irrigado do Chókwè, mais concretamente na localidade Primeira Zona, na província de Gaza (MADER, 2018).

O BBTV pertence ao Domínio *Monodnariria*, Reino *Shotokuvirae*, Filo *Cresnaviricota*, Classe *Arfiviricetes*, Ordem *Mulpavirales* Família *Nanoviridae* e Gênero *Babuvirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV, 2021). O BBTV afeta apenas os membros do gênero *Musa* e na natureza é transmitido de maneira persistente circulativa por seu único vetor conhecido, *Pentalonia nigronervosa* Coq (BELL *et al.*, 2002; HU *et al.*, 1996). O genoma do BBTV possui seis componentes de DNA de fita simples circular (ssDNA) (DNA-R, DNA-U3, DNA-S, DNA-M, DNA-C e DNA-N), cada um com cerca de 1 quilobase (kb) em tamanho (BURNS; HARDING; DALE, 1995). Cada componente potencialmente codifica uma proteína, exceto o DNA-R, que codifica duas proteínas ligadas à replicação viral (HERRERA-VALENCIA *et al.*, 2006; HORSER *et al.*, 2001).

O DNA-S codifica a proteína do capsídeo (CP), que forma partículas isométricas, e auxilia no empacotamento do genoma (JI *et al.*, 2019). DNA-C, -N e -M codificam a proteína de ligação do ciclo celular (Clink), a proteína de transporte nuclear (NSP) e a proteína de movimento (MP), respectivamente (AMIN *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2019; ZHUANG *et al.*, 2019). A função do DNA-U3 permanece desconhecida para o BBTV. Rep e CP são evolutivamente mais conservadas do que as outras proteínas e, portanto, servem como marcadores úteis para a identificação e classificação de vírus ssDNA (YU *et al.*, 2012).

O gene R tem sido empregado para a classificação dos isolados provenientes de diferentes países localizados em regiões geográficas distintas (KARAN; HARDING; DALE, 1994). São dois os grupos sugeridos: o do Oceano Pacífico indico (PIO) e o do Sudoeste Asiático (SEA), caracterizados por apresentarem uma diferença de identidade de aproximadamente 10% de diferença de nucleotídeos, enquanto que a diferença intragrupo varia de 1,9 a 3,0% (KARAN; HARDING; DALE, 1994).

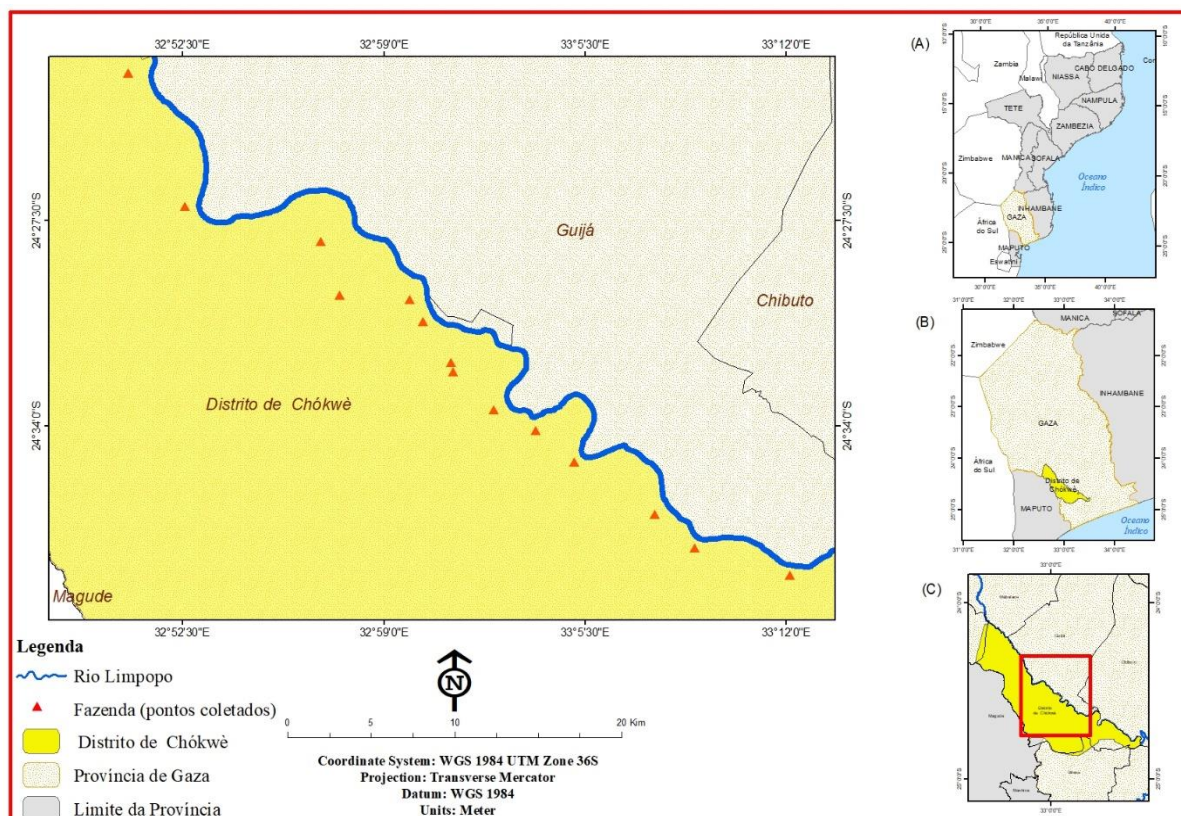
Em Moçambique ainda não foram relatadas as características genéticas dos isolados BBTV que ocorrem nos campos produtores localizados no sul do país. Esses dados poderiam permitir a inferência sobre a possível origem geográfica dos isolados virais presentes e embasar medidas preventivas relacionadas ao controle da disseminação viral no continente africano. Neste estudo o DNA-R e o DNA-S de 40 isolados, representantes dos 175 isolados coletados anteriormente em 23 localidades de 11 fazendas localizadas no distrito de Chókwè, foram sequenciados e analisados. Os resultados obtidos são aqui apresentados e discutidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados de BBTV analisados

Os 40 isolados de BBTV utilizados neste trabalho foram escolhidos proporcionalmente ao número daqueles provenientes de 23 campos, localizados em 11 fazendas, nos 4 postos administrativos do distrito de Chókwè (local inicial do surto), Província de Gaza (FIGURA 1B) em Moçambique (FIGURA 1A), com auxílio de pesquisadores do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique - IIAM e de produtores comerciais e familiares comprometidos com a produção de banana. Localizado ao sul da província de Gaza, o distrito de Chókwè (FIGURA 1C) apresenta as seguintes coordenadas geográficas 24°05' e 24°48' Latitude Sul; 32°33' e 33°35' Longitude Leste (UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME - UNDP, 2007).

Figura 1 - Distribuição geográfica dos isolados de BBTV coletados no distrito de Chókwe, Província de Gaza, Moçambique (indicados com pontos vermelhos).



Fonte: Da autora (2022).

2.2 Amplificação e análise dos genes S e R

2.2.1 Extração do DNA e PCR

O DNA total das plantas foi extraído a partir do tecido foliar no laboratório do Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane de Moçambique (UEM), segundo o protocolo de Lodhi *et al.* (1994). Para a extração foram macerados 0,35 g de tecido vegetal fresco na presença de nitrogênio líquido e, em seguida, foram adicionados 1,5 mL de tampão CTAB 2% (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 80 mM Na₂SO₃; 2% PVP-10 e 2% de brometo de cetil trimetil-amônio CTAB), contendo 0,2% de β mercaptoetanol. Depois de macerado o tecido foi transferido para um tubo de microcentrífuga esterilizado de 1,5 mL. Em seguida adicionaram-se 750 μl de tampão de extração com 2% de PVP e incubação a 60°C por 30 minutos, misturando-se os tubos por imersão a cada dez minutos. Um volume de 750 μl de solução clorofórmio: álcool isoamílico

(24:1) foi adicionado aos tubos e centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos a 23°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para novos tubos Eppendorf e o DNA precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e incubado a -20°C por uma hora. Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante, fez-se a lavagem do DNA com 500 µl de etanol a 70% e a ressuspensão em 100 µl de tampão TBE 1X. Os tubos contendo o DNA extraído foram acondicionados em gelo seco e transportados para o Brasil, para o Laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para os estudos posteriores.

Na reação de amplificação dos DNAs foram empregados primers especialmente desenhados para flanquear a região do gene S e a região do gene R, conforme especificado na Quadro 1.

Quadro 1 - Primers empregados para amplificação dos Genes R e S com as respectivas temperaturas de anelamento e fragmento amplificado.

Direção do primer e gene amplificado	Sequência	Tamanho do Gene	Fragmento amplificado
Foward gene S	67SF 5' CGTTTAGATGGGTTTGGG 3'	528 pb	718 pb
Reverse Gene S	784SR 5' CGTTTAGATGGGTTTGGG 3',		
Foward Gene R	32RF 5' CGGGACGGGACATTTGC 3'	861 pb	1007 pb
Reverse Gene R	1038SR 5' CGTTAGGATAGCACAATC3'		

Fonte: Da autora (2022).

A amplificação dos DNAs foi feita numa reação de 25 µl, sendo: 2,5 µl do tampão de PCR 10X contendo MgCl₂ a 15 mM; 2,0 µl de dNTPs a 10 mM; 1,0 µl do primer foward e 1,0 µl do primer reverse, na concentração de de 10 µM; 0,25 µl de Taq DNA polimerase (Sigma, EUA), 1,0 µl do DNA e água suficiente para um total de 25 µl de reação. A amplificação foi realizada no Termociclador Master Cycler (Eppendorf, Alemanha), com o seguinte programa: 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, de 49°C (DNA S) ou 52°C (DNA R) por 20 segundos e 72°C por 60 segundos, com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, contrastado com Gel Red (Biotium). As bandas foram visualizadas e documentadas usando Alpha Imager (Alpha Innotech Corp., EUA). Os produtos de PCR foram quantificados em ng/µl usando o espectrofotômetro NanoDrop ND-

1000 com limite de 1,80 valores na razão de absorbância A260/280.

2.2.2 Sequenciamento e análise das sequências dos DNAs S e R

Os produtos de PCR para cada um dos fragmentos do DNA-R e DNA-S (CP) foram purificados e enviados para sequenciamento na empresa brasileira FIOCRUZ. Os dados das sequências foram analisados usando o Programa de software BioEdit (versão 7.0.90) e NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos isolados estudados com os demais isolados virais disponíveis no *GenBank* (QUADRO 2), bem como a identidade entre eles, foram realizados utilizando o programa CRUSTAL W2 (V.2.0). Foram escolhidos isolados do grupo PIO, incluindo alguns isolados da África Subsaariana, e do grupo do SEA para comparação. Como “*out group*” foi utilizado um isolado de *Abaca bunchy top virus* (ABTV). As árvores filogenéticas foram construídas pelo método Neighbor-Joining (NJ) no programa MEGA7.02 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), utilizando bootstrap com 2.000 repetições.

Quadro 2 - Isolados do BBTv de DNA R e DNA S e o número de acessos disponíveis no *GenBank*, usados para comparação com os isolados Moçambicanos.

BBTV Grupo*	Origem	Nr de Acesso no GenBank (DNA R)	Referências	Origem	Nr de Acesso no GenBank (DNA S)	Referências
PIO	Egito	HQ259074	Islam <i>et al.</i> (2010)	Egito	KM607471	Stainton <i>et al.</i> (2015)
PIO	Egito	AF416465	Horser <i>et al.</i> (2001)	Egito	KM607470	Stainton <i>et al.</i> (2015)
PIO	Fiji	AF416466	Horser <i>et al.</i> (2001)	Tonga	KM607584	Stainton <i>et al.</i> (2015)
PIO	Malawi	JQ820453	James <i>et al.</i> (2011)	Malawi	JF755980	Kumar <i>et al.</i> (2011)
PIO	Ruanda	JQ820465	James <i>et al.</i> (2011)	Ruanda	JQ820467	James <i>et al.</i> (2012)
PIO	Tonga	AF416467	Horser <i>et al.</i> (2001)	Tonga	KM607550	Stainton <i>et al.</i> (2015)
PIO	Paquistão	AM418538	Amin <i>et al.</i> (2008)	Paquistão	MK140621	Bashir <i>et al.</i> (2022)
PIO	DRC	KM607635	Stainton <i>et al.</i> (2015)	DRC	KM607505	Stainton <i>et al.</i> (2015)
PIO	Austrália	KM607623	Stainton <i>et al.</i> (2015)	Austrália	KM607489	Stainton <i>et al.</i> (2015)
PIO	Burundi	KM607598	Stainton <i>et al.</i> (2015)	Burundi	KM607456	Stainton <i>et al.</i> (2015)
SEA	China	HQ616074	Yu <i>et al.</i> (2012)	China	KM607536	Stainton <i>et al.</i> (2015)
SEA	China	HQ378190	Yu <i>et al.</i> (2012)	China	AF238876	He <i>et al.</i> (2001)
SEA	Japão	AB108458	Furuya, Kawano e Natsuaki (2005)	Japão	AB078023	Kawabe e Onuki (2002)
SEA	Indonésia	AB186924	Furuya, Kawano e Natsuaki (2005)	Indonésia	MT433375	Rahayuniati <i>et al.</i> (2021)
SEA	Vietnam	AF416477	Bell <i>et al.</i> (2002)	Miamar	AB252644	Furuya e Natsuaki (2008)
SEA	Vietnam	AF416472	Bell <i>et al.</i> (2002)	Miamar	AB252642	Furuya, Kawano e Natsuaki (2006)
SEA	Japão	AB108455	Furuya, Kawano e Natsuaki (2005)	Malawi	JQ820455	James <i>et al.</i> (2012)
SEA	Taiwan	AF416468	Horser <i>et al.</i> (2001)	Taiwan	KM607468	Stainton <i>et al.</i> (2015)
SEA	Filipinas	AF416469	Horser <i>et al.</i> (2001)	Filipinas	KM607469	Stainton <i>et al.</i> (2015)
SEA	Indonésia	AB186925	Furuya, Kawano e Natsuaki (2005)	Indonésia	MT433376	Rahayuniati <i>et al.</i> (2021)
OuGR	Malásia	EF546813	Sharman <i>et al.</i> (2008)	Malásia	NC_010316	Sharman <i>et al.</i> (2008)

*Grupo PIO de acordo com análise do DNA R

Países da SSA a negrito

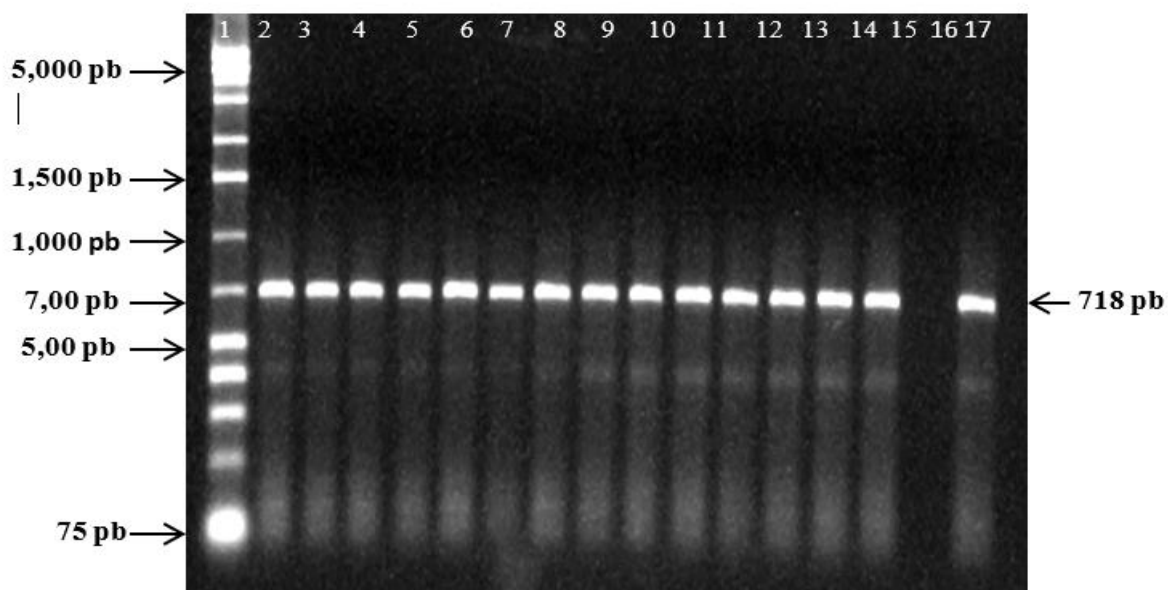
Fonte: Da autora (2022).

