

DM

**Deteção e Caracterização Molecular  
das Estirpes de *Wolbachia* nos Afídeos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Marta Abreu Moreira**

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

*A Nossa Universidade*

[www.uma.pt](http://www.uma.pt)

Setembro | 2014

# **Deteção e Caracterização Molecular das Éstirpes de *Wolbachia* nos Afídeos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Marta Abreu Moreira**

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTAÇÃO  
Mahnaz Khadem

## Agradecimentos

Tenho de agradecer antes de mais aos meus pais, Francisco e Tereza Moreira. Obrigado por sempre acreditarem e lutarem por mim, por desejarem o melhor para mim e fazerem o impossível para o conseguir. Graças ao suor do vosso trabalho e aos sacrifícios que sempre fizeram pude escolher o meu rumo, estudar e ser a pessoa que sou hoje. Nunca haverá palavras suficientes para vos agradecer!

Agradeço também ao meu namorado, Gonçalo Gomes, por todo o apoio, paciência e pelas horas de sono mal dormidas graças aos momentos de inspiração (e os prazos a cumprir!) que me faziam escrever até altas horas da madrugada. Thank you my sunshine!

Agradeço aos meus amigos e colegas do laboratório, a minha segunda família, que sempre me apoiaram e aturaram. Os dias no laboratório com vocês são sem dúvida dias que irei guardar para sempre comigo! Todos os risos e brincadeiras, sempre memoráveis, mas também toda a entreatada em horas em que o volume de trabalho aumentava e os momentos de *stress* crescia consideravelmente.

Agradeço em particular á Carla Gouveia por ser a amiga de sempre, a companheira de tantos anos, a pessoa que mesmo sem falar, só com um olhar, um sorriso, conseguia me acalmar e me mostrar que desse por onde desse ela estaria lá, comigo, sempre!

Agradeço ao Fábio Reis pelas horas de música, riso e conversas que me proporcionou, muitas vezes na companhia da Sónia Alves. Vocês sem dúvida me marcaram o meu dia-a-dia no laboratório, me apoiaram e acompanharam nos momentos mais críticos, viram as minhas lágrimas e me consolaram quando precisei... Obrigado!

Énio Freitas, meu biólogo secretário, obrigado pelo carinho e companheirismo, obrigado por me fazeres rir e me dares uma razão, para mesmo nos dias mais difíceis, sair do laboratório de sorriso no rosto nem que fosse só pelo prazer de te chatear!

Agradeço a minha orientadora, Professora Dra. Mahnaz Khadem, por ter, antes de mais, confiado em mim e me ter dado a oportunidade de aprender e crescer profissionalmente sob sua orientação. Sem dúvida, no laboratório, foi uma mãe para mim... Mostrou-me o caminho mais correto, deu-me força para seguir em frente e querer mais e, como não podia deixar de ser, chamou-me à atenção quando as minhas escolhas não eram as melhores. Obrigado pela paciência e apoio de sempre.

Agradeço ao Professor Dr. Miguel Ângelo Carvalho, coordenador do ISOplexis - Banco de Germoplasma, e à Universidade da Madeira por ter disponibilizado os meios e instalações para a realização deste projeto.

Agradeço ao Engenheiro Franquinho pelo apoio prestado na identificação das amostras, por ter disponibilizado espaço no Laboratório Agrícola da Camacha e por me deixar acompanhar a sua equipa nas saídas de campo.

Agradeço à Dra Amparo Latorre e sua equipa do Instituto Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva (Valência – Espanha) pela oportunidade que me deram de aprender novas técnicas, tendo disponibilizado as instalações, e por me terem orientado nos meses que passei no laboratório.

## Resumo

A *Wolbachia* pertence a um grupo de bactérias intracelulares, transmitidas maternalmente, que se encontram amplamente distribuídas nos artrópodes. Estes endossimbiontes encontram-se normalmente nos tecidos do sistema reprodutor dos artrópodes e têm a capacidade manipular a sua reprodução de modo a garantir a sua transmissão à descendência e rápida dispersão na população. A capacidade de manipulação reprodutiva da *Wolbachia* tornou-a o alvo de diversos estudos para uma maior e melhor perceção da sua implicação em processos biológicos e evolutivos e por acreditar-se que esta bactéria é uma promissora ferramenta no controlo de populações de insetos que são pragas agrícolas.

Os afídeos são um grupo de insetos associados às plantas que podem ter um efeito devastador nas culturas agrícolas e hortícolas pois não só retiram nutrientes às plantas como podem ser vetores de doenças. Embora durante muito tempo se pensasse que estes insetos não albergavam a *Wolbachia* estudos recentes mostram que são várias as espécies de afídeos infetados com esta bactéria.

O principal objetivo deste trabalho é estudar a prevalência de infeção por *Wolbachia* assim como a caracterização das suas estirpes em amostras de afídeos dos Arquipélagos da Madeira e dos Açores.

Neste estudo foram analisadas 545 amostras de afídeos, 361 provenientes do Arquipélago da Madeira e 184 dos Açores. Utilizando a técnica da “Polymerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase) amplificou-se o gene *16S rRNA* (RNA ribossomal) e verificou-se que 32 destas amostras encontravam-se infetadas com *Wolbachia* sendo a maior parte das amostras infetadas provenientes dos Açores.

Para determinar a estirpe que infeta estes afídeos utilizou-se a tipagem sequencial multilocus (MLST) com os genes glutamyl-tRNA amidotransferase, subunidade B (*gatB*), citocromo c oxidase, subunidade I (*coxA*), proteína hipotética conservativa (*hcpA*) e proteína da divisão celular (*ftsZ*). A análise filogenética realizada para os diferentes genes mostrou que grande parte das amostras analisadas estão incluídas em dois dos novos supergrupos descobertos para *Wolbachia*, supergrupo M e N. Foi detetada a presença da mesma estirpe de *Wolbachia*, supergrupo N, em duas espécies diferentes de afídeos, *Neophyllaphis podocarpi* e *Aphis spiraecola* da mesma planta hospedeira, *Podocarpus macrophyllus*. Esta infeção reforça a ideia de que a *Wolbachia* não recorre só a transmissão vertical para se difundir na população mas utiliza também a transmissão horizontal.

A deteção e caracterização das estirpes de *Wolbachia* é essencial para um maior entendimento sobre a sua origem e forma de disseminação. Esta informação é importante para desenvolvimento de estratégias de controlo de pestes recorrendo a estes endossimbiontes.

Palavras chave: Simbiose, *Wolbachia*, Afídeos, MLST, análise filogenética, transmissão horizontal

## Abstract

*Wolbachia* belongs to a group of intracellular bacteria transmitted maternally, which are widely distributed in arthropods. These endosymbionts are usually found in the reproductive tissues of arthropods and have the ability to manipulate their reproduction in order to ensure its transmission to the progeny and dispersion in the population. *Wolbachia* ability to manipulate the host reproductive system became the target of several studies whose main goal is to have a better perception of their involvement in biological and evolutionary processes. These bacteria are believed to be a promising tool to the biological control of insect populations that are agricultural pests.

Aphids are a group of insects associated with plants that can have a devastating effect on crops because they may not only remove nutrients from the plants as they can be disease vectors. Although for a long time it was thought that these insects didn't harbour *Wolbachia* recent studies show that there are several species of aphids infected with these bacteria.

The main objective of this work is to study the prevalence of *Wolbachia* infection and the characterization of their strains in samples of aphids from Madeira and Azores Islands.

In this study were analyzed 545 samples of aphids, 361 from the Archipelago of Madeira and 184 from Azores. Using the polymerase chain reaction (PCR) the gene 16S rRNA was amplified and 32 samples were infected with *Wolbachia*, most of these samples were from Azores. To characterize the *Wolbachia* strains we used MLST genes glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit B (*gatB*), cytochrome c oxidase, subunit I (*coxA*), conserved hypothetical protein (*hcpA*) and cell division protein (*ftsZ*). The phylogenetic analysis performed for the different genes showed that most samples are included in two new supergroups discovered for *Wolbachia*, supergroup M and N.

The same strain of *Wolbachia*, from the supergroup N, was found in two different species of aphids, *Neophyllaphis podocarpi* and *Aphis spiraecola*. These two species have their host plant, *Podocarpus macrophyllus*, in common. This infection reinforces the idea that *Wolbachia* doesn't use only the vertical transmission to spread in a population but also uses horizontal transmission.

The detection and characterization of *Wolbachia* strains is essential for a better understanding of its origin and mode of spread. This information is important for developing strategies to control pests using these endosymbionts.

Key words: Symbiosis, *Wolbachia*, Aphids, MLST, phylogenetic analysis, horizontal transmission

# Índice Geral

Agradecimentos.....	1
Resumo .....	3
Abstract .....	4
Índice Geral .....	5
Lista de Abreviaturas.....	7
Glossário .....	8
Índice de Tabelas .....	9
Índice de Figuras .....	9
1. Introdução.....	10
1.1. Revisão bibliográfica .....	11
1.1.1. Simbiose.....	11
1.1.1.1. Endossimbiose .....	12
1.1.1.2. Endossimbiose em insetos.....	12
1.1.1.3. Categorias de simbiotes .....	13
1.1.2. O endossimbionte – <i>Wolbachia</i> .....	14
1.1.2.1. Manipulação reprodutiva .....	16
1.1.2.1.1. Incompatibilidade citoplasmática.....	17
1.1.2.1.2. Partenogénese .....	18
1.1.2.1.3. Feminização .....	19
1.1.2.1.4. Morte do macho.....	19
1.1.2.2. Modos de transmissão .....	20
1.1.2.3. Diversidade genética - supergrupos.....	21
1.1.3. O hospedeiro - Afídeo .....	25
1.1.3.1. Taxonomia.....	26
1.1.3.2. Ciclo de vida e polimorfismo dos afídeos.....	27
1.1.3.3. Comportamento e alimentação .....	28
1.1.3.4. Praga agrícola .....	30

1.1.4.	Relações endossimbióticas: afídeo/bactérias .....	31
1.1.4.1.	<i>Wolbachia</i> como controlo biológico .....	32
2.	Material e Métodos .....	34
2.1.	Recolha e conservação das amostras .....	34
2.1.1.	Extração de DNA .....	35
2.2.	PCR com primers gerais – gene 16S rRNA .....	35
2.3.	Visualização dos produtos de amplificação .....	37
2.4.	PCR com os genes MLST .....	37
2.5.	Purificação das amostras amplificadas .....	39
2.6.	Clonagem (choque térmico e miniprep) .....	39
2.7.	Digestão e sequenciação .....	40
2.8.	Análise filogenética das sequências .....	40
3.	Resultados e Discussão .....	41
3.1.	Amostras coletadas e taxa de infeção .....	42
3.2.	Deteção de <i>Wolbachia</i> .....	43
3.3.	Análise das estirpes utilizando os genes MLST .....	44
3.4.	Análise filogenética .....	47
3.5.	Modos de transmissão .....	54
3.6.	Controlo Biológico .....	56
4.	Conclusões e Perspetivas Futuras .....	58
5.	Referências Bibliográficas .....	59
6.	Anexos .....	66

## Lista de Abreviaturas

- Água mQ – “milli-Q”: água ultrapura (Millipore)  
AMP – Ampicilina  
BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”  
°C – Graus Celsius  
coxA – Citocromo c oxidase, subunidade I  
DNA – Ácido Desoxirribonucléico  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
*fbpA* – Frutose bifosfato aldolase  
*ftsZ* – Proteína de divisão celular  
*gatB* – Glutamil-tRNA amidotransferase, subunidade B  
*hcpA* – Proteínas hipotéticas conservadas  
IPTG – Isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosideo  
KOAc – Acetato de potássio  
LB – Meio Luria-Bertani  
MLST – Tipagem sequencial multilocus  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NaOH – Hidróxido de sódio  
PCR – Reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”)  
Rpm – Rotações por minuto  
rRNA – RNA Ribossomal  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
TAE – Tampão Tris-acetato-EDTA  
Tris-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) hidrocloreto  
UV – Ultravioleta  
W – Watt  
*wsp* – proteína de superfície  
X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosideo

## Glossário

**Dicotiledóneas** – classe de plantas cujo embrião/semente contem dois ou mais cotilédones (pequenas folhas).

**Diplóides** – possuem dois cromossomas (cromossomas homólogos).

**Espmatogénese** – processo de formação dos espermatozóides.

**Fitness** – Também denominado de valor adaptativo ou aptidão. Medida do sucesso evolutivo de uma população.

**Fitófagos** – Indivíduos que se alimentam de vegetais.

**Fitotoxinas** – Substâncias nocivas (toxinas) às plantas.

**Haplóides** – possuem um só cromossoma no seu núcleo.

**Pronúcleo** – Núcleo dos gâmetas masculino (espermatozóide) e feminino (óvulo) durante o processo de fertilização (antes da fusão).

**Túbulos de Malpighi** – Principais órgãos excretores dos insetos.

**Vivíparas** – Animais cujo embrião se desenvolve dentro do corpo da mãe que lhe fornece os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento.

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Primers utilizados para amplificação do gene 16S rRNA. ....	37
Tabela 2 – Primers e loci dos genes <i>wsp</i> e MLST.....	38
Tabela 3 – Tabela resumo das amostras infetadas com <i>Wolbachia</i> . ....	45
Tabela 4 – Amostras dos Açores utilizadas na clonagem. ....	46

## Índice de Figuras

Figura 1 – Imagem confocal da <i>Wolbachia</i> . ....	14
Figura 2 – Distribuição da <i>Wolbachia</i> em diferentes tecidos e alguns dos consequentes efeitos na biologia do hospedeiro. ....	15
Figura 3 – Manipulação reprodutiva por <i>Wolbachia</i> . ....	16
Figura 4 – Representação de como a <i>Wolbachia</i> se espalha numa população de mosquitos utilizando a incompatibilidade citoplasmática. ....	18
Figura 5 – Mapa do cromossoma de <i>wMel</i> ( <i>Drosophila melanogaster</i> ) ..... 22	22
Figura 6 – Árvore filogenética contendo as diferentes estirpes de <i>Wolbachia</i> ..... 23	23
Figura 7 – Exemplo da diversidade dos afídeos ..... 25	25
Figura 8 – Ciclo de vida dos afídeos. .... 27	27
Figura 9 – Forma áptera (no topo) e alada (em baixo) do afídeo <i>Myzus persicae</i> ..... 29	29
Figura 10 – Representação esquemática da posição dos primers no gene 16S rRNA. .... 36	36
Figura 11 – Representação gráfica das famílias de afídeos presentes neste estudo. .... 42	42
Figura 12 – Representação gráfica das amostras coletadas e infetadas. .... 43	43
Figura 13 – Árvore filogenética de <i>16S rRNA</i> . .... 48	48
Figura 14 – Árvore filogenética <i>ftsZ</i> . .... 49	49
Figura 16 – Árvore filogenética de <i>gatB</i> . .... 50	50
Figura 16 – Árvore filogenética de <i>coxA</i> . .... 51	51
Figura 17 – Árvore filogenética de <i>hcpA</i> . .... 52	52

# 1. Introdução

Existe um grande número de insetos herbívoros, principalmente da Ordem Homoptera – como no caso dos afídeos, mosca branca e psílídeos, entre outros – que normalmente se encontram associados a bactérias intracelulares (endossimbiontes) (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2013).

A sua dieta restrita, devido ao facto do floema do qual se alimentam ser nutricionalmente deficiente, faz com que os insetos sejam hospedeiros de simbiotes que lhes fornecem nutrientes essenciais a sua sobrevivência, que de outro modo seriam incapazes de obter. Em contrapartida os simbiotes usufruem, entre outras coisas, de proteção e de um modo seguro de transmissão à descendência (Kikuchi, 2009; Ahmed *et al.*, 2013).

Os insetos podem ter endossimbiontes de carácter obrigatório (primário) ou facultativo (secundário). Um dos casos mais comuns de endossimbiose obrigatória encontra-se nos afídeos que albergam a bactéria *Buchnera aphidicola*. Adicionalmente pode também ocorrer associações com endossimbiontes facultativos, como por exemplo com a *Serratia sp.* ou a *Wolbachia sp.*, que apesar de terem um efeito positivo sobre os afídeos não são essenciais à sua sobrevivência e reprodução (Kikuchi, 2009). Normalmente, as associações entre bactérias e insetos são herdadas, isto é, são transmitidas fielmente da mãe à sua descendência (Oliver *et al.*, 2010). Acredita-se que estas são o principal fator para o sucesso evolutivo e para a capacidade de adaptação a novos nichos ecológicos existente nos insetos (Pérez-Brocal *et al.*, 2005).

Estudos realizados nos últimos anos indicam que o endossimbionte *Wolbachia* pode ser utilizado no controlo biológico de pragas. Tendo em conta que os afídeos são considerados uma praga agrícola a compreensão da ação dos endossimbiontes nesta população é de grande importância.

Tendo a agricultura uma grande importância na alimentação mundial é essencial conhecer as possíveis formas de diminuição ou mesmo eliminação de pragas agrícolas. Como tal, este trabalho incidiu principalmente na deteção e caracterização do endossimbionte *Wolbachia* em diferentes espécies de afídeos recolhidos no Arquipélago da Madeira e dos Açores.

## 1.1. Revisão bibliográfica

### 1.1.1. Simbiose

A palavra simbiose, que provém do grego “syn” (“juntamente com”) e “bios” (“vida”), significa viver em associação (Raven e Johnson, 2002). São denominados de simbioses aqueles que vivem em estreita relação com outro indivíduo, o hospedeiro, do qual obtêm benefícios (Robinson, 2001; Ishikawa, H., 2003). Estes podem retirar comida ou consumir tecidos do seu hospedeiro idealmente de um modo suportável permitindo a sua sobrevivência, visto que o simbiote não é beneficiado pela morte do hospedeiro (Robinson, 2001).

A simbiose é normalmente classificada em três categorias, tendo em conta a ação que têm no hospedeiro – sendo assim esta pode ser benéfica, neutra ou prejudicial. Aquela na qual o hospedeiro como o simbiote beneficiam da associação denomina-se mutualismo – o simbiote normalmente contribui para a *fitness* do hospedeiro; designa-se comensalismo quando o simbiote retira comida do hospedeiro ou alimenta-se dos seus tecidos sem que este seja prejudicado mas também sem que obtenha qualquer benefício; e por fim existem relações simbióticas nas quais o simbiote afeta o hospedeiro negativamente, normalmente porque existe um consumo nutricional, ou de tecidos, demasiado elevado por parte do simbiote fazendo com que o hospedeiro tenha dificuldade em recuperar, este é considerado parasitismo (Robinson, 2001; Ishikawa, H., 2003; Goto *et al.*, 2006).

Para compreender os efeitos biológicos dos simbioses é importante conhecer a densidade da infeção. Esta pode afetar vários aspetos da simbiose tais como a intensidade de fenótipos reprodutivos, os efeitos no nível de *fitness* e a fidelidade da transmissão vertical, entre outros. A densidade de infeção é algo que tem de ser bem controlado pelo simbiote pois uma baixa infeção pode resultar numa transmissão vertical imperfeita, o que atenuaria os efeitos fenotípicos (poderia levar a perda da infeção). No entanto, uma alta densidade de infeção também não é benéfica visto poder resultar em alterações fenotípicas que influenciem significativamente a *fitness* do hospedeiro (Goto *et al.*, 2006).

A densidade da infeção pode ser afetada pela presença de mais do que uma estirpe num hospedeiro – coinfeção. Esta coinfeção pode ter duas consequências: as diferentes estirpes competem entre si por recursos e espaço ou então estas regulam a sua densidade de modo a não desregularem todo o sistema simbiótico (Goto *et al.*, 2006).

### 1.1.1.1. Endossimbiose

A simbiose intracelular, também denominada endossimbiose, é uma das mais íntimas relações de simbiose existente entre dois organismos (Ishikawa, H.,2003). Ao contrário das bactérias de vida livre que crescem em qualquer ambiente os endossimbiontes encontram-se obrigatoriamente no interior das células, seja livremente no citoplasma ou numa estrutura especializada, para poderem crescer (Ishikawa, H., 2003).

### 1.1.1.2. Endossimbiose em insetos

São várias as espécies de insetos que são hospedeiros de microrganismos simbióticos. Esta associação encontra-se especialmente dispersa em Ordens como a Homoptera (afídeos, mosca branca, entre outros), Blattaria (baratas) e Coleoptera (escaravelhos) (Gómez-Valero *et al.*, 2004). Acredita-se que este tipo de simbiose pode afetar mais de 70% das espécies de insetos (Ishikawa, H., 2003)

Estes microrganismos são normalmente transmitidos verticalmente, isto é, passam da fêmea para a sua prole. A sua sobrevivência depende assim do sucesso reprodutivo do seu hospedeiro e como tal os simbiotes desenvolvem características que lhes permitam aumentar a sobrevivência do hospedeiro (Majerus, 2003; Goto *et al.*, 2006).

No entanto, existem simbiotes que manipulam o seu hospedeiro de modo a serem beneficiados mesmo que o hospedeiro saia prejudicado. Algumas das estratégias que os simbiotes utilizam incluem a esterilização dos indivíduos não transmissores, a feminização dos machos, a indução da reprodução assexuada ou o aumento do rácio sexual a favor das fêmeas, matando os machos. Esta forma egoísta de manipulação faz com os simbiotes propaguem muito rapidamente a infeção dentro da população hospedeira. A maior parte deste tipo de parasitas reprodutivos são bactérias, sendo os géneros *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Arsenophonus* e *Cardinium* alguns dos mais conhecidos (Majerus, 2003; Goto *et al.*, 2006).

### 1.1.1.3. Categorias de simbioses

Os simbioses podem ser separados em três categorias diferentes. Na primeira encontram-se indivíduos mutualistas obrigatórios. Estes podem também ser denominados de simbioses primários e encontram-se normalmente localizados em células especializadas, denominadas bacteriócito (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Moran *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2011). A origem deste bacteriócito é diferente dependendo do hospedeiro. Este pode consistir de células intestinais, células de gordura ou, em alguns casos, de células altamente especializadas destinadas a formar o bacteriócito ainda durante a fase embrionária (Moran *et al.*, 2008).

Existe uma outra categoria de simbioses, que contrariamente aos obrigatórios, não são essenciais. Estes simbioses, denominados facultativos ou secundários, não sendo essenciais a sobrevivência do hospedeiro podem ser benéficos para a sua *fitness*, sob condições ambientais específicas. No entanto estes simbioses facultativos podem, quando se encontram sob *stress*, alterar a reprodução do seu hospedeiro de modo a manterem a sua frequência no hospedeiro (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Moran *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que os simbioses facultativos encontram-se em menor quantidade no hospedeiro quando comparados com o simbiote obrigatório. Acontece também o simbiote facultativo não se encontrar confinado ao bacteriócito e poder ser encontrado em outros tecidos, como por exemplo nos intestinos, glândulas, fluidos corporais e até nas células que circulam o simbiote obrigatório (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Moran *et al.*, 2008).

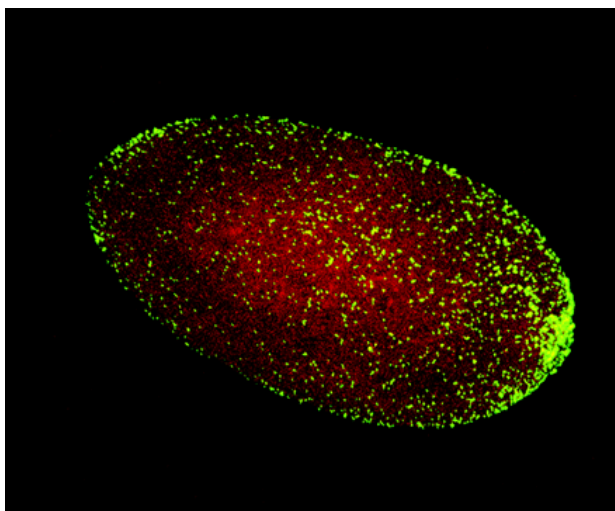
Existe uma terceira categoria na qual se podem encontrar os parasitas que são manipuladores reprodutivos. Estes manipulam a reprodução do seu hospedeiro de modo a se espalharem pela população passando da geração parental para a sua descendência e reduzindo o número de hospedeiros não infetados da população. Um dos manipuladores reprodutivos mais estudados é a *Wolbachia pipientis* devido a sua vasta distribuição em artrópodes e outros invertebrados (Moran *et al.*, 2008).

### 1.1.2. O endossimbionte – *Wolbachia*

Uma bactéria intracelular foi reportada pela primeira vez em 1924, após ser encontrada nos tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens*, por Hertig e Wolbach. Esta foi denominada *Wolbachia pipientis*(figura 1) (Werren, 1997; Merçot e Poinot, 2009; Saridaki e Bourtzis, 2010).

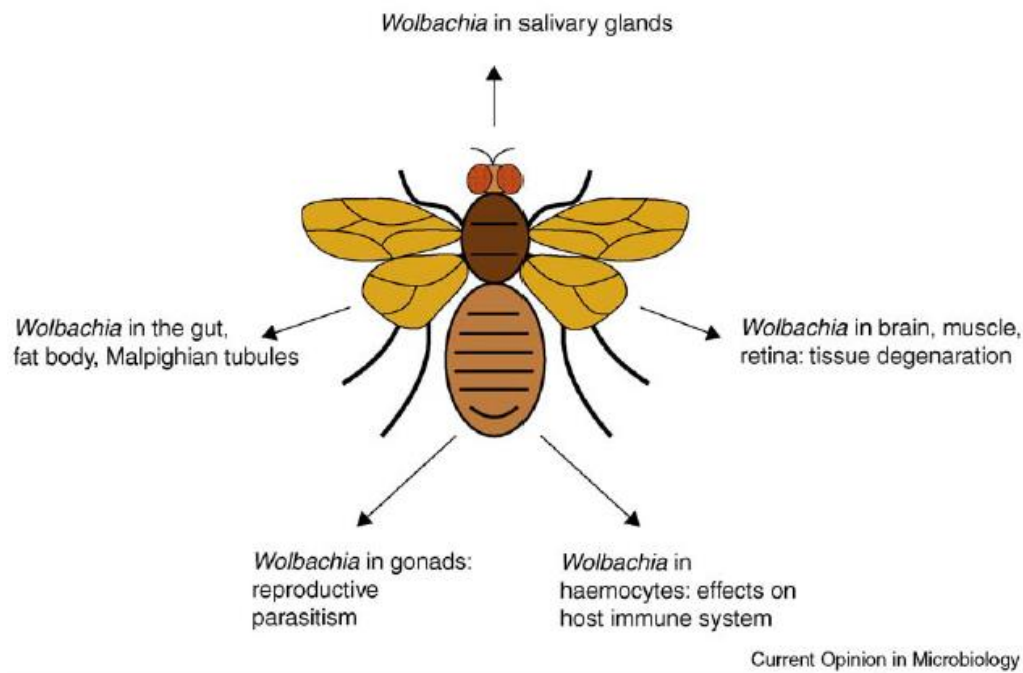
*Wolbachia* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória que é herdada citoplasmicamente e se encontra numa grande variedade de artrópodes e nemátodes (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Kremer *et al.*, 2009; Ros *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Kraaijeveld *et al.*, 2011; Vasquez *et al.*, 2011; Osei-Poku *et al.*, 2012; Duplouy *et al.*, 2013).

Nos artrópodes estas bactérias, normalmente encontradas nos tecidos reprodutivos, causam um grande número de alterações reprodutivas no seu hospedeiro, dependendo da estirpe que o infeta, incluindo incompatibilidade citoplasmática, morte do macho, indução de partenogénese e feminização dos machos, causando também virulência em insetos como a *Drosophila melanogaster* (Werren, 1997; Gómez-Valero *et al.*, 2004; Verne *et al.*, 2007; Kremer *et al.*, 2009; Ros *et al.*, 2009; Kraaijeveld *et al.*, 2011; Vasquez *et al.*, 2011; Osei-Poku *et al.*, 2012; Duplouy *et al.*, 2013).



**Figura 1** –Imagem confocal da *Wolbachia*.Imagem de um embrião de drosófila infetada com *Wolbachia*. Os núcleos encontram-se a vermelho e os pontos verdes são a *Wolbachia* (Zabalou *et al.*, 2008)

Desde a sua descoberta esta bactéria tem vindo a ser detetada não só em diferentes hospedeiros mas também em diferentes tecidos e órgãos (Verne *et al.*, 2007; Saridaki e Bourtzis, 2010). Esta pode estar presente nas glândulas salivares, cérebro, músculo e retina – causando degeneração dos tecidos, nas hemácias – afetando o sistema imunitário, nas gónadas – parasitismo reprodutivo – e nos intestinos, gordura corporal e túbulos de Malpighi (figura 2). A *Wolbachia* infeta inúmeras espécies e tem a capacidade de se difundir muito rapidamente sendo que o seu limite de distribuição ainda é desconhecido (Saridaki e Bourtzis, 2010).



**Figura 2**—Distribuição da *Wolbachia* em diferentes tecidos e alguns dos consequentes efeitos na biologia do hospedeiro(Saridaki e Bourtzis, 2010).

O seu sucesso deve-se ao facto desta ser capaz de tolerar o ambiente celular de diversos hospedeiros. Até ao momento foi encontrada em cerca de 40% das espécies de artrópodes, estando em mais de 80 espécies de insetos, alguns crustáceos e quelicerados. Mas esta bactéria pode ser também encontrada em nematodes (Werren, 1997; Ros *et al.*, 2009; Yun *et al.*, 2011; Osei-Poku *et al.*, 2012; Bing *et al.*, 2014).

A determinação do tamanho genómico mostra que a *Wolbachia* tem um genoma que se aproxima do genoma de outras bactérias intracelulares e que é muito mais pequeno do que o das bactérias de vida livre (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2011). A sua análise filogenética, que utiliza genes como o da proteína de divisão celular(*ftsZ*) e da proteína de superfície (*wsp*) para caracterizar as suas estirpes, revela que existem dois grupos principais, denominados de A e B (Gómez-Valero *et al.*, 2004). Foram vários os estudos realizados mas foi a utilização da tipagem sequencial multilocus (MLST) que permitiu a caracterização e identificação dos catorze supergrupos (A a O) nos quais este género se encontra neste momento dividido (Augustinos *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2011; Salunke *et al.* 2012)

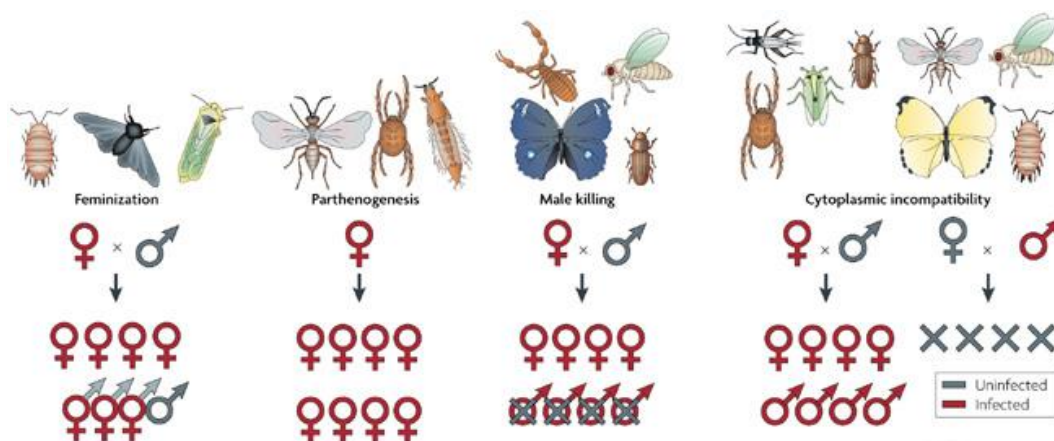
Este género de bactérias nos últimos anos tem vindo a despertar cada vez mais interesse, em cientistas de diversas áreas, devido a sua ampla distribuição e aos efeitos causados no hospedeiro. Estas têm particular interesse no que diz respeito a processos evolutivos, pelo seu potencial papel em mecanismos de rápida especiação. Existe a possibilidade da sua utilização no controlo biológico, melhorando a produtividade de inimigos naturais ou então como vetor para espalhar de modificações genéticas nas populações de insetos (Werren, 1997; Charlat *et al.*, 2003; Baldo *et al.*, 2006; Osei-Poku *et al.*, 2012).

### 1.1.2.1. Manipulação reprodutiva

A *Wolbachia* manipula o sistema reprodutor do seu hospedeiro de modo a melhorar a sua transmissão dentro da população. Isto porque, quanto mais elevada a taxa de infeção maior a tendência das fêmeas para produzir um maior número de embriões, o que lhes confere ainda maior vantagem reprodutiva quando comparadas com as fêmeas não infetadas (Schraiber *et al.*, 2012). Visto que a sua transmissão dá-se através da mãe a manipulação ocorre de modo a aumentar a produção e favorecer a descendência das fêmeas infetadas (Kremer *et al.*, 2009; Kraaijeveld *et al.*, 2011).

Sendo encontrada na maior parte dos insetos, ácaros e isópodes a incompatibilidade citoplasmática é a manipulação mais comum da *Wolbachia* (Tagami *et al.*, 2006; Kremer *et al.*, 2009; Merçot e Poinot, 2009). Já a feminização dos machos ocorre principalmente em crustáceos, embora seja encontrada também em lepidópteros e hemípteros. A morte do macho encontra-se ligada aos lepidópteros e coleópteros (grupos nos quais existe muita competição entre irmãos). À partenogénese estão associadas espécies haplodiploides infetadas com *Wolbachia* (ácaros e himenópteros) (figura 3) (Kremer *et al.*, 2009; Merçot e Poinot, 2009).

Ao longo dos anos foram encontradas evidências de que a *Wolbachia* não só tem a capacidade de manipular o sistema reprodutor como também consegue alterar o sistema antioxidante do hospedeiro de modo a aumentar a sua taxa de sobrevivência. Por exemplo, a relação simbiótica entre a *Wolbachia* e o *Aedes albopictus* depende em grande parte da geração de espécies reativas ao oxigénio (ROS) e da indução da produção de enzima antioxidantes (Saridaki e Bourtzis, 2010).



**Figura 3 –Manipulação reprodutiva por *Wolbachia*.** Acontece de modo a aumentar o número de fêmeas infetadas pois estas, além de transmitirem a infeção à descendência, têm vantagens sobre as não infetadas que resulta num aumento da frequência da infeção. **Feminização** – os machos são transformados em fêmeas aumentando a população infetada; **Partenogénese** – fêmeas infetadas reproduzem-se mesmo não sendo fertilizadas dando origem a fêmeas infetadas; **Morte do Macho** – morte dos machos infetados para benefício das fêmeas (ex.: redução da competição pela alimentação, etc...); **Incompatibilidade citoplasmática** – ocorre quando machos infetados acasalam com fêmeas não infetadas. (Merçot e Poinot, 2009; [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v6/n10/fig\\_tab/nrmicro1969\\_F2.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v6/n10/fig_tab/nrmicro1969_F2.html))

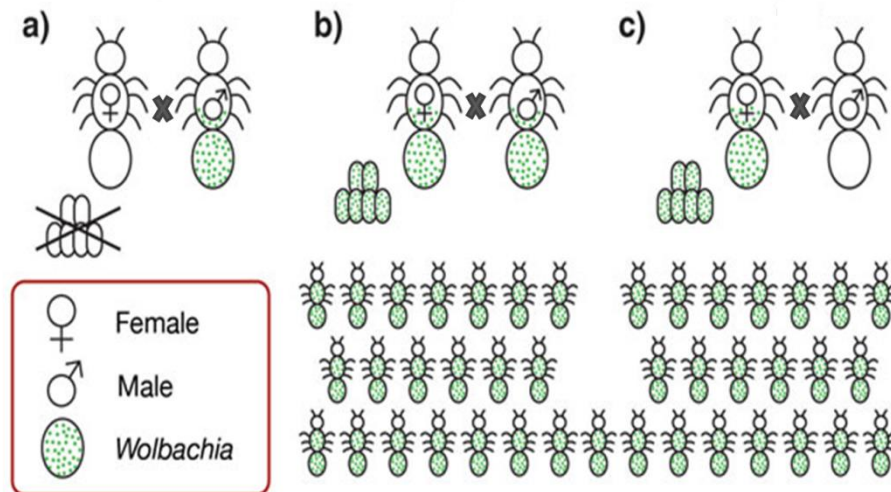
### 1.1.2.1.1. Incompatibilidade citoplasmática

Estudos realizados em mosquitos mostraram a existência de cruzamentos incompatíveis, através dos quais não obtinham descendência, devido a um fenómeno que denominaram incompatibilidade citoplasmática. No início dos anos 70 foi possível associar esta incompatibilidade a presença de *Wolbachia* utilizando antibióticos para eliminar a bactéria dos mosquitos. Hoje sabe-se que a incompatibilidade citoplasmática é possivelmente a característica da *Wolbachia* mais difundida e proeminente (Werren, 1997; Zabalou *et al.*, 2004; Merçot e Poinot, 2009).

Esta forma de manipulação consiste na incompatibilidade entre o esperma e o oócito que pode ocorrer de duas formas, unidirecional ou bidirecional. A primeira expressasse quando o esperma de um macho infetado com *Wolbachia* fertiliza um ovo não infetado, levando a morte do embrião. No entanto, o cruzamento entre machos não infetados e fêmeas infetadas também pode acontecer, até porque a transmissão da bactéria ocorre através do ovo e não do esperma. A incompatibilidade bidirecional ocorre quando o macho e a fêmea se encontram infetados mas possuem duas estirpes diferentes de *Wolbachia* (Werren, 1997; Dobson, 2003; Zabalou *et al.*, 2004; Schraiber *et al.*, 2012).

Embora ainda não haja uma explicação a nível molecular para esta incompatibilidade, ao longo dos anos têm surgido várias evidências que sugerem que a *Wolbachia* modifica os cromossomas paternos durante a espermatogénese causando a perda de sincronia na divisão mitótica (Zabalou *et al.*, 2004; Merçot e Poinot, 2009). A assincronia no desenvolvimento do pronúcleo do macho e da fêmea induz ao retardamento na formação do complexo histona H3.3/H3, uma das histonas envolvidas na formação do nucleossoma, no pronúcleo do macho o que causa uma condensação mitótica tardia e defeitos na segregação (Saridaki e Bourtzis, 2010).

A incompatibilidade citoplasmática é então uma das principais razões para a rápida transmissão desta bactéria visto que os indivíduos não infetados vêm o seu número reduzido dentro da população enquanto que o número de infetados aumenta consideravelmente (figura 4) (Werren, 1997; Dobson, 2003).



**Figura 4**—Representação de como a *Wolbachia* se espalha numa população de mosquitos utilizando a incompatibilidade citoplasmática. **a)** Quando o macho se encontra infectado com a bactéria mas a fêmea não está põe ovos mas estes não se desenvolvem; **b)** Quando o macho e a fêmea se encontram infectados os ovos são portadores da bactéria e desenvolvem-se normalmente dando origem a crias infectadas; **c)** Quando a fêmea está infectada mas o macho não está os ovos se desenvolvem e dão origem a crias infectadas (adaptação de <http://www.eliminatedengue.com/our-research/wolbachia>)

### 1.1.2.1.2. Partenogénese

A partenogénese é uma forma de reprodução assexual na qual não existe necessidade de uma fertilização por esperma (Weeks e Breeuwer, 2001; Huigens e Stouthamer, 2003; Merçot e Poinot, 2008). Tendo em conta que os machos não têm qualquer função na evolução da *Wolbachia* esta é a forma mais eficaz de transmissão e disseminação de uma bactéria dentro de uma população (Weeks e Breeuwer, 2001; Huigens e Stouthamer, 2003).

Na partenogénese enquanto os ovos não fertilizados (haploides) dão origem a machos os fertilizados (diploides) dão origem a fêmeas. Quando presente a *Wolbachia*, dependendo do hospedeiro, pode suprimir a meiose totalmente ou então impedir a realização da fase final da mitose pois deste modo já garante a duplicação do número de cromossomas. Assim, mesmo um ovo não fertilizado, dará origem a uma fêmea (Merçot e Poinot, 2009).

Com esta forma de manipulação reprodutiva a *Wolbachia* garante que 100% da prole do hospedeiro se encontra infectada com a bactéria sem que haja qualquer tipo de perdas pois não há a produção de machos, que não têm a capacidade de transmitir a infeção (Weeks e Breeuwer, 2001; Merçot e Poinot, 2009). Este tipo de manipulação encontra-se associado aos insetos, particularmente os Himenóptera, que apresenta mais de 40 espécies infectadas com *Wolbachia* que induz a partenogénese (Weeks e Breeuwer, 2001).

### 1.1.2.1.3. Feminização

A feminização talvez seja a estratégia que apresenta maiores benefícios no que diz respeito a transmissão da infecção. Esta consiste na supressão de uma glândula de modo a converter os machos em fêmeas com capacidade reprodutiva (Werren, 1997). As fêmeas infetadas produzem o dobro de filhas que as não infetadas. Estas apresentam uma maior capacidade de sobrevivência e conseqüentemente existe uma maior eficiência na transmissão da bactéria a descendência, permitindo que a infecção se espalhe (Merçot e Poinso, 2009; Charlat et al., 2003).

### 1.1.2.1.4. Morte do macho

São várias as bactérias conhecidas por causarem a morte do macho, incluindo a *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Arsenophonus* e a *Wolbachia*, entre outras. No entanto, embora se conheça o resultado, o mecanismo que o origina não se encontra bem caracterizado e varia de bactéria para bactéria. A *Spiroplasma*, na presença de cinco péptidos específicos do complexo de compensação do hospedeiro, provoca a morte do macho no início da fase embrionária enquanto que a *Arsenophonus* inibe a formação dos centrómeros necessários para o desenvolvimento dos machos (Merçot e Poinso, 2009; Duploux et al., 2013).

No que diz respeito a *Wolbachia*, o mecanismo ainda se encontra pouco caracterizado mas acredita-se que esta causa defeitos na remodelação da cromatina e na organização do fusomitótico do embrião, levando a falha do desenvolvimento (Riparbelli et al., 2012; Duploux et al., 2013).

A indução da morte dos machos, descendentes de fêmeas infetadas, imposta pela *Wolbachia* deve-se ao facto de assim as suas irmãs fêmeas, portadoras da bactéria, saírem beneficiadas. Com a morte do macho há a redução da intensidade de interações antagónicas entre irmãos e há um aumento dos recursos para as fêmeas da população (Charlat et al., 2003).

## 1.1.2.2. Modos de transmissão

A *Wolbachia*, por se encontrar mundialmente dispersa e infetar um vasto número de insetos, desperta um grande interesse no que diz respeito ao seu modo de transmissão (Li *et al.*, 2013). Existem dois modos possíveis de transmissão, a transmissão vertical – a mais comum e na qual a bactéria passa a descendência através da reprodução – e a transmissão horizontal – que consiste na transmissão por contato direto ou por contaminação indireta através de um vetor ou pelo ambiente que partilham. Normalmente a transmissão vertical está associada a simbioses mutualistas enquanto a horizontal esta associada a parasitas ou patógenos (Merçot e Poinot, 2009).

Estudos de relações genéticas entre os simbioses primários e o seu hospedeiro mostram elevada congruência o que sugere que houve uma infeção de um inseto ancestral e esta foi transmitida verticalmente havendo uma subsequente coespeciação simbiote-hospedeiro. Contrariamente, a incongruência detetada nos estudos realizados com simbioses secundários, mostram que provavelmente houve múltiplas infeções ao longo dos anos assim como transmissão horizontal para hospedeiros não relacionados (Ahmed *et al.*, 2013).

A transmissão vertical constitui o seu modo de transmissão primário mas algumas contradições na sua filogenia indica que esta também infetar hospedeiros que não lhe são relacionados através da transmissão horizontal, como acontece com os parasitoides (Kraaijeveld *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). No entanto, não se sabe ao certo se a transmissão horizontal tem ou não um papel na propagação inicial da *Wolbachia* num novo hospedeiro (Kraaijeveld *et al.*, 2011).

Um dos modos utilizados para perceber os movimentos da *Wolbachia* nos hospedeiros e examinando distribuição geográfica de estirpes que sejam relacionadas. Possíveis incongruências entre a filogenia da *Wolbachia* e do hospedeiro são consideradas evidências de transmissão horizontal assim como o facto de estirpes semelhantes encontrarem-se presentes em espécies ecologicamente relacionadas (Li *et al.*, 2013).

São diversos os estudos filogenéticos e taxonómicos realizados para o melhor entendimento da raiz evolucionária da *Wolbachia* e acredita-se que esta se encontra entre os simbioses de nematodes e artrópodes mas esta conclusão continua a ser alvo de constante discussão. Métodos filogenéticos recentes continuam a não resolver o problema da relação entre as *Wolbachia* parasitas e mutualistas (Saridaki e Bourtzis, 2010).

A elevada complexidade da *Wolbachia* dificulta a perceção da sua evolução e modo de transmissão. Hoje sabe-se que, embora a manipulação reprodutiva seja a sua principal característica no que diz respeito aa relação simbiote-hospedeiro, esta bactéria pode estabelecer com o hospedeiro uma relação mutualista. A grande diferença entra os dois tipos de relação é a consequência desta na evolução do hospedeiro. Enquanto na manipulação reprodutiva o simbiote se espalha na população diminuindo o número de indivíduos não infetados, não se preocupando com a diminuição da *fitness* do hospedeiro (por exemplo: morte

dos machos) no caso do mutualismo o simbiote aumenta a taxa de infecção aumentando a *fitness* do hospedeiro. Assim sendo, a pressão seletiva no hospedeiro é convergente o que leva ao estabelecimento da infecção, co-adaptação e dependência recíproca, isto é, as características de uma simbiose obrigatória (Dedeine *et al.*, 2003).

São conhecidos nemátodes nos quais esta bactéria é endossimbionte primário pois estes são dependentes da infecção – a retirada do endossimbionte tem efeitos negativos no desenvolvimento e sobrevivência da população. Pelo contrário, nos artrópodes as infecções induzem manipulações reprodutivas, característica de um endossimbionte secundário. Isto prova que a *Wolbachia* adota as duas estratégias na sua relação com o hospedeiro (Dedeine *et al.*, 2003)

### 1.1.2.3. Diversidade genética - supergrupos

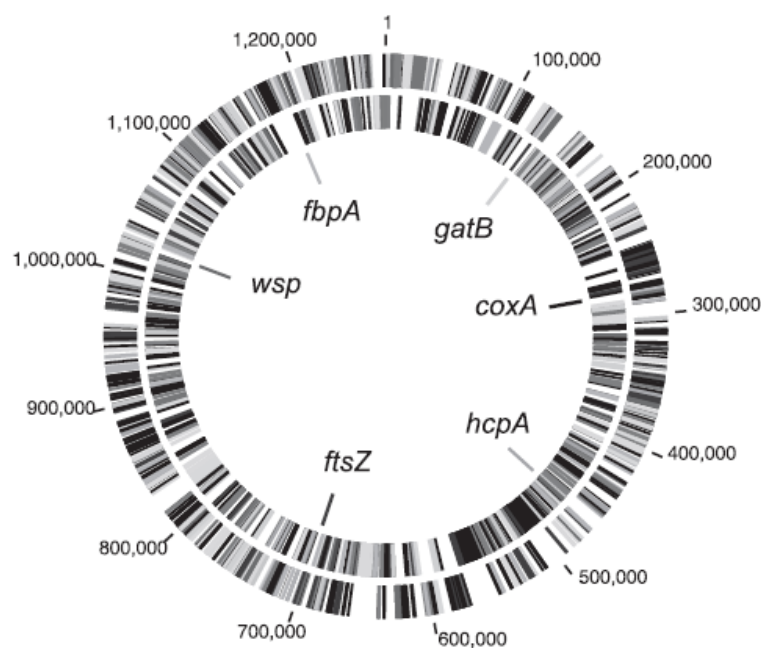
O facto deste género, quando comparado com outros endossimbiontes, apresentar uma grande diversidade genética impôs a criação de diferentes unidades filogenéticas, supergrupos, que agrupam indivíduos de estirpes relacionadas. No entanto, o número e o tipo de genes utilizados para fazer esta relação não está ainda definido. A classificação inicial foi baseada em similaridades encontradas ao serem realizados estudos com os genes da proteína da divisão celular (*ftsZ*) e *16S rRNA* (RNA ribossomal) mas desde então foram utilizados outros genes para estudar a taxonomia da *Wolbachia* (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Baldo e Werren, 2007).

Existe um método padrão usado para tipagem de estirpes bacterianas, denominado de tipagem sequencial multilocus (MLST), que consiste na inferência de uma série de genes conservativos (“housekeeping”) que se encontram amplamente distribuídos pelo genoma (Baldo e Werren, 2007).

O sistema MLST foi utilizado inicialmente em estudos de epidemiologia e vigilância de bactérias patogénicas e define uma estirpe como uma sequência, com base na combinação dos alelos - perfil alélico. A similaridade entre as estirpes é então descrita pela sequência de nucleótidos de alelos em cada locus. Isto significa que, com o uso das combinações dos alelos com marcadores moleculares para genotipar estirpes, a recombinação não impede a caracterização das estirpes. Pelo contrário, a informação alélica possibilita a determinação de recombinação entre genes assim com posicionamento da recombinação dentro da população (Baldo *et al.* 2006).

Este método, recentemente desenvolvido para *Wolbachia*, foi inicialmente usado no estudo de estirpes existentes em drosófila, de modo a auxiliar no processo de classificação e consequente separação dos diferentes supergrupos (Baldo *et al.* 2006).

O plano consiste em utilizar cinco genes conservativos: glutamyl-tRNA amidotransferase, subunidade B (*gatB*), citocromo c oxidase, subunidade I (*coxA*), proteína hipotética conservativa(*hcpA*), proteína da divisão celular(*ftsZ*)e frutose bifosfato aldolase (*fbpA*) e seguidamente verificar qual o supergrupo no qual a estirpe se enquadra (figura 5) (Baldo e Werren, 2007; Saridaki e Bourtzis, 2010). Os primers usados na PCR amplificam sem problemas o *loci* de estirpes que façam parte dos supergrupos A e B e potencialmente amplificam também os pertencentes a outros supergrupos (Baldo *et al.* 2006).



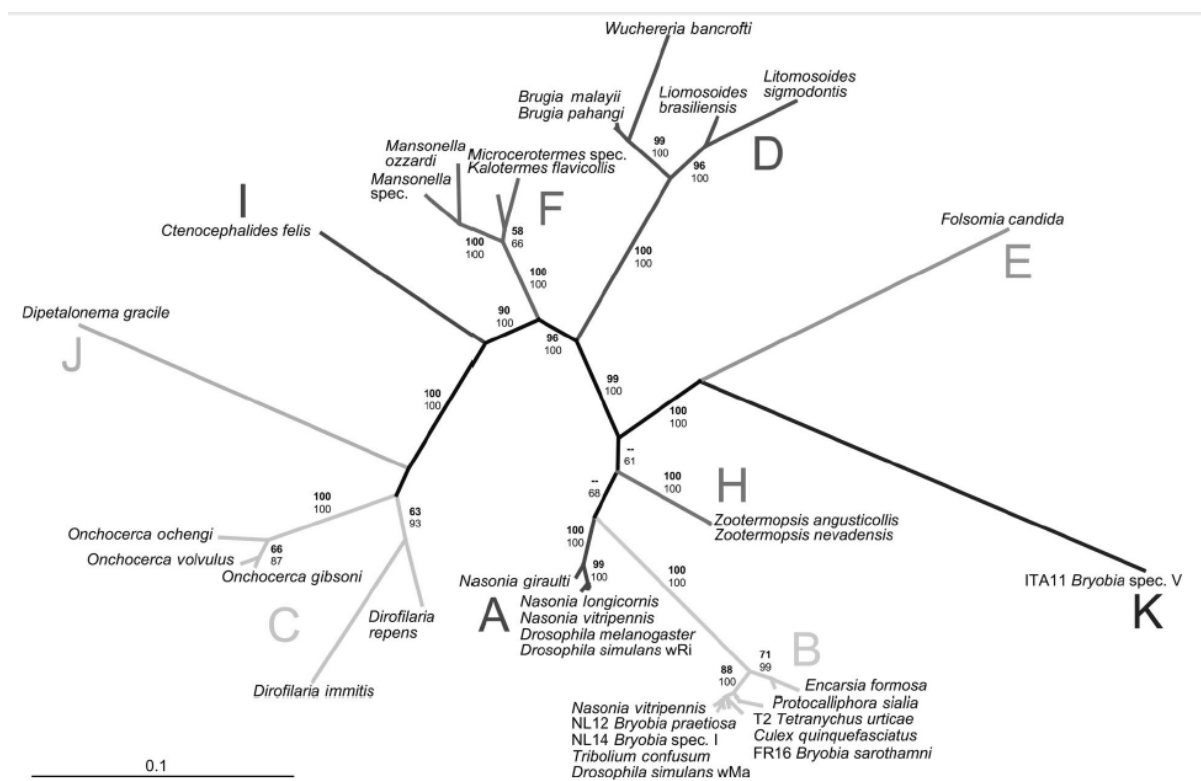
**Figura 5**–Mapa do cromossoma de *wMel* (*Drosophila melanogaster*). Este mapa mostra a localização do loci dos cinco MLST e também do *wsp*. (Baldo *et al.* 2006).

Comparando os resultados da análise MLST com as realizadas com *wsp* foi possível encontrar algumas discrepâncias possivelmente devido a recombinações do gene *wsp* obrigando a uma revisão sistemática. Como tal, atualmente o método MLST é o recomendado para a caracterização taxonómica da *Wolbachia*, sendo que a utilização de um só gene MLST, preferencialmente o *ftsZ*, seja suficientemente efetivo para a designação de uma estirpe do grupo A ou B (Baldo e Werren, 2007).

Os maiores e mais antigos supergrupos, que se encontram presentes nos artrópodes, são o A e o B. Os restantes supergrupos são menos comuns e alguns são compostos por poucas espécies (Baldo e Werren, 2007; Merçot e Poinso, 2009; Saridaki e Bourtzis, 2010).

Nos últimos anos, graças a utilização do método MLST tem sido dado vários passos em direção a uma melhor caracterização das estirpes de *Wolbachia*. A diversidade existente em cada supergrupo varia, estando alguns presentes numa grande diversidade de espécies, enquanto outros estejam restritos a uma ou muito poucas espécies (Ros *et al.*, 2009).

Dos supergrupos A e B fazem parte principalmente artrópodes, na sua maioria insetos mas também isópodes terrestres e aranhas, enquanto que o C e o D se encontram restritos a nematodes filariais. O grupo F foi o primeiro a quebrar as barreiras que se pensava existir e encontra-se presente tanto em nematodes, do género *Mansonella*, como numa grande quantidade artrópodes (aranhas, escorpiões, piolho, entre outros). Os grupos E e H são os mais restritos sendo encontrados nos colêmbolos e térmitas, respetivamente. Um dos grupos que ainda suscita alguma discussão é o grupo G. Pensa-se que este grupo, presente em aranhas australianas, seja resultado da recombinação entre os supergrupos A e B e não uma estirpe distinta. Dos supergrupos I e J fazem parte um pequeno grupo de espécies da ordem Siphonaptera e o nematode filarial *D. gracile*, respetivamente (Merçot e Poinot, 2009; Ros *et al.*, 2009; Augustinos *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2011). O supergrupo K foi encontrado em algumas espécies de ácaros do género *Bryobia* – embora grande parte deste género seja infetado pelo supergrupo B (figura 6) (Ros *et al.*, 2009; Augustinos *et al.*, 2011).



**Figura 6 – Árvore filogenética contendo as diferentes estirpes de *Wolbachia*.** A árvore foi construída com base nas sequências dos genes *gltA*, *ftsZ* e *groEL*. É possível ver em cada um dos ramos o nome da espécie hospedeira da *Wolbachia*. Nesta árvore, apresentada no artigo de Ros e seus colegas em 2009, ainda não se podiam encontrar as 13 estirpes de *Wolbachia* que estão descritas neste momento (Ros *et al.*, 2009).

Recentemente foram encontrados três novos supergrupos: M, N e O. Nos dois primeiros estão incluídas unicamente espécies de afídeos enquanto no supergrupo O se encontra o género *Bemisia* (mosca branca) (Augustinos *et al.*, 2011; Bing *et al.*, 2014).

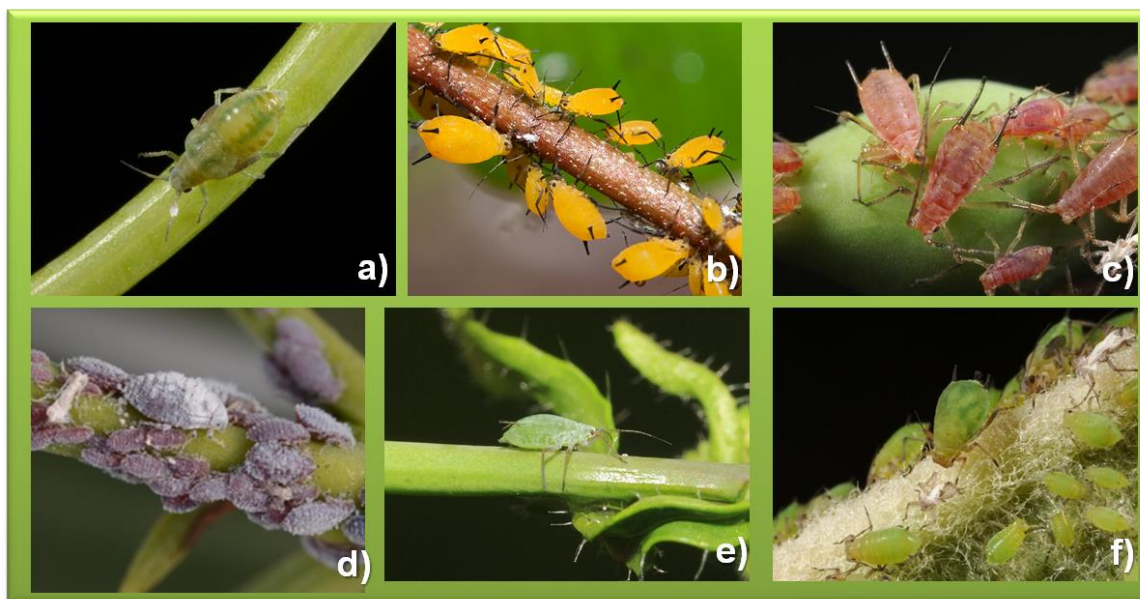
Até ao momento, existem quatro estirpes de *Wolbachia* cujo genoma foi completamente sequenciado e descrito. Três destas estirpes estão associadas a indução da incompatibilidade citoplasmática e confere aos seus hospedeiros proteção contra patógenos – *wMel* e *wRi* (supergrupo A), *wPip* (supergrupo B) – enquanto que a *wBm* (supergrupo D) é o único simbiote mutualista obrigatório (Duploux *et al.*, 2013).

Uma base de dados foi criada com o intuito de armazenar as sequências, toda a informação sobre a estirpe e sobre o hospedeiro (<http://pubmlst.org/wolbachia/>) (Baldo *et al.* 2006).

### 1.1.3. O hospedeiro - Afídeo

Os afídeos compõem um diverso grupo de insetos fitófagos especializados em sugar a seiva das plantas (figura 7) (Giordanengo *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2011). Estes encontram-se entre os insetos mais bem-sucedidos devido as suas excelentes capacidades adaptativas. A sua evolução foi conduzida pela seleção de nutrientes e pelas plantas hospedeiras nas quais se alimentam levando-os a desenvolver ciclos de vida e polimorfismos complexos. De modo a garantir a sua sobrevivência e a prosperidade dos seus genes estes desenvolveram uma dispersão passiva pelo vento e uma alta capacidade de reprodução (Sorensen, 2003).

A sua capacidade evolutiva, o facto de serem vetores de doenças e de se alimentarem diretamente da seiva das plantas fez com que os afídeos se tornassem um dos grupos de insetos com maior importância a nível económico sendo considerados inimigos da agricultura por causarem perdas significativas de plantas cultivares (Sorensen, 2003; Kaygin *et al.*, 2008; Giordanengo *et al.*, 2010).



**Figura 7 –Exemplo da diversidade dos afídeos–** a) *Cavariella aegopodii* – afídeo da cenoura; b) *Aphis nerii*; c) *Macrosiphum rosae* – afídeo das rosas; d) *Neophyllaphis podocarpae*; e) *Aulacorthum solani* – afídeo da batata; f) *Aphis pomi* – afídeo da maçã (a); c); e); f) <http://www.aphotofauna.com>; b) <http://www.zenthroughalens.com>; d) <http://entnemdept.ufl.edu>)

### 1.1.3.1. Taxonomia

Os afídeos surgiram a cerca de 140 milhões de anos durante cretáceo inferior diversificando-se juntamente com as angiospérmicas. Embora grande parte dos afídeos se tenham extinguido durante a passagem do Cretáceo para o Terciário, os afídeos modernos foram capazes de se manter e sobreviver até a atualidade (Sorensen, 2003).

A classificação taxonómica dos afídeos constitui no entanto uma tarefa complicada. Em 1997, a classificação de Remaudiere e Remaudiere reconhece 25 subfamílias de afídeos, cerca de 600 géneros e 4700 espécies (Sorensen, 2003; Blackman e Eastop, 2007). Os afídeos fazem parte da superfamília Aphidoidea que pertence aos Sternorrhyncha dentro do grupo Hemiptera. A superfamília Aphidoidea é composta por três famílias: Adelgidae, Phylloxoridae e Aphididae, sendo a terceira aquela na qual se encontram os afídeos (Sorensen, 2003).

São várias as espécies de afídeos que se desenvolveram juntamente com a sua planta hospedeira. No entanto, ocasionalmente algumas espécies mudam radicalmente de hospedeiro de modo a satisfazer as suas necessidades evolutivas (Sorensen, 2003).

Existem subfamílias de afídeos muito importantes, nomeadamente aquelas que se encontram relacionadas com produtos agrícolas. Algumas dessas subfamílias são a Chaitophorinae (a qual pertence o afídeo da cana-de-açúcar *Sipha flava*) e se encontra nas Salicaceae e Gramineae; a subfamília Lachnidae que se encontra normalmente em raízes de dicotiledóneas (como o afídeo da raiz da alface), entre outros (Sorensen, 2003).

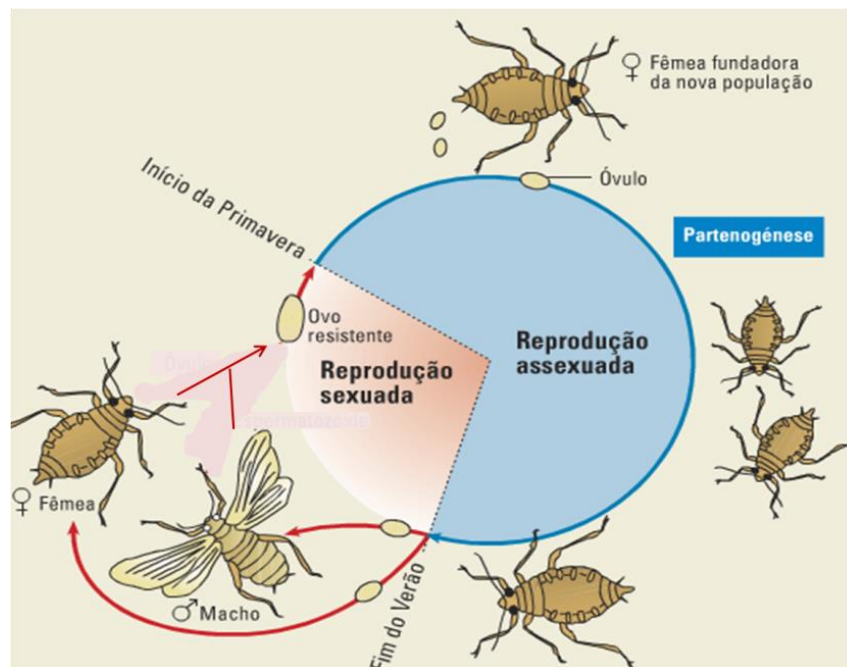
Os afídeos normalmente apresentam também uma relação de mutualismo com formigas por não terem a capacidade de perfurar as plantas dependem dos afídeos para obter o “néctar” e em troca fornecem-lhes proteção contra predadores (Sorensen, 2003).

A maior e mais importante família de afídeos, uma das mais recentes a nível evolutivo, é composta por duas (grandes) tribos com grande importância agrícola. São estas as tribos Aphidini, que tem um número reduzido de géneros mas uma grande diversidade de espécies de afídeos que encontram-se normalmente associados a formigas; e a Macrosiphini que, ao contrário da primeira, tem uma grande diversidade de géneros de afídeos que não se encontram necessariamente associados a formigas. A tribo Aphidini é de elevada importância visto conter um dos géneros mais importantes e numerosos de afídeos, o género *Aphis*, detentor de cerca de 1000 espécies (Sorensen, 2003).

### 1.1.3.2. Ciclo de vida e polimorfismo dos afídeos

O ciclo de vida típico dos afídeos é muito complexo sendo as suas características responsáveis por este inseto ter um grande potencial demográfico pois é capaz de produzir indivíduos em massa (Simon *et al.*, 2002).

Quando um afídeo tem uma só planta hospedeira num ano as formas sexuais são produzidas no Outono/Inverno possivelmente devido a diminuição da luz do dia e da temperatura. Os ovos produzidos permanecem dormentes durante o Inverno sendo no início da Primavera que a fêmea fundadora emerge do ovo, matura e inicia a reprodução assexuada por partenogénese. As ninfas originadas deste modo tornam-se vivíparas continuando a apresentar este tipo de reprodução e assim se mantêm até ao fim do Verão (figura 8) (Simon *et al.*, 2002; Sorensen, 2003).



**Figura 8 –Ciclo de vida dos afídeos.** Nesta imagem encontra-se representado as duas fases o ciclo de vida dos afídeos – reprodução sexuada, no Verão, e reprodução assexuada (partenogénese), no Inverno (adaptação de [www.netxplica.com](http://www.netxplica.com))

Algumas espécies ou populações tornaram-se partenogénicas obrigatórias pois perderam a capacidade de se reproduzir sexualmente. Quando comparadas as duas linhas, sexuadas ou assexuadas, as sexuadas apresentam maior vantagem ecológica. As linhas assexuadas têm a desvantagem de não colocarem ovos no Inverno pois apresentam uma maior suscetibilidade às baixas temperaturas, ao contrário do que acontece com as sexuadas, que põem ovos com capacidade de resistir ao frio (Simon *et al.*, 2002).

### 1.1.3.3. Comportamento e alimentação

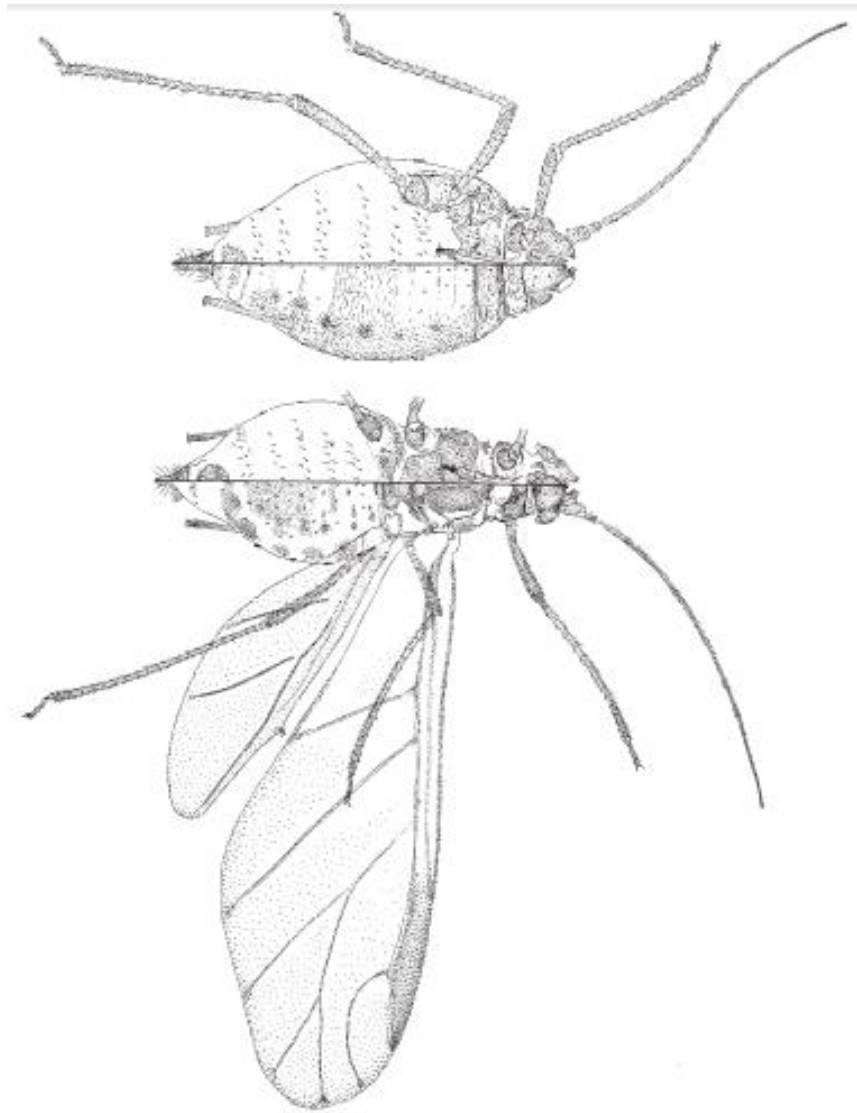
Ao longo do tempo as plantas, para evitar o ataque de herbívoros, desenvolveram inúmeros modos de defesa, tanto químicos como físicos. Os afídeos, para assegurarem a sua sobrevivência, necessitaram desenvolver métodos para evitar ou sabotar a resposta defensiva da planta. Isto porque, ao contrário de grande parte dos herbívoros que deixam a planta após se alimentarem, os afídeos necessitam permanecer na planta por um período de tempo prolongado pois possuem um corpo pequeno coberto por uma cutícula macia que os torna vulneráveis à desidratação (Giordanengo *et al.*, 2010).

Os afídeos alimentam-se então através da inserção do estilete nas plantas de modo a sugarem a seiva floémica. O avanço do estilete na planta só se proporciona devido ao facto deste ser lubrificado pela saliva que contém uma pectinase que tem a capacidade de quebrar as ligações existentes entre as células da planta. Esta saliva forma uma camada que envolve o estilete como um escudo que só cai quando o estilete é removido da planta (Sorensen, 2003; Giordanengo *et al.*, 2010).

Devido ao tipo de dieta imposta pelo consumo de seiva os afídeos têm nos intestinos bacteriócitos que contêm bactérias do tipo rickettsia que ajudam na síntese dos nutrientes. Estas bactérias, que normalmente são transmitidas a prole pela progenitora, coevoluíram com as linhagens de afídeos, diferindo entre eles (Sorensen, 2003).

O sucesso desta espécie depende também da sua interação dentro do grupo. A maior parte das interações que se dá entre os afídeos acontece através de sinais químicos. Um dos sinais mais característicos dos afídeos são as suas feromonas de alarme que alerta-os para a presença de perigos imediatos, tais como predadores (Vandermoten *et al.* 2012).

Os afídeos dependem também da sua elevada capacidade reprodutiva e capacidade de dispersão para aumentar o seu rácio de sobrevivência num ambiente hostil. Eles utilizam comportamentos morfo específicos para promover a sobrevivência do seu material genético (Sorensen, 2003). São os indivíduos alados que permitem uma melhor capacidade de dispersão sendo que os indivíduos ápteros, considerados sedentários, investem mais na reprodução e só saem da planta hospedeira quando necessitam melhores condições, seja de alimentação ou para fugir de parasitas ou predadores (figura 9) (Sorensen, 2003; Lombaert *et al.*, 2006; Giordanengo *et al.*, 2010). Estes após saírem de planta hospedeira tentam encontrar uma nova planta com duas características muito importantes. A primeira é a cor amarela, para a qual são principalmente atraídos, pois esta cor predomina na fase de crescimento ou senescência, momentos nos quais as plantas são uma melhor fonte de nitrogénio. A segunda característica é procurada após chegarem à nova planta e caso não seja encontrada estes partem à procura de uma nova hospedeira. Ao pousarem na nova planta os afídeos perfuram a epiderme procurando por compostos secundários da planta, que não lhes sendo essenciais, são específicos das plantas hospedeiras de afídeos (Sorensen, 2003).



**Figura 9** –Forma áptera (no topo) e alada (em baixo) do afídeo *Myzus persicae*.É possível ver nas figuras o pormenor da parte ventral (na metade superior) e da parte dorsal (na metade inferior) estando a cabeça voltada para a direita (Sorensen, 2003).

Os afídeos normalmente apresentam também uma relação de mutualismo com formigas. Estas, por não terem a capacidade de perfurar as plantas dependem dos afídeos para obter o “néctar” e em troca fornecem-lhes proteção contra predadores (Sorensen, 2003).

### 1.1.3.4. Praga agrícola

Embora só cerca de 250 espécies de afídeos sejam consideradas pragas agrícolas a verdade é que este inseto é considerado uma das maiores e mais destrutivas pestes agrícolas do momento, especialmente em zonas temperadas, causando danos em culturas aráveis e hortícolas (Sorensen, 2003; Lombaert *et al.*, 2006; Vandermoten *et al.*, 2012).

O facto de grande parte destes insetos combinarem partenogénese com uma dispersão muito eficiente faz com que a sua população cresça rapidamente e que estes se tornem exploradores de grande parte dos recursos vegetais existentes no local (Lombaert *et al.*, 2006; Giordanengo *et al.*, 2010; Vandermoten *et al.*, 2012).

Existem algumas espécies que afetam um hospedeiro específico – monófagas – como por exemplo a *Brevicoryne brassicae* que se encontra associada às couves - mas aquelas que causam maiores problemas são as espécies polífagas – que são capazes de afetar uma grande quantidade de hospedeiros diferentes (Sorensen, 2003).

São várias as formas, diretas e indiretas, através das quais os afídeos causam dano na planta hospedeira. O facto de haver uma grande quantidade de afídeos na planta pode levar a acumulação tanto de excrementos como do próprio melado da planta que conduz à formação de bolores e fungos. Estes não só causam uma diminuição da capacidade de fotossíntese (pois há menor superfície da planta exposta) como podem causar doenças graves na planta. Mas a presença dos afídeos pode ter outros efeitos. A secreção salivar de alguns afídeos contém fitotoxinas que alteram o balanço hormonal e o metabolismo da planta podendo causar desde deformações nas folhas, a formação de vesículas ou até mesmo défice estrutural (nanismo). O facto de os afídeos aumentarem a sua população muito rapidamente pode fazer com que a remoção de seiva seja demasiado elevada levando a planta à morte. Estes insetos são também vetores de várias viroses que se espalham rapidamente na planta. O facto de serem vetores de doenças torna-os um problema ainda maior para a agricultura atual (Sorensen, 2003; Kaygin *et al.*, 2008).

O controlo dos afídeos na agricultura está incluído nas estratégias de gestão de pragas que visa a identificação de espécies que se comportam como pragas e desenvolver táticas que permitam o seu controle. Algumas das estratégias desenvolvidas tendo em vista a diminuição das populações em campos agrícolas foram a minimização de espécies que promovem a presença de afídeos nas plantas, como por exemplo as formigas, usar luz UV perto das plantas para repelir os indivíduos alados ou colocar no terreno plantas que promovam a aproximação de inimigos naturais dos afídeos (Sorensen, 2003).

No entanto, é cada vez mais importante encontrar um método de controlo biológico que auxilie na eliminação desta praga. O uso de pequenas vespas, que parasitam e se dispersam na população de afídeos e a libertação de predadores como por exemplo a joaninha (*Hippodamia convergens*) são algumas das medidas que já foram tomadas de modo a aferir qual o método de controlo adequado (Sorensen, 2003). Os inimigos naturais tendem a aumentar o

seu número com o passar do tempo, alimentando-se da peste para utilizar os seus nutrientes. Consequentemente a peste tem a sua população diminuída devido a alta taxa de mortalidade ou pela diminuição do número de descendentes (Van Driesche e Hoddle, 2003).

#### 1.1.4. Relações endossimbióticas: afídeo/bactérias

É conhecido que os afídeos encontram-se em associação com vários microrganismos e são extensos os estudos realizados para a sua melhor percepção (Nikoh, 2010; Jones *et al.*, 2011). Verificou-se que essa associação pode ter uma vasta gama de resultados que pode ser benéfica ou prejudicial. A maior parte das bactérias associadas aos afídeos são mutualistas e herdadas por via materna, no entanto algumas, nomeadamente da família Enterobacteriaceae mostram ser patogénicas para estes insetos (Jones *et al.*, 2011).

A *Buchnera aphidicola* é o endossimbionte primário que infeta os afídeos. A sua transmissão depende da entrada destas nos embriões em cada geração (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Lamelas *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2011). Sendo esta uma associação muito antiga que é transmitida da fêmea para a prole a muitas gerações verifica-se a existência de coespeciação entre a bactéria e o afídeo hospedeiro. A bactéria produz aminoácidos que se encontram em falta na seiva floémica (Jones *et al.*, 2011).

Adicionalmente a hospedar a *B. aphidicola* os afídeos podem ser hospedeiros de outras bactérias intracelulares – simbiontes secundários (Gómez-Valero *et al.*, 2004; Lamelas *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2011). Em 2004, Gómez-Valero e a sua equipa, reportaram a presença de *Wolbachia* nos afídeos da espécie *Cinara cedri*, que se encontra normalmente associada a planta *Cupressus sp.* Apesar da *Wolbachia* ser um simbionte que infeta uma vasta quantidade de artrópodes a sua associação aos afídeos foi durante muito tempo desconhecida. A única  $\alpha$ -proteobactéria encontrada nos afídeos até então havia sido a *Rickettsia*, presente na hemolinfa do *Aphis pisum* (Gómez-Valero *et al.*, 2004).

### 1.1.4.1. *Wolbachia* como controlo biológico

Desde o desenvolvimento da agricultura e da sua utilização como forma de subsistência que o controle de pragas foi algo que preocupação a população.

O controlo biológico de pestes começou a ser utilizado a relativamente 130 anos, tendo o seu início aproximadamente nos anos 1880. Com o passar dos anos, o aumento da informação e o avanço da tecnologia possibilitou uma maior compreensão da sua utilização e o aumento da sua eficiência. Este controlo consiste então na utilização um organismo vivo, o inimigo natural, para controlar e/ou diminuir a densidade populacional de uma espécie, considerada peste. Os inimigos naturais podem ser de vários tipos: parasitas, predadores, insetos herbívoros ou um patogene (ex.: bactéria, vírus, nematodes ou fungos, entre outros) que os infeta. No caso do patogene o que acontece e que estes quando se encontram no hospedeiro podem suprimir local e temporariamente o número da peste (Van Driesche e Hoddle, 2003).

Ao contrário dos pesticidas ou outros químicos usados no controlo de pestes, que ao fim de algum tempo deixam de ter efeito pois a peste ganha resistência, a utilização de controlos biológicos tem maior potencial porque a sua ação pode ser permanente, pois estes reproduzem-se e difundem-se acompanhando a população da peste. A vantagem deste tipo de controlo e que, ao contrário dos pesticidas, este não representa qualquer perigo para os humanos ou restantes organismos (Van Driesche e Hoddle, 2003).

Pensa-se que a *Wolbachia* é uma importante ferramenta para a “técnica de incompatibilidade de insetos” (Incompatible Insect Technique) que consiste na utilização de incompatibilidade reprodutiva associada a simbiontes para o controlo de pragas e vetores de doenças (Saridaki e Bourtzis, 2010). O interesse da utilização da *Wolbachia* como controlo biológico devesse ao facto desta bactéria ter a capacidade de modificar severamente a capacidade reprodutiva e conseqüentemente o rácio sexual dos seus hospedeiros. Esta seria uma forma de controlo de pestes, transformação de doenças e melhoramento de insetos benéficos (Saridaki e Bourtzis, 2010; Vasquez *et al.* 2011).

Embora sejam várias as hipóteses sobre o resultado da utilização desta bactéria como controlo biológico, que variam entre o prejudicial, neutro e benéfico, a realidade é que existem casos nos quais a utilização desta bactéria contribuiu para uma grande alteração na *fitness* dos seus hospedeiros. Em 1997, Min e Benzer, utilizaram uma estirpe virulenta de *Wolbachia* em *Drosophila melanogaster* que causou uma redução drástica da população e, mais tarde, redução da transmissão de doenças dentro das populações. Esta estratégia foi recentemente utilizada no mosquito *Aedes aegypti* com o intuito de impedir a transmissão da dengue com resultados positivos (Vasquez *et al.* 2011).

É importante compreender que o processo de controlo biológico centra-se na *fitness* e reprodução do agente de controlo biológico, normalmente da fêmea, o que faz com que quaisquer possibilidades de melhoramento da sua eficiente seja de elevado interesse. Como tal, foi a capacidade da *Wolbachia* de aumentar o número de fêmeas na população que

despertou o interesse da comunidade científica para a sua utilização no controlo biológico. Uma população com maior número de descendentes fêmeas e menor gasto energético na produção de machos são alguns dos benefícios da utilização desta bactéria (Vasquez *et al.* 2011).

Uma das ideias consideradas para o controle biológico é a utilização capacidade da *Wolbachia* de induzir a incompatibilidade citoplasmática para erradicar a população hospedeira. Esta tem um efeito análogo a libertação de machos estéreis, no entanto, esta só tem impacto se for utilizada numa população pequena. Sendo assim a utilização da incompatibilidade citoplasmática para reduzir o potencial reprodutivo dos insetos representa uma alternativa mais viável. A partenogénese também poderia ser usada. O seu aumento dentro da população é superior, há uma maior capacidade de colonização e de se estabelecer na população pois não existe o problema de encontrar um parceiro. Poderia ser facilmente usada em programas de produção em massa pois não há o problema da perda de machos no processo (Werren, 1997).

Uma melhor caracterização da *Wolbachia* que infecta os afídeos e importante para compreender a relação evolutiva entre simbiote e afídeo.

Foi realizado um estudo extensivo em afídeos no qual foi possível verificar, recorrendo maioritariamente a sequências obtidas do gene *16S rRNA*, a existência de dois novos supergrupos para a *Wolbachia* dois quais fazem parte somente espécies de afídeos sendo um deles constituído unicamente por amostras dos Açores (Augustinos *et al.*, 2011).

O principal objetivo deste trabalho é a caracterização molecular das estirpes de *Wolbachia* presentes nos afídeos recorrendo a um maior número de genes, nomeadamente os genes MLST, de modo a tentar obter mais informação acerca destes novos supergrupos. Esta caracterização é importante para entender a diversidade e dispersão desta bactéria nos afídeos e compreender como ocorre a sua transmissão dentro da população.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Recolha e conservação das amostras

Neste trabalho foram utilizados afídeos recolhidos entre Março de 2012 e Junho de 2013 na Ilha da Madeira assim como afídeos de diferentes ilhas do Arquipélago dos Açores recolhidos em Junho de 2012 no Arquipélago dos Açores (São Miguel, São Jorge e Pico). Para possibilitar a comparação de dados será utilizada uma amostra recolhida em Barcelona em Maio de 2013 assim como amostras existentes em coleção no laboratório, que foram recolhidas entre Abril de 2009 e Novembro de 2011 na Ilha da Madeira e em Junho e Setembro de 2010 no Arquipélago dos Açores (Terceira e São Miguel, respetivamente).

Coletou-se os indivíduos juntamente com parte da sua planta hospedeira, para posterior identificação, transportou-se cuidadosamente em sacos de plástico de modo a permanecerem vivos. No laboratório procedeu-se a recolha dos indivíduos da planta, com o auxílio de um pincel, colocou-se em eppendorfs contendo etanol e guardou-se no congelador a -20°C para conservação até ao momento da utilização.

Alguns indivíduos de cada uma das amostras, também conservados em álcool, foram levados para o Laboratório de Qualidade Agrícola da Camacha.

O método utilizado para a preparação dos afídeos foi a montagem em lâmina e lamela. Retirou-se os afídeos necessários para identificação do hospedeiro vegetal e colocou-se em álcool a 90% durante 24 horas. Colocou-se o afídeo numa caixa de petri com o álcool a 90% e fez-se um furo na face ventral do abdómen com a ajuda de uma agulha fina. Transferiu-se os afídeos para um eppendorf com solução de hidróxido de potássio a 10% e deixou-se durante 24 horas. No dia seguinte colocou-se teepol a 25% (solução detergente) numa caixa de petri na qual foram colocados os afídeos. Esmagou-se cuidadosamente o seu corpo durante 5 a 10 minutos de modo a retirar todo o conteúdo. Transferiu-se os afídeos para uma nova caixa de petri contendo água destilada e aproveitou-se para limpar os restos que ainda permaneciam no interior dos corpos. Após 5 a 10 minutos passou-se os afídeos para uma caixa de petri com álcool a 90%. Depois de 30 minutos colocou-se em meio clarificador, eugenol, no qual permaneceram por 30 minutos. Retirou-se os afídeos da caixa de petri e colocou-se na lâmina utilizando como meio de inclusão permanente o entellan.

A identificação foi realizada posteriormente pelo Engenheiro António Franquinho (Blackman e Eastop, 1989, 1994, 2006; Nafria *et al.* 2005; Blackman, 2013).

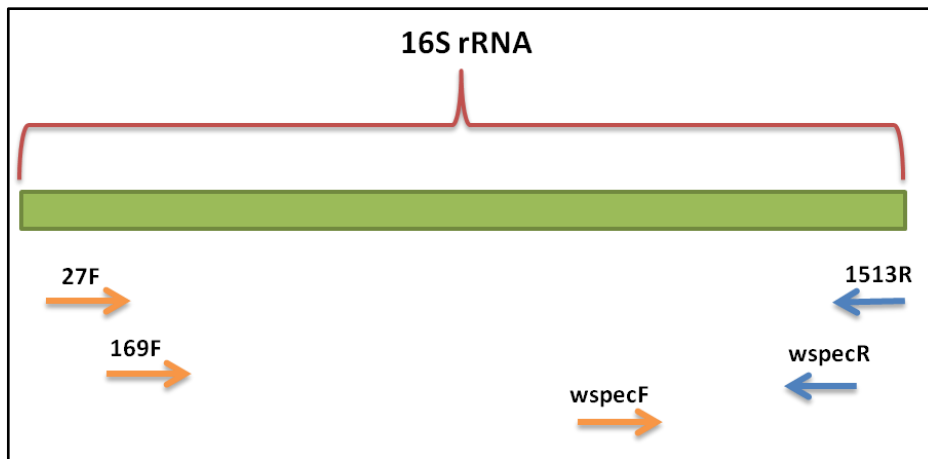
### 2.1.1. Extração de DNA

Devido ao facto do teor de *Wolbachia* ser relativamente baixo no hospedeiro faz com que o seu estudo exija a utilização de um grande número de amostras. Como tal, na extração de DNA foram utilizados quatro indivíduos de cada amostra a fim de aumentar a quantidade de DNA obtida.

Procedeu-se á extração do DNA total do afídeo utilizando o protocolo de extração de DNA total de Latorre *et al.* 1986. Começou-se por homogeneizar a amostra em 160µL de tampão I (10mM de Tris-HCl; 60mM de NaCl; 5% de sacarose; 10mM de EDTA). Adicionou-se 200µL de tampão II (300mM de Tris-HCl; 1.35% de SDS; 5% de sacarose; 10mM de EDTA) e homogeneizou-se por inversão. Incubou-se por 30 minutos a 65°C e neutralizou-se com 60µL de tampão III (KOAc a 3M). Homogeneizou-se por inversão e incubou-se por 20 minutos a -20°C. Centrifugou-se por 15 minutos a 13000rpm. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se um volume de isopropanol. Homogeneizou-se por inversão e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se por 10 minutos a 13000rpm e eliminou-se o sobrenadante por decantação. Lavou-se o precipitado com 100µL de etanol a 70%. Centrifugou-se por 5 minutos a 13000rpm, descartou-se o sobrenadante e secou-se a vácuo. Ressuspendeu-se o precipitado em 20µL de água ultrapura.

## 2.2. PCR com primers gerais – gene 16S rRNA

Neste trabalho começou-se por efetuar uma PCR diagnóstico utilizando diferentes primers para comparar qual o melhor para verificar a presença de infeção. Para a PCR testaram-se os primers 27F/1513R e wspecF/wspecR. Num determinado momento do trabalho testou-se o uso de nested-PCR em vez de uma PCR normal para verificar se obtinha-mos melhores resultados (figura 10).



**Figura 10** –Representação esquemática da posição dos primers no gene 16S rRNA. A cor-de-laranja encontram-se os primers F (“forward”) e a azul os primers R (“reverse”)

A PCR realizou-se com 25µL de volume de reação: 1µL DNA, 2.5µL de tampão de reação 10x, 2µL de dNTP's (2.5mM), 1.25µL de MgCl<sub>2</sub> (100mM), 1µL de cada primer (100µg/µL), 0.2µL de *Taq polimerase* (5U/µL) e 16.05µL de água mQ. Utilizou-se como controle positivo uma amostra infetada de *Bemisia tabaci* com *Wolbachia* e como controle negativo utilizou-se água ultrapura.

O perfil de temperaturas variou ligeiramente dependendo dos primers usados. Quando utilizados os primers 16S **27F/1513R** as condições da PCR foram as seguintes: 95°C por 2 minutos seguindo-se 38 ciclos de 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto com extensão final a 72°C por 5 minutos. Embora tenhamos conseguido amplificar algumas amostras ao fazer uma sequenciação teste percebeu-se que as sequências tinham pouca qualidade.

Decidiu-se então tentar amplificar utilizando uma outra técnica de PCR, que aumenta a especificidade da amplificação, denominada nested-PCR. Muito basicamente, esta técnica consiste na utilização do produto da primeira PCR, neste caso amplificados com os primers 169F/1513R, na PCR seguinte, com os primers 169F/wspecR. O wspecR, um primer mais interno que o 1513R - como é possível ver na figura 9, torna a amplificação mais específica pois usa o produto já amplificado. Após alguns testes verificou-se os problemas anteriores e percebeu-se que provavelmente iria ser necessário recorrer a clonagem para obter linhas puras. Para os **169F/1513R** e **169F/wspecR** usou-se o seguinte perfil: 94°C por 2 minutos seguido de 2 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos, seguindo-se 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos com extensão final a 72°C por 5 minutos.

Ao amplificar utilizando a nested-PCR foi possível obter resultados satisfatórios mas como surgiu a possibilidade de tentar amplificar com os primers *wspecF/wspecR*, e mesmo após a decisão de clonar, resolvemos testar estes primers pois assim poderíamos pôr de parte a nested-PCR, na qual se despende mais tempo e reagentes, e usar uma PCR normal.

Testou-se então os primers **wspecF/wspecR** com o seguinte perfil: 94°C por 2 minutos seguindo-se 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

**Tabela 1**—Primers utilizados para amplificação do gene *16S rRNA*. Na tabela é possível encontrar os diferentes primers utilizados para a detecção de *Wolbachia* assim como a sua respetiva sequência, comprimento e temperaturas de *annealing*.

Gene	Comprimento do gene (pb)	Nome	Sequencia	Posição	Produto (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
16S	1446	169F	CTAATACCGTATACGCCCTAYG	169	-	51/53*
		1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	1473	1304	53*
		1513R	ACGGYTTACCTTGTTACGACTT	1476	1307	51
		wspecF	YATACCTATTCGAAGGGATAG	955	-	54
		wspecR	AGCTTCGAGTGAAACACCTTC	1393	438	54

### 2.3. Visualização dos produtos de amplificação

Para verificar o resultado das reações de PCR utilizou-se géis de agarose a 0.8%. Injetou-se no gel 4µL do produto da reação e correu-se, num banho de TAE 1x, por cerca de 30 minutos a 110W. Colocou-se o gel, após a corrida, numa tina contendo 250mL de tampão TAE 1x e 50µL brometo de etídio por 30 minutos. Visualizou-se o gel utilizando uma luz UV e fotografou-se com uma câmara digital Canon.

### 2.4. PCR com os genes MLST

Encontradas as amostras infetadas com *Wolbachia* passou-se à análise das mesmas com os genes conservativos de glutamyl-tRNA amidotransferase - subunidade B (*gatB*), citocromo c oxidase - subunidade I (*coxA*), proteína hipotética conservativa (*hcpA*), proteína da divisão celular (*ftsZ*) e frutose bifosfato aldolase (*fbpA*).

Utilizou-se como base as condições presentes no artigo de Baldo *et al.* (2006) mas foi necessário otimizar a temperatura de *annealing* para os diferentes genes (tabela 2).

Realizou-se a PCR com 25µL de volume de reação: 1µL DNA, 2.5µL de tampão de reação 10x, 2µL de dNTP's (2.5mM), 1.25µL de MgCl<sub>2</sub> (100mM), 1µL de cada primer (100µg/µL), 0.2µL de *Taq polimerase* (5U/µL) e 16.05µL de água mQ. Tal como nas anteriores PCR's utilizou-se como controle positivo uma amostra de *Bemisia tabaci* infetada com *Wolbachia* e como controle negativo utilizou-se água ultrapura.

O perfil de temperaturas utilizado na PCR foi: 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, TA°C\* por 45 segundos, 72°C por 90 segundos com extensão final a 72°C por 5 minutos.

A \*temperatura de annealing "TA" foi de 54°C para os genes *gatB*, *coxA* e *ftsZ* e de 53°C para o gene *hcpA*.

Não foi encontrada uma temperatura de annealing ótima para o gene *fbpA*.

O resultado da PCR foi novamente verificado correndo 4µL do produto das reações em gel de agarose a 0.8%.

**Tabela 2–Primers e loci dos genes *wsp* e MLST.** A tabela contém a sequência dos primers usados para a análise dos genes MLST assim como os respectivos pares de base ("bp") (Baldo *et al.*, 2006)

TABLE 1. MLST and *wsp* loci and primer features

Cluster category <sup>a</sup>	Locus code (wMel)	Gene	Product	Primer		Gene length (bp) <sup>b</sup>	Amplified nucleotide range (bp) <sup>b</sup>	MLST fragment size (bp)
				Designation	Sequence (5'-3')			
<i>α-Proteobacteria</i>	WD_0146	<i>gatB</i>	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit B	gatB_F1	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT	1,425	421–891	369
				gatB_R1	TGGYAAATCRGGYAAAAGATGA			
<i>Escherichia coli</i>	WD_0301	<i>coxA</i>	Cytochrome c oxidase, subunit I	coxA_F1 coxA_R1	TTGGRGCRATYAACTTTATAG CTAAAGACTTTKACRCCAGT	1,551	491–977	402
<i>Escherichia coli</i>	WD_0484	<i>hcpA</i>	Conserved hypothetical protein	hcpA_F1 hcpA_R1	GAAATARCAGTTGCTGCAAA GAAAGTYRAGCAAGYTCTG	741	91–605	444
<i>Escherichia coli</i>	WD_0723	<i>ftsZ</i>	Cell division protein	ftsZ_F1 ftsZ_R1	ATYATGGARCATATAAARGATAG TCRAGYAATGGATTTRGATAT	1,197	274–798	435
<i>Rickettsiales</i>	WD_1238	<i>fbpA</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	fbpA_F1 fbpA_R1	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT CCRCCAGARAAAAYACTATTC	900	241–749	429
<i>Wolbachia</i>	WD_1063	<i>wsp</i>	Outer surface protein	wsp_F1 wsp_R1	GTCCAATARSTGATGARGAAAC CYGCACCAAYAGYRCRTTAAA	714	85–688	546

## 2.5. Purificação das amostras amplificadas

As amostras infetadas foram purificadas utilizando as placas NucleoFast® 96 PCR (Macherey-Nagel). O processo consiste em colocar cada uma das amostras num poço da placa, sem tocar na membrana. Colocou-se a placa no vácuo e após 10 minutos adicionou-se 50µL de água mQ morna. Agitou-se a placa por 10 minutos para a total ressuspensão do DNA. Retirou-se o produto da placa e colocou-se num eppendorf de 1,5mL.

Reservou-se o produto da purificação para a realização da clonagem.

## 2.6. Clonagem (choque térmico e miniprep)

Para a clonagem foram selecionadas apenas algumas amostras pois todo o processo necessitava otimização, obrigando a um elevado gasto de recursos e tempo.

Utilizou-se os produtos da purificação para a clonagem. Iniciou-se o processo utilizando o vector pGEM-T (Easy Vector System) para fazer 10µL de solução de ligação (5µL de tampão de ligação 2x; 1µL de pGEM 50ng, 1µL de T4 DNA ligase) com 3µL da amostra purificada. Deixou-se a mistura de ligação à temperatura ambiente durante uma hora. Iniciou-se a transformação adicionando os 10µL da solução de ligação à células competentes JM109. Agitou-se gentilmente e incubou-se durante 20 minutos em gelo. O choque térmico às células foi dado durante 45 segundos num banho-maria a exatamente 42°C. Retirou-se e colocou-se em gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 950µL de meio LB à mistura e incubou-se por 1 hora e meia a 37°C, com agitação. Após esse tempo semeou-se 100µL da mistura nas placas LB/AMP/IPTG/X-Gal e incubou-se na estufa a 37°C durante toda a noite. Selecionou-se as colónias brancas e inoculou-se em 1mL de meio LB/AMP líquido a 37°C durante toda a noite, com agitação (Promega).

Iniciou-se a miniprep “quick and dirty” centrifugando o tubo com o cultivo à velocidade máxima durante 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 50µL de solução tampão (TE). Ressuspendeu-se e adicionou-se 200µL de solução de lise (20µL de SDS 1%; 20µL de NaOH 0.2N; 160µL de água mQ). Homogeneizou-se e incubou-se por 3 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 150µL de KOAc a 3M e incubou-se a -20°C por 5 minutos. Centrifugou-se à velocidade máxima por 5 minutos e recolheu-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 volume de isopropanol e ressuspendeu-se no vórtex. Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente e seguiu-se uma nova centrifugação por 5 minutos à velocidade máxima. Lavou-se o pellet com 100µL de etanol a 70% e centrifugou-se por 1 minuto à velocidade máxima. Retirou-se o sobrenadante com uma pipeta e secou-se a vácuo. Ressuspendeu-se o pellet com 30µL de água ultrapura.

## 2.7. Digestão e sequenciação

As amostras foram sujeitas a digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. Utilizou-se um gel de agarose para verificar se as amostras continham ou não o inserto.

As amostras que apresentaram inserto foram sujeitas a PCR com os primers T7 e SP6. Realizou-se a PCR com 8µL de volume de reação: 5µL DNA, 1µL de tampão de reação 10x, 1µL de BigDye (BioSystems) e 1µL de primer. O perfil de temperaturas foi de 99 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Os produtos foram enviados para sequenciação.

## 2.8. Análise filogenética das sequências

Das amostras sequenciadas foram várias as que não tinham qualidade suficiente ou que não tinham a homologia correta para ser utilizada neste trabalho. As sequências com qualidade e homologia a *Wolbachia* foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Verificou-se manualmente o alinhamento obtido, corrigindo os erros existentes, e procurou-se por sequências similares às obtidas na base de dados GenBank utilizando o BLAST. Efetuou-se, no programa Mega (versão 6.0), um teste do modelo evolutivo para verificar qual o método mais adequado para a análise das amostras. As árvores foram construídas pelo método Maximum Likelihood, utilizando o teste de filogenia Bootstrap com 1000 replicações, o modelo “General Time Reversal” (GTR) “Gamma distributed” (G), “Invariant sites” (I) ou “Gamma distributed with invariante sites” (G+I) dependendo do resultado obtido no teste do modelo evolutivo para cada um dos genes.

### 3. Resultados e Discussão

Os afídeos são, há muitos anos, foco de estudo no que diz respeito a interações com simbiontes primários. Estes insetos são hospedeiros de simbiontes primários, como é o caso da *Buchnera aphidicola*, mas ocasionalmente podem albergar simbiontes secundários que lhes conferem vantagens evolutivas. São conhecidas alguns outros simbiontes, como *Candidatus Serratia symbiotica*, presente no afídeo *Acyrtosiphon pisum*, que lhes conferem tolerância ao calor (Montllor *et al.*, 2002) ou *Candidatus Regiella insecticola* e *Candidatus Hamiltonella defensa* que os protegem contra parasitoides (Oliver *et al.*, 2010; Volburger *et al.*, 2010).

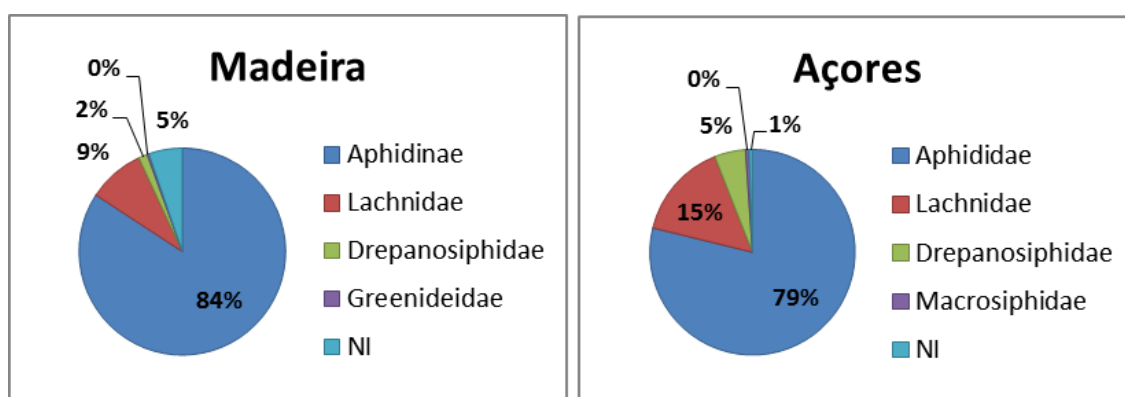
O estudo de *Wolbachia*, endossimbionte secundário, nos afídeos está condicionado por dificuldades na deteção e amplificação e assim como à baixa taxa de infeção (Augustinos *et al.*, 2011) todavia existem alguns trabalhos desenvolvidos com o intuito de verificar e caracterizar a sua presença nos afídeos (West *et al.*, 1998). Um estudo que utilizou a técnica Long-PCR, que origina melhores resultados do que com a PCR padrão detetou pela primeira vez *Wolbachia* nos afídeos *Toxoptera citricidus* e o *Aphis craccivora* (Jeyaprakash e Hoy, 2000). Posteriormente vários trabalhos mostraram a presença de *Wolbachia* nos afídeos, tais como o estudo realizado por Gómez-Valero *et al.* (2004) que revelou pela primeira vez a presença de *Wolbachia* no afídeo *Cinara cedri*, espécie associada a coníferas (Gómez-Valero *et al.*, 2004); os afídeos do trigo, *Sitobion miscanthi*, infetados com *Wolbachia* do supergrupo A e B (Wang *et al.*, 2009). Recentemente, num estudo extensivo baseado no gene *16S rRNA*, dos afídeos de várias zonas geográficas (Portugal, Espanha, Grécia, Israel e Irão) foram encontradas diversas espécies infetadas com *Wolbachia* do supergrupo B mas também verificaram a existência de dois novos supergrupos, M e N (Augustinos *et al.*, 2011).

Este projeto foi então elaborado, com o intuito de detetar a taxa de infeção *Wolbachia* presente nos afídeos dos Arquipélagos da Madeira e Açores, utilizando não só o gene *16S rRNA* mas também os genes MLST: glutamyl-tRNA amidotransferase - subunidade B (*gatB*), citocromo c oxidase - subunidade I (*coxA*), proteína hipotética conservativa (*hcpA*) e a proteína da divisão celular (*ftsZ*) possibilitando uma melhor caracterização das estirpes desta bactéria assim como a comparação com os resultados publicados.

### 3.1. Amostras coletadas e taxa de infecção

No decorrer este trabalho tentou-se recolher amostras de vários locais e diferentes plantas hospedeiras (Anexo 1) de modo a obter uma informação ampla sobre a taxa de infecção bem como das diferentes estirpes de *Wolbachia* que poderão estar associadas aos afídeos.

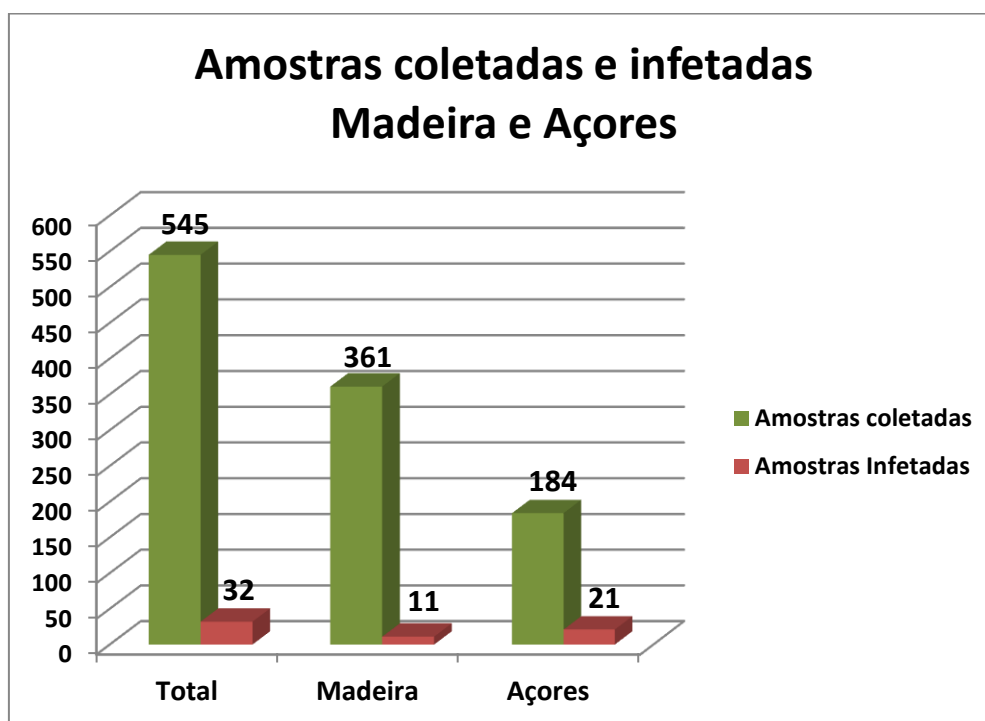
Um total de 545 amostras de afídeos, 361 no Arquipélago da Madeira (Ilha da Madeira) e 184 no Arquipélago dos Açores (Ilhas Terceira, São Miguel, Pico e Faial). Na Madeira a família Aphididae representa 84% das amostras coletadas, um total de 304 amostras, e nos Açores representam 79% das amostras coletadas, que corresponde a 145 amostras. As restantes famílias encontram-se numa percentagem muito inferior sendo a segunda mais abundante em ambos os arquipélagos a família Lachnidae que representa 9% e 15% das amostras da Madeira e Açores, respetivamente (figura 11). Estes resultados estão de acordo com o esperado visto que a família Aphididae é a família mais abundante dos afídeos (Sorensen, 2003).



**Figura 11** – Representação gráfica das famílias de afídeos presentes neste estudo. Gráficos com as percentagens das diferentes famílias dos afídeos coletadas no arquipélago da Madeira e dos Açores. Legenda: NI – Amostras não identificadas

### 3.2. Detecção de *Wolbachia*

Das 545 amostras coletadas nos dois arquipélagos somente 32 (6%) se encontravam infetadas com *Wolbachia* sendo na sua maioria amostras dos Açores (figura 12). Cerca de 12% das amostras dos Açores apresentavam a infeção enquanto somente 3% das amostras da Madeira estavam infetadas. Existe então uma maior prevalência de infeção nos afídeos dos Açores quando comparados com os da Madeira. Ao comparar o resultado deste estudo com os resultados do estudo feito nos afídeos por Augustinos e seus colegas (2011) podemos verificar que a taxa de infeção na Madeira (3%) é inferior à taxa de infeção na Grécia (4,6%) sendo a taxa de infeção dos Açores superior a qualquer umas dessas localizações geográficas.



**Figura 12** –Representação gráfica das amostras coletadas e infetadas. Gráfico de barras sumário representando o número total de amostras coletadas e comparando com as infetadas para cada Arquipélago.

Calcula-se que neste momento a taxa de infeção da *Wolbachia* nos insetos encontra-se entre os 16% e os 66% (Salunke *et al.* 2012). Comparando a taxa de infeção dos afídeos presentes neste estudo com os dados de estudos realizados com outros insetos verifica-se que a taxa de infeção dos afídeos, 6%, é inferior à conhecida para a mosca branca *Bemisia tabaci* que apresenta uma taxa de infeção de 88,4% na China (Bing *et al.*, 2014) e várias espécies de borboleta da Índia que apresentam uma taxa de infeção de cerca de 37,3% (Salunke *et al.*, 2012).

### 3.3. Análise das estirpes utilizando os genes MLST

Grande parte dos trabalhos para a detecção e caracterização de *Wolbachia* foram realizados utilizando o gene que codifica a proteína de superfície, *wsp*. No entanto são vários os estudos que mostram que a utilização unicamente deste gene não é suficiente para a caracterização das estirpes de *Wolbachia* (Roy e Harry, 2007) sendo necessária a utilização do gene *16S rRNA* e do sistema de tipagem multilocus (MLST) para uma melhor diferenciação das estirpes de *Wolbachia* (Baldo *et al.*, 2006; Roy e Harry, 2007). Como tal, uma parte muito importante deste trabalho consistiu na utilização dos genes MLST para caracterizar as estirpes de *Wolbachia* presentes nas amostras.

As amostras infetadas com *Wolbachia* foram analisadas para os genes MLST e após otimizar as condições de PCR foi possível amplificar quatro genes (*ftsZ*, *coxA*, *gatB* e *hcpA*) excepto o gene *fbpA*, para o qual não foi possível otimizar a temperatura de *annealing* de modo a obter uma boa amplificação.

Todavia não foi possível amplificar todas as amostras infetadas para todos os genes MLST (tabela 3). No entanto, para as amostras *Neophyllaphis podocarpi*(81 e 85), *Aphis spiraecola* (86), *Aphis hederae* (136) e *Neophyllaphis podocarpi*(162, 172 e 181) conseguiu-se amplificar todos os genes o poderá possibilitar posteriormente uma melhor caracterização das estirpes de *Wolbachia*.

**Tabela 3**–Tabela resumo das amostras infetadas com *Wolbachia*. Nesta tabela encontra-se a espécie e família dos afídeos coletados, as plantas hospedeiras e os respetivos resultados das diferentes PCR's (com 16S rRNA e com os primers dos genes MLST). Legenda: NI – não identificada; NT – não testado; \* - amostras de um estudo anterior utilizadas para comparação com os dados das amostras usadas na tese

Amostra	Planta hospedeira	Espécie	Família	Extracção DNA	16S rRNA	MLST			
						coxA	gatB	hcpA	ftsZ
Madeira 23*	<i>Cupressus macrocarpa</i>	<i>Cinara fresai</i>	Lachnidae	+	+	-	-	NT	NT
Madeira 24*	<i>Salix canariensis</i>	<i>Tuberolachnus salignus</i>	Lachnidae	+	+	-	-	NT	NT
Madeira 48*	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinea</i>	Lachnidae	+	+	-	-	NT	NT
Madeira 162*	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	+	+	+	+	NT	NT
Madeira 166*	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphididae	+	+	+	+	NT	NT
Madeira 181*	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinea</i>	Lachnidae	+	+	+	+	NT	NT
Madeira 187*	Annonaceae	<i>Toxoptera citricidus</i>	Aphididae	+	+	-	+	NT	NT
Madeira 199*	<i>Euphorbia piscatoria</i>	<i>Aulacorthum solani</i>	Aphididae	+	+	-	+	NT	NT
Madeira 200*	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	+	+	-	+	NT	NT
Madeira 201*	<i>Galactites tomentosa</i>	<i>Brachycaudus cardui</i>	Aphididae	+	+	-	+	NT	NT
Madeira 203*	<i>Solandra grandiflora</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aphididae	+	+	+	+	NT	NT
Açores 1*	<i>Acer sp.</i>	<i>Drepanosiphum sp.</i>	Drepanosiphidae	+	+	-	-	NT	NT
Açores 3*	NI	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	+	+	-	-	NT	NT
Açores 10*	<i>Rumex sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	+	+	-	-	NT	NT
Açores 11*	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphididae	+	+	-	-	NT	NT
Açores 16*	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	+	+	-	-	NT	NT
Açores 30*	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphididae	+	+	-	-	NT	NT
Açores 66*	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	+	+	+	+	NT	NT
Açores 80	<i>Pyracantha angustifolia</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	+	+	-	+	+	-
Açores 81	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	+	+	+	+	+	+
Açores 85	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	+	+	+	+	+	+
Açores 86	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	+	+	+	+	+	+
Açores 100	NI	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	+	+	-	+	+	+
Açores 102	NI	NI	Aphididae	+	+	-	+	+	-
Açores 129	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	+	+	-	+	-	+
Açores 134	<i>Pyracantha coccinea</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	+	+	-	+	-	+
Açores 135	<i>Ilex perado azorica</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	+	+	-	+	-	+
Açores 136	<i>Hedra sp.</i>	<i>Aphis hederiae</i>	Aphididae	+	+	+	+	+	+
Açores 162	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	+	+	+	+	+	+
Açores 172	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	+	+	+	+	+	+
Açores 181	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	+	+	+	+	+	+
Açores 184	<i>Pyracantha angustifolia</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	+	+	-	+	+	-
Barcelona 1	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	+	+	NT	NT	NT	NT

Ao analisar as sequências resultantes da sequenciação direta dos produtos de PCR verificou-se que estes apresentavam baixa qualidade, com muita sobreposição de picos, e concluiu-se que este não era o melhor caminho a seguir. Uma explicação para a falta de qualidade das sequências é a baixa massa corporal dos afídeos que impede a obtenção de uma boa quantidade de DNA mas uma outra explicação é a possibilidade da existência de co-infeções de diferentes estirpes de *Wolbachia* (Augustinos *et al.*, 2011).

Assim sendo, houve a necessidade de recorrer a clonagem de modo a obter linhas puras que apresentassem sequências com qualidade para serem consequentemente analisadas.

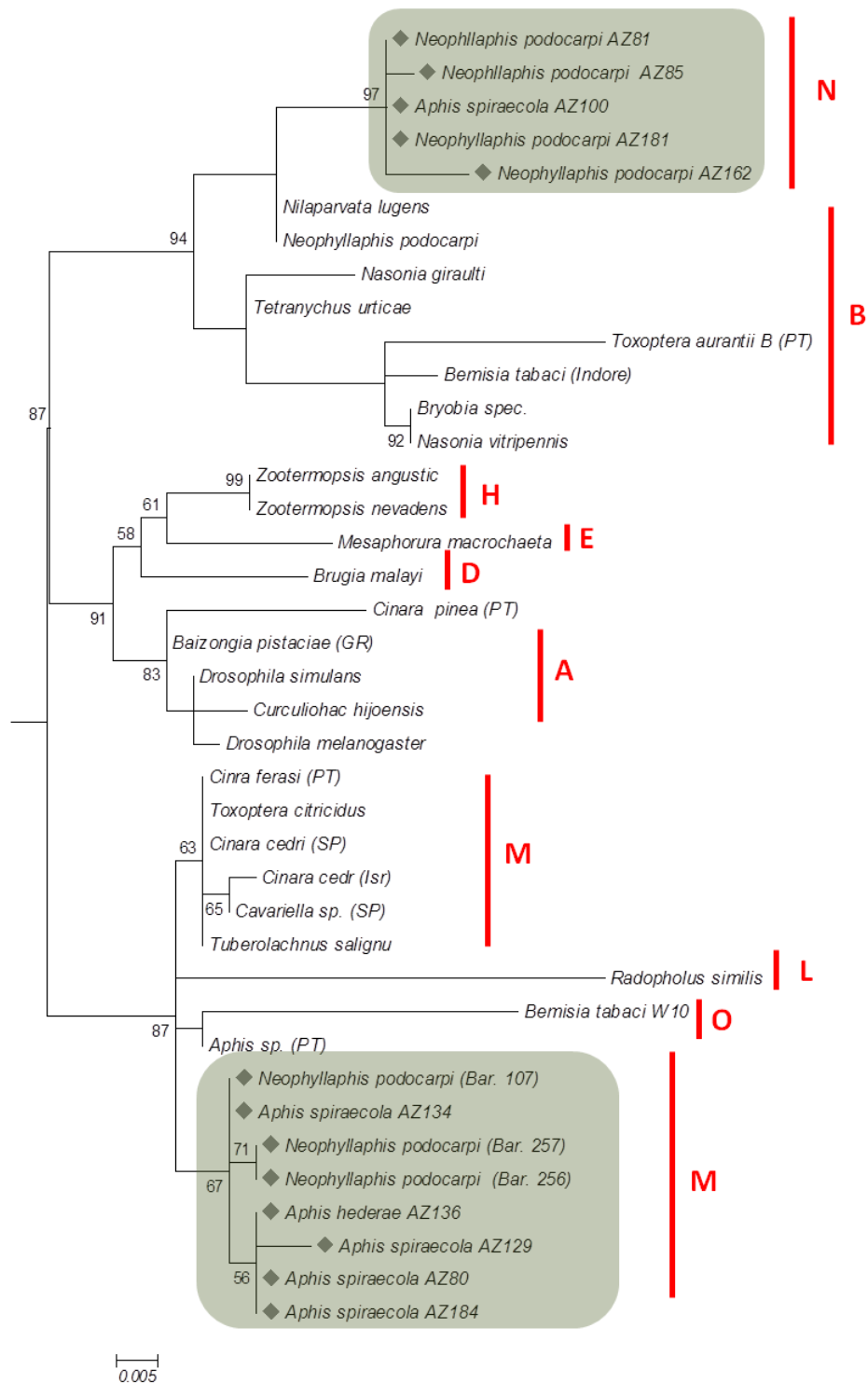
Para a clonagem escolhemos apenas algumas das amostras infetadas dos Açores visto que estas não só apresentavam uma maior taxa de infeção como diferentes espécies de afídeos foram colhidos em hospedeiros da mesma espécie – como por exemplo o *Aphis spiraecola* e *Neophyllaphis podocarpi*, ambos colhidos na planta *Podocarpus macrophyllus* – assim como a mesma espécie de afídeos foram colhidos em hospedeiros diferentes – como o caso dos afídeos da espécie *Aphis spiraecola* que foram colhido em cinco plantas hospedeiras diferentes (tabela 4). Estas eram também as amostras que apresentavam maior número de genes MLST amplificados. Assim teríamos resultados de amostras que nos permitiam fazer uma melhor comparação e possivelmente até aferir o tipo de transmissão, horizontal ou vertical, existente.

**Tabela 4 – Amostras dos Açores e Barcelona utilizadas na clonagem.** Tabela resumo na qual se encontra as amostras utilizadas na clonagem assim como a respetiva planta hospedeira e local onde foi onde foram coletadas. Legenda: NI – Não Identificada

Amostra	Planta hospedeira	Espécie	Local
80	<i>Pyracantha angustifolia</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	São Miguel – Ponta Delgada
81	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	São Miguel – Ponta Delgada
85	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	São Miguel – Sete Cidades
86	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	São Miguel – Sete Cidades
100	NI	<i>Aphis spiraecola</i>	São Jorge - Urzelina
129	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Pico - Lajes
134	<i>Pyracantha coccinea</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Pico – São João
135	<i>Ilex perado azorica</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Pico – São João
136	<i>Hedra sp.</i>	<i>Aphis hederæ</i>	Pico – São João
162	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	São Miguel – Noreste
172	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	São Miguel – Sete Cidades
181	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	São Miguel – Furnas
184	<i>Pyracantha angustifolia</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	São Miguel- Ponta Delgada
Barc. 1	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Barcelona

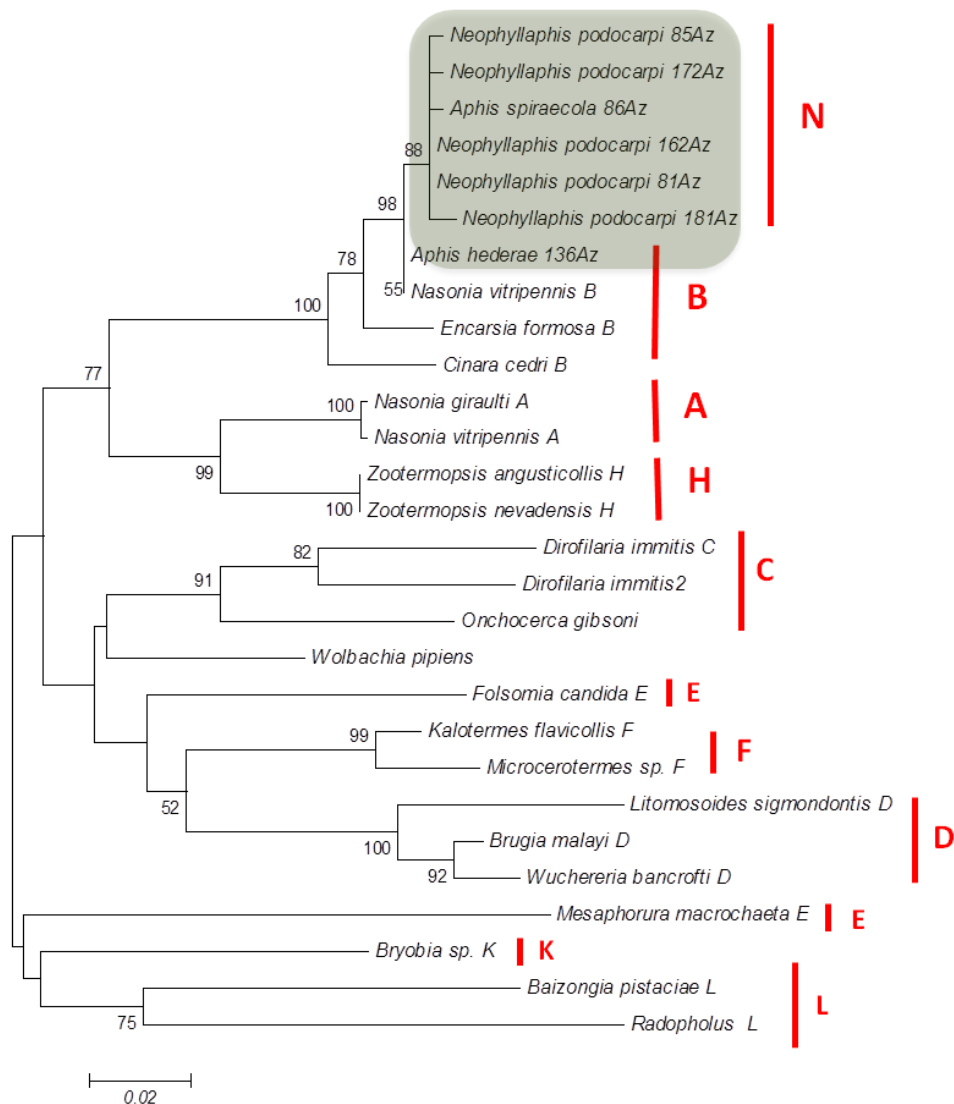
### 3.4. Análise filogenética

Na árvore filogenética obtida para o gene *16S rRNA* foi possível verificar que as amostras encontram-se divididas em dois supergrupos, M e N. As amostras *Aphis spiraeicola* (80, 129, 134 e 184), *Neophyllaphis podocarp* (Barc.) e *Aphis hederae* (136) estão incluídas no supergrupo M enquanto que as amostras *Neophyllaphis podocarp* (81, 85, 162 e 181) e *Aphis spiraeicola* (100) se encontram no supergrupo N. Um resultado importante é a inserção em supergrupos diferentes das amostras de *Neophyllaphis podocarp* colhidas no hospedeiro, *Podocarpus macrophyllus*, de localizações geográficas diferentes (Açores e Barcelona).



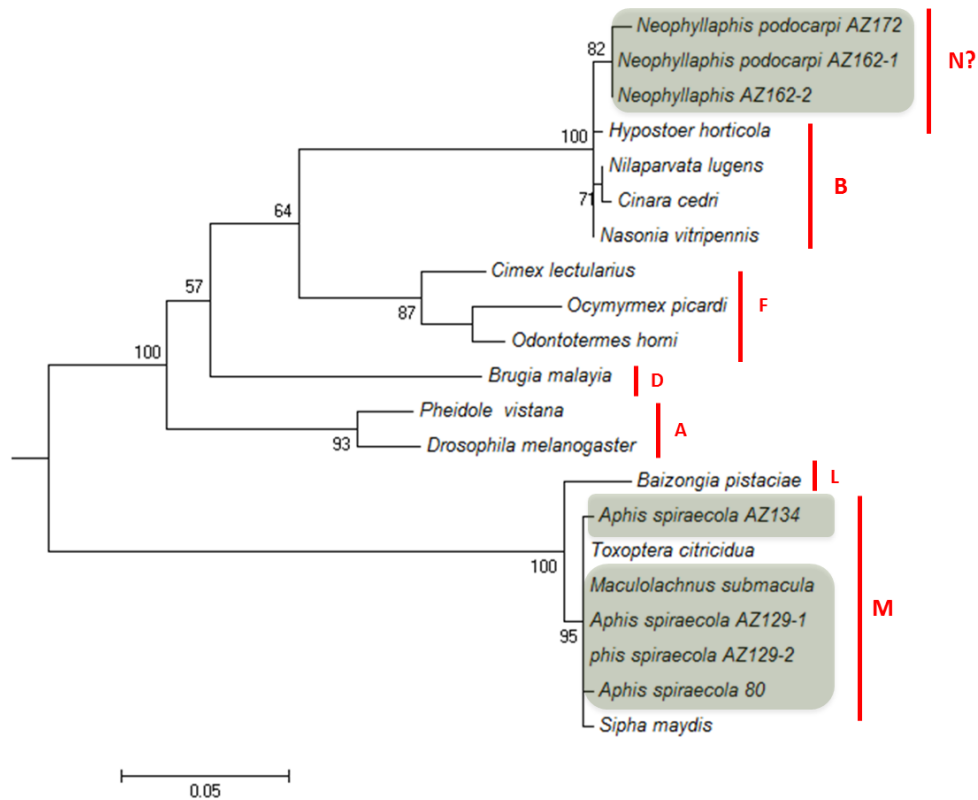
**Figura 13 –Árvore filogenética de 16S rRNA.** Árvore construída com base nos dados obtidos para o gene 16s rRNA através do método de “Maximum Likelihood”, modelo GTR+G+I (programa Mega 6.0). Na figura é possível ver espécies que representam diferentes supergrupos de *Wolbachia* e, as amostras obtidas neste trabalho, estão assinaladas a cinzento.

Ao analisar a árvore filogenética obtida para o gene *ftsZ* verifica-se que as amostras 81, 85, 162, 172 e 181, que correspondem a espécie *Neophyllaphis podocarpi*, juntamente com a amostra 86, espécie *Aphis spiraeicola*, formam claramente um grupo afastado das restantes espécies presentes, sendo incluídas no supergrupo N. As espécies que se encontram mais próximas destas são as que fazem parte do supergrupo B no qual também se pode encontrar a espécie *Aphis hederae*, amostra 136 deste trabalho. É de referir que em nenhum outro estudo, publicado até ao momento, existe uma árvore filogenética para o gene *ftsZ* para afídeos, sendo esta a primeira.



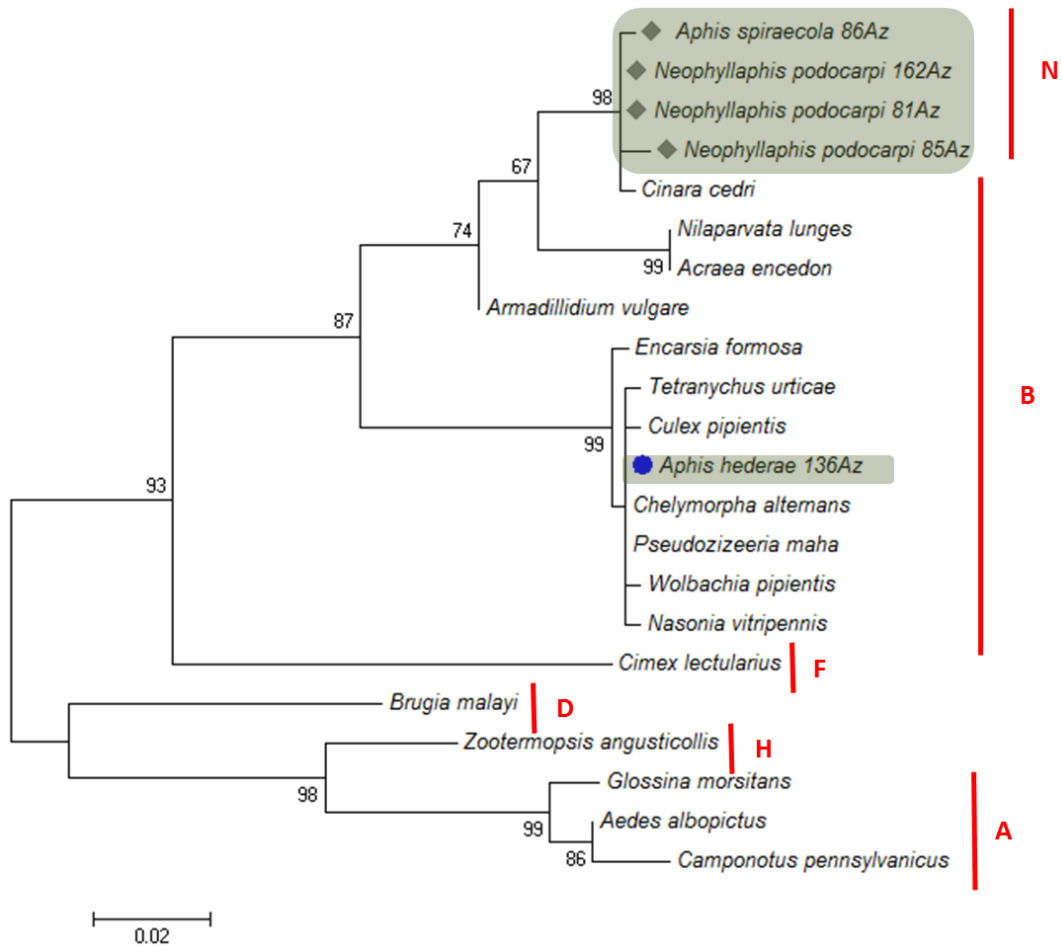
**Figura 14 –Árvore filogenética *ftsZ*.** Construída com base nos dados obtidos para o gene *ftsZ* através do método de “Maximum Likelihood”, modelo GTR+I (programa Mega 6.0). Na figura é possível ver espécies que representam diferentes supergrupos de *Wolbachia* e, as amostras obtidas neste trabalho, estão assinaladas a cinzento.

A árvore filogenética do gene *gatB* mostra que as amostras 162 e 172 (*Neophyllaphis podocarpi*) embora muito próximas das espécies do supergrupo B se encontram num grupo separado que parece corresponder ao supergrupo N. As outras três amostras analisadas com este gene, 80, 129 e 134 (*Aphis spiraecola*) encontram-se incluídas no supergrupo M tendo como supergrupo mais próximo o supergrupo L.



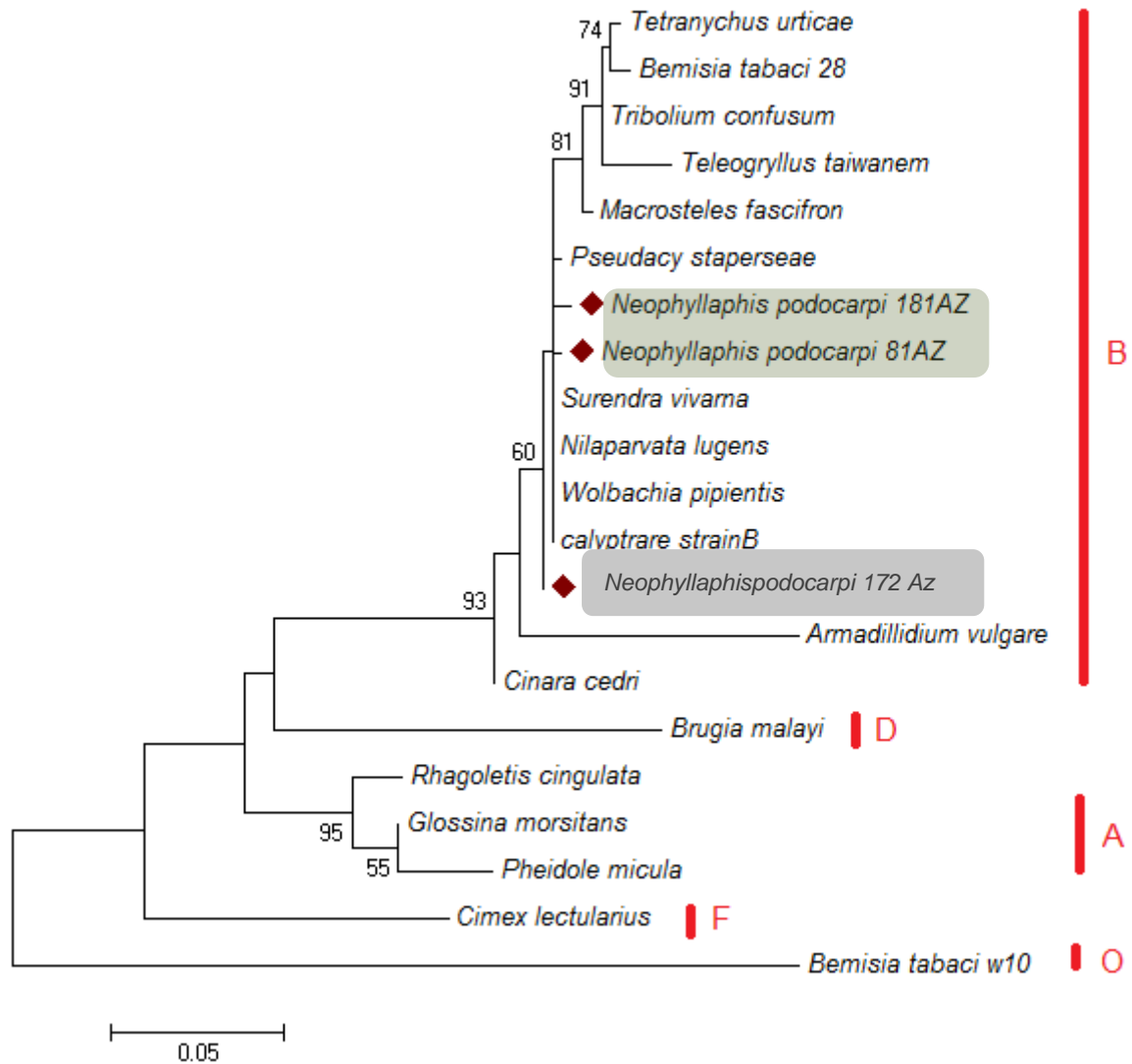
**Figura 15 –Árvore filogenética de *gatB*.** Arvore construída com base nos dados obtidos para o gene *gatB* através do método de “Maximum Likelihood”, modelo GTR+G (programa Mega 6.0). Na figura é possível ver espécies que representam diferentes supergrupos de *Wolbachia* e, as amostras obtidas neste trabalho, estão assinaladas a cinzento

Quando analisado o gene *coxA* verifica-se que as amostras da espécie *Neophyllaphis podocarp* (amostras 81, 85 e 162) e da espécie *Aphis spiraecola* (amostra 86) embora apresentem uma proximidade ao supergrupo B se encontram num grupo separado (bootstrap 98), incluindo-se assim no supergrupo N. A espécie *Aphis hederae* (amostra 136) encontra-se separada das restantes amostras dos Açores estando incluída no supergrupo B. Esta é também a primeira árvore do gene *coxA* construída para os afídeos.



**Figura 16**—Árvore filogenética de *coxA*. Arvore construída com base nos dados obtidos para o gene *coxA* através do método de “Maximum Likelihood”, modelo GTR+G(programa Mega 6.0). Na figura é possível ver espécies que representam diferentes supergrupos de *Wolbachia* e, as amostras obtidas neste trabalho, estão assinaladas a cinzento

A análise com do gene *hcpA* revelou que a espécie *Neophyllaphis podocarp* (amostras 81, 172 e 181) encontra-se incluída no supergrupo B. Este é o único gene no qual estas amostras estão incluídas neste supergrupo.



**Figura 17 –Árvore filogenética de *hcpA*.** Arvore construída com base nos dados obtidos para o gene *hcpA* através do método de “maximum-likelihood”, modelo GTR+G (programa Mega 6.0). Na figura é possível ver espécies que representam diferentes supergrupos de *Wolbachia* e, as amostras obtidas neste trabalho, estão assinaladas a cinzento.

Este estudo demonstrou que alguns genes são mais indicados para a diferenciação dos supergrupos do que outros. O estudo do gene *hcpA* é o único a fornecer uma árvore filogenética que inclui todas as amostras estudadas num só supergrupo, o B, sugerindo também a existência de pouca variabilidade genética entre as amostras. Por sua vez, os genes *16S rRNA*, *ftsZ*, *coxA* e *gatB* apontam para uma maior variabilidade das amostras e conseqüente separação das amostras em diferentes supergrupos. Através dos resultados obtidos escolheria os genes *16S rRNA*, *ftsZ*, *gatB* e *coxA* para a caracterização das estirpes de *Wolbachia*. No entanto é de referir que, dentro destes quatro genes, o gene *gatB* é o único que não mostra uma separação muito clara entre todas as amostras deste estudo e os supergrupos mais antigos, estando um dos conjuntos de amostras (162 e 172) muito próximo do supergrupo B. No entanto, o bootstrap apresentado foi tido em atenção no momento da inclusão das amostras nos supergrupos sendo então possível utilizar este gene na caracterização das estirpes.

Neste momento não existe uma definição clara de supergrupo mas a realidade é que estudos realizados com múltiplos genes podem efetivamente dar uma ideia da separação existente entre os diversos grupos e como tal pode ser usado para a análise filogenética. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a hipótese levantada da existência de novos supergrupos de *Wolbachianos* quais, até ao momento, estão presentes somente espécies de afídeos (Augustinos *et al.*, 2011).

Embora fosse importante aumentar o número de espécies estudadas e os genes analisados para cada uma delas, a realidade é que a divergência verificada entre as amostras estudadas, nomeadamente as amostras 129 e 134 – espécie *Aphis spiraecola* – e as espécies infetadas com *Wolbachia* dos supergrupos mais antigos (A e B), é elevada. Estas, como é possível verificar na árvore do gene *gatB* (figura 16), apresentam grande proximidade as espécies *Maculolachnus submacula* e *Sipha maydis*, entre outras, que são apresentadas por Augustinos *et al.* (2011) como pertencentes ao supergrupo M. Fazendo então uma análise geral às árvores construídas verifica-se que todas as amostras de *Neophyllaphis podocarpi* (amostras 81, 85, 162, 172 e 181) encontram-se sempre incluídas no supergrupo N, com exceção das amostras de Barcelona (Barc.) que, na única árvore na qual está presente (*16S rRNA*), se encontra incluída no supergrupo M. Já as amostras da espécie *Aphis spiraecola* – 80, 129, 134 e 184 – encontram-se sempre no supergrupo M com exceção das amostras 86 e 100 que se estão incluídas no supergrupo N (árvores do gene *ftsZ* e *coxA* [86] e *16S rRNA* [100]).

### 3.5. Modos de transmissão

A *Wolbachia* é normalmente vista como uma bactéria herdada maternalmente, isto é, através de transmissão vertical, mas a transmissão horizontal, embora ocorra menos frequentemente, também pode ser encontrada em associações parasitoide-hospedeiro (Vavre *et al.*, 1999). No presente trabalho verifica-se que duas espécies diferentes, *Neophyllaphis podocarp*i e *Aphis spiraecola*, que se encontram na mesma planta são portadoras da mesma estirpe da bactéria, baseado na sequenciados genes *ftsZ* e *coxA*, indicando a ocorrência de transmissão horizontal. Este resultado fortalece a hipótese levantada por Gómez-Valero e seus colegas em 2004, de que a infeção de *Wolbachia* por eles encontrada nos afídeos era resultado de transmissão horizontal, visto não ter sido encontrada antes em outro afídeo. Neste caso os parasitoides, do género *Pauesia*, foram indicados como possíveis transmissores desta bactéria aos afídeos (Gómez-Valero *et al.*, 2004).

Pensa-se que nos supergrupos A e B a transmissão horizontal e recombinação é comum devido a diversidade encontrada recentemente nestes grupos – estão presentes em pelo menos três classes dos artrópodes (Chelicerata, Crustacea e Hexopoda) (Verne *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2009).

São vários os estudos realizados com o intuito de descobrir se existe uma associação entre o tipo de transmissão e a manipulação reprodutiva. Diversos estudos indicam que insetos nos quais ocorrem incompatibilidade citoplasmática apresentam evidências de transmissão horizontal (Vavre *et al.*, 1999; van Borm *et al.*, 2003; Cordaux *et al.*, 2004) assim como isópodes do género *Armadillidium* mostraram que em espécies nas quais ocorre feminização este tipo de transmissão também é comum (Verne *et al.*, 2007). No entanto, este modo de transmissão encontra-se ausente, por exemplo, em supergrupos constituídos por nematodes (supergrupo C e D). A congruência da relação encontrada entre os nematodes e a *Wolbachia* que o infeta é tão elevada que sugere uma coevolução de milhões de anos (Ros *et al.*, 2009).

Estudos anteriores sugerem que a transmissão horizontal de *Wolbachia* ocorre entre espécies que se encontram mais próximas, isto é, que partilham o mesmo nicho ecológico. A combinação das ligações ecológicas e filogenéticas do hospedeiro pode ter um papel determinante na transmissão horizontal da *Wolbachia* (Kremer, 2009). Recentemente esta questão foi levantada por investigadores que verificaram a presença de estirpes de *Wolbachia* muito semelhantes entre duas espécies parasitoides e o seu hospedeiro *Ostrinia furnicalis* (Jing *et al.*, 2013). A espécie *Neophyllaphis podocarp*i, que se encontra neste estudo, tem uma relação muito antiga com a sua planta hospedeira *Podocarpus macrophyllus*, originária do sul da China, Japão e Austrália (Hales e Lardner, 1988). É possível verificar através dos dados obtidos que todas as amostras recolhidas na planta *Podocarpus macrophyllus* ficaram, no estudo com o gene *16S rRNA* e *ftsZ*, incluídas no mesmo supergrupo embora nem todos os afídeos hospedeiros sejam da mesma espécie. A maioria das amostras são da espécie *Neophyllaphis podocarp*i mas existe uma amostra da espécie *Aphis spiraecola*. Assim sendo, é

muito provável que estes afídeos, de espécies diferentes, estejam a partilhar a mesma estirpe de *Wolbachia* devido ao facto de habitarem a mesma planta. Esta hipótese ganha mais força pelo facto do supergrupo no qual estas amostras se encontram ser um dos novos supergrupos atribuídos a *Wolbachia*, o supergrupo N.

A árvore do gene 16S *rRNA* revela também outro dado importante. A amostra da espécie *Neophyllaphis podocarpi* recolhida na planta *Podocarpus macrophyllus* em Barcelona encontra-se infetada com uma estirpe diferente de *Wolbachia*. Uma das hipóteses que podemos colocar para explicar estes resultados é que a planta *Podocarpus macrophyllus*, no local de onde é originária (Sul da China, Japão e Austrália), continha afídeos contaminados com *Wolbachia* da estirpe N. Esta planta foi introduzida nos Açores e os seus afídeos mantiveram a estirpe de *Wolbachia* original, N, disseminando-a dentro da população. Contrariamente, os afídeos da planta introduzida em Barcelona podem, de algum modo, ter perdido a infeção original tendo adquirido uma nova estirpe. Uma outra hipótese é que os afídeos desta planta, no seu país de origem, não se encontravam infetados por *Wolbachia* tendo adquirido a estirpe N e M, nos Açores e Barcelona respetivamente, após a introdução da planta nestes locais.

O facto de existirem dois genes a incluírem a espécie *Neophyllaphis podocarpi* e a espécie *Aphis spiraeicola* no mesmo supergrupo reforça a ideia da ocorrência de transmissão horizontal da *Wolbachia* excluindo a hipótese da existência de recombinação. Um dos mecanismos sugeridos para a transmissão horizontal, que acontece na *Bemisia tabaci*, é a infeção através da alimentação da mesma parte da planta. No entanto, para que tal aconteça é necessário que a bactéria seja suficientemente pequena para passar pelo ducto salivar da mosca e trabalhos recentes sugerem que a *Wolbachia* é demasiado grande para o fazer. Além disso, esta troca através da alimentação de um inseto para outro teria de acontecer quase em simultâneo pois a *Wolbachia* não tem a capacidade de sobreviver fora do corpo do hospedeiro. Uma outra via possível é através dos seus parasitoides que ao depositarem os ovos no afídeo ficam infetados e transmitem a infeção ao afídeo seguinte quando o picam (Ahmed *et al.*, 2012).

Continua a não ser claro como é que ocorre a transmissão horizontal assim como quais serão os seus mecanismos e padrões (Jing *et al.*, 2013). Acredita-se que muitos dos eventos de transmissão horizontal são mediados pelo bacteriófago, que transmitem a estirpes de *Wolbachia* que co-infetam o mesmo hospedeiro facilitando a transmissão horizontal e a diversificação génica (Duploux *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos neste trabalho são o primeiro passo para a compreensão da ação da *Wolbachia* nos afídeos. Esta compreensão é importante pois estes endossimbiontes são considerados um meio eficaz para populações de insetos que são pragas ou vetores de doenças. Seria importante conseguir associar ao supergrupo M e N um tipo de manipulação reprodutiva mas o facto de este ser um grupo recente torna a informação que existe é muito limitada. No entanto, verificarmos que grande parte das amostras presentes neste estudo são incluídas no supergrupo B indica que provavelmente a estirpe de *Wolbachia* que os infeta tem a capacidade de provocar incompatibilidade citoplasmática (Machtelinckx *et al.*, 2009).

### 3.6. Controlo Biológico

Cada vez mais a ideia de usar microrganismos no controlo biológico ganha força pois sabe-se que os insetos têm várias doenças associadas a bactérias e que estas doenças por vezes influenciam a sua densidade populacional. Verificar qual o patogene capaz de eliminar a peste e desenvolver um método de inserção deste na população é o grande desafio. Para tal, o conhecimento da biologia do microrganismo, das condições ambientais necessárias a sua capacidade de infeção e o conhecimento de qual o seu efeito no hospedeiro é crucial para o seu uso eficaz. Este microrganismo deve apresentar uma taxa de infeção elevada na peste mas, ao mesmo tempo, tem de estar sob controlo (Van Driesche e Hoddle, 2003).

A *Wolbachia* é importante para a defesa antiviral dos insetos pois apresenta potencial para prevenir a transmissão de vírus (Osei-Poku *et al.*, 2012). Esta bactéria está a ser utilizada por exemplo, para o combate ao mosquito transmissor da dengue, *Aedes aegypti*. Estudos recentes mostram que a infeção de *Wolbachia* existente nos mosquitos confere proteção e diminui a sua capacidade de alimentação, pois são incapazes de sugar o sangue, e esta incapacidade impossibilita a transmissão da dengue. Como tal, aumentar a infeção de *Wolbachia* na população de *Aedes aegypti* ajudará reduzir a transmissão da dengue dos mosquitos para os humanos (Turley *et al.*, 2009; Osei-Poku *et al.*, 2012; Miller, 2013; Ye *et al.*, 2013). Um outro estudo recorreu ao desenvolvimento de um modelo matemático para verificar como ocorre a transmissão da dengue quando a população de mosquitos *Aedes aegypti* se encontra infetada com *Wolbachia*. Estes verificaram que a presença desta bactéria tem um papel de controlo na dispersão da doença entre os humanos e acreditam que a dengue pode ser eliminada pela introdução da *Wolbachia* nos mosquitos. Neste momento estão a investigar qual a quantidade ótima de mosquitos infetados com *Wolbachia* necessitam ser lançados para a população selvagem de modo a obter estes resultados na natureza (Supriatna e Anggriani, 2012).

Nos últimos anos houve também um interessante crescente na *Wolbachia* também no que diz respeito ao seu uso como controlo biológico de pestes agrícolas. Pensa-se que estas podem auxiliar na supressão de populações de artrópodes, para serem usadas como vetores para expressão de genes ou como ferramenta para conduzir um determinado genótipo para populações de artrópodes (Zabalou *et al.*, 2004). Uma investigação realizada com borboletas que causam transtornos na agricultura indica que as borboletas infetadas com as estirpes A e B de *Wolbachia* mostram alteração em diversos processos biológicos, tais como no rácio sexual, na determinação do sexo, na compatibilidade esperma-ovo e na especiação (Salunke *et al.*, 2012).

Também foram realizados alguns estudos de modo a perceber se a incompatibilidade citoplasmática tinha a capacidade de suprimir o crescimento de uma população. Verificaram que se colocassem em gaiolas diferentes rácios de fêmeas não infetadas para machos não infetados e machos infetados os níveis de supressão conseguiam atingir os 99% se o número de machos infetados fosse muito superior aos de não infetados. Isto mostra claramente que a incompatibilidade citoplasmática pode ser utilizada como ferramenta no controlo de pestes (Zabalou *et al.*, 2004). A sua capacidade de indução à incompatibilidade citoplasmática pode ser então usada para substituir as técnicas de esterilização utilizadas atualmente em insetos (Tagami *et al.*, 2006; Kageyama *et al.*, 2010).

Acredita-se então que as alterações no sistema reprodutor provocadas pela *Wolbachia* tanto pode facilitar o aparecimento de novas espécies de insetos, através da especiação, como podem aumentar o risco de extinção. Isto deve-se não só ao facto da *Wolbachia* decrescer a produtividade da população (reduzindo o número de descendentes em cada geração) mas também porque, a longo prazo, reduzem a diversidade genética e tendem a acumular mutações e a perder capacidade evolutiva (Charlat *et al.*, 2003).

A combinação da proteção contra vírus, encurtamento do tempo de vida e a capacidade ser transmitida pela mãe a sua prole faz com que as estirpes de *Wolbachia* sejam boas candidatas para estratégias de controlo de insetos considerados pestes.

## 4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Os simbioses secundários embora não tenham um papel fundamental à sobrevivência da espécie estão associados a aspetos positivos tais como a especialização à planta hospedeira, maior resistência ao ataque de parasitas e inimigos naturais e até para recuperação quando ocorre danos provocados pelo calor. Diversos estudos efetuados com *Wolbachia* mostram a sua importância evolucionária, ecológica e biológica.

Neste estudo realizado em 545 amostras de afídeos da Madeira e dos Açores foi possível detetar a infeção de 32 amostras com *Wolbachia*. Nestas foram identificadas três estirpes diferentes, uma amostra pertence a um dos supergrupos mais antigos conhecidos, o supergrupo B, mas a maioria das amostras pertencem a dois dos supergrupos descobertos recentemente, M e N. Reforçou-se também a ideia da presença de um supergrupo de *Wolbachia* constituído unicamente por espécies de afídeos. O facto das espécies *Neophyllaphis podocarp*i e *Aphis spiraecola* estarem incluídas no supergrupo N e terem em comum a planta hospedeira fortalece a ideia de que a *Wolbachia* não faz só transmissão vertical como recorre também a transmissão horizontal para aumentar a taxa de infeção.

Futuramente seria importante concentrarmo-nos na recolha de amostras na planta *Podocarpus macrophyllus* de diferentes zonas partes do mundo, nomeadamente da Ásia (Sul da China e Japão), de onde a planta é originária, de modo a verificar se a estirpe que infeta a espécie *Neophyllaphis podocarp*i dos Açores (N) ou Barcelona (M) se encontra presente em alguma outra espécie desse continente. Seguidamente, poderia ser realizado um estudo para aferir qual o meio de transmissão horizontal da *Wolbachia* nos afídeos hospedeiros da planta *Podocarpus macrophyllus*. Através da deteção, análise e caracterização da *Wolbachia* presente no parasitoide seria possível saber se a estirpe que o infeta é a mesma que infeta os afídeos por ele parasitado. Pensando na aplicação da *Wolbachia* no controlo biológico, deveriam também ser realizados estudos a fim de determinar qual a manipulação reprodutiva associada ao supergrupo M e N.

Existem outros estudos que podem ser realizados com os afídeos. Focando o estudo numa só espécie ou num pequeno grupo de espécies, de modo a obter uma grande quantidade de indivíduos, poderíamos estudar a possibilidade da existência de múltiplas infeções dentro da população.

Entender os mecanismos envolvidos nas suas relações simbióticas *Wolbachia*/hospedeiro permitirá conhecer as consequências da infeção na evolução dos hospedeiros e aumentará a possibilidade de desenvolver novas estratégias de controlo de pragas que sejam ao mesmo tempo eficientes e amigas do ambiente.

## 5. Referências Bibliográficas

Augustinos, A. A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Doudoumis, V., Ramos, S., Aguiar, A. F., Borges, P. A. V., Khadem, M., Latorre, A., Tsiamis, G. e Bourtzis, K. (2011). Detection and Characterization of Wolbachia Infections in Natural Populations of Aphids: Is the Hidden Diversity Fully Unraveled?. *PLoS ONE*. **6(12)**: e28695. doi:10.1371/journal.pone.0028695

Ahmed, M.Z., De Barro, P.J., Ren, S-X., Greeff, J.M. e Qiu, B-L. (2013). Evidence for Horizontal Transmission of Secondary Endosymbionts in the *Bemisia tabaci* Cryptic Species Complex. *PLoS ONE*. **8(1)**:e53084. doi:10.1371/journal.pone.0053084

Atyame, C. M., Delsuc, F., Pasteur, N., Weill, M. e Duron, O. (2011). Diversification of Wolbachia Endosymbiont in the *Culex pipiens* Mosquito. *Molecular Biology and Evolution*. **28(10)**: 2761–2772

Baldo, L., Hotopp, J. C. D., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H. e Werren, J. H. (2006). Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and environmental microbiology*. **72(11)**: 7098–7110

Baldo, L. e Werren, J. H. (2007). Revisiting Wolbachia Supergroup Typing Based on WSP: Spurious Lineages and Discordance with MLST. *Current microbiology*. **55**: 81–87

Bing X., Xia, W., Gui, J., Yan, G., Wang, X. e Liu, S. (2014). Diversity and evolution of the Wolbachia endosymbionts of Bemisia (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies. *Ecology and Evolution*. **4(13)**: 2714–2737

Blackman, R.L. (2013). Aphids on the world's plants – An online identification and information guide. <http://www.aphidsontheworldsplants.info>

Blackman, R.L. e Eastop, V.F. (1989). Aphids on the world's crops – an identification guide. London. Interscience publication

Blackman, R.L. e Eastop, V.F. (1994). Aphids on the world's trees – an identification and information guide. London

Blackman, R.L. e Eastop, V.F. (2006). Aphids on the world's herbaceous plants and shrubs. **1 e 2**. West Sussex

Charlat, S., Hurst, G. D. D. e Mercot, H. (2003). Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics*. **19(4)**: 217-223

Cordaux, R., Michel-Salzat, A., Frelon-Raimond, M., Rigaud, T. e Bouchon, D. (2004). Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity*. **93**: 78–84

Dedeine, F., Bandi, C., Boulétreau, M. e Kramer, L. H. (2003). Insights into *Wolbachia* Obligatory Symbiosis. *Insect symbiosis*. Editado por Bourtzis, K. e Miller, T. A. CRC Press. **1**: 267–269

Dobson, S. L. (2003). *Wolbachia pipientis*: Impotent by Association. *Insect symbiosis*. Editado por Bourtzis, K. e Miller, T. A. CRC Press. **1**: 199–208

Duplouy, A., Iturbe-Ormaetxe, I., Beatson, S. A., Szubert, J. M., Brownlie, J. C., McMeniman, C. J., McGraw, E. A., Hurst, G. D. D., Charlat, S., O'Neill, S. L. e Woolfit, M. (2013). Draft genome sequence of the male-killing *Wolbachia* strain wBol1 reveals recent horizontal gene transfers from diverse sources. *BioMed Central Genomics*. **14**: 20

Giordanengo, P., Brunissen, L., Rusterucci, C., Vincent, C., van Bel, A., Dinant, S., Girusse, C., Faucher, M. e Bonnemain, J. (2010). Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *Comptes Rendus Biologies*. **333**: 516-523

Gómez-Valero, L., Soriano-Navarro, M., Pérez-Brocal, V., Heddi, A., Moya, A., Manuel García-Verdugo, J. e Latorre, A. (2004). Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a Secondary Symbiont in the Aphid *Cinara cedri*. *Journal of bacteriology*. **186(19)**: 6626–6633

Goto, S., Anbutsu, H. e Fukatsu, T. (2006). Asymmetrical interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts coexisting in the same insect host. *Applied and environmental microbiology*. **72(7)**: 4805–4810

Huigens, M. E. e Stouthamer, R. (2003). Parthenogenesis Associated with *Wolbachia*. *Insect symbiosis*. Editado por Bourtzis, K. e Miller, T. A. CRC Press. **1**: 247–248

Ishikawa, H. (2003). Insect Symbiosis: An Introduction. *Insect symbiosis*. Editado por Bourtzis, K. e Miller, T. A. CRC Press. **1**: 1–16

- Jeyaprakash, A. e Hoy, M. A. (2000). Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wspsequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*. **9(4)**: 393–405
- Jones, R. T., Bressam, A., Greenwell, A. M. e Fierer, N. (2011). Bacterial Communities of Two Parthenogenetic Aphid Species Cocolonizing Two Host Plants across the Hawaiian Islands. *Applied and environmental microbiology*. **77(23)**: 8345-8349
- Kageyama, D., Narita, S., Imamura, T. e Miyanoshta, A. (2010). Detection and identification of *Wolbachia* endosymbionts from laboratory stocks of stored-product insect pests and their parasitoids. *Journal of Stored Products Research*. **46(1)**: 13-19
- Kaygin, A. T., Gorur, G. e Çota, F. (2008). Contribution to the Aphid (Homoptera: Aphididae) Species Damaging on Woody Plants in Bartın, Türkiye. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*. **2(1)**: 83-86
- Kikuchi, Y. (2009). Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes and Environments*. **24(3)**: 195 – 204
- Kraaijeveld, K., Franco, P., Knijff, P., Stouthamer, R. e Van Alphen, J. J. M. (2011). Clonal genetic variation in a *Wolbachia*-infected asexual wasp: horizontal transmission or historical sex?. *Molecular Ecology*. **20**: 3644–3652
- Kremer, N., Charif, D., Henri, H., Bataille, M., Prévost, G., Kraaijeveld, K. e Vavre, F. (2009). A new case of *Wolbachia* dependence in the genus *Asobara*: evidence for parthenogenesis induction in *Asobara japonica*. *Heredity*. **103**: 248–256
- Lamelas, A., Vicente Pérez-Brocal, V., Gómez-Valero, L., Gosalbes, M. J., Moya, A. e Latorre, A. (2008). Evolution of the Secondary Symbiont “*Candidatus Serratia symbiotica*” in Aphid Species of the Subfamily Lachninae. *Applied and Environmental Microbiology*. **74(13)**: 4236–4240
- Li, J., Wang, Z., Bourguet, D. e He, K. (2013). *Wolbachia* Infection in Populations of *Ostrinia furnacalis*: Diversity, Prevalence, Phylogeny and Evidence for Horizontal Transmission. *Journal of Integrative Agriculture*. **12(2)**: 283–295
- Lombaert, E., Boll, R. e Lapchin, L. (2006). Dispersal strategies of phytophagous insects at a local scale: adaptive potential of aphids in an agricultural environment. *BMC Evolutionary Biology*. **6**:75

Machtelinckx, T., Van Leeuwen, T., Vanholme, B., Gehesquière, B., Dermauw, W., Vandekerckhove, B., Gheysen, G. e De Clercq, P. (2009). *Wolbachia* induces strong cytoplasmic incompatibility in the predatory bug *Macrolophus pygmaeus*. *Insect Molecular Biology*. **18(3)**: 373–381

Majerus, M. E. N. (2003). Symbionts. *Encyclopedia of insects*. Editado por Vincent H. Resh e Ring T. Cardé. Elsevier Science. USA. **1**: 1107

Merçot, H. e Poinso, D. (2009). Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *C.R. Biologies*. **332(2-3)**: 284-97

Miller, W. J. (2013). Bugs in Transition: The Dynamic World of *Wolbachia* in Insects. *PLoS Genetics*. **9(12)**: e1004069. doi:10.1371/journal.pgen.1004069

Montllor, C. B., Maxmen, A. e Purcell, A. H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat. *Ecological entomology*. **27**: 189-195

Moran, N. A., McCutcheon, J. P. e Nakabachi, A. (2008). Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics*. **42**:165–90

Nafria, J.M. N., Durante, M.P. M., Prieto, F. G. e Hidalgo, N. P.(2005). Hemiptera: Aphididae III. In: *Fauna Iberica*. Madrid.**28**

Nikoh, N., McCutcheon, J. P., Kudo, T., Miyagishima, S., Moran, N. A. e Nakabachi, A. (2010) Bacterial Genes in the Aphid Genome: Absence of Functional Gene Transfer from *Buchnera* to Its Host. *PLoS Genetics*. **6(2)**: e1000827. doi:10.1371/journal.pgen. 1000827

Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R. e Moran, N. A. (2010). Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology*. **55**: 247–66

Osei-Poku, J., Han, C., Mbogo, C. M. e Jiggins, F. M. (2012). Identification of *Wolbachia* Strains in Mosquito Disease Vectors. *Plos One*. **7(11)**: e49922. doi:10.1371/journal.pone.0049922

Pérez-Brocal, V., Latorre, A., Gil, R. e Moya, A. (2005). Comparative analysis of two genomic regions among four strains of *Buchnera aphidicola*, primary endosymbiont of aphids. *Gene*. **345**: 73–80

Raven, P. H e Johnson, G. B. (2002). *Biology 6<sup>th</sup> edition*. McGraw-Hill. USA. 694-695

Riparbelli, M. G., Giordano, R., Ueyama, M. e Callaini, G. (2012). *Wolbachia*-Mediated Male Killing Is Associated with Defective Chromatin Remodeling. PLoS ONE. **7(1)**:e30045. doi:10.1371/journal.pone.0030045

Robinson, R. (2001). *Biology*, Macmillan Reference USA. **1(A-D)**:76

Ros, V. I. D., Fleming, V. M., Feil, E. J. e Breeuwer, J. A. J. (2009). How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae). Applied and environmental microbiology. **75(4)**: 1036–1043

Salunke, B. K., Salunkhe, R. C., Dhotre, D. P., Walujkar, S. A., Khandagale, A. B., Chaudhari, R., Chandode, R. K., Ghate, H. V., Patole, M. S., Werren, J. H. e Shouche, Y. S. (2012). Determination of *Wolbachia* Diversity in Butterflies from Western Ghats, India, by a Multigene Approach. Applied and Environmental Microbiology. **78(12)**: 4458–4467

Saridaki, A. e Bourtzis, K. (2010). *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. Current Opinion in Microbiology. **13**: 67–72

Schraiber, J. G., Kaczmarczyk, A. N., Kwok, R., Park, M., Silverstein, R., Rutaganira, F. U., Aggarwal, T., Schwemmer, M. A., Hom, C. L., Grosberg, R. K. e Schreiber, S. J. (2012). Constraints on the use of lifespan-shortening *Wolbachia* to control dengue fever. Journal of Theoretical Biology. **297**: 26–32

Simon, J. C., Rispe, C. e Sunnucks, P. (2002). Ecology and evolution of sex in aphids. Trends in Ecology & Evolution. **17(1)**: 34-39

Sorensen, J. T. (2003). Aphids. *Encyclopedia of insects*. Editado por Vincent H. Resh e Ring T. Cardé. Elsevier Science. USA. **1**: 32-37

Supriatna, A. K. e Anggriani, N. (2012). System Dynamics Model of *Wolbachia* Infection in Dengue Transmission. Procedia Engineering. **50**: 12 – 18

Tagami, Y., Doi, M., Sugiyama, K., Tatara, A. e Saito, T. (2006). *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Liriomyza trifolii* and its possible use as a tool in insect pest control. Biological Control. **38**: 205–209

Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T. J. (1994). ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. **22**: 4673–4680

- Van Borm, S., Wenseleers, T., Billen, J. e Boomsma, J. J. (2003). Cloning and sequencing of wsp encoding gene fragments reveals a diversity of co-infecting *Wolbachia* strains in *Acromyrmex leafcutter* ants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **26**: 102–109
- Van Driesche, R. G. e Hoddle, M. S. (2003). Biological Control of Insect Pests. *Encyclopedia of insects*. Editado por Vincent H. Resh e Ring T. Cardé. Elsevier Science. USA. **1**: 103-104, 114-115
- Vandermoten, S., Mescher, M. C., Francis, F., Haubruge, E. e Verheggen, J. (2012). Aphid alarm pheromone: An overview of current knowledge on biosynthesis and functions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **42**: 155-163
- Vasquez, C. J., Stouthamer, R., Jeong, G. e Morse, J. G. (2011). Discovery of a CI inducing *Wolbachia* and its associated fitness costs in the biological control agent *Aphytis melinus* DeBach (Hymenoptera: Aphelinidae). *Biological Control*. **58**: 192–198
- Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P. e Boulétreau, M. (1999). Phylogenetic Evidence for Horizontal Transmission of *Wolbachia* in Host-Parasitoid Associations. *Molecular Biology and Evolution*. **16(12)**: 1711-1723
- Verne, S., Johnson, M., Bouchon, D. e Grandjean, F. (2007). Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene*. **397**: 58–66
- Vorburger, C., Gehrler, L. e Rodriguez, P. (2010). A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biology Letters*. **6**: 109–111
- Wang, Z., Shen, Z. Song, Y., Liu, H. e Li, Z. (2009). Distribution and diversity of *Wolbachia* in different populations of the wheat aphid *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) in China. *European Journal of Entomology*. **106**: 49–55
- Weeks, A. R. e Breeuwer, J. A. (2001). *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proceedings The Royal Society Biological Sciences*. **268(1482)**: 2245–2251
- Werren, J. H. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annual Review Entomology*. **42**: 587–609
- West, S.A., Cook, J.M., Werren, J.H. e Godfray, H.C. (1998). *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Molecular Ecology*. **7**: 1457-1465

Ye, Y. H., Woolfit, M., Huttley, G. A., Rancès, E., Caragata, E. P., Popovici, J., O'Neill, S. L. e McGraw, E. A. (2013). Infection with a Virulent Strain of *Wolbachia* Disrupts Genome Wide-Patterns of Cytosine Methylation in the Mosquito *Aedes aegypti*. PLoS ONE. **8(6)**: e66482. doi:10.1371/journal.pone.0066482

Yun, Y., Lei, C., Peng, Y., Liu, F., Chen, J. e Chen, L. (2011). *Wolbachia* Strains Typing in Different Geographic Population Spider, *Hylyphantes Graminicola* (Linyphiidae). Current Microbiology. **62**:139–145

Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stauffer, C., Savakis, C. e Bourtzis, K. (2004). *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. PNAS. **101(42)**: 15042–15045

<http://www.eliminatedengue.com/our-research/wolbachia> acessado a 15 de Julho de 2014

[http://www.nature.com/nrmicro/journal/v6/n10/fig\\_tab/nrmicro1969\\_F2.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v6/n10/fig_tab/nrmicro1969_F2.html) acessado a 20 de Julho de 2014

[http://www.aphotofauna.com/bugs\\_homoptera.htm](http://www.aphotofauna.com/bugs_homoptera.htm) acessado a 24 de Agosto de 2014

<http://www.zenthroughalens.com/2012/01/aphis-nerii-and-i.html> acessado a 24 de Agosto de 2014

<http://entnemdept.ufl.edu/news/2013-2014/March14.html> acessado a 24 de Agosto de 2014

## 6. Anexos

**Anexo 1 – Tabela completa das amostras** – dados de todas as amostras utilizadas neste estudo, tanto as existentes em coleção no laboratório de Biotecnologia da Universidade da Madeira como as recolhidas mais recentemente na Madeira, Açores e Barcelona. Legenda: NI – Não Identificados

Amostra	Planta hospedeira	Espécie	Família	Local de recolha
Madeira 1	<i>Ageratina adenophora</i>	NI	NI	Covão
Madeira 2	<i>Galium aparine</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Vereda Achada do Gramacho
Madeira 3	<i>Vitis sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Vereda Achada do Gramacho
Madeira 4	<i>Vicia faba</i>	NI	NI	Vereda Achada do Gramacho
Madeira 5	<i>Galium aparine</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Vereda Achada do Gramacho
Madeira 6	<i>Beta sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Vereda Achada do Gramacho
Madeira 7	<i>Rubus sp.</i>	NI	NI	Vereda Achada do Gramacho
Madeira 8	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Aphis ulicis</i>	Aphidinae	Vereda Achada do Gramacho
Madeira 9	<i>Elicrisum</i>	<i>Macrosiphoniella madeirensis</i>	Aphidinae	Vereda Achada do Gramacho
Madeira 10	<i>Quercus sp.</i>	NI	NI	S. Jorge
Madeira 11	<i>Rubus sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Covão
Madeira 12	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Covão
Madeira 13	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphidinae	Covão
Madeira 14	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara maritimae</i>	Lachninae	Poiso - Chão da Ribeira
Madeira 15	<i>Picea sp.</i>	<i>Eulachnus rileyi</i>	Lachninae	Caniço
Madeira 16	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara maritimae</i>	Lachninae	Poiso - Chão da Ribeira
Madeira 17	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara maritimae</i>	Lachninae	Poiso - Chão da Ribeira
Madeira 18	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Cinara maritimae</i>	Lachninae	Poiso - Chão da Ribeira
Madeira 19	<i>Vicia faba</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Ponta do Sol
Madeira 20	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Ponta do Sol
Madeira 21	<i>Salix canariensis</i>	<i>Aphis farinosa</i>	Aphidinae	Ponta do Sol
Madeira 22	<i>Salix babylonica</i>	<i>Aphis farinosa</i>	Aphidinae	Ponta do Sol
Madeira 23	<i>Cupressus macrocarpa</i>	<i>Cinara fresai</i>	Lachninae	Penteada
Madeira 24	<i>Salix canariensis</i>	<i>Tuberolachnus salignus</i>	Lachninae	Penteada
Madeira 25	<i>Pittosporum tobira</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira	<i>Chamaecyparis sp./</i>	<i>Cinara tujafilina</i>	Lachnidae	Funchal

26	<i>Cupressus sp.</i>			
Madeira 27	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 28	<i>Nerium oleander</i>	NI	NI	Penteada
Madeira 29	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Viveiros - D. João
Madeira 30	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Viveiros - D. João
Madeira 31	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 32	<i>Asclepias curassavica</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphidinae	Calheta
Madeira 33	<i>Hebe sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Viveiros - D. João
Madeira 34	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Viveiros - D. João
Madeira 35	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 36	<i>Pittosporum tobira</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 37	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 38	<i>Petroselinum crispum</i>	NI	NI	Calheta
Madeira 39	<i>Galium aparine</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Calheta
Madeira 40	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 41	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 42	NI	<i>Cinara sp.</i>	Lachninae	Funchal
Madeira 43	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 44	<i>Lavatera critica</i>	<i>Aphis umbrella</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 45	NI	<i>Cinara sp.</i>	Lachninae	Caminho Sto Serra
Madeira 46	NI	<i>Aphis craccivora</i>	Aphidinae	Caminho Sto Serra
Madeira 47	NI	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Caminho Sto Serra
Madeira 48	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinea</i>	Lachninae	Caminho Sto Serra
Madeira 49	<i>Pinus sp.</i>	<i>Eulachnus mediterraneus</i>	Lachninae	Caminho Sto Serra
Madeira 50	Asteraceae	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 51	NI	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Pico da Boneca - Santana
Madeira 52	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Pico da Boneca - Santana
Madeira 53	<i>Clethra arborea</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Pico da Boneca - Santana
Madeira 54	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Aphis ulicis</i>	Aphidinae	Pico da Boneca - Santana
Madeira 55	<i>Cotoneaster sp.</i>	<i>Aphis spiraeicola</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 56	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira	<i>Cassia didymobotrya</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Penteada

57				
Madeira 58	<i>Agapanthus sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 59	<i>Vicia faba</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	S. Jorge
Madeira 60	<i>Mentha sp.</i>	<i>Eucarazzia elegans</i>	Aphidinae	Caniço
Madeira 61	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Lido
Madeira 62	NI	<i>Takecallis sp.</i>	Drepanosiphinae	Funchal
Madeira 64	<i>Pinus sp.</i>	NI	NI	Poiso
Madeira 65	NI	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 66	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Aphis pomi</i>	Aphidinae	Garajau
Madeira 67	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	S. Gonçalves
Madeira 68	NI	NI	NI	Funchal
Madeira 69	NI	NI	NI	Penteada
Madeira 70	<i>Cupressus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachninae	S. Jorge
Madeira 71	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphidinae	Lido
Madeira 72	NI	<i>Aphis nerii</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 73	NI	<i>Wahlgreniella arbuti</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 74	NI	<i>Myzocallis kuricola</i>	Drepanosiphinae	Funchal
Madeira 75	NI	<i>Aphis nerii</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 76	<i>Zantedeschia aethiopicaca</i>	<i>Neomyzus circumflexus</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 77	<i>Citrus limon</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphidinae	Garajau
Madeira 78	NI	<i>Uroleucon sp.</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 79	<i>Cupressus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachninae	Covão
Madeira 80	<i>Euryops pectinatus</i>	<i>Brachycaudus helichrysi</i>	Aphidinae	Covão
Madeira 81	<i>Erodium sp.</i>	<i>Brachycaudus helichrysi</i>	Aphidinae	Covão
Madeira 82	<i>Poacea</i>	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	Aphidinae	Covão
Madeira 83	<i>Malva sp.</i>	<i>Aphis umbrella</i>	Aphidinae	Covão
Madeira 84	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphidinae	Covão
Madeira 85	<i>Cupressus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachninae	Penteada
Madeira 86	<i>Sonchus sp.</i>	<i>Uroleucon sonchi</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 87	<i>Medicago sp.</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphidinae	Posto Agrário de Santana
Madeira 88	<i>Vicia sativa</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Posto Agrário de Santana
Madeira	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphidinae	Posto Agrário de

89				Santana
Madeira 90	NI	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Funchal
Madeira 91	<i>Labiatae</i>	<i>Aulacorthum solani</i>	Aphidinae	Estrada Paúl da Serra - Canhas
Madeira 92	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 93	<i>Sonchus spp.</i>	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 94	<i>Geranium sp.</i>	<i>Acyrtosiphon malvae</i>	Aphidinae	Ribeira da Janela
Madeira 95	<i>Allium triquetrum</i>	<i>Neotoxoptera formosana</i>	Aphidinae	Ribeira da Janela
Madeira 96	<i>Argyranthemum pinnatifidum</i>	NI	NI	Santa Porto Moniz
Madeira 97	<i>Rosa sp.</i>	<i>Metopolophium dirhodum</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 98	NI	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 99	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis spiraeicola</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 100	<i>Vicia faba</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 101	<i>Rubus sp.</i>	<i>Aphis idaei</i>	Aphidinae	Santa Cruz
Madeira 102	<i>Crepis divaricata</i>	<i>Uroleucon sonchi</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 103	<i>Crepis divaricata</i>	<i>Hyperomyzys lactucae</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 104	NI	<i>Acyrtosiphum sp.</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 105	<i>Lavatera critica</i>	NI	NI	Chão da Ribeira
Madeira 106	NI	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	São Vicente
Madeira 107	<i>Salix canariensis</i>	<i>Aphis farinosa</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 108	<i>Lagurus ovatus</i>	<i>Metopolophium festucae</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 109	<i>Graminea</i>	NI	NI	Santa Porto Moniz
Madeira 110	<i>Centaurium sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 111	<i>Wahlenbergia lobelioides lobelioides</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 112	<i>Avena barbata</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 113	<i>Bituminaria bituminosa</i>	NI	NI	Santa Porto Moniz
Madeira 114	<i>Medicago sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 115	<i>Rubia fruticosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 116	<i>Centaurium sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira 117	<i>Crepis divaricata</i>	<i>Uroleucon hypochoeridis</i>	Aphidinae	Achadas da Cruz
Madeira 118	<i>Helminthotheca echioides</i>	NI	NI	Santa Porto Moniz
Madeira 119	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz
Madeira	<i>Centaurium sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Santa Porto Moniz

120				
Madeira 121	<i>Malva sp.</i>	<i>Aphis umbrella</i>	Aphidinae	Penteada - quinta
Madeira 122	<i>Ficus carica</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Penteada - quinta
Madeira 123	<i>Pinus sp.</i>	NI	NI	Pta Pargo - Estação Água
Madeira 124	<i>Carthamus lanatus</i>	<i>Uroleucon jaceae</i>	Aphidinae	Pta Pargo - Farol
Madeira 125	<i>Helminthotheca echioides</i>	<i>Uroleucon picridis</i>	Aphidinae	Pta Pargo - Farol
Madeira 126	<i>Crepis divaricata</i>	NI	NI	Pta Pargo - Estação Água
Madeira 127	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Aphis ulicis</i>	Aphidinae	Pta Pargo - Estação Água
Madeira 128	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Fajã da Ovelha - Paúl do Mar
Madeira 129	<i>Cholophytum colosum</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Fajã da Ovelha - Paúl do Mar
Madeira 130	<i>Crepis divaricata</i>	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphidinae	Fajã da Ovelha - Paúl do Mar
Madeira 131	Asteraceae	<i>Aphis spiraeicola</i>	Aphidinae	Fajã da Ovelha - Paúl do Mar
Madeira 132	<i>Solanum mauritianum</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Fajã da Ovelha - Paúl do Mar
Madeira 133	<i>Lavatera critica</i>	<i>Aphis nasturtii</i>	Aphidinae	Miradouro Arco da Calheta
Madeira 134	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Arco da Calheta
Madeira 135	<i>Rubus sp.</i>	<i>Amphorophora rubi</i>	Aphidinae	Levada Nova - Pta do Sol
Madeira 136	<i>Hordeum sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Miradouro Arco Calheta
Madeira 137	<i>Vicia sativa</i>	<i>Cavariella aegopodii</i>	Aphidinae	Levada Nova - Pta do Sol
Madeira 138	<i>Ammi majus</i>	<i>Cavariella aegopodii</i>	Aphidinae	Levada Nova - Pta do Sol
Madeira 139	Asteraceae	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphidinae	Miradouro Arco Calheta
Madeira 140	<i>Rubia fruticosa</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Miradouro Arco Calheta
Madeira 141	<i>Achyranthes sicula</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Miradouro Arco Calheta
Madeira 142	<i>Euphorbia piscatoria</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Miradouro Arco Calheta
Madeira 143	<i>Centaurium sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Moledos da Pta do Sol
Madeira 144	NI	<i>Brachycaudus cardui</i>	Aphidinae	Levada Nova - Pta do Sol
Madeira 145	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Levada Nova - Pta do Sol
Madeira 146	<i>Galactites tomentosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Miradouro Arco Calheta
Madeira 147	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aphidinae	Covão
Madeira 148	NI	<i>Cavariella theobaldi</i>	Aphidinae	Penteada - Jardim
Madeira 149	<i>Pinus sp.</i>	NI	NI	Chão da Ribeira
Madeira 150	<i>Rumex sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira	<i>Aichryson divaricatum</i>	<i>Aphis cf. gossypii</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira

151				
Madeira 152	<i>Rumex sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 153	<i>Phyllis nobla</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 154	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 155	<i>Geranium purpureum</i>	<i>Acyrtosiphon malvae</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 156	<i>Poacea</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 157	NI	<i>Cinara sp.</i>	Lachninae	Funchal
Madeira 158	<i>Pteridium aquilinum</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 159	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 160	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 161	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 162	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachninae	Chão da Ribeira
Madeira 163	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphidinae	Chão da Ribeira
Madeira 164	<i>Vitis sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Vale da Ribeira da Janela
Madeira 165	<i>Rumex sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Vale da Ribeira da Janela
Madeira 166	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphidinae	Vale da Ribeira da Janela
Madeira 167	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinihabitans</i>	Lachninae	Paúl da Serra
Madeira 168	<i>Bituminaria bituminosa</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphidinae	Camacha
Madeira 169	<i>Asteraceae</i>	NI	NI	Camacha
Madeira 170	<i>Poacea</i>	<i>Sipha sp</i>	Drepanosiphidae	Camacha
Madeira 171	<i>Avena sp.</i>	<i>Sipha sp.</i>	Drepanosiphidae	Camacha
Madeira 172	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Aphis ulicis</i>	Aphidinae	Camacha
Madeira 173	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Camacha
Madeira 174	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinea</i>	Lachninae	Camacha
Madeira 175	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Santo da Serra
Madeira 176	<i>Rosa sp.</i>	<i>Macrosiphum rosae</i>	Aphidinae	Santo da Serra - Caminho da Lagoa
Madeira 177	NI	<i>Aphis umbrella</i>	Aphidinae	Rib. de Machico - Fonte de Sto António
Madeira 178	<i>Malus domestica</i>	<i>Aphis pomi</i>	Aphidinae	Rib. de Machico - Fonte de Sto António
Madeira 179	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 180	<i>Juniperus cedrus</i>	<i>Cinara cf. juniperi</i>	Lachninae	Montado do Pereiro
Madeira 181	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinea</i>	Lachninae	Montado do Pereiro
Madeira	<i>Digitalis purpurea</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Montado do Pereiro

182				
Madeira 183	<i>Crocoshmia crocosmiiflora</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Santana - Rocha do Navio
Madeira 184	<i>Cassia didymobotrya</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Santana - Rocha do Navio
Madeira 185	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Santana - Rocha do Navio
Madeira 186	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Montado do Pereiro
Madeira 187	Annonaceae	<i>Toxoptera citricidus</i>	Aphidinae	Jardim Universidade - Penteada
Madeira 188	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Levado do Alecrim - Rabaçal
Madeira 189	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Aphis ulicis</i>	Aphidinae	Levado do Alecrim - Rabaçal
Madeira 190	NI	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	Aphidinae	Levado do Alecrim - Rabaçal
Madeira 191	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphidinae	Levado do Alecrim - Rabaçal
Madeira 192	<i>Rubus sp.</i>	<i>Aphis ruborum</i>	Aphidinae	Levado do Alecrim - Rabaçal
Madeira 193	<i>Prunus domestica</i>	<i>Brachycaudus schwartzi</i>	Aphidinae	Monte
Madeira 194	<i>Quercus sp.</i>	<i>Tuberculooides annulatus</i>	Aphidinae	Levada da Ribeira da Janela
Madeira 195	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Aphis pomi</i>	Aphidinae	Levada da Ribeira da Janela
Madeira 196	<i>Rubus sp.</i>	<i>Aphis ruborum</i>	Aphidinae	Levada da Ribeira da Janela
Madeira 197	Asteraceae	<i>Uroleucon sp.</i>	Aphidinae	Chão dos Louros
Madeira 198	NI	<i>Aphis pomi</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 199	<i>Euphorbia piscatoria</i>	<i>Aulacorthum solani</i>	Aphidinae	Prazeres
Madeira 200	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Prazeres
Madeira 201	<i>Galactites tomentosa</i>	<i>Brachycaudus cardui</i>	Aphidinae	Prazeres
Madeira 202	Asteraceae	<i>Uroleucon sonchi</i>	Aphididae	Achadas da Cruz
Madeira 203	<i>Solandra grandiflora</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aphidinae	Penteada
Madeira 204	<i>Mentha sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Covão
Madeira 205	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Aphis ulicis</i>	Aphididae	Estrada Fanal - Rib. Janela
Madeira 206	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinea</i>	Lachnidae	Jardim Universidade - Penteada
Madeira 208	<i>Pericallis aurita</i>	<i>Brachycaudus cardui</i>	Aphididae	Paúl da Serra
Madeira 209	<i>Rubus sