



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE AGRONOMIA E ENGENHARIA FLORESTAL
CURSO DE ENGENHARIA AGRONÓMICA**

PROJECTO FINAL

**Avaliação da incidência do afídeo vector da doença vírus de topo em
leque da bananeira e prospeção de potenciais insectos vectores da
doença**



Autor: Carlota Marcelino Monjane

Supervisores:

Doutora Laura Canhanga (PhD)

Professor Doutor João Bila (PhD)

Maputo, Setembro 2024

**Avaliação da incidência do afídeo vector da doença vírus de topo em
leque da bananeira e prospeção de potenciais insectos vectores**

O conhecimento é o principio de toda sabedoria, provérbios 1:7

Dedico

Aos meus pais Marcelino Mário Monjane e Amélia Francisco Nhancale Monjane;

Aos meus irmãos, Manuel Marcelino Monjane e Mário Marcelino Monjane

Agradecimentos

Ao meu bom Deus pelo dom da vida, força e proteção durante todo o percurso acadêmico.

Ao Serviço Distrital das Actividades Econômicas (SDAE) e a todos técnicos e extensionistas do distrito de Manhiça.

A minha gratidão aos meus supervisores Doutor João Bila e a Doutora Laura Canhanganga pelo acolhimento, direcionamento, paciência, atenção desde a escolha do tema e o desenvolvimento de todas as actividades.

A Engenheira Marília Ernesto pela ajuda técnica, por todo apoio moral, força e conselhos diários que os guardarei, os agradecimentos estendem-se também para Dra. Vanessa, Dra. Raquelina e a equipe geral do centro de Biotecnologia pela recepção e por cada experiência colhida naquele lugar.

A Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal (FAEF) da Universidade Eduardo Mondlane (UEM) por ter tornado realidade o sonho de me tornar uma engenheira. A dona Graça, a Dona Maria Adélia técnicas do laboratório de Entomologia, a dona Jordina técnica de laboratório de Fitopatologia, ao senhor Sérgio Miguel por nos dirigir em todas viagens com segurança, a todos docentes da FAEF pelos ensinamentos que se refletem neste trabalho, a minha gratidão.

A Felita Mate e Laila Timana por disponibilizarem os seus computadores sempre que necessário, ao meu colega de laboratório Ronaldo Zunguza o meu muito obrigado.

Aos meus pais que sempre me ensinaram a importância de buscar o conhecimento, pela confiança que depositaram em mim, aos meus irmãos: Manuel, Mário e Elia pelo amor e motivação diária, a minha prima Ana Claudia pela força durante o percurso acadêmico, as minhas amigas: Cintia, Débora, Laila, Leontina, Luana, Uneiza que sempre me acompanharam neste percurso, ao meu amigo Benildo Nuvunga pelo apoio e motivação.

Aos meus colegas em especial, Euridse, Ernesto, Nelicia, e Herminia, pelo apoio nos estudos e companheirismo. E a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para todo o meu percurso acadêmico, ajudando-me assim a tornar o meu sonho de ser Engenheira Agrônoma tornar-se realidade.

Resumo

A produção de banana tem uma grande importância comercial em Moçambique por esta ser uma fonte de renda, porém têm sido registadas perdas avultadas devido a pragas e doenças como a Banana Bunchy Top vírus (BBTV), doença viral cujo vector conhecido é o afídeo *Pentalonia nigronervosa*. A doença de BBTV está presente no sul de Moçambique, especificamente nos distritos de Chókwé e Manhiça. A crescente ameaça da expansão da doença, foi um dos factores importantes para o desenvolvimento deste estudo, que teve como foco avaliar a incidência do afídeo vector da doença do vírus de topo em leque da bananeira e prospeção de possíveis insectos vectores da doença. O trabalho foi realizado no posto administrativo de Ilha Josina Machel, nos bairros 2, 3, 4, e 1º de Maio (na localidade Maguiguana) e bairro 6 e Matchedje (na localidade de Zonguene). Nas bananeiras com sintomas da doença, determinou-se a infestação e a densidade do vector *P. nigronervosa*, fez-se o levantamento de outros insectos sugadores associados as bananeiras infectadas e em algumas infestantes circunvizinhas com sintomas da doença. As amostras colhidas foram conservadas em etanol a 70 % seguida pela detecção do vírus. Os resultados mostraram que o afídeo *P. nigronervosa*, infestou em média 24% a 62 % de plantas com sintomas da doença, com densidades medias que variaram de 1 a 25 afídeos/planta. Os bairros 2, 3, 4, 6, e 1º de Maio (na localidade de Maguiguana) tiveram uma densidade significativamente maior comparativamente as do bairro 6 e Matchedje (na localidade de Zonguene). Foram identificados outros insectos sugadores, associados a bananeira com sintomas da doença, pertencentes a ordem Hemiptera representado pelas famílias Pentatomidae, Reduvidae e Afididae. A maior densidade dos outros insectos sugadores foi observada pelos afídeos da *Pentalonia caladii*, e a menor em percevejos cuja média variou de 0,65 e 0,72 individuo por planta, respectivamente. A detecção do vírus da BBTV no afídeo (*Pentalonia nigronervosa*) e outros sugadores forneceram resultados positivos para as amostras 4, 5 e 8 usando primer's diferentes, mais específicos para a detecção do vírus da BBTV, por outro lado, foram registados resultados negativos, provavelmente devido a ausência do vírus da BBTV nos insectos no momento da colecta das amostras, pois o *P. nigronervosa* necessita de horas para a aquisição do mesmo.

Palavra-chave: BBTV, vectores de doenças, outros sugadores, *Pentalonia nigronervosa*

ÍNDICE

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista dos anexos	x
Lista de abreviaturas.....	xi
1. Introdução	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Problema e justificativa.....	2
1.3. Objectivos.....	4
1.3.1. Geral.....	4
1.3.2. Específicos.....	4
2. Revisão bibliográfica	5
2.1. Aspectos gerais da cultura da banana	5
2.1.1. Produção e importância da banana.....	5
2.1.2. Principais factores que influenciam na produção de bananeira.....	6
2.1.3. Principais pragas e doenças que atacam a bananeira	6
2.2. Doença do topo em leque da banana (BBTD).....	7
2.3. Dispersão da doença da BBTV em Moçambique.....	8
2.4. Vector da doença da BBTV.....	8
2.5. Potenciais vectores da doença da BBTV	10
2.6. Controlo da BBTV	11
2.7. Detecção.....	12
2.7.1. Métodos para a detecção do vírus	12
2.7.2. Detecção da BBTV pelo método de PCR.....	14
3. Metodologia	16
3.1. Descrição da área de estudo	16
3.2. Selecção de campos	17
3.3. Identificação de afídeos e outros insectos sugadores.....	17

3.4.	Determinação da percentagem de infestação do afídeo e insectos sugadores	19
3.5.	Densidade populacional de afídeos na bananeira e outros insectos sugadores ...	19
3.6.	Detecção molecular do vírus de BBTV com base no PCR	20
3.6.1.	Extração do DNA.....	20
3.6.2.	Reacção em cadeia polimerase	21
3.6.3.	Visualização em gel de agarose	23
3.7.	Análise de dados	24
4.	Resultados e discussão	25
4.1.	Identificação morfológica dos insectos sugadores	25
4.2.	Percentagem de infestação do afídeo	26
a)	Percentagem de infestação de outros insectos sugadores	28
4.3.	Densidade Populacional	29
b)	Densidade populacional de outros insectos sugadores	30
4.4.	Detecção da doença da BBTV nos insectos colectados.....	31
a)	Electroforese usando o primer CP	31
b)	Electroforese usando primer BBT	32
5.	Conclusões e Recomendações.....	34
5.1.	Conclusões.....	34
5.2.	Recomendações:	34
6.	Referências bibliográficas.....	35
	ANEXOS	41

Lista de figuras

Figura 1: Conjunto de plantas de bananeira.....	5
Figura 2: Sintomas da doença de BBTV.....	7
Figura 3: Adulto do afídeo <i>Pentalonia nigronervosa</i>	9
Figura 4: Ciclo de vida do vector <i>P.nigronervosa</i>	10
Figura 5: Mapa de localização geográfica do distrito da Manhiça	16
Figura 6: Insecto sobre a luz no microscópio	18
Figura 7: Colecta de amostras.....	19
Figura 8: Extracção do DNA.....	20
Figura 9: Reacção em cadeia polimerase	23
Figura 10: Electroforese	21
Figura 11: Insecto sugador da familia pentatomidae.....	24
Figura 12: Infestação de pentalonia nigronervosa em diferentes locais.....	26
Figura 13: Percentagem de infestação de outros insectos sugadores.....	27
Figura 14: Densidade populacional do afídeo em plantas de bananeiras.....	28
Figura 15: Gel de agarose CP.....	31
Figura 16: Gel de agarose BBT1/2.....	32

Lista de tabelas

Tabela 1: Reagentes e condições de temperatura e tempo usados para o PCR	21
Tabela 2: Sequência de Primer's usados para a detecção do vírus Error! Bookmark not defined.	20
Tabela 3: Comportamento da densidade populacional de outros sugadores em diferentes localidades.	30
Tabela 4: insectos sugadores encontrados no distrito de Manhiça.....	28

Lista dos anexos

Anexo 1: Percentagem de infestação de <i>Pentalonia nigronervosa</i>	41
Anexo 2: Teste de comparação de médias de <i>Pentalonia nigronervosa</i>	42
Anexo 3: Densidade populacional do <i>pentalonia nigronervosa</i>	42
Anexo 4: Teste de comparação de médias da densidade populacional do <i>Pentalonia nigronervosa</i>	43
Anexo 5: Percentagem de infestação de outros sugadores	44
Anexo 6: Dados normalizados de outros insectos sugadores	44
Anexo 7: Comparação de médias da densidade de outros insectos sugadores.....	45
Anexo 8: Densidade populacional de outros sugadores	46
Anexo 9: Comparação de médias da densidade de outros insectos sugadores.....	46
Anexo 10: Protocolo de extracção de ADN (CTAB).....	47

Lista de abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

Anova - Análise de Variância

BBTV – Banana Bunchy Top Vírus

BBTD- Banana Bunchy Top Disease

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamonio

Cp- Proteína de revestimento

DMSO – Dimetilsulfóxido

Elisa – Ensaio Imonoabsorvente Enzimático

IIAM – Instituto de Investigação Agraria de Moçambique

MASA – Ministério da Agricultura e Segurança alimentar

ml - Microlitro

Pb – Partes de bases

PCR – Reacção de Cadeia Polimerase

Rpm- Rotação por minuto

TAE – Tris – Acetato – EDTA

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais

A bananeira é uma planta monocotiledónea herbácea de crescimento vigoroso. A maioria das cultivares e híbridos da bananeira pertencem ao género *Cuminata*, género *Musa*, e espécie *balbisiana* (Gold *et al.*, 2002).

A cultura desempenha um papel importante na alimentação e na nutrição, devido ao seu alto valor nutricional e medicinal, sendo o quarto alimento mais importante a nível internacional, precedido pelo arroz, trigo e milho (Vieira e Luís, 2009; Halbert *et al.*, 2015). A banana é considerada um alimento energético, por ser maioritariamente constituído por água, carboidratos, uma proporção mais reduzida de gorduras e proteínas, porém rica em sais minerais e vitaminas permitindo que este alimento seja um dos componentes para a redução de doenças como a anemia, hipertensão entre outras (SENAR, 2009). De grande importância socioeconómica em Moçambique, contribui para a boa nutrição das comunidades rurais, assim como para garantir a segurança alimentar, geração de renda e fonte de emprego (MASA, 2019). A banana é o principal produto no comércio internacional de frutas frescas movimentadas (Borges *et al.*, 2000).

Porém o seu comércio vem sendo prejudicado devido ao ataque de pragas como é o caso da mosca da fruta, doenças como o mal de panamá e a sigatoka negra que reduzem a sua qualidade e quantidade (Embrapa 2020 & FAO, 2016). Nos últimos anos destaca-se no país a doença do vírus de topo em leque da bananeira (do inglês “Banana Bunchy Top Vírus” abreviado para BBTV) que tem criando perdas devastadoras na produção da banana (BananaMoz, 2019).

Estima-se uma produção de cerca de 6,4ton/ha para o sector familiar, e 45 a 60ton/ha do sector comercial, que poderá estar ameaçado devido a doença do vírus de topo em leque que tem tido maior impacto na indústria nacional de banana reduzindo a sua produção em cerca de 22% (MASA, 2019).

A doença do vírus do topo em leque, é uma das doenças virais de maior importância económica na banana. Em Moçambique, a doença da BBTV é igualmente de

importância quarentenária e com impacto no comércio internacional, por impedir a entrada da banana produzida internamente, nos países com restrições quarentenárias (IIAM, 2019).

1.2. Problema e justificativa

A banana é uma cultura de extrema importância em Moçambique, devido ao papel que desempenha na nutrição e segurança alimentar, e pelo potencial que o país tem para produção e exportação, mas está tem enfrentado perdas devido ao ataque de pragas e doenças de importância económica (MASA, 2019). Dentre as doenças que afectam esta cultura constam o Mal do Panamá também conhecido como Foc-TR4 que foi identificada na zona norte do país, e vírus do Topo em Leque da Bananeira também conhecido como BBTV que tem assolado com maior incidência nos campos de Chókwè, ameaçando derrubar a indústria da bananeira (MASA, 2019; Rufasse, 2019).

Este vírus é letal quando a planta infectada não é eliminada, além de contribuir para a disseminação da doença e foi nesta visão que a BananaMoz em parceria com IIAM criou um programa de erradicação do vírus do topo em leque da bananeira, que tinha como objectivo de reduzir o impacto da doença no país com o principal enfoque no sector familiar (Rufasse, 2019).

A doença da BBTV causa danos a bananeira, podendo chegar até 100% se não for controlada. Em plantas jovens causa o atrofiamento da bananeira o que impede a produção de cachos, em plantas adultas a BBTV afecta a qualidade do fruto tornando-o impróprio para o mercado, para além desses danos ela representa um perigo para Moçambique MASA (2019), por se tratar de uma doença quarentenária em locais onde esta é presente, uma vez que as bananas produzidas em áreas consideradas infestadas não podem ser exportadas para países com restrições quarentenárias (Halbert e Baker, 2015).

De acordo com a IIAM (2021), em 2016 nos distritos de Chókwè e Guijá, na província de Gaza, a BBTV levou as autoridades a abater milhares de bananeiras em diversos campos de produção, para evitar a disseminação da doença. Apesar disso, a

doença atravessou para Província de Maputo especificamente no distrito de Manhica (Rufasse, 2019).

O vírus é propagado de um campo para outro por meio de material de propagação infectado e através de *Pentalonia nigronervosa* que se alimenta da seiva das plantas, transmitindo o vírus de uma planta para a outra, tornando fácil a disseminação da doença.

Pentalonia nigronervosa é até então o único vector com conhecido da doença do topo em leque da banana com maior eficiência de transmissão do vírus (Halbert e Baker, 2015), Contudo, não existe informação sobre a sua densidade e são escassas as informações existentes na literatura sobre outros insectos vectores do vírus (Footit *et al.*, 2010). Pelo facto de umas das vias para o Maneio da BBTV ser o controlo do insecto vector que serve de inóculo, para evitar a disseminação da doença é essencial conhecer os níveis populacionais do insecto vector e de insectos associados a bananeira e o seu papel na transmissão do vírus, por forma a garantir o melhor maneio da doença.

1.3. Objectivos

1.3.1. Geral

- Avaliar o nível de infestação do afídeo vector da doença do vírus de topo em leque da bananeira e identificar potenciais insectos vectores da doença da BBTV;

1.3.2. Específicos

- Identificar os afídeos presentes em plantas infectadas pela BBTV os outros insectos sugadores associados;
- Determinar a percentagem de infestação da bananeira por *P. nigronervosa* e outros sugadores;
- Determinar a densidade populacional do *P. nigronervosa* e outros sugadores;
- Detectar a doença do topo em leque da bananeira no afídeo *P. nigronervosa* e em outros insectos sugadores.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Aspectos gerais da cultura da banana

A bananeira é uma planta monocotiledónea e herbácea, contém um caule subterrâneo (rizoma) de onde provém as suas raízes primárias. O pseudocaule é formado por bainhas foliares, terminando com uma copa de folhas compridas e largas com uma nervura central bem desenvolvida (fig. 1). A sua inflorescência sai do centro da copa, apresentando brácteas ovaladas de coloração roxo-vermelho em cujas axilas forma-se as flores, que cada conjunto se forma as pencas (Borges e Sousa, 2004).



Figura 1: Plantas de bananeira.

2.1.1. Produção e importância da banana

A produção de banana tem um papel importante a nível mundial, devido a sua comercialização e grande rentabilidade. No sistema produtivo tem um grande destaque devido ao seu elevado potencial agrícola, sendo uma fonte de renda para os pequenos e médios produtores, proporcionando e influenciando no desenvolvimento local e no crescimento económico das regiões envolvidas na sua produção (Sousa *et al*, 2019). Para alguns países como Moçambique, Angola, Malawi, África do Sul entre

outros, a produção da banana tem um papel significativo na economia devido a exportação (Fiovaranço, 2000; Sousa *et al.*, 2019).

A produção da banana em Moçambique é maioritariamente para fins comerciais, e é feita em grande escala nas províncias de Maputo, Nampula e Manica, onde as produções feitas em Maputo e Nampula são destinadas a exportação, e as produções feitas em Manica são destinadas ao consumo interno devido a baixa qualidade da fruta causado por pragas como mosca da fruta e este factor faz com que não haja a exportação da banana produzida em Manica sendo apenas para o consumo nacional (Calima *et al.*, 2014).

2.1.2. Principais factores que influenciam na produção de bananeira

Durante o crescimento das bananeiras há vários factores que influenciam a sua produção, podendo estes ser classificados em factores internos e externos. Os factores internos estão relacionados com as características genéticas da variedade utilizada, enquanto que os externos se referem as condições edáficas (solo), ambientais (clima), agentes bióticos e á acção do homem que interferem nos factores edáficos e climáticos (Borges e Sousa, 2004).

2.1.3. Principais pragas e doenças que atacam a bananeira

Tal como em outras culturas, a produção de banana tem enfrentado perdas avultadas devido a pragas e doenças que têm uma grande influência no sucesso de produção. Exemplos de pragas que ocorrem no mundo são os afídeos da bananeira *Pentalonia nigronervosa* *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* (Sulzer), sendo todos eles vectores de viroses (Picanso, 2000; Borges *et al.*, 2000). Para além destes sugadores a cultura também pode ser afectada pela broca-do-rizoma, que na fase de larva cria danos devastadores como a formação de galerias que permite a penetração de patógenos tornando-as mais sensíveis ao tombamento, sobretudo as que se encontram na fase de frutificação, o desenvolvimento limitado contribui para a redução da produtividade, para além destes as galerias criam contaminações de plantas por outros agentes externos causando podridões e a morte da planta (Borges *et al.*, 2000). Dentre as doenças destacam-se na banana doenças transmitidas por vírus como topo em leque da bananeira, mosaico da bananeira e estrias da bananeira. Para além destas ocorre

também a doença fúngica, o mal de Panamá, que tem assolado a zona norte de Moçambique devido a intensidade com que a doença afeta as plantas, assim como o seu impactos em termos de rendimento ou qualidade nas planta (MASA, 2022; Cordeiro *et al.*,2000).

2.2. Doença do topo em leque da banana (BBTD)

A doença do topo em leque da banana é causada por um vírus que é encontrado no tecido do floema de plantas infectadas, no estágio vegetativo, floração e frutificação. O vírus da doença da BBTV apresenta partículas isométricas, com uma estrutura arredondada, não contém um capsômero sendo este um vírus falso, com um genoma composto de um ADN circular de fita simples (Dale *et al.*,1987). Esta doença é considerada a principal doença de etiologia viral da bananeira em algumas regiões produtoras de banana como a Ásia, África, Oceânia e Havai, na qual é observada uma redução no teor de clorofila na área foliar, do diâmetro do pseudocaule, da altura e parte aérea da planta (Hooks *et al.*, 2000).

Um dos sintomas severos da infecção que ocorre é a formação de rosetas devido ao nanismo e encurtamento dos entrenós com as folhas tornando-se mais estreitas, curtas e verticais. Os sintomas foliares ocorrem principalmente em folhas jovens emergentes após a infecção, e incluem o enrolamento e amarelecimento marginal das bordas (fig. 2 A) com riscas verde-escura na nervura central e no pecíolo, pontos verde-escuro são bem visíveis. Em infecções mais avançadas as folhas mais novas tendem a apresentar sintomas mais graves. A coroa da bananeira é caracterizada pelo acúmulo de folhas pequenas, verdes-pálido ou amarelas, formando um leque, o crescimento geralmente é atrofiado e a planta pode não produzir cachos ou frutos (fig. 2 B); no caso de produzir os frutos, serão pequenos e deformados como ilustra a (fig. 2 C) (Meissner, 2000).



Figura 2: Sintomas de BBTV. A-Nanismo foliar, B-Amarelecimento e ondulação das margens foliares em bananeira infectada com BBTV, C- Frutos pequenos atrofiados e deformados.

É importante prestar atenção nos locais onde o vírus está presente, uma vez que algumas bananeiras podem apresentar a infecção de forma latente, isto é, as bananeiras são fonte de inóculo, mas não apresentam os sintomas. A manifestação dos sintomas depende do estágio de desenvolvimento na qual a planta se encontra, da variedade e das condições ambientais de onde é produzida (Qazi, 2016).

O vírus da BBTV é um vírus sistémico, quando infecta a planta este tem a capacidade de se deslocar para todas as partes da planta incluindo rebentos e rizomas, porém ao infectar a planta em um estágio mais desenvolvido, os rebentos podem não ser infectados pelo vírus da BBTV (Wright, 2005).

2.3. Dispersão da doença da BBTV em Moçambique

A doença da BBTV em Moçambique foi relatada pela primeira vez no Norte do País perto do Malawi, em uma quinta de investigação, onde foi confirmada a ocorrência com base nos sintomas das plantas da bananeira, e os casos relatados foram erradicados (Gondwe *et al.*, 2007).

Foi oficialmente notificada pela primeira vez em junho de 2016 a sul de Moçambique na província de Gaza nos distritos de Chóckwè e Guijá em uma pequena exploração agrícola, onde a doença foi relatada em explorações agrícolas comerciais privadas e campos agrícolas, nestas, tendo-se confirmado pelo teste de PCR (IPPC, 2016). A doença progrediu para província de Maputo especificamente no distrito de Manhiça, na Ilha Josina Machel (Rufasse, 2019).

2.4. Vector da doença da BBTV

A BBTV é uma doença com uma transmissão persistente circulante e é transmitido pelo vector *Pentalonia nigronervosa* (Hemíptera: aphididae) (fig. 3), não sendo possível a transmissão mecânica (Jackson e Wright, 2005).

O *P. nigronervosa* é um afídeo da bananeira que é encontrado nas regiões tropicais e subtropicais onde a banana é cultivada (Blackman e Eastop, 2006).



Figura 3: Adulto do afídeo *Pentalonia nigronervosa*.
Fonte: (Nelson, 2004).

O *P. nigronervosa* apresenta uma metamorfose incompleta, e a sua reprodução é inteiramente partenogénica (sem acasalamento). Os afídeos adultos vivíparos apresentam-se alados e ápteros a sua cor varia de vermelho a castanho-escuro e as suas formas mais jovens possuem uma cor mais clara. Segundo Zeck e Eastwood (1979) nenhuma fêmea ou macho sexual tem sido observado, isto é, todos os indivíduos adultos alados ou ápteros são fêmeas as quais por partenogénese dão origem a formas jovens (Alves *et al.*, 1982).

Geralmente os afídeos passam por quatro instares para alcançarem a fase adulta, no terceiro instar é possível identificar aqueles que se tornarão adultos, através da presença ou não das tecas alares (fig. 4), os afídeos são sugadores fitófagos e podem alimentar-se nos vértices da parte foliar, raízes, caule raramente em frutos (Alves *et al.*, 1982). Do primeiro ao terceiro instar geralmente tem uma longevidade de 2 a 3 dias e o quarto instar tem uma longevidade de 2 a 4 dias; com o estágio ninfal com um período que varia de 9 a 12 dias e uma longevidade adulta com um período que varia de 17 a 22 dias, a vida do afídeo desde o primeiro instar ninfal até a fase adulta varia de 26,5 a 33 dias (Amsavalli, 2022). Tendo o primeiro instar com um comprimento de 0.1mm, o segundo instar a medir 0.7mm, o terceiro instar com 0.9mm e por fim o quarto instar deferindo dos três primeiros medindo 1mm, o adulto mede cerca de 1 a 2mm (Capineia, 2008).

O vector deve se alimentar de uma planta infectada por um tempo mínimo de 17 horas antes que possa transmitir a doença (Raut e Suvarna, 2004).

Geralmente ataca o hospedeiro ao redor da porção basal do pseudocaule, mas às vezes pode se alimentar das folhas superiores e pecíolos. O insecto espalha o patógeno a curtas distâncias e transmite o vírus de forma persistente (Rishi, 2009).

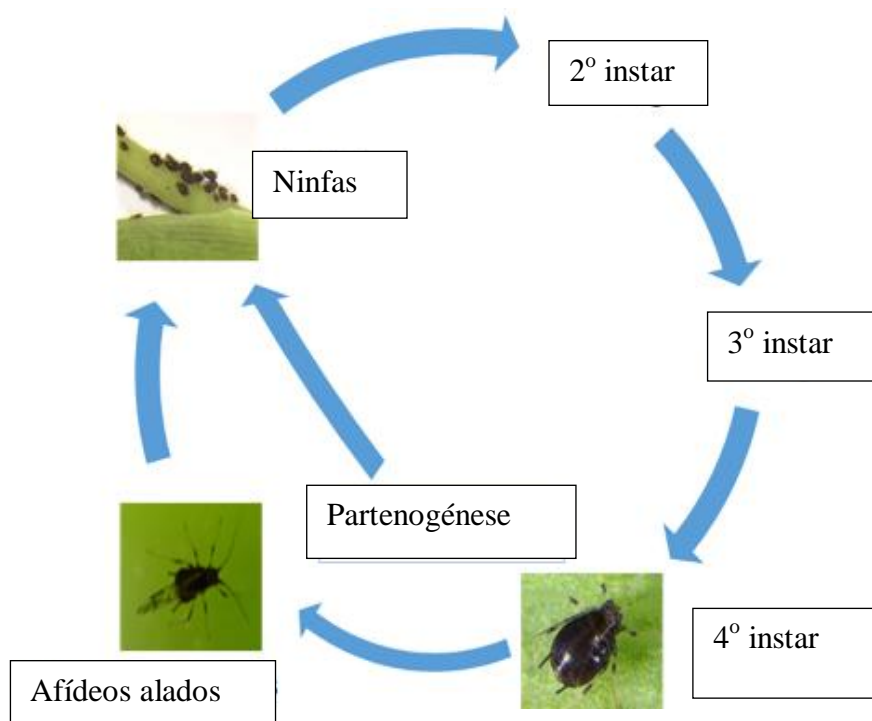


Figura 4: Ciclo de Vida do Vector *P. nigronevosa*.
Fonte: Nelson *et.al* (2006).

Tanto as ninfas assim como os adultos tem a capacidade de adquirir o vírus, embora seja mais eficiente no estágio de ninfa. Este vírus também pode ser transmitido através de material de plantio vegetativo tanto em rebentos, como em pedaços de rebentos, assim como por meio de micropropagação (Tomas, 2008).

2.5. Potenciais vectores da doença da BBTV

Vectores de doenças em plantas são um grupo diversificado, organismos vivos que têm a capacidade de transmitir o patógeno de uma planta para outra disseminando assim doenças aos seus hospedeiros (Jaisval *et al.*, 2023). A maioria dos insectos vectores dos patógenos de plantas são insectos hemípteros como por exemplo afídeos,

moscas brancas e tripses, que possuem aparelho bucal sugador perfurante comum (Heck, 2018).

O principal vector da BBTV é o *Pentalonia nigronervosa*, porém estudos recentes mostram a existência de uma outra espécie, a *Pentalonia caladii* com a capacidade de transmitir a BBTV, mas com nível de eficiência inferior ao *P. nigronervosa* (Kumar *et al.*, 2015).

A *Pentalonia caladii* infesta as plantas como a *Heliconia* (Heliconiaceae), *Alpinia e zingiber* (Zingiberaceae) e a *Colocásia* (Araceae) (Watanabe *et al.*, 2013).

Considera-se que, quando se verifica a presença do afídeo na planta da bananeira o mais provável é que seja da espécie *P. nigronervosa*. Se o vector for achado em uma outra planta, ou seja, um hospedeiro que não seja a bananeira, o vector do vírus do topo em leque da bananeira é o afídeo da espécie *P. caladii*. Portanto a preferência do hospedeiro diferencia as duas espécies (Footit *et al.*, 2010).

2.6. Controlo da BBTV

Não existe um tratamento possível para o controlo da doença do vírus do topo em leque da bananeira, e nem uma variedade resistente á mesma.

Uma das vias para o controlo da BBTV é a eliminação do insecto vector e a destruição das plantas infectadas, que servem de inóculo para evitar a disseminação da doença. O controlo da BBTV é realizado por medidas de quarentena em locais nos quais ela não ocorre. Nos locais onde se manifesta deve se tomar medidas de erradicação. Também pode se realizar o replantio com plantas livres de vírus e realizar o controlo dos afídeos com insecticida (Qazi, 2016). Geralmente, a dispersão do vírus é lenta o que irá favorecer um controlo mais eficiente com a erradicação das plantas.

a) Controle biológico

Refere-se ao uso de fungos endofititos para avaliar a actividade fúngica como mecanismos de bio controle na presença da BBTV (Batista *et al.*, 2002). O uso de bactérias como as pseudomonas e microrganismos bacterianos, geralmente tem sido aplicado, ou seja, inoculado em bananeiras para reduzir a incidência da BBTV, e tem mostrado resultados eficientes reduzindo a incidência do patógeno entre 52-80% (Vijay *et al.*, 2013). Foi analisado que utilizando as *Pseudomonas fluorescens* com

quitina, há uma redução da incidência da BBTV e aumento na produtividade de cachos (Kavino *et al.*, 2008).

b) Controle químico

Insecticidas tem sido usados em alguns países para controlar a população de *P.nigronervosa*, mas o controle em toda a plantação não é viável. Portanto um dos meios de mitigar a situação deve se eliminar todos os insectos encontrados na planta infectada antes da sua destruição como um mecanismo de evitar a propagação; deve se pulverizar de modo a eliminar as plantas assim como os sugadores principalmente na área da gema, e propõe-se o uso de emulsões de querosene, alguns insecticidas como dimetoato, acefato e glifosato (Jackson e Wright, 2005).

c) Controle cultural

O principal meio de evitar a propagação da BBTV em áreas que não foram infectadas é o uso de material de propagação livre de doença, o controle irá depender da detecção precoce através de técnicos treinados e formas intensivas de erradicação (Departamento de agricultura e pesca, 2016). A erradicação consiste na eliminação total da doença e do vector através da indução a morte de bananeiras afectadas por uma virose, com o uso de um herbicida específico (Borges *et al.*, 2000).

2.7. Detecção

2.7.1. Métodos para a detecção do vírus

a) Detecção biológica

Apesar de ser um método que leva muito tempo para avaliação assim como as diferentes variações que podem ocorrer na reacção das plantas indicadoras em função das condições ambientais, a detecção biológica, é utilizado para a detecção de vírus não caracterizados molecularmente e por oferecer informações sobre características biológicas do isolado ou espécies virais. Este método apenas revela a virose e não o vector responsável pelos sintomas, por outro lado, para a sua aplicação tem a necessidade de ter um espaço amplo para a manutenção das plantas até o diagnóstico final (Nickel e Fajardo, 2009).

b) Método sorológico

A sorologia é um método de detecção viral em material vegetal através de anticorpos específicos capazes de reconhecer proteínas capsidiais (Neto e Silva, 2009). É uma das técnicas utilizadas neste método é a Elisa, neste método os anticorpos produzidos contra a proteína capsidial de um determinado vírus são utilizados para a sua detecção, onde os extractos que passam pela lise mecânica de tecido vegetal infectado são utilizados como antígeno (Lima e Fajardo, 2012). Este método divide-se em dois tipos, o directo em que o anticorpo é usado para a detecção do antígeno viral e indirecto em que o anticorpo não detecta o antígeno, mas reconhece um fragmento universal do anticorpo específico. O resultado é determinado por uma reacção enzimática fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo, é um método que oferece resultados rápidos, porém em casos de carga viral baixa pode apresentar falsos negativos por não poder fazer a detecção (Basso *et al.*, 2014).

O Western blot é uma técnica imunoelectrica que serve para a caracterização de proteínas virais, onde as proteínas extraídas da planta infectada são desnaturadas e de seguida separadas em um gel de SDS-Poliacrilamida (Lima e Fajardo, 2012).

c) Métodos moleculares

É um conjunto de técnicas utilizados para analisar marcadores biológicos no genoma e proteoma de indivíduos, isto é, focalizando no DNA e RNA dos organismos (Barreto, 2017).

Dos diferentes métodos a reacção em cadeia polimerase é o mais utilizado, pois a maioria dos vírus pode ser identificado por esta técnica devido a sua alta sensibilidade que permite que o patógeno ainda que esteja em pequenas quantidades na amostra vegetal a amplificação pela PCR propicie a sua detecção, este método baseia-se na amplificação do vírus de DNA e RNA em amostras vegetais infectadas por meio de iniciadores (Primer's) e uma enzima taq polimerase em uma incubação no termociclador que faz a transcrição reversa do RNA em DNA complementar e de seguida passa por vários ciclos que visam a produção de copias de fragmento alvo deste DNA (Lima e Fajardo, 2012).

Primer's são pedaços curtos de DNA de fita simples, geralmente por volta de 20 a 24 nucleotídeos de comprimento, este actua como um iniciador para a polimerase, dois primer's são usados para cada reacção de PCR e estes são projectados de modo que englobem a região de interesse (região que deve ser copiada), isto é, são dadas

sequências que os farão se ligar a fitas opostas do DNA molde bem nas extremidades da região a ser copiada. Os primer's se ligam ao pareamento de bases complementares (Barreto, 2017).

Outros métodos moleculares incluem as hibridizações, northern blot (utilizada para a detecção de RNA) e o Southern blot (utilizada para a detecção de DNA) nos dois métodos o ácido viral é detectado por meio da utilização de sondas moleculares (Lima e Fajardo, 2012).

2.7.2. Detecção da BBTV pelo método de PCR

2.7.2.1. Procedimentos:

a) Extração do DNA

Este processo envolve a lise mecânica, com a libertação de todo material intracelular, e purificação do DNA (Oliveira, 2019). Com a lise celular são libertados compostos intracelulares como proteínas, lípidos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, seguido da purificação do DNA que consiste em libertar o DNA de todos compostos referidos com a acção de enzimas, ás precipitações diferenciais, recorre-se geralmente a mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, em que o fenol e o clorofórmio desnaturam as proteínas que solubilizam na fase fenólica que separa com maior eficácia da fase aquosa por acção do clorofórmio e álcool isoamílico, de seguida é usado o etanol a 70% no qual se dissolvem a maioria dos catões, resultando em um DNA puro no precipitado (Costa e Moura, 2001). O DNA deve ser guardado solubilizado a -70°C para prevenir mutações espontâneas e acção de DNases que possam contaminar a solução (Oliveira, 2019).

b) Reacção de cadeia polimerase

O PCR consiste na detecção e amplificação de regiões específicas de ácidos nucleicos (DNA ou cDNA) (Tyrell, 1997), onde o procedimento desta técnica é feito utilizando os seguintes reagentes: amostra, primer's, dNTPs, Taq polimerase, MgCl₂ tampão da PCR, em um termociclador (Agne *et al.*, 2009; Novais; Pires-Alves, 2004; Santos *et al.*, 2014). A amostra é fonte do material a ser amplificado que pode ser qualquer tecido, líquidos corpóreos entre outros, os primer's são responsáveis de identificar o local exacto do material amplificado, os dNTPs são responsáveis pelas copias do material a ser amplificado, a Taq sintetiza novas cadeias de DNA, o MgCl₂ e o tampão

da PCR são responsáveis pela actividade da polimerase, o termociclador é responsável pelas alterações das temperaturas que levam a desnaturação da molécula, anelamento dos primer's e ao alongamento das novas cadeias (Santos *et al.*, 2014).

A PCR é feita com os primer's e iniciadores específicos para a detecção de uma doença viral como por ex. BBT-IF (5'CTC GTC ATG TGC AAG GTT ATG TCG3') e BBT-2 (5' GAA GTT CTC CAG CTA TTC ATC GCC3') (Thompson, Dietzgen, 1995).

c) Electroforese

A electroforese é um processo onde ocorre a migração de uma partícula carregada em um campo eléctrico; por ser composto por grupos ionizáveis, as moléculas adquirem carga positiva ou negativa em um determinado pH, onde ao serem submetidas a um campo eléctrico, essas moléculas carregadas migram para o cátodo ou ânodo, dependendo da sua carga (Wilson e Walker, 2010). Para este processo é necessária uma fonte e uma unidade de electroforese que estão disponíveis na forma vertical e horizontal, para além destes é necessário um gel que pode ser de poliacrilamida ou de agarose (Petecof *et al.*, 2015). Os tampões mais usados neste tipo de electroforese são os tris /acetatos (TAE) e o tris/borato (TBE) (Oliveira, 2019).

3. Metodologia

3.1. Descrição da área de estudo

O presente estudo foi realizado nos bananais do distrito de Manhiça, no posto administrativo ilha Josina Machel (fig. 5) na província de Maputo, na época seca e fresca nos meses de Junho, Julho, Setembro no ano de 2022.

O distrito de Manhiça está situado na parte norte da província de Maputo. Com uma superfície de 2.373 km², é limitado a norte pelo distrito de Macia (província de Gaza), a sul pelo distrito de Marracuene e a oeste pelos distritos de Moamba e de Maputo, a este é banhado pelo oceano indico (MAE, 2005; Governo da província de Maputo, 2005).

As amostras foram analisadas na clínica de fitossanidade na Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal na UEM onde realizou-se a extracção de DNA e no laboratório de biotecnologia no Centro de Biotecnologia- UEM no Instituto de Investigação Agrária de Moçambique, onde fez-se o PCR e a Electroforese.

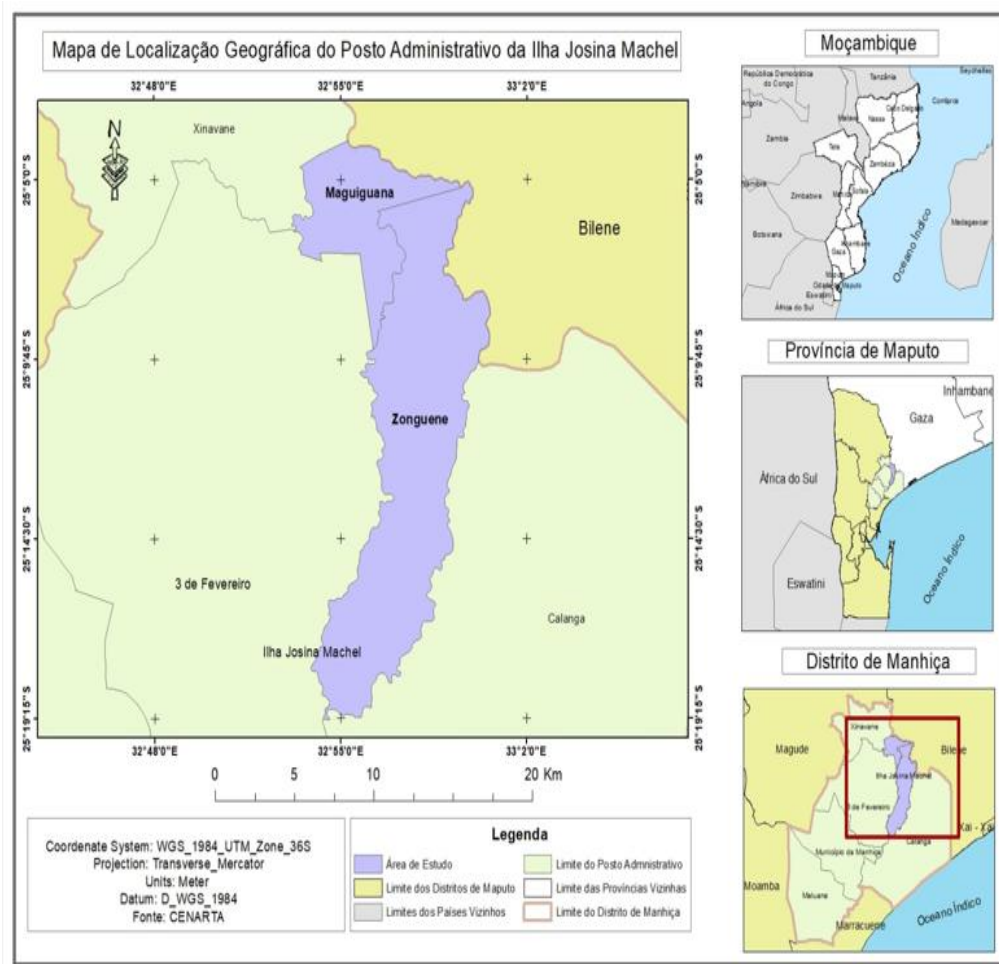


Figura 5: Mapa de localização geográfica do distrito da Manhiça

O clima do distrito é dominado pelo tipo tropical húmido no litoral e tropical seco a medida que avança ao interior, onde predominam as estações quentes e frescas. A precipitação média anual é de 807mm, as temperaturas médias anuais é de 23°C, sendo máxima em janeiro cerca de 32°C e a mínima em Julho 13°C (Governo da província de Maputo, 2005).

A principal actividade económica é a agricultura que envolve maior parte da população, predominando explorações familiares, cujas culturas básicas cultivadas são o milho, arroz, feijão, mandioca, batata-doce e a banana (MAE, 2005), a colecta das amostras foi feita em duas localidades nomeadamente, Maguiguana (Bairro 2, Bairro 3, Bairro 4, Bairro 6 e 1º de Maio) e Zonguene (Matchedje e Bairro 6).

3.2. Selecção de campos

A selecção de campos foi realizada com o auxílio das autoridades locais da agricultura, optando por (2) localidades com relatos da ocorrência da BBTV. A escolha dos campos por localidade foi baseada no nível de densidades (no mínimo 10) de plantas de bananeiras satisfatórias, isto é, com maior incidência da doença para a realização do estudo, ou seja, campos com maior número de plantas infectadas pela BBTV. Em cada bairro/local foi realizada a amostragem de 5 campos, totalizando 35 campos.

Para o estudo usou-se a amostragem Sequencial Binominal por se tratar de um vector (afídeos) de doença e não uma praga directa, nesta abordagem os afídeos eram designados presentes ou ausentes em uma planta (Wright e Robson, 2007). Foram inspeccionadas um total de 10 plantas com altura de 1 a 1,5 metros optando sempre em iniciar com a segunda planta (Young e Wright, 2005), sendo o pré-requisito a presença de sintomas da doença.

3.3. Identificação de afídeos Presentes em plantas infectadas pela BBTV e outros insectos sugadores associados

A identificação foi feita no laboratório de entomologia, baseando-se na metodologia de Monteiro (1994) e para tal colocou-se os afídeos em tubos de vidro contendo a

solução de KOH a 10% que posteriormente foram colocados em banho-maria até atingir uma temperatura de 80° C. O tempo para a clarificação ou descoloração dos afídeos variou em função tamanho, sendo 30 min o tempo máximo. Após a descoloração a amostra foi lavada com água destilada duas a três vezes tendo o cuidado de não exceder 30 minutos para evitar a formação de bolhas. De seguida foram mantidas em etanol até a montagem em laminas (Queiroz *et al.*, 2017). Fez-se a montagem das lâminas na lupa do seguinte modo: foi colocada uma lâmina sobre a lupa e adicionou-se uma gota de bálsamo do Canadá sobre o centro da lamínula e nesse local se colocou o *Pentalonia nigronervosa* na posição ventral e com ajuda de um estilete do tamanho 00, organizou -se a estrutura dos insectos. As espécies foram visualizadas utilizando a lupa, de seguida com ajuda da chave dicotômica fez-se a identificação do afídeo.

O procedimento de branqueamento foi realizado apenas para os afídeos para os outros sugadores foram usadas chaves dicotômicas como ilustra a (fig. 6) e baseando-se nas características dos mesmos como a cor, o tipo de asa, antenas, presença ou ausência de pêlos e o tipo de peças bucais a fez-se a comparação das características do insecto em estudo e as características da possível espécie Queiroz (2015).



Figura 6: Insecto sobre a luz na lupa

As chaves dicotômicas utilizadas foram:

- Identification Key to the principal families of Florida Heteroptera (Choate, 1979).
- The pentatomidae, or stink bugs, of kansas with a key to species (Hemiptera: Heteroptera) (Packauskas, 2012).
- Hemiptera Pentatomidae (Firmino, 2013).

3.4. Determinação da percentagem de infestação do afídeo e insectos sugadores

Após a seleção de plantas com sintomas da doença, em cada uma delas foi observada a presença ou não de afídeos nas axilas das folhas da bananeira, abrindo-as ligeiramente para facilitar a sua visualização. Usou-se uma escala de 0-1, onde 0 indica a ausência e 1 a presença da *Pentalonia nigronervosa* assim como dos outros sugadores.

Recorreu-se a fórmula abaixo para calcular a percentagem da infestação por *Pentalonia nigronervosa*:

$$\text{percentagem de infestação} = \frac{\text{planta com presença de afídeos}}{\text{total de plantas observadas}} \times 100$$

3.5. Densidade populacional de afídeos na bananeira e outros insectos sugadores

Depois de verificada a presença de afídios, estimou-se o número de afídeos por colónia, baseando-se na escala citada por Carvalho *et al.*, (2006) onde:

- 1-Plantas sem afídios
- 2-Plantas com 1 a 25 afídios
- 3- Plantas com 26 a 100 afídios
- 4- Plantas com 101 a 500 afídios
- 5- Plantas com mais de 500 afídios.

O número total de afídeos por planta foi registado na folha de colecta de dados.

A densidade de indivíduos de cada espécie foi estimada pela fórmula abaixo:

$$\text{Densidade} = \frac{\text{número de indivíduos da espécie } x}{\text{número total de planta observadas}}$$

Para os outros insectos sugadores utilizou-se o método de contagem para os insectos que não se encontravam em colónias.

Após a observação e contagem foram coletadas as amostras do afídeo e outros insectos sugadores baseando-se no método descrito por Almeida *et al.*, (1998) porém

com algumas modificações. Para a colecta dos afídeos foram usados pincéis humedecidos com 70% de álcool (fig. 7 a), e a seguir foram introduzidos em frascos estéreis contendo álcool (fig. 7 b). Para os casos em que os insectos encontravam-se na folha dificultando a sua retirada, cortou-se com ajuda da tesoura uma parte do tecido da planta e colocou-se em tigelas (fig. 7 c) para evitar a dispersão das colónias, e posteriormente transferiu-se para os frascos com devidos cuidados (Waqu *et al.*, 1986).

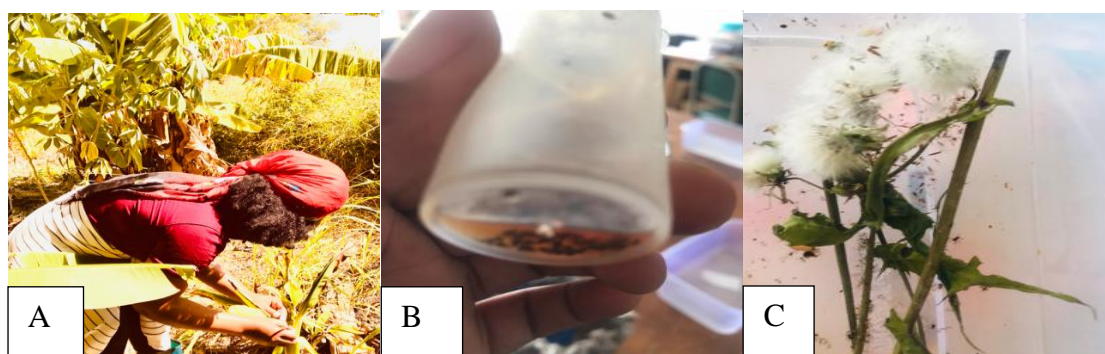


Figura 7: Colecta de amostras. A- colecta dos insectos com o pincel para os frascos B- Parte da planta com insectos na tigela, C- insectos transferidos da tigela para frascos em álcool

3.6. Detecção molecular do vírus de BBTV com base no PCR

3.6.1. Extração do DNA

Para fazer a extracção do ADN no *Pentalonia nigronervosa* e noutros insectos sugadores recorreu-se ao protocolo descrito por Vejay *et al.*, (1993), que se baseia na extracção do organismo dos insectos Anexo 1, onde 2 a 3 insectos ou apenas 1 de acordo com o protocolo de extracção foram submetidos a uma lise mecânica por meio de CTAB buffer em almofarizes (fig. 8 a), que foi procedido pelos processos de desintegração da membrana celular (fig. 8 b) por acção mecânica e química submetendo a solução do ADN a limpeza, precipitação e eluição sobre diferentes temperaturas até que se obteve o pellet, que deixou-se a temperatura ambiente até que não tivesse nenhuma solução sobre o mesmo (fig. 8 c), de seguida fez-se a leitura e quantificação do ADN em 11 amostras que incluem alguns duplicados na máquina Nanodrop, tendo passado para as fases subsequentes as amostras com concentrações positivas e limpas.



Figura 8: Extração do ADN. A-Insecto com CTAB no almofariz, B-Desintegração dos insectos, C-Secagem do pellet em temperatura ambiente

3.6.2. Reacção em cadeia polimerase

Para amplificação procedeu-se a optimização das condições usadas pelo Arumugam & Kalaimughilan (2017) onde foi feita com base nos reagentes e condições de temperatura apresentados nas tabelas abaixo (Tabela 1 e 2), por meio de um termociclador (Thermo Fisher Scientific Goteborg, Sweden).

Tabela 1: Reagentes e quantidades usadas para o PCR, condições para o PCR high fidelity

Reagentes	Quantidades (µl)
Master mix	7,5
Primer F	0,3
Primer R	0,3
AND	2
DMSO	0,45
H2O	4,45
Volume final	15

Tabela 2: Condição de temperatura e tempo usados para o PCR

Etapa	Temperatura °C	Tempo
1	95	5 Minutos
2	94	30 Segundos
3	47	1 Minuto
4	72	10 Minutos
5	72	10 Minutos
6	4	∞
39 Ciclos		

As temperaturas do processo de (PCR) se repetem de forma cíclica em 3 etapas:

1. A desnaturação do ADN é caracterizou-se pelo aumento da temperatura (92 °C – 94 °C) com a finalidade de quebrar as pontes de hidrogênio permitindo a abertura da dupla fita.
2. O anelamento do primer esta relacionado com a ligação dos primer's na região específica do material a amplificar, a partir da redução da temperatura (40 °C – 60 °C).
3. A extensão do primer foi realizada a 72 °C, e geralmente actua catalisado por um ADN polimerase termo-estável (geralmente Taq polimerase de termus aquaticus) (Santos, 2014). Estas alterações de temperatura ocorrem em torno de 30 a 40 vezes e designam- se ciclos (Novais; Pires-Alves, 2004).

Para a detecção do vírus foram usadas sequências de Primer's com comprimento e tamanho do produto da amplificação diferentes, porém desenhados especificamente para a detecção da doença de BBTV como são ilustrados na (tabela 3) abaixo.

Tabela 3: Sequência de Primer's usados para a detecção do vírus

Nome	Sequencia	Comprimento (Pb)	Tamanho do produto da amplificação por PCR (pb)	Referências
CP.F	5' ATG GCT AGG TAT CCG AAG 3'	18	513	Arumugam & Kalaimughilan, 2017
CP.R	5' TCA AAC ATG ATA TGT AAT TC 3'	20		
BBT-F	5' CTC GTC ATG TGC AAG GTT ATG TCG 3'	24	349	Lestari & Hidayat, 2020
BBT. R	5' GAA GTT CTC CAG CTA TTC ATC GCC 3'	24		

Em uma câmara de fumo utilizando os tubos de ependorf de 1,5 µl preparou – se a mix contendo os reagentes da tabela 1 acima, de seguida distribuiu-se para os tubos de PCR previamente etiquetados, um volume de 13 µl em cada tubo. Em seguida, em uma bancada adicionou-se 2 µl do ADN de modo a perfazer um volume de 15 µl e levou-se a correr na máquina com as condições de temperatura e tempo indicadas na tabela 2.

3.6.3. Visualização em Gel de agarose

Seguiu-se os procedimentos do (anexo 2), onde primeiro determinou-se a quantidade de agarose correspondente a quantidade de TAE, de seguida em um recipiente adicionou-se a quantidade do TAE e agarose e agitou-se, depois levou-se ao microondas sem fechar completamente a tampa e deixou-se a ferver até dissolver toda a agarose retirou-se e deixou-se a arrefecer sobre a bancada até ficar morno. De seguida adicionou-se o stainer e por fim colocou-se a mistura em uma malha de modo a cristalizar (fig. 9 a).

Em seguida usando um papel filme colocou-se 2 μ l do loading, para cada produto de PCR carregado misturou-se, colocou-se em cada orifício do gel (fig. 9 b) e levou-se para tina correu-se em 80V, 2000 A por 45 minutos (fig. 9 c).

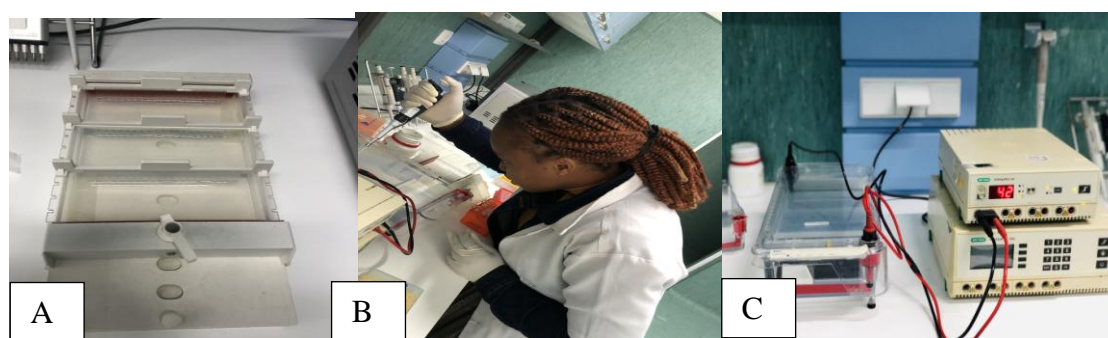


Figura 9: Electroforese. A-Malha com o Gel a Cristalizar, B-Adição do Produto do PCR no orifício, C-Adição do Produto do PCR no orifício

De seguida o gel foi colocado em um transluminador (fig. 9 a) em luz ultravioleta que emite fluorescência que facilita a visualização das bandas e captura de fotografias (usando a máquina Canon) como ilustra a figura (fig. 9 b).

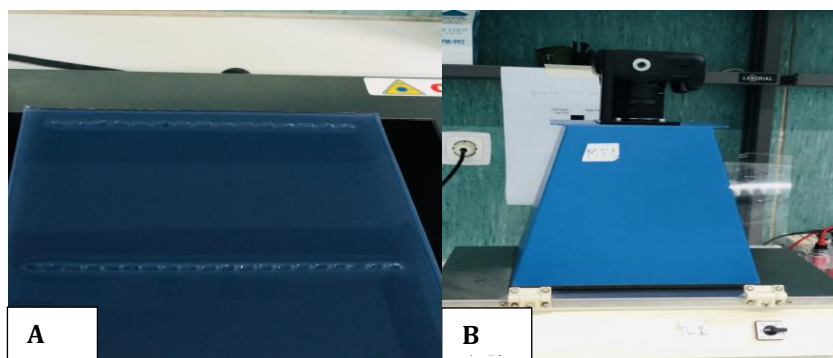


Figura 10: Electroforese. A-Máquina transluminadora de UV, B-Máquina canon sobre a transluminado

3.7. Análise de dados

Recorreu-se ao pacote estatístico *Microsoft Excel* para a organização dos dados, construção de tabelas, gráficos e cálculos de estatísticas descritivas (médias referentes a percentagem de infestação pelos afídeos e outros insectos, densidade dos insectos). Os dados foram estatisticamente analisados com o auxílio do programa *Stata 13*. Foram feitos testes de especificação de modo a validar o Teste de variância (Anova), como o teste de Normalidade (Shapiro -wilks) e Heteroquedasticidade (Breush-Pagan), fez-se a transformação dos dados na percentagem de infestação de outros sugadores. No teste de anova foi considerada significativa onde o $P > 0.05$ e $P < 0.05$ onde não foi significativa e a comparação de médias foi realizada com base no teste de Duncan, em que se considerou como tratamento Maguiguana (Bairro 2, Bairro 3, Bairro 4, Bairro 6 e 1º de Maio) e Zonguene (Matchedje e Bairro 6) e como variável resposta o parâmetro escala (densidade) e a % de infestação.

4. Resultados e discussão

4.1. Identificação morfológica dos insectos sugadores

Identificação morfológica sugere que o afídeo colectado trata-se do *P. nigronervosa*. Os outros insectos sugadores foram: percevejos e afídeos que possivelmente sejam *P. caladii*, encontrados em plantas infestantes ao redor das plantas de bananeira em espécies como *Justicia flava*, *Colocasia*, *Cissampelos sp*, *Cardiospermum halicacabum* (tabela 4).

Contundo levando em conta as características dos afídeos como o comprimento, a largura das patas e o tamanho do aparelho bucal dificultou a identificação morfológica dos mesmos, devido a falta de matérias próprios de observação e medição para a identificação dos afídeos. As amostras foram enviadas a Suécia para confirmar os resultados obtidos.

Tabela 4: insectos sugadores encontrados no distrito de Manhiça

Ordem	Família	Espécie
Hemíptera	Aphididae	<i>Pentalonia caladii</i>
Hemíptera	Aphididae	<i>Pentalonia nigronervosa</i>
Hemiptera	Pentatomidae Reduvidae	-

A imagens abaixo (fig. 11) ilustram os outros insectos sugadores encontrados nas plantas circunvizinhas da bananeira.



Figura 11: Insecto sugador da família pentatomidae (Percevejo).

De acordo com o Goot (1917) *P. nigronervosa* geralmente infesta plantas de bananeiras o género Mussa, enquanto que, *P. caladii* infesta plantas como *Colocasia esculenta*, *Heliconia sp*, *Zingiber officinale* (Footit *et al.*,2020). Estas plantas crescem ao redor da planta de bananeira (Watanabe *et al.*, 2013).

Plantações de milho e soja, são consideradas culturas comuns para a ocorrência de percevejo por conter o seu alimento preferencial, porém na ausência do seu hospedeiro estas conseguem sobreviver em hospedeiros alternativos sobretudo em plantas infestantes e leguminosas (Ferreira, Gomes, 2017, Wardel, *et al.*, 2016).

4.2. Percentagem de infestação do afídeo

a) Percentagem de infestação do afídeo da banana

Foram amostradas um total de 350 bananeiras sintomáticas das cultivares William e Cavendish consideradas variedades mais susceptíveis ao ataque ou infecção da BBTV (kumar *et al.*, 2011).

As percentagens de infestação por *P. nigronervosa* variaram de 24% a 62%, no bairro matchedje (localidade de zonguene) e bairro 3 (localidade de Maguiguana) respectivamente. A análise de variância mostrou que as localidades em estudo tiveram efeito significativo sobre a percentagem de infestação ($F = 3.90$; $P = 0.0059$), com os bairros 3 e 6 (na localidade de Maguiguana) apresentando um número significativamente maior de bananeiras infestadas pelo afídeo da bananeira em relação aos bairros 2, 4 e 1º de maio (na localidade de Maguiguana) e bairros 6, Matchedje (na localidade de Zonguene) que mostraram menores infestações. Estes por sua vez não diferiram significativamente entre si (fig. 12).

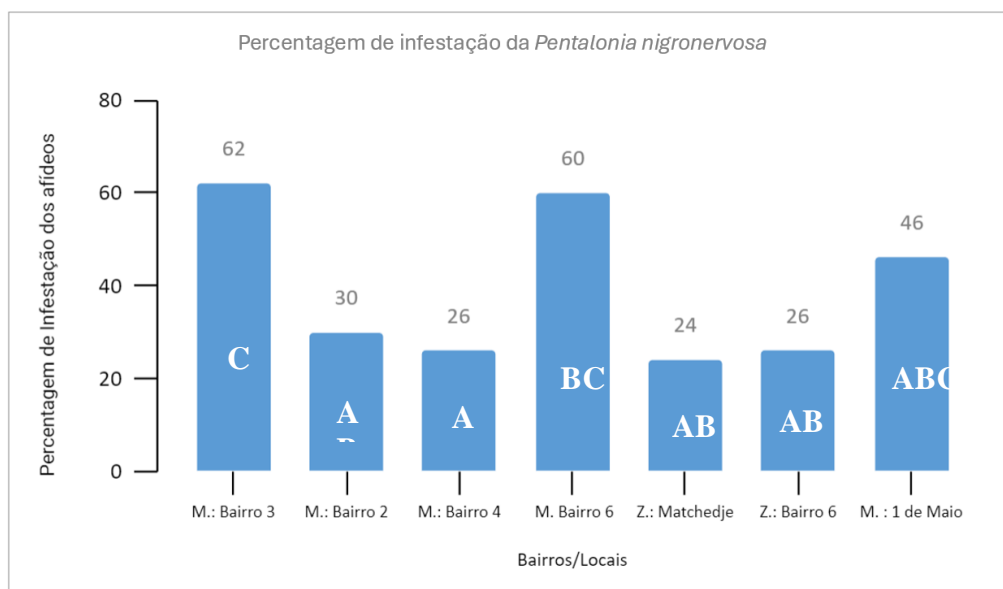


Figura 12: Infestação da *Pentalonia nigronervosa* em diferentes bairros/loais.

***Barras que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncann a 5 % de significância.**

Um dos factores a considerar para o maior nível de infestação é a falta de manejo e saneamento em alguns campos. Para Young e Wright, (2005) quando há falta de saneamento de campo permitindo o crescimento de outras plantas como a *Justicia flava* a *colocásia* entre outras dentro das fileiras ou ao redor do pseudocaule das plantas assim como folhas senescentes que não são retiradas, cria-se um ambiente favorável para o aumento de nível de infestação dos afídeos.

Por outro lado, a baixa percentagem de infestação nas localidades de Maguiguana (bairro 2, bairro 4 e 1º de Maio) e Zonguene (Matchedje, bairro 6), está relacionado a prática diligente de saneamento, o cumprimento de um compasso óptimo permitindo que a distância de uma planta para outra limite a dispersão dos afídeos para a formação de novos agregados de plantas infectadas por BBTV (Young e Wright, 2005).

B) Percentagem de infestação de outros insectos sugadores

As percentagens de infestação de outros sugadores variaram de a 0% (na localidade de Zonguene) a 70%, (no bairro 6 da localidade de Maguiguana). A análise de variância mostrou que as localidades em estudo tiveram efeito significativo sobre as percentagem de infestação ($F = 4.06$; $P = 0.0048$), com os bairros 6, 3, 4, 2 (na localidade de Maguiguana) apresentando um número significativamente maior de infestação por outros sugadores, quando comparado com os bairros 6, Matchedje (na localidade de Zonguene) e bairro 1º de Maio (na localidade de Maguiguana), que nos quais nenhum outro insecto sugador foi encontrado nas bananeiras com sintomas da doença (fig. 13).

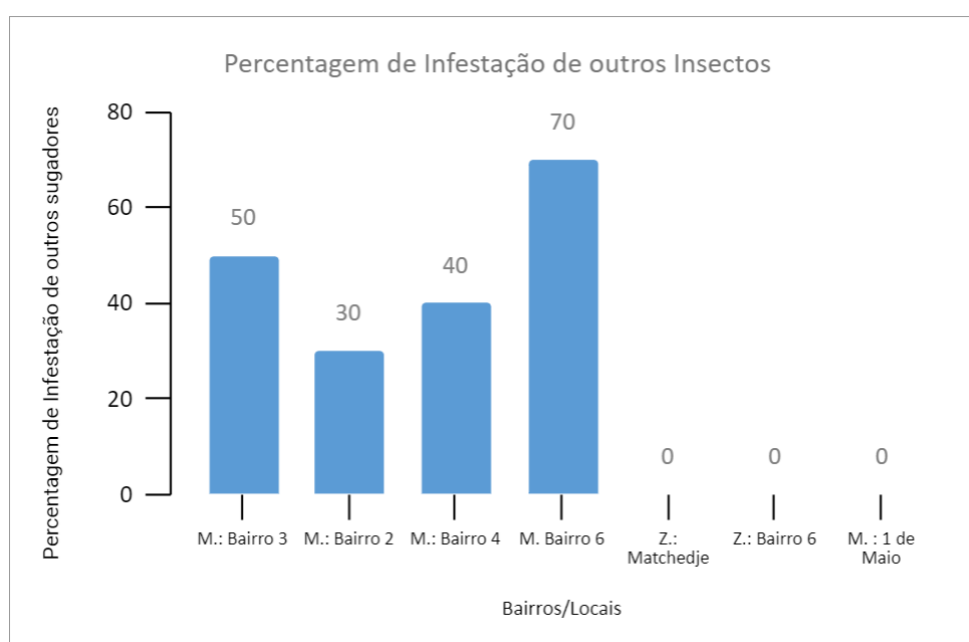


Figura 13: Percentagem de Infestação de outros insectos sugadores em diferentes bairros/locais.

A percentagem dos outros sugadores apresenta uma tendência como a dos afídeos, pois nos mesmos locais onde a % de infestação de *P. nigronevosa* é alta e onde esta é baixa, os outros insectos apresentam-se da mesma maneira, porém onde o *P. nigronevosa* é menor há inexistência dos outros sugadores.

4.3. Densidade Populacional

a) Densidade do afídeo da banana

Os afídeos da banana registaram densidade populacional numa escala com valores médios que variam de 1.18 a 2.22, o que significa uma densidade abaixo de 25 afídeos/planta. O resultado de análise de variância mostrou que o local teve efeito significativo sobre esta variável ($F= 2.96$; $P= 0.0229$) (fig. 14).

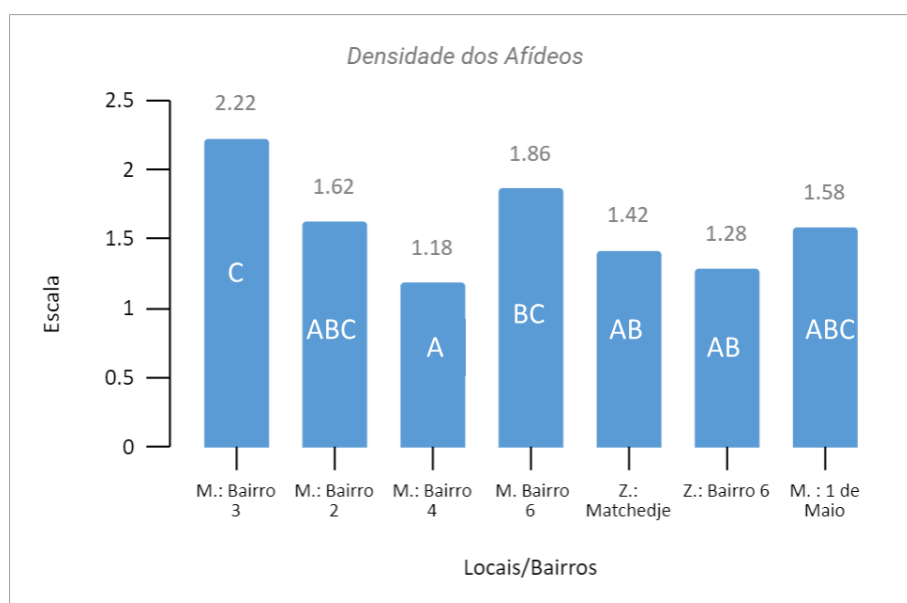


Figura 14: A densidade populacional dos afídeos da banana em diferentes locais.

*Barras que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncann a 5 % de significância.

Os valores de densidade encontrados, podem ser considerados baixos provavelmente pelo facto de as amostragens terem sido feitas na época seca fresca, pois ainda que não seja a época chuvosa, verificou-se acúmulo de água das chuvas na bainha das folhas causada pela queda das chuvas em alguns dias antes da amostragem, que desta forma, pode ter causado a baixa densidade dos afídeos. De acordo com Samwys (1979), na ausência de população significativa de predadores e em condições de precipitação moderada que inundam a bainha das folhas causando a morte dos afídeos reduzindo desta maneira a população, pode estar por detrás da baixa densidade do *Pentalonia nigronervosa* nas bananeiras infestadas.

As maiores densidades foram verificadas no bairro 6, 2, 3 e 1º de maio (na localidade de Maguiguana) e Matchedje (na localidade de Zonguene) que pode ter sido devido a copa, pois uma copa mais densa ajuda a multiplicar a população de afídeos onde esta

impede parcialmente que a chuva atinja as folhas e o pseudocaule favorecendo assim a multiplicação dos afídeos (Samywy, 1979).

Pode verificar-se uma relação directa entre a densidade e a % de infestação, onde as zonas que tiveram maior percentagem de infestação estas também apresentam maior densidade de *Pentalonia nigronervosa*. Outro factor a considerar por serem campos onde pratica-se a agricultura de subsistência, para além da bananeira outras culturas são produzidas na mesma área, como outras fruteiras, assim como folha de *Amarantus* e hortícolas que cria ambiente favorável para maior agregação do *P. nigronervosa* (Robson & Wright, 2006).

Ainda que a densidade por planta seja baixa ou insignificativa, este é um factor preocupante pois apenas um afídeo é capaz de contaminar várias plantas. Segundo Cunha (2017) apenas um afídeo pode contaminar várias plantas e uma espécie de afídeo pode transmitir um ou mais vírus, a dispersão do vírus deve ser levada em consideração já que os afídeos podem produzir formas aladas em quantidade elevada, com grande capacidade de voo.

b) Densidade populacional de outros insectos sugadores

Para outros insectos sugadores, as densidades foram igualmente baixas, não excedendo 1 individuo/planta (Tabela 5).

Verificou-se maior densidade populacional do afídeo que se acredita que seja da espécie *P. caladii* devido ao seu hospedeiro preferencial nas plantas circunvizinhas, e menor densidade populacional embora não seja significativa para os percevejos.

Tabela 5: Comportamento da densidade populacional de outros sugadores em diferentes localidades.

Outros insectos sugadores	Densidade (Individuo/planta)
Afídeos	0.72
Percevejo	0.65

Um dos factores a considerar para a densidade populacional verificada do percevejo assim como dos afídeos é a adopção de rotação de culturas em sistemas de plantio

directo, que favorece os percevejos assim como os afídeos proporcionar alimentação contínua e condições adequadas de sobrevivência, mesmo em períodos de inverno ou seca nestas condições os insectos alimentam-se de restos de culturas. Assim como, o cultivo de plantas hospedeiras como milho e soja que é uma das condições favoráveis para o aumento da densidade destes insectos segundo Cruz *et al.* (2012), que vai de acordo com o observado em campo um ambiente favorável para o aumento da densidade populacional de outros sugadores.

4.4. Detecção da doença da BBTV nos insectos colectados

a) Electroforese usando o primer CP

A imagem abaixo (fig. 15) apresenta os resultados da amplificação de 11 amostras de ADN de *Pentalonia nigronervosa* e alguns insectos sugadores, considerados possíveis vectores da BBTV em um gel de agarose de 1,5% usando o primer CP.

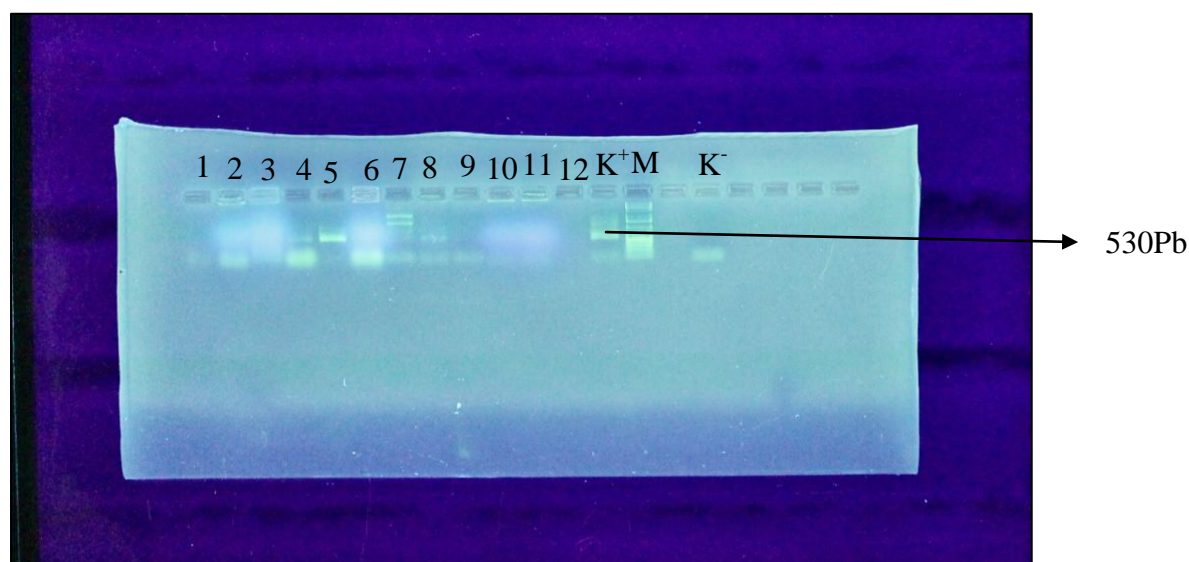


Figura 15: Detecção do vírus de BBTV por PCR. Poços: 1- Percevejo, 2- Percevejo, 3- percevejo, 4- percevejo, 5- *P. nigronervosa*, 6- Afídeo, 7-Afídeo 8- Percevejo, 9- *P. nigronervosa*, 10- *P. nigronervosa*, 11-Afídeo, K+, K-, M representa o padrão do peso molecular de 1kb (marcador).

As amostras submetidas a reacção de amplificação (PCR) forneceram resultados positivos e negativos, onde foi possível confirmar através do vector (*Pentalonia nigronervosa*) e um possível vector (percevejo), a presença do vírus causador da BBTV nas localidades estudadas. Verificou-se de igual modo a ausência do fragmento esperado que confirme a presença da BBTV em alguns afídeos (*P.nigronervosa*) e

percevejos. Segundo Manssor *et al.*, (2005) a presença do fragmento esperado confirma o diagnóstico da BBTV.

Iniciadores específicos do gene CP da BBTV foram obtidos através de uma região conservada no gene CP de forma a amplificar o tamanho de 530 pb. Em um estudo de plantas sintomáticas fez-se o diagnóstico do vírus do topo em leque da bananeira, realizado por Arumugam (2017) a mesma sequência de primer's foram utilizados para fazer a detecção da doença em bananeiras vermelhas infectadas por BBTV, os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose onde plantas sintomáticas testaram positivo ao BBTV, observado no tamanho esperado de (530 pb) e (513 pb), (Arumugam & Kalaimughilan, 2017).

Em contrapartida o que pode ter levado a ausência do fragmento esperado, ou seja, resultado negativo para o vírus da doença em outros insectos é que os insectos podem ter pousado em plantas com sintomatologia da BBTV e não tenham adquirido o vírus até o momento que se fez a colecta da amostra, para o caso dos afídeos estes precisam de um período mínimo necessário de 4h e 30 min para que adquiram o vírus, e também pelo facto da transmissão do vírus ser persistente circulativa não – propagativa a transmissão ocorre por vários dias ou semanas após o vector se tornar portador do vírus (Amin *et al.*, 2008; Fajardo e Nickel, 2019).

b) Electroforese usando primer BBT

A imagem abaixo (fig. 16) apresenta os resultados da amplificação de 4 amostras de ADN de *Pentalonia nigronervosa* e alguns insectos sugadores que são possíveis vectores de BBTV, onde seleccionou-se 4 amostras e repetiu-se o diagnóstico utilizando primer's diferentes, para obter resultados mais consistentes de modo a confirmar os resultados obtidos.

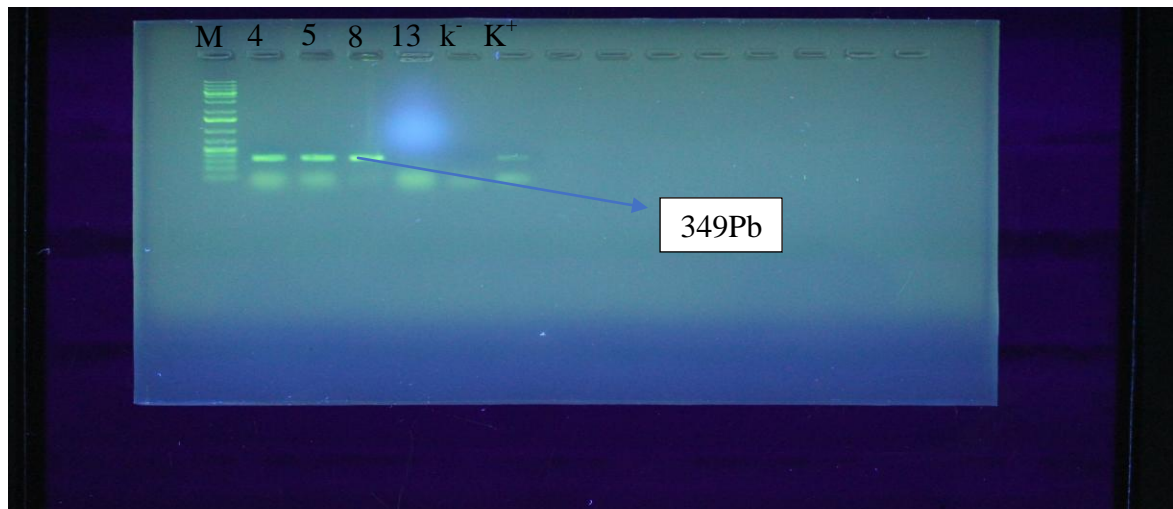


Figura 16: Gel de agarose (1%) corado com safeview Tampão TAE mostra o produto de PCR de 4 amostras 4- percevejo, 5- percevejo, 8- *P. nigronevosa*, 10- *P. nigronevosa*. A letra M representa o padrão do peso molecular de 1kb (marcador), K- representa o controle negativo e K+ representa o controle positivo.

A presença do fragmento esperado nas amostras dos percevejos e *P. nigronevosa* da (fig. 16) confirma o diagnóstico da BBTV e a ausência do fragmento do tamanho esperado na amostra do *P. nigronevosa* fornece-nos o diagnóstico negativo da BBTV (Manssor *et al.*, 2005).

Portanto as mesmas amostras testadas usando primer's específicos (CP) foram testadas com os primer's (BBT), confirmaram a presença de BBTV com tamanho de amplicon de 349Pb com sequência de primer's diferentes o resultado confirma a presença da BBTV nas espécies estudadas.

Assim sendo para além do vector do vírus da BBTV *Pentalonia nigronervosa*, o percevejo da família Pentatomidae, pode ser considerado como outro potencial vector da BBTV.

Os insectos sugadores tem a habilidade de transmitir doenças para as plantas, e o mesmo esta relacionado ao modo de alimentação. E os percevejos (Heterópteros) são de importância económica mínima como vectores de patógenos de plantas, porém tem se notado casos em que estes para além de transmitir fungos os pentatomorphos (Lygaeoidea, Coreoidea, Pentatomídea e Pyrrhocoroidea) tem capacidade de transmitir vírus e fitoplasmas, tornando desta maneira importante incluir os percevejos em levantamentos como potenciais transmissores de doenças virais (Mitchell, 2004).

5. Conclusões e Recomendações

5.1. Conclusões

- Foi identificado o afídeo da bananeira o *Pentalonia nigronervosa*, e os insectos associados que é o percevejo e o afídeo *P. caladii*.
- A percentagem de infestação por *P. nigronervosa* variou de 24 a 62% no bairro Matchedje (na localidade de Zonguene) e bairro 3 (na localidade de Maguiguana) respectivamente. Para os insectos associados variou de 0 a 70%.
- As localidades em estudo apresentaram em média uma densidade populacional de 25 afídeos/planta. E para os outros insectos apresentaram uma densidade média de 1 indivíduo/planta.
- Foi detectada o vírus de BBTV em uma amostra de afídeo e em um potencial vector do vírus da doença do topo em leque da bananeira que é o percevejo.

5.2. Recomendações:

Para os Investigadores:

- Recomenda-se aos investigadores que se faça uma identificação molecular dos Potenciais vectores de doenças, que permita identificar desde a família até a espécie.
- Desenvolver mais estudos sobre o levantamento de outros sugadores associados a bananeira que podem ser considerados como potenciais vectores.

6. Referências bibliográficas

1. Alves, E. J., Nascimento, A. S., Mesquita, A. L. M. (1982). *Ocorrência do pulgão *Pentalonia nigronervosa* coq.(hom: Aphididae), em bananeiras.*
2. Amin, I. Q., Mansoor, S., Ilyas, M., Briddon, RB. (2008). *Caracterização molecular do Banana Bunchy Top Virus (BBTV)* hhp: dx.doi.org/10.1007/s11262-007-0168-y
3. Arumugan, C., Kalaimughilan, K., Kathithachalam, A. (2017). *Banana bunch top viral coat protein (CP) gene expression studies at molecular level in hill banana cv. Sirumalai (AAB).* Internacional Journal of Microbiology and Applied Sciences ISSN: 2319 7706 (6): 398-411.
4. BananaMoz. (2019). *Ocorrência de topo em leque da bananeira.*
5. Blackman, R.L & Eastop, V. F. (2006). *Pulgões nas plantações da banana do mundo.* shurbs, Londres., Ltd.
6. Batista, M. F., Marinho, V. L. A., Miller, R. (2002). *Praga quarentenaria A1 BBT nanavírus.*
7. Basso, M. F., Fajardo, T.V.M., Pio, R.G., Eiras, M., Zerbin, F. M. (2014). *Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira.* Revisão Anual de Patologia de plantas, (22): 160-207.
8. Borges, A., Mesquita, A., Costa, D., Silva, J., Carvalho, J., Matos, A. (2000). *Banana Fitossanidade.*
9. Borges, A., Souza, L. 2004. *O cultivo da bananeira, empresa Brasileira de pesquisa Agropecuaria Embrapa Mandioca e Fruticultura.* Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento.
10. Calima, J., Dengo, M. N., Moamba, C.S. (2014). *Expansão dos recursos naturais de Moçambique- quais são os potenciais impactos na competitividade da agricultura?* Relatório preliminar. USAID/Moçambique.
11. Cabi. 2017. *Crop protection compendium* version 2. Wallingford, UK: CAB international.
12. Carvalho, L. M., Bueno, V. H. P., Mendes, S. M. (2006). *Ocorrência e flutuação populacional de tripses, pulgões e inimigos naturais em crisântemo de corte em casa de vegetação.* V65. Campinas, Bragantia.

13. Cordeiro, Z. J. M. (2000). *Banana Fitossanidade*. Embrapa comunicação para transferência de tecnologia Brasília de pesquisa Agropecuaria Embrapa Mandioca e Fruticultura Ministério da Agricultura e do Abastecimento.
14. Costa, M. R., Moura, F. E. (2001). *Manual de extracção de DNA*.
15. Choate, M. P. (1979). *Identification Key to the principal families of Florida Heteroptera*
16. Capineira, J. L. (2008). *Banana pest and their management*. Enciclopedia of entomology. 368p.
17. Cunha, Suzan. (2017). *Afídeos e suas Interações Biológicas em áreas de vegetação natural e agrícolas: Exemplo de Sucesso nas Invasões biológicas*. Universidade Federal de São Carlos.
18. Cruz, I., Mendes, S., Viana, P. (2012). *Importancia economica e manejo de insectos sugadores associados á parte aérea de plantas de milho Bt*.
19. Dale, J. L. (1987). *Topo da banana uma doença de plantas tropicais economicamente importante avanço na pesquisa de virus*.
20. Embrapa. (2020). *Mal do panama*. <https://.agencia.cnptia>.
21. FAO. (2016). *Doença do topo em leque da bananeira*.
22. Ferreira, C. S. B., Gomez, S. R. D. (2017). *Percevejos e o sistema de produção soja-milho*.
23. Firmino, J. V. L. (2013). *Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera) da mata atlantica do estado de alagos*.
24. Footit, R. G., Hell, Maw., Piker, E., Miller, R. H. (2010). *A identidade da Pentalonia nigronervosa coquerel e P. caladii van der Goot (Hemiptera: Aphididae) com base em análise molecular e morfológica*. zootaxa 2358: 25-38.
25. Fiovoranço, J. C. (2000). *Comércio internacional de produtos hortifrutícolas; estudo de la Union Europea*. 410p. Tese (Doutorado) – UPV, Valência.
26. Gondwe, W.T., Mweneband, B. M. L., Natha, E., Mutale, P. (2007). *Banana bunchy top disease in Mozambique and Zambia*. InfoMusa (16): 38-39.
27. Goot, C. A. (1917). *Banana bunchy top vírus: Ocorrença do P. calladi em plantas de bananeiras*.
28. Governo de Mocambique. (2005). *Distrito de Manhiça*.

29. Halbert, (2015). E Scott, (2004) e Universidade de Havai (2006). *Vírus do topo da banana*. SADER. Ficha Técnica N° 31.
30. Halbert, M. Baker, K. (2015). *Banana bunchy top disease*.
31. Hooks, C.R.R., Fukuda, S., Perez, E. A., Manandhar, R. W. K., Almeida R.P. P. (2000). *Transmissão por pulgões do vírus banana bunchy top vírus para bananas após o tratamento com bananacida*. jornal de entomologia económica.
32. IIAM. (2019). *Ocorrência da doença da banana bunch top (BBTV) em Moçambique*.
33. IIAM. (2021). *Vírus do topo em leque, multiplicação das mudas*.
34. IPPC. (2016). *Confirmation of Banana Buch Top Disease (BBTV) in Mozambique*
35. Jaisval, K. G., Dweivedi. H., Pandey., Shukla, P. (2023). *A comprehensive review on plant disease vectors and their management*.
36. Karamura, E., Frison, E., DA, Sharrock, S., (1998). *Sistemas De Produção De Banana*.
37. Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., Samiyappan, R. (2008). *Indução de resistência sistêmica em bananeira (Musa sp) contra o vírus banana bunchy top (BBTV) pela combinação de quitina com pseudomonas fluorescens cepa CHAO colonizadoras de raízes*.
38. Kumar, L., Selvarajan, R., Iskra-Caruana, M. L., Chabannes, M., Hanna, R. (2015). *Biology, Etiology and Control of Virus Disease of Banana and Plantain*.
39. Kumar, P. L., Hanna, A.Y. R. b., Alabic, O. J., Soko, M. M d, Obena, T. T, Vangue, G. H. P., Naiduc, R. A. (2011). *Vírus do topo da banana na África Subsaariana: Investigações Sobre distribuição e diversidade de vírus*. Pag 401-412
40. Lima, M., Fajardo, T.V.M. (2012). *Doenças causadas por vírus*. In: Lima, M. F., Moreira, F. R. B. (Ed.). Uva de Mesa: Fitossanidade. 2. Ed. Brasília, DF: Embrapa, P. 43-58 (Frutas do Brasil, 14).
41. Lima, M., Fajardo, T.V.M. (2019). *Doenças causadas por vírus*. In: Lima, M. F., Moreira, F. R. B. (Ed.). Uva de Mesa: Fitossanidade. 2. Ed. Brasília, DF: Embrapa, P. 43-58 (Frutas do Brasil, 14).

42. Lima, M., Fajardo, T.V.M. (2012). *Doenças causadas por vírus*. In: Lima, M. F., Moreira, F. R. B. (Ed.). Uva de Mesa: Fitossanidade. 2. Ed. Brasília, DF: Embrapa, P. 43-58 (Frutas do Brasil, 14).
43. Fajardo, T.V.M., Niquel, O. (2019). *Banana bunchy top disease*. 2. Ed. Brasília, DF: Embrapa, P. 43-58 (Frutas do Brasil, 14).
44. MAE. (2005). *Distrito de Manhiça*.
45. MASA. (2019). *Doença do topo em leque da banana em Moçambique*.
46. Mansoor, S., Qazi, J., Amin, I., Khatri, A., Khan, I. A., Raz, S., Briddon, R. W. (2005). *PCR-based method, with internal control, for the detection of Banana Bunchy Top Virus in Banana*. *Molecular biotechnology* (30): 167-189.
47. Manzo, S. G, Orozco, S. M, Martinez, B. L, Canto, C. B. (2014). *Doenças de quarentena e importancia economica em bananeira (Musa sp)*. no México Faculdade de ciências Biologicas e agrarian, Universidade de Colima, A.
48. Meissner, P. E., Brioso, P. S. T. (2000). *Doenças causadas por vírus*. In:(Org) *banana: fitossanidade. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura*. Brasília: Embrapa Comunicação para a transferência de Tecnologia, P.78-81 (Frutas do Brasil, 8.).
49. Mitchel, A. M. (2004). *Heteroptera as vectors of Pathogens*. Dept. biology, Uinthrop University, neotropical entomology. Pag: 519-545.
50. Nelson, S. (2004). *Banana top bunchy: detalhado sinais e sintomas*. serviço de extensão cooperative UH-CTAHR
51. Neto, S. P. S., Silva, M. S. (2009). *Cultura de tecido no controle de viroses da bananeira*, em Brasil, embrapa.
52. Nickel, O., Fajardo, T.V.M. (2009). *Obtenção de material Propagativo Livre de Vírus e diagnostico de vírus em macieiras e pereiras*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e vinho.
53. Novais, C. M., Pires-Alves, M. (2004). *PCR em tempo real*. Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento, (33): 10-13.
54. Oliveira, E. (2019). *Electroforese: Conceitos e Aplicações*. Centro científico conhecer-Goiânia, (11) número.22, <https://doi.org/10.18677/Enciclopedia>.
55. Packauskas, R. J. (2012). *The pentatomidae, or stink bugs, of kansas with a key to species (Hemiptera: Heteroptera)*.

56. Petecof, R., et al. (2015). *Análise da eficiência do gel de agarose na eletroforese de DNA*. *Acis Atas de Ciências da Saúde*, v. 3, n. 3.
57. Picango, C. M. (2000). *Maneio integrado de pragas*. Universidade Federal de Viçosa. Departamento da biologia animal.
58. Qazi, J. (2016). *Banana bunch top virus and the bunch top disease*. *Journal of general plant pathology*, (82): 2-11, DOI10.1007/s 10327-015-0642-7.
59. Raut, S. P, e Suvarna, R. (2004). *Doenças das bananeiras e seu manejo e doença de frutas e leguminosas* (2): 37-52. Kluwer Academic Publishers, Holanda, (2): 37-52.
60. Rishi, N. (2009). *Doenças de Vírus de plantas significativas na Índia e Vislumbre da tecnologia moderna de gerenciamento de doenças*. *J. Gen. Pathol*, 75: 1-18.
61. Ruface, C. (2019). *Conferencia internacional de controlo da Banana na Africa*. (Coordenador do Projecto Banana Bunchy Top Virus).
62. Robson, j. D., & Wright, M. G. (2006). *Within-plant Distribution and Binominal Sampling of Pentalonia nigronervosa (Hemiptera: Aphididae) on Banana*. *Journal of Economic Entomology*, (99): 85-90.
63. Santos, E. A., et al. (2014). *Influência da Temperatura Ambiente Na Análise do Termociclador*. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, p. 1522-1525,
64. Secretaria de agricultura, pecuário desenvolvimento rural, pesca e alimentação <https://nube.Siap.gob.mx/cierreagricola>.
65. Sousa, A. K., Lucas. R. M., Souza, O. D., Costa. B. B. (2019). *A produção da Banana e seus impactos socioeconómicos no desenvolvimento da Microregião de Araguaína – TO*.
66. Thomson, D., Dietzgen, R. G. (1995). *Detecção de vírus de plantas de ADN e ARN por PCR e RT-PCR usando um protocolo de liberação rápida sem homogenização de tecidos*. *J Métodos* (54):85-95.
67. Tomas, J. E. (2008). *Banana bunch top vírus*. 3ª edição, Jackson, GVH.
68. Tyrell, D. A. J. (1997). *Polymerase Chain Reaction*. *BMJ*. (324): 4-9,.
69. Vijay, C. & Verma, A. (2013). *Avanços na pesquisa endofítica*. Springer Science e Business media 2013-454 pag online <https://link.springer.com/book>.

70. Vieira, L. C. R. (2009). *Avaliação de Cultivares de Bananeiras na Microrregião de Aquidauana*. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Adiquana.
71. Wardel, A. J., Ribeiro, P. L., Chiaradia, L. A. Nesi, N. C. (2016). *Pragas e doenças do milho*. epagri. [Hhttps://aegro.com.br/percevejos](https://aegro.com.br/percevejos).
72. Watanabe, S, Greenwell, A. M; Bressan, A. (2013). *Locations, concentration, and transmission efficiency of banana bunch top virus in four asexual lineages of pentalonina aphids*. *Viruses*, (5):758-775.
73. Wilson, K. & Walker, J. (2010). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 7. Ed. New York: Cambridge University Press.
74. Wright, J. G. (2005). *Pest Advisory no 2 banana bunch top*, Serviço de proteção vegetal, secretaria da comunidade do pacifico.
75. Wright, M. G. (2007). *Plant distribution and binominal of Pentalonina nigronervosa*. article in jornal of economic entomology.
76. Young, C. L., & Wright, M. G. (2005). *Seasonal and spacial Distribution of banana aphid, Pentalonina nigronervosa (Hemiptera: Aphididae)*. Department of plant and Environmental protection sciences.

ANEXOS

Anexo 1: Percentagem de infestação de *Pentalonia nigronervosa*

```
anova niv trat
```

	Number of obs =	35	R-squared =	0.4550
	Root MSE =	18.8604	Adj R-squared =	0.3382

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	8314.28571	6	1385.71429	3.90	0.0059
trat	8314.28571	6	1385.71429	3.90	0.0059
Residual	9960	28	355.714286		
Total	18274.2857	34	537.478992		

```
. swilk erro
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
erro	35	0.96334	1.309	0.561	0.28723

```
. hettest erro
```

Breusch-Pagan / Cook-Weisberg test for heteroskedasticity

Ho: Constant variance

Variables: erro

chi2(1) = 6.45

Prob > chi2 = 0.0111

Anexo 2: Teste de Comparação de médias de Pentalonia nigronervosa

niv	Mean	Std. Err.	Duncan Groups
trat			
1	62	8.434623	B
2	30	8.434623	A
3	26	8.434623	A
4	60	8.434623	B
5	24	8.434623	A
6	26	8.434623	A
7	46	8.434623	AB

Note: Means sharing a letter in the group label are not significantly different at the 5% level.

Anexo 3: Densidade populacional do Pentalonia nigronervosa

```
. anova esc trat
```

Number of obs =	35	R-squared =	0.3881
Root MSE =	.463681	Adj R-squared =	0.2570

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	3.8188569	6	.63647615	2.96	0.0229
trat	3.8188569	6	.63647615	2.96	0.0229
Residual	6.02000023	28	.215000008		
Total	9.83885713	34	.289378151		

```

. swilk erro

                Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable | Obs   W       V       z       Prob>z
-----|-----
erro    |   35  0.97040  1.057  0.115  0.45429

. hettest erro

Breusch-Pagan / Cook-Weisberg test for heteroskedasticity
Ho: Constant variance
Variables: erro

chi2(1)      =      0.42
Prob > chi2  =      0.5150

```

Anexo 4: Teste de Comparação de médias da densidade populacional do *Pentalonia nigronervosa*

esc	Mean	Std. Err.	Duncan Groups
trat			
1	2.22	.2073644	C
2	1.62	.2073644	ABC
3	1.18	.2073644	A
4	1.86	.2073644	BC
5	1.42	.2073644	AB
6	1.28	.2073644	AB
7	1.58	.2073644	ABC

Note: Means sharing a letter in the group label are not significantly different at the 5% level.

Anexo 5: Percentagem de infestação de outros sugadores

```
anova os trat
```

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	2.38276948	6	.397128247	3.48	0.0107
trat	2.38276948	6	.397128247	3.48	0.0107
Residual	3.19398762	28	.114070986		
Total	5.5767571	34	.164022268		

Number of obs = 35 R-squared = 0.4273
 Root MSE = .337744 Adj R-squared = 0.3045

```
swilk erro
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
erro	35	0.92371	2.723	2.091	0.01826

```
anova rqsos trat
```

Anexo 6: Dados normalizados de outros insectos sugadores

```
generate rqsos=os^0.5
```

```
anova rqsos trat
```

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	2.96529235	6	.494215392	4.06	0.0048
trat	2.96529235	6	.494215392	4.06	0.0048
Residual	3.41118042	28	.121827872		
Total	6.37647277	34	.187543317		

Number of obs = 35 R-squared = 0.4650
 Root MSE = .349038 Adj R-squared = 0.3504

```

. predict errol, residual

. swilk errol

                Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable |      Obs      W      V      z      Prob>z
-----|-----
   errol |      35  0.94370  2.009  1.457  0.07260

. hettest errol

Breusch-Pagan / Cook-Weisberg test for heteroskedasticity
Ho: Constant variance
Variables: errol

chi2(1)      =      0.67
Prob > chi2  =      0.4134

```

Anexo 7: Comparação de médias da densidade de outros insectos sugadores

rqs	Mean	Std. Err.	Duncan Groups
trat			
1	.5897367	.1560948	C
2	.3886472	.1560948	ABC
3	.4942088	.1560948	BC
4	.7642906	.1560948	C
5	.0316228	.1560948	AB
6	0	.1560948	A
7	0	.1560948	AB

Note: Means sharing a letter in the group label are not significantly different at the 5% level.

Anexo 8: Densidade populacional de outros sugadores

```
. anova dens trat
```

	Number of obs =	35	R-squared =	0.3665
	Root MSE =	.312194	Adj R-squared =	0.2308

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	1.57912758	6	.26318793	2.70	0.0339
trat	1.57912758	6	.26318793	2.70	0.0339
Residual	2.72901506	28	.097464824		
Total	4.30814264	34	.126710078		

```
. swilk erro
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
erro	35	0.97122	1.027	0.056	0.47778


```
. hettest erro
```

Breusch-Pagan / Cook-Weisberg test for heteroskedasticity

Ho: Constant variance

Variables: erro

chi2(1) = 0.00

Prob > chi2 = 0.9653

Anexo 9: Comparação de médias da densidade de outros insectos sugadores

dens	Mean	Std. Err.	Duncan Groups
trat			
1	.52	.1396172	B
2	.2162963	.1396172	AB
3	.4	.1396172	AB
4	.44	.1396172	AB
5	-1.11e-16	.1396172	A
6	-1.11e-16	.1396172	A
7	-1.11e-16	.1396172	A

Note: Means sharing a letter in the group label are not significantly different at the 5% level.

Anexo 10: Protocolo de extração de ADN (CTAB)

1. Pesar 500mg de material e colocar num almofariz contendo 4 ml de CTAB buffer (inicia-se com 2.5 ml e perfaça o volume a medida que for macerando) e 1% de pvp (ponta de uma espátula).
2. Macerar ate ficar uma mistura homogênea;
3. Transferir 2ml do macerado para um tubo de igual volume;
4. Adicionar 2ml de RNase a (20 mg/ml) a cada 2 ml do macerado e deixar na bancada por 5 minutos
5. Incubar por 20 minutos a 65°C;
6. Centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm e transferir 1ml do sobrenadante para um novo tubo de preferencia de 2ml;
7. Adicionar 1 ml clorofórmio-álcool-isoamilico e agitar manualmente por 20 segundos;
8. Centrifugar por 15 minutos a 13200 rpm e transferir o sobrenadante para um novo tubo;
9. Adicionar 1 ml de isopropanol gelado e guardar a -20°C POR 30 minutos;
10. Centrifugar por 15 minutos a 13200rpm;
11. Descartar o sobrenadante;
12. Lavar duas vezes com etanol a 70% centrifugando a 13200 rpm por 10 e 5 minutos respectivamente (nas duas lavagens, descartar cuidadosamente o etanol);

13. Secar o pellet a temperatura ambiente (30 minutos a 1 hora, dependendo da quantidade de etanol remanescente na ultima lavagem);

14. Ressuspender em 50 ml de H₂O e guardar a 4°C ate necessitado para o uso.

Anexo 10: Ficha de campo

Distrito	Localidade	Data: / /
Número do campo:		
Espécie:		
Planta	Infestação	Nível/Escala
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		