3 RESULTADOS

3.1. Amplificação dos genes S e R

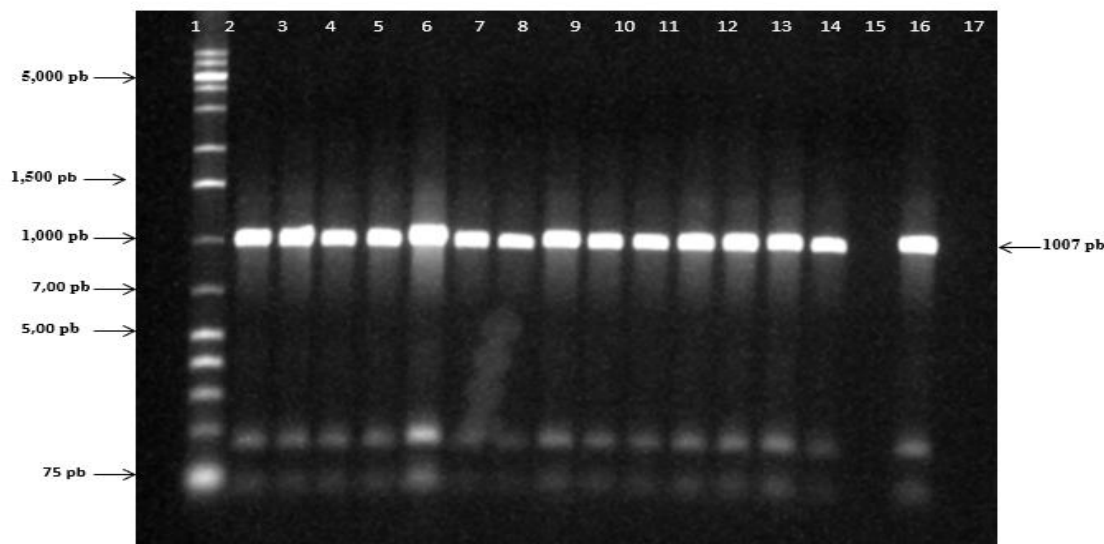
Foram sequenciados e analisados os 40 isolados de BBTV oriundos das onze fazendas dos 4 postos administrativos do distrito de Chóckwè, província de Gaza, Moçambique. As bandas amplificadas a partir do gene S podem ser vistas na FIGURA 2 e as do gene R na FIGURA 3.

Figura 2 - Análise eletroforética dos produtos de PCR gerados por gene DNA S de isolados de BBTV em catorze amostras diferentes: 1: marcador 1Kb; linha de 2 a 15 amostras que testaram positivas entre as analisadas; 16: controle negativo; 17: controle positivo.



Fonte: Da autora (2022).

Figura 3 - Análise eletroforética dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA R de isolados de BBTV em catorze amostras diferentes. 1: marcador 1Kb; 2 a 15: padrão de bandas dos isolados amplificados; 16: controle negativo; 17: controle positivo.



Fonte: Da autora (2022).

3.2 Análise das seqüências do DNA S do BBTV

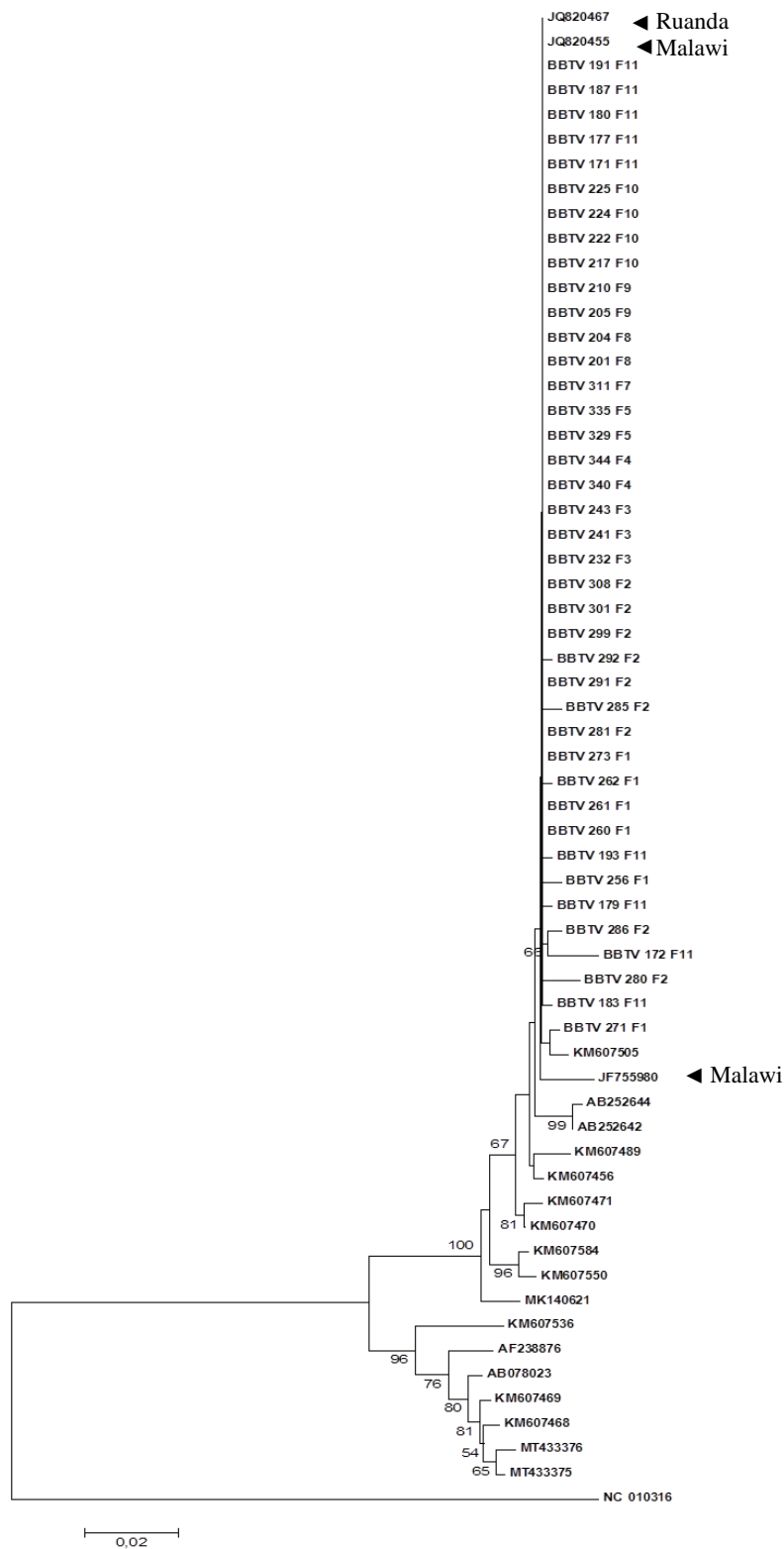
As identidades de nucleotídeos entre os 40 isolados coletados em Moçambique, sequenciados e analisados, entre os isolados provenientes de diversas regiões do mundo disponíveis no *GenBank* podem ser visualizadas no Quadro 3. Pode-se observar que esse gene é altamente conservado, apresentando mais de 50% dos isolados com identidade de 100% e identidade mínima de 98%. Quando comparados com os isolados do *GenBank*, as menores identidades observadas (92-93%) ocorreram com os isolados MT433376 e MT433375 da Indonésia, KM607468 do Taiwan, KM607469 das Filipinas, KM607536 e AF238876 da China e o AB078023 do Japão. As maiores identidades entre os isolados de Moçambique e os do *GenBank* ocorreram com os isolados JQ820467 da Ruanda, KM607470 do Egito, KM607505 da República Democrática do Congo (DRC), e os isolados JF755980 e JQ820455 do Malawi, todos do continente Africano, embora de regiões geográficas diferentes. Apenas Malawi se encontra em região circunvizinha, fazendo limite a oeste de Moçambique. Provavelmente esses isolados tiveram uma origem geográfica comum.

As identidades de aminoácidos entre estes mesmos isolados se encontram no Quadro 4. As identidades de aminoácidos observadas entre os isolados moçambicanos foram

semelhantes, com apenas sete isolados variando entre 96 e 99% e as demais apresentando 100% de identidade. Quando comparadas com os isolados do *GenBank*, além das maiores identidades já especificadas acima, apresentaram também altas identidades com os isolados do Sul e Sudeste Asiático e Sul do Pacífico: MK140621 do Paquistão AB252642 Míamar e KM607584 de Tonga. Destaques podem ser dados aos isolados BBTV_172_F11 de Moçambique e o AB078023 do Japão que apresentaram 98% e 93% de identidade de nucleotídeos, respectivamente, quando comparados com os demais isolados. A identidade de aminoácidos do isolado Moçambicano ficou entre 95 e 97% indicando que as substituições de nucleotídeos foram do tipo sinônima, enquanto que o isolado japonês apresentou identidades de aminoácidos entre 95 e 98%, indicando substituições do tipo sinônimas.

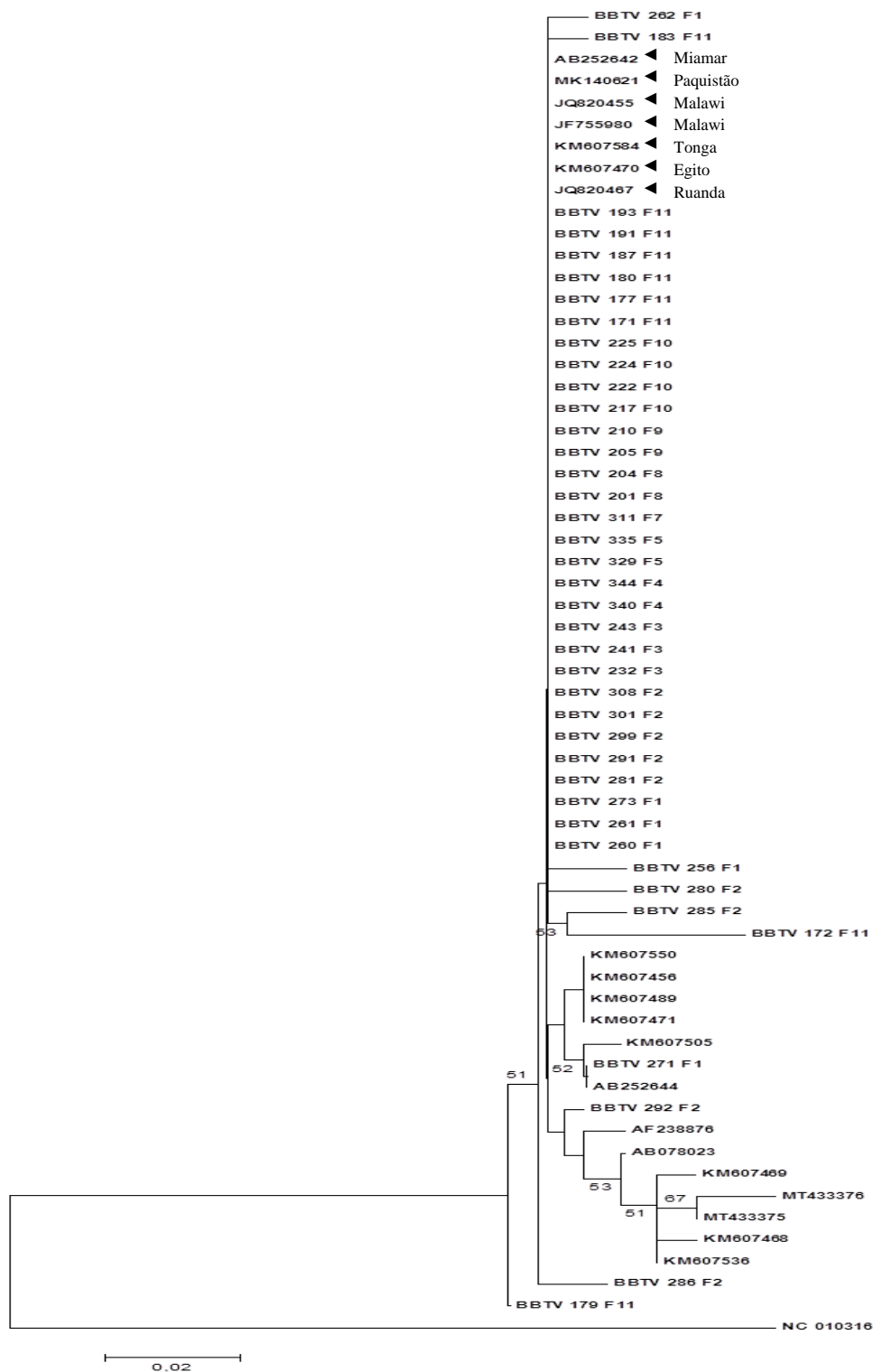
As Figuras 4 e 5 ilustram as árvores filogenéticas construídas com base na sequência de nucleotídeos e de aminoácidos, respectivamente, do DNA-S. Houve uma clara subdivisão dos isolados em dois clados, sendo um com os isolados da China, Japão, Filipinas, Taiwan e Indonésia e um com isolados Moçambicanos e os demais isolados do *GenBank*.

Figura 4 - Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do DNA S de isolados do BBTV coletados no distrito de Chókwe – Moçambique e isolados do *GenBank*. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA 7.0 e Neighbor Joining com 2.000 repetições.



Fonte: Da autora (2022).

Figura 5 - Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos do DNA S de isolados do BBTV coletados no distrito de Chókwe – Moçambique e isolados do *GenBank*. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA 7.0 e Neighbor Joining com 2.000 repetições.



Fonte: Da autora (2022).

Os isolados moçambicanos se agruparam no mesmo clado em que os isolados de Míamar, Malawi, Ruanda e DRC. Apesar de os isolados de: Míamar, Austrália, Burundi, Egito, Tonga, Paquistão e China, terem se agrupado no mesmo clado que os isolados moçambicanos, eles ocuparam subclados distintos.

Na árvore construída com base na sequência de aminoácidos, além dos isolados de Malawi e Ruanda os isolados de Míamar, Paquistão, Tonga e Egito também se agruparam com os isolados moçambicanos. Isso deve ter ocorrido devido as substituições de nucleotídeos serem sinônimas. Nesta árvore, alguns isolados se deslocaram e ocuparam outros subclados. O isolado BBTV_271_F1 ocupou um subclado juntamente com o isolado AB252644 de Míamar e o isolado KM607505 da DRC; o isolado BBTV_292_F2 ficou alocado em um subclado próximo aos isolados da China, Japão, Filipinas, Indonésia e Taiwan, enquanto que o isolado BBTV_286_F2 BBTV_179_F11 ficaram isolados em subclado e clado distintos.

3.3 Análises das sequências do DNA R do BBTV

As identidades de nucleotídeos do DNA R se encontram no Quadro 5. A exemplo do gene DNA S, o DNA R também se mostrou bastante conservado. Com exceção dos isolados BBTV_286_F2 e do BBTV_273_F1 que apresentaram identidades entre 93 e 96% quando comparados entre si, todos os demais isolados apresentaram identidades entre 98% e 100%. Quando comparados com os isolados PIO do *GenBank*, a identidade desses dois isolados foi de 94% a 96% enquanto que todos os demais isolados moçambicanos apresentaram identidade entre 96% e 99%. Por outro lado, quando comparados com os isolados SEA, os dois isolados apresentaram identidades entre 87 e 89%, enquanto que os demais apresentaram identidades entre 90 e 93%.

Ao se comparar a identidade entre os isolados PIO do *GenBank*, nota-se que eles apresentam identidade de 97% a 99% entre si e identidades entre 90 e 93% com os isolados SEA. Esses resultados permitiram inferir que os isolados que ocorrem em Moçambique são do tipo PIO, ou seja, pertencem ao grupo do Oceano Pacífico Índico.

As identidades de aminoácidos se encontram no Quadro 6. As identidades de aminoácidos entre os dois isolados citados anteriormente (BBTV_273_F1 e BBTV_286_F2) e os demais isolados moçambicanos foi menor que a de nucleotídeos, entre 91 a 93%, indicando que as substituições de nucleotídeos foram do tipo não sinônimas.

O mesmo foi notado com o isolado 3, cuja identidade de nucleotídeos variou de 94% a 99% e a de aminoácidos de 91% a 97%. A maioria dos isolados apresentou identidade igual a 100% quando comparados entre si, e de 97% a 100% quando comparados com os isolados do grupo PIO e 91% a 95% quando comparados aos isolados do grupo SEA.

A árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos se encontra ilustrada na Figura 6. Os isolados se agruparam em dois clados distintos, sendo um com os isolados do grupo PIO e outro com os isolados do grupo SEA. Todos os isolados moçambicanos se agruparam em um subclado com o isolado JQ820453 de Malawi. Os demais isolados do grupo PIO se agruparam no mesmo clado, porém reunidos em um subclado distinto.

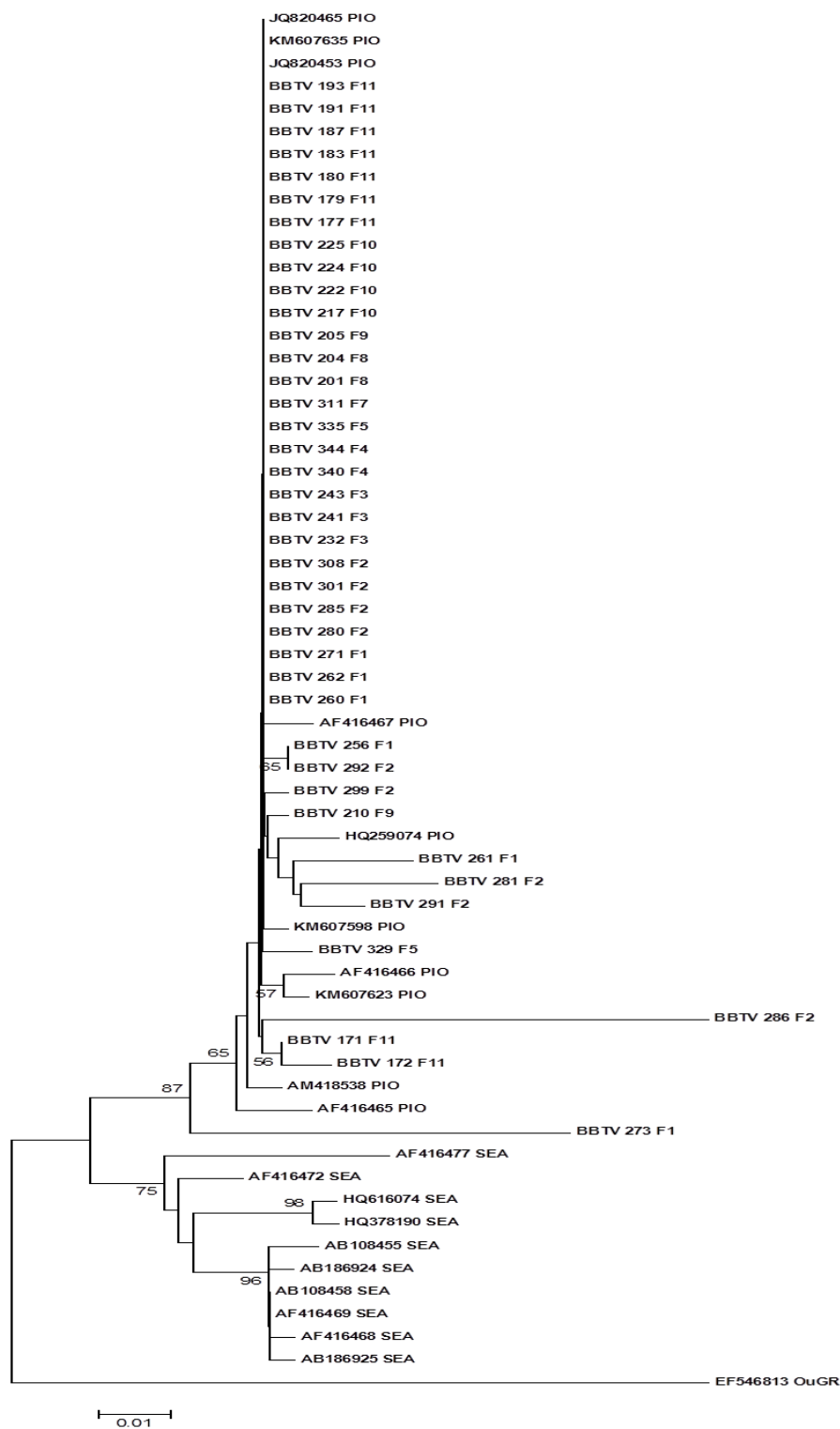
Na árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos (FIGURA 7) a distribuição foi ligeiramente diferente. Houve também uma separação dos isolados em dois clados, um com os isolados do grupo PIO e outro com os isolados do grupo SEA. Porém, além do isolado JQ820453 de Malawi, os isolados KM607635 da RDC, isolado JQ820465 da Ruanda e um pouco mais distante o isolado AF416467 de Tonga também se agruparam com a maior parte dos isolados moçambicanos. Outros oito isolados de Moçambique se misturaram aos isolados de diversas partes do mundo em diferentes combinações. Tanto os resultados das identidades como os da filogenia apontam para a classificação dos isolados estudados dentro do grupo PIO.

Figura 6 - Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do DNA R de isolados do BBTV coletados no distrito de Chókwè – Moçambique e isolados do *GenBank*. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA 7.0 e Neighbor Joining com 2.000 repetições.



Fonte: Da autora (2022).

Figura 7 - Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos do DNA R de isolados do BBTV coletados no distrito de Chókwè – Moçambique e isolados do *GenBank*. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA 7.0 e Neighbor Joining com 2.000 repetições.



Fonte: Da autora (2022).

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho os isolados moçambicanos de BBTv, provenientes do distrito de Chókwè, em Gaza, tiveram as sequências dos DNA R e DNA S sequenciadas e analisadas pela primeira vez, revelando informações inéditas sobre a sua classificação e possível origem geográfica.

As identidades de nucleotídeos do DNA R entre os 40 isolados analisados, revelaram que 38 deles apresentaram no máximo 2% de diferença, mostrando a alta conservação desse gene, já observado por autores de outras regiões do mundo. Adegbola *et al.* (2013) na Nigéria, também encontraram identidades de 100% entre os isolados locais. Outro estudo feito em Camarões por Oben *et al.* (2009) mostrou resultado semelhante, ou seja, 100% de homologia entre sequências dos isolados detectados.

Estudos filogenéticos realizados por Karan *et al.* em 1995 e revisados por Yu *et al.* em 2012, propuseram a classificação dos isolados do BBTv, com base na sequência de nucleotídeos, em dois grupos: Grupo do Pacífico Sul e Grupo Asiático. Os isolados moçambicanos apresentaram identidade maior com os isolados do grupo PIO, entre 97% e 99%, e menor identidade com os isolados do grupo SEA que foi entre 90% e 92%, indicando que os isolados moçambicanos pertencem ao primeiro grupo. Estes resultados foram corroborados pela distribuição dos isolados na árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos, que mostrou uma clara subdivisão dos isolados em dois clados distintos, com todos os isolados moçambicanos agrupados com os isolados do grupo PIO. Outros autores, estudando os isolados dos diversos países da África, também observaram que os isolados pertenciam ao grupo PIO (ABDEL-SALAM; DAHOT; SADIK, 2012; ADEGBOLA *et al.*, 2013; KARAN; HARDING; DALE, 1994; 1997; NIYONGERE *et al.*, 2015; OBEN *et al.*, 2009; WANITCHAKORN *et al.*, 2000).

O interessante foi observar que os isolados moçambicanos apresentaram uma grande proximidade com o isolado JQ820453 de Malawi, que é um país fronteiro a Moçambique, com o qual se limita a sul e a oeste. Isso demonstra que existe uma alta probabilidade de que os isolados Moçambicanos tenham sido provenientes deste país. Kumar *et al.* (2011) já haviam considerado o Malawi como um foco de disseminação do BBTv através da troca de material de plantio de cultivares preferidos entre os agricultores de países fronteiriços. Entretanto, é preciso considerar que a África do Sul também tem a presença do BBTv e faz fronteira com o Sul de Moçambique. Como não existem informações sobre as sequências do

gene completo do DNA R no *GenBank*, não pode ser incluído neste estudo. Porém, não se pode descartar a África do Sul como originária dos inóculos que chegaram à Malawi e a Moçambique, uma vez que ela se encontra geograficamente mais próxima do sul de Moçambique que o Malawi.

Pesquisas sobre a introdução de BBTV na África sub-sariana (SSA) indicaram que a chegada no BBTV na África pode ter ocorrido de duas maneiras: na República Democrática de Congo (RDC) em 1950 se deu provavelmente através de propágulos infectados trazidos do sul da Ásia ou Pacífico Sul (DALE, 1987; FOURÉ E MANSER, 1982; WARDLAW, 1961); na Guiné equatorial e no Gabão pode ter sido introduzida pelo afídeo *Pentalonia nigronervosa* infectado trazido por trabalhadores imigrantes das Filipinas. Em seguida supõe-se que tenha ocorrido uma disseminação para outros países da África (Ruanda, Burundi e República Centro Africana) (JEGER *et al.*, 1995; WARDLAW, 1961).

Esta virose é conhecida por ser amplamente prevalente nos países da África Central e no Malawi, na África Austral (KUMAR *et al.*, 2011). Até o momento a ocorrência da doença já foi relatada em 16 países da África Central e Austral (Angola, Benim, Egito, Nigéria, Gabão, Burundi, Camarões, República Centro-Africana, República Democrática do Congo (RDC), Congo, Guiné Equatorial, Malawi, Ruanda, Zâmbia, África do Sul e Moçambique) (EPPO, 2021).

Na análise do gene S entre si, observou-se que também é altamente conservado, com mais de 50% de isolados 100% idênticos entre si, considerando-se a identidade de nucleotídeos, sendo que a menor identidade foi de 98%. Também no caso do gene S, as maiores identidades de nucleotídeos foram observadas com os isolados do grupo PIO, destacando-se os isolados africanos JQ820467 da Ruanda, KM607470 do Egito, KM607505 da República Democrática do Congo (DRC), e os isolados JF755980 e JQ820455 do Malawi. A árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos, a exemplo do observado para o gene R, também mostraram uma maior proximidade com os com os isolados do grupo PIO, destacando-se os isolados RJQ820467 da Ruanda e o isolado JQ820455 do Malawi.

Considerando o perigo que esta doença constitui para a indústria da banana e para a segurança alimentar, são necessárias medidas urgentes de combate tais como a instalação de laboratórios de indexação e a disponibilidade de controles positivos de modo a aumentar a confiança no diagnóstico baseado em PCR, como a detecção e validação de isolados locais, o treinamento da equipe local de programas agrícolas e de extensão no reconhecimento e

controle da doença. Nesse contexto, torna-se urgente sensibilizar os agricultores e funcionários do governo sobre a doença e a necessidade de implementação de medidas de controle, incluindo (i) produção em grande escala e fornecimento de material de plantio gratuito livre do BBTV de variedades preferidas pelos agricultores para reabilitar a produção de banana nas regiões afetadas, prevenindo o uso de material de plantio infetado; (ii) educação dos agricultores na destruição do material infetado; (iii) maior vigilância fitossanitária e implementação estrita das respectivas medidas incluindo restrições à movimentação de materiais de plantio de regiões afetadas pela doença, principalmente naquelas que fazem fronteira com áreas afetadas pela BBTD; (iv) implementação de programas de conscientização entre agricultores, extensionistas e agências reguladoras; (v) treinamento para melhorar a capacidade de monitoramento e diagnóstico da doença; (vi) aplicação de normas de quarentena e práticas de cultivo integrado (ICP), destinadas a reduzir a propagação da doença e do afideo vector *Pentalonia nigronervosa* e (vii) fomentar e desenvolver programas robustos de pesquisa para identificar as variedades resistentes, as diferentes cepas do vírus e suas origens bem como a diversidade genética existente em cada região de produção de banana em Moçambique. Tais medidas são também recomendadas por diversos pesquisadores como James *et al.* (2012), Oben *et al.* (2009), Adegbola *et al.* (2013) e Ximba *et al.* (2022).

Considerando que a presença do vírus em Moçambique e nos países vizinhos constitui uma grande ameaça para as lavouras comerciais e para os produtores familiares de banana, cuja cultura é considerada de subsistência para esse segmento da população em Moçambique, essas ações são essenciais e precisam ser implantadas com urgência e depois sustentadas pelos órgãos governamentais.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo apontam para a classificação dos isolados moçambicanos dentro do grupo PIO, como o observado em Malawi. Este e outros resultados indicam que a introdução do BBTV em Moçambique tem uma grande probabilidade de ser provenientes de Malawi, através da propagação de material de infectado para plantio.

Esses resultados enfatizam a necessidade de pesquisas intensivas para avaliar a extensão da disseminação geográfica e a gravidade do BBTV em Moçambique e da

implementação de medidas de quarentena e fitossanitárias para evitar a propagação interna e trans-fronteiriça do vírus .

REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, S. M.; DAHOT, M. U.; SADIK, A. S. Molecular comparative analysis of component 1 (DNA-R) of an Egyptian isolate of banana bunchy top nanovirus isolated from banana aphid (*Pentalonia nigronervosa*). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [England], v. 10, n. 1, p. 55–65, June 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X12000212>. Acesso em: 22 jun. 2022.

ADEGBOLA, R. O. *et al.* First Report of Banana bunchy top virus in Banana and Plantain (*Musa spp.*) in Nigeria. **Plant Disease**, [United States], v. 97, n. 2, p. 290-290, Feb. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30722330/>. Acesso em: 22 jun. 2022.

AMIN, I. *et al.* Identification of a major pathogenicity determinant and suppressors of RNA silencing encoded by a South Pacific isolate of *Banana bunchy top virus* originating from Pakistan. **Virus Genes**, [Dordrecht], v. 42, n. 2, p. 272–281, Apr. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21161359/>. Acesso em: 20 out. 2022.

AMIN, I. *et al.* Molecular characterisation of *Banana bunchy top virus* (BBTV) from Pakistan. **Virus Genes**, [Dordrecht], v. 36, n. 1, p. 191-198, Feb. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17990091/>. Acesso em: 19 set. 2019.

BASHIR, S. *et al.* *Banana bunchy top virus* genetic diversity in Pakistan and association of diversity with recombination in its genomes. **Plos One**, [San Francisco], v. 17, n. 3, Mar. 2022. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0263875>. Acesso em: 20 jan. 2023.

BELL, K. E. *et al.* Characterization of rep-encoding components associated with banana bunchy top nanovirus in Vietnam. **Archives of Virology**, [Wien], v. 147, p. 695-707, Apr. 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s007050200019>. Acesso em: 22 set. 2022.

BURNS, T. M.; HARDING, R. M.; DALE, J. L. The genome organization of *banana bunchy top virus*: Analysis of six ssDNA components. **The Journal of General Virology**, [England], v. 76, p. 1471–1482, June 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7782775/>. Acesso em: 25 maio 2022.

CHABI, M. C. *et al.* Banana and plantain production systems in Benin: Ethnobotanical investigation, varietal diversity, pests, and implications for better production. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, [London], v. 14, n. 78, p. 1-18, Dec. 2018. Disponível em: <https://ethnobiomed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13002-018-0280-1>. Acesso em: 22 jan. 2022.

- DALE, J. L. Banana bunchy top: an economically important tropical plant virus disease. **Advances in Virus Research**, [Amsterdam], v. 33, p. 301–325, Jan. 1987. Disponível em: <http://europepmc.org/article/MED/3296696>. Acesso em: 12 set. 2019.
- DAS, T.; BANERJEE, A. Distribution, molecular characterization and diversity of *banana bunchy top virus* in Tripura, India. **VirusDisease**, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 157-166, June 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6003063/>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- DOTTO, J.; MATEMU, A.; NDAKIDEMI, P. Potential of cooking bananas in addressing food security in East Africa. **International Journal of Biosciences**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 278-294, Oct. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/329360823_Potential_of_Cooking_Bananas_in_Addressing_Food_Security_in_East_Africa. Acesso em: 19 jan. 2023.
- DUGDALE, B. *et al.* Promoter activity associated with the intergenic regions of *banana bunchy top virus* DNA-1 to-6 in transgenic tobacco and banana cells. **The Journal of General Virology**, [England], v. 79, n. 10, p. 2301-2311, Oct. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9780033/>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- DUGDALE, B. *et al.* Promoters derived from *banana bunchy top virus* DNA-1 to -5 direct vascular-associated expression in transgenic banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Reports**, [New York], v. 19, p. 810–814, July 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s002999900185.pdf?pdf=button>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- EPPO – EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Global Database. **Banana bunchy top virus (BBTV00)**. EPPO, 2021. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/BBTV00/distribution>. Acesso em: 15 jul. 2021.
- FERREIRA, S. A.; TRUJILLO, E. E.; OGATA, D. Y. **Bunchy top disease of bananas**. 1989. 2 p. Disponível em: <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/CFS-BAN-4A.pdf>. Acesso em: 20 set. 2019.
- FOURÉ, E.; MANSER, P. D. Note sur l'apparition au Gabon d'une grave maladie virale des bananiers et plantains: le bunchy top. *Fruits*, Paris, v. 37, n. 6, p. 409-414, Jan. 1982. Disponível em: <https://agritrop.cirad.fr/414190/>. Acesso em: 20 set. 2020.
- FURUYA, N.; KAWANO, S.; NATSUAKI, K. T. Characterization of genetic status of *banana bunchy top virus* isolated from Okinawa, Japan. **Journal of General Plant Pathology**, [Tokyo], v. 71, p. 68-73, Feb. 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10327-004-0162-3.pdf>. Acesso em: 23 set. 2019.
- FURUYA, N.; NATSUAKI, K. T. **Identification of banana viruses in Myanmar**. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/394326320>. Acesso em: 21 jan. 2023.

- GRIGORAS, I. *et al.* High variability and rapid evolution of a nanovirus. **Journal of Virology**, [Washington], v. 84, n. 18, p. 9105-9117, Sept. 2010. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.00607-10>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- HE, Z. *et al.* Cloning and sequencing of DNA component 1 of two BBTV strains. **Journal of Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 145-148, Jan. 2001. Disponível em: <https://europepmc.org/article/cba/348734>. Acesso em: 21 jan. 2023.
- HERRERA-VALENCIA, V. A. *et al.* An iterated sequence in the genome of *Banana bunchy top virus* is essential for efficient replication. **Journal of General Virology**, [England], v. 87, p. 3409-3412, Nov. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17030877/>. Acesso em: 23 jul. 2022.
- HORSER, C. L. *et al.* Additional Rep-encoding DNAs associated with *banana bunchy top virus*. **Archives of Virology**, [Wien], v. 146, n. 1, p. 71-86, Jan. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11266219/>. Acesso em: 7 maio 2019.
- HU, J. S. *et al.* Use of polymerase chain reaction (PCR) to study transmission of *banana bunchy top virus* by the banana aphid (*Pentalonia nigronervosa*). **The Annals of Applied Biology**, [Malden], v. 128, n. 1, p. 55-64, Feb. 1996. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.1996.tb07089.x>. Acesso em: 20 fev. 2019.
- ICTV - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **International Committee on Taxonomy of Viruses 9th Report**. ICTV, 2021. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/ssdna-viruses 2011/w/ssdna_viruses/150/nanoviridae-figures. Acesso em: 20 jan. 2022.
- ISLAM, M. N. *et al.* Genetic diversity and possible evidence of recombination among *Banana Bunchy Top Virus* (BBTV) isolates. **International Research Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 1-12, Mar. 2010. Disponível em: <https://www.interestjournals.org/articles/genetic-diversity-and-possible-evidence-of-recombination-among-banana-bunchy-top-virus-bbttv-isolates.pdf>. Acesso em: 11 maio 2020.
- JAMES, A. P. *et al.* **Molecular characterisation of *Banana bunchy top virus* isolates from Malawi and Rwanda**. July 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/394326320>. Acesso em: 10 jan. 2023.
- JAMES, A. P. **Viruses of Banana in East Africa**: Queensland University of Technology. 2011.
- JEGER, M. J. *et al.* Banana Diseases. In: GOWEN, S. (ed.). **Bananas and Plantains**. London: Chapman and Hall, 1995. p. 317-381.
- Ji, X. L. *et al.* *Banana bunchy top virus* (BBTV) nuclear shuttle protein interacts and re-distributes BBTV coat protein in *Nicotiana benthamiana*. **3 Biotech**, [Heidelberg], v. 9, n. 4, Apr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30863700/>. Acesso em: 20 jun. 2021.

JONES, D. R. Disease and pest constraints to banana production. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v. 828, p. 21–36, 2009. Disponível em: https://www.ishs.org/ishs-article/828_1. Acesso em: 20 jun. 2020.

JOOSTE, A. E. C.; WESSELS, N.; VAN DER MERWE, M. First report of *Banana bunchy top virus* in Banana (*Musa* spp.) from South Africa. **Plant Disease**, [United States], v. 100, n. 6, p. 1251, Mar. 2016. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-12-15-1422-PDN>. Acesso em: 8 abr. 2021.

KAHLID, S.; SOOMRO, M. H.; STOVER, R. H. First report of *banana bunchy top virus* in Pakistan. **Plant Disease**, [United States], v. 77, p. 101, 1993. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1993Abstracts/PD_77_101A.htm. Acesso em: 12 jun. 2020.

KARAMURA, E. B. *et al.* Banana production Systems in Eastern and Southern Africa. In: PICQ, C.; FOURÉ, E.; FRISON, E. A. (eds.). **Bananas and Food security. International Network for the improvement of Banana an Plantain**. France: Montpellier, 1999. p. 401-412.

KARAN, M. **Sequence diversity of DNA fragments associated with *Banana bunchy top virus***. 1995. PhD thesis - Queensland University of Technology, Australia, 1995.

KARAN, M.; HARDING, R. M.; DALE, J. L. Association of *Banana bunchy top virus* DNA components 2 to 6 with bunchy top disease. **Molecular Plant Pathology**, [Malden], p. 1-7, 1997. Disponível em: <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=8297>. Acesso em: 20 maio 2019.

KARAN, M.; HARDING, R. M.; DALE, J. L. Evidence for two groups of *banana bunchy top virus* isolates. **The Journal of General Virology**, [England], v. 75, p. 3541-3546, Dec. 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7996145/>. Acesso em: 20 set. 2021.

KAWABE, K.; ONUKI, M. ***Banana bunchy top virus* coat protein (CP) gene**. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/394326320>. Acesso em: 10 jan. 2023.

KENYON, L.; BROWN, M.; KHONJE, P. First report of *banana bunchy top virus* in Malawi. **Plant Disease**, [United States], v. 81, n. 9, p. 1096-1096, Sept. 1997. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/1997/September/Pages/81_9_1096.1.aspx. Acesso em: 12 jul. 2021.

KUMAR, H. R. *et al.* *Banana bunchy top virus* in sub-Saharan Africa: investigations on virus distribution and diversity. **Virus Research**, [Amsterdam], v. 159, n. 2, p. 171-182, Aug. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170211001572>. Acesso em: 25 ago. 2019.

- KUMAR, P. L. *et al.* First report of *Banana bunchy top virus* in banana and plantain (*Musa* spp.) in Angola. **Plant Pathology**, [Malden], v. 58, n. 2, p. 402-403, Apr. 2009. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2008.01974.x>. Acesso em: 20 ago. 2019.
- KUMAR, S.; STECHER G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, [Oxford], v. 33, n. 7, p. 1870-1874, July 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27004904/>. Acesso em: 20 ago.2021.
- LODHI, M. A. *et al.* Simple and efficient method for DNA extraction from grape vine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, [New York], v. 12, n. 1, p. 6–13, Mar. 1994. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02668658>. Acesso em: 5 jun. 2020.
- MAGEE, C. J. Investigation on the bunchy top disease of bananas. **Bulletin of the Council for Scientific and Industrial Research**, [s.l.], v. 30, p. 1-88, 1927. Disponível em: <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=12192>. Acesso em: 15 set. 2018.
- MANSER, P. D. Bunchy top disease of plantain. **FAO Plant Protection Bulletin**, [s.l.], v. 30, p. 78-79, 1982. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Bunchy-top-disease-of-plantain.-Manser/edb6beb52940a4d552841f34de6edc5e5cb0ab61>. Acesso em: 25 jun. 2020.
- MADER - MINISTERIO DE AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL. **Indústria da banana em Moçambique - situação de Foc TR4 e BBTV**. Moçambique: MADER, 2018.
- MUKWA, L. F. T. *et al.* Low genetic diversity of *Banana bunchy top virus*, with a sub-regional pattern of variation, in Democratic Republic of Congo. **Virus Genes**, [Dordrecht], v. 52, n. 6, p. 900-905, Dec. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27550369/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- NIYONGERE, C. *et al.* Towards understanding the diversity of *banana bunchy top virus* in the Great Lakes region of Africa. **African Journal of Agricultural Research**, [Nigeria], v. 10, n. 7, p. 702–709, Jan. 2015. Disponível em: <https://www.rtb.cgiar.org/publications/towards-understanding-the-diversity-of-banana-bunchy-top-virus-in-the-great-lakes-region-of-africa/>. Acesso em: 12 jun. 2020.
- OBEN, T. T. *et al.* Occurrence of Banana Bunchy Top Disease Caused by the *Banana bunchy top virus* on Banana and Plantain (*Musa* sp.) in Cameroon. **Plant Disease**, [United States], v. 93, n. 10, Oct. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30754355/>. Acesso em: 30 out. 2020.
- PILLAY, M. *et al.* Presence of *Banana bunchy top virus* in Angola. **InfoMusa**, [s.l.], v. 14, p. 44-45, 2005.

- PERRIER, X. *et al.* Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa spp.*) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [Washington], v. 108, n. 28, p. 11311-11318, July 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21730145/>. Acesso em: 19 jan. 2023.
- RAHAYUNIATI, R. F. *et al.* Recent distribution and diversity analysis on *banana bunchy top virus* of banana and alternative host in Indonesia. **Tropical Plant Pathology**, [United States], v. 46, p. 506–517, June 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-021-00443-3>. Acesso em: 21 dez. 2022.
- SELVARAJAN, R.; BALASUBRAMANIAN, V. Host–virus interactions in banana-infecting viruses. In: GAUR, R. K.; HOHN T.; SHARMA, P. (eds.). **Plant virus–host interaction molecular approaches and viral evolution**. United States: Elsevier Academic Press, 2014. p. 57-58.
- SHARMAN, M. *et al.* Abaca Bunchy Top Virus, a New Member of the Genus Babuvirus (family Nanoviridae)’. **Archives of Virology**, [Wien], v. 153, n. 1, p. 135–147, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17978886/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- SHARROCK, S.; FRISON, E. A. Musa production around the world-trends, varieties and regional importance. In: **Network for the Improvement of Banana and Plantain**. Montpellier: France, 1998.
- STAINTON, D. *et al.* Evidence of inter-bunchy top virus. **Journal of General Virology**, [England], v. 93, p. 103-119, May 2012. Disponível em: <https://asu.pure.elsevier.com/en/publications/evidence-of-inter-component-recombination-intra-component-recombi>. Acesso em: 23 out. 2022.
- STAINTON, D. *et al.* The global distribution of *banana bunchy top virus* reveals little evidence for frequent recent, human-mediated long distance dispersal events. **Virus Evolution**, [Oxford], v. 1, n. 1, p. 1-15, Sept. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27774281/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- THOMAS, J. E. *et al.* Bract mosaic. In: JONES, D. R. (ed.). **Diseases of Banana, Abacá and Enset**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. p. 253–256.
- TUSHEMEREIRWE, W. *et al.* Repaso de la distribución de las enfermedades y el estado de plagas en Africa. In: WORKSHOP ON BANANA IPM, NELSPRUIT (ZAF), 11., 1998, Nelspruit. **Anais [...]**. Nelspruit, 1998. p. 23-28.
- UNDP - UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME. **MDG Achievement Fund – Environment and Climate Change Thematic Window**. MDG-F Terms of Reference. Madrid: MDG-F, 2007. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.462.1402&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 12 jun. 2020.

- VENKATARAMAN, S.; SELVARAJAN, R. Recent advances in understanding the replication initiator protein of the ssDNA plant viruses of the Family Nanoviridae. **VirusDisease**, [s.l.], v. 30, p. 22–31, Mar. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6517469/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- VILJOEN, A. *et al.* Biotechnology for sustainable banana and plantain production in Africa: the South African contribution. **South African Journal of Botany**, [Amsterdam], v. 70, n. 1, p. 67-74, Mar. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629915303082>. Acesso em: 8 nov. 2019.
- XIMBA, S. P. F. *et al.* Monitoring the distribution of *banana bunchy top virus* in South Africa: a countrywide survey. **Archives of Virology**, [Wien], v. 167, n. 6, p. 1433-144, June 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35461377/>. Acesso em: 22 set. 2022.
- WANITCHAKORN, R.; HARDING, R. M.; DALE, J. L. Sequence variability in the Coat protein gene of two groups of banana bunchy top isolates. **Archives of Virology**, [Wien], v. 145, n. 3, p. 593-602, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10795525/>. Acesso em: 20 out. 2022.
- WARDLAW, C. W. **Banana diseases including plantain and abaca**. London: Longmans, Green, 1961. 648 p. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19621604171>. Acesso em: 20 out. 2021.
- YU, N.-T. *et al.* Cloning and sequence analysis of two *banana bunchy top virus* genomes in Hainan. **Virus Genes**, [Dordrecht], v. 44, n. 3, p. 488–494, June 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10795525/>. Acesso em: 25 set. 2019.
- YU, N.-T. *et al.* Independent modulation of individual genomic component transcription and a cis-acting element related to high transcriptional activity in a multipartite DNA virus. **BMC Genomics**, [London], v. 20, n. 573, July 2019. Disponível em: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-019-5901-0>. Acesso em: 20 out. 2021.
- ZHUANG, J. *et al.* Cleavage of the babuvirus movement protein B4 into functional peptides capable of host factor conjugation is required for virulence. **Virologia Sinica**, [s.l.], v. 34, n. 3, p. 295–305, June 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30868360/>. Acesso em: 22 set. 2022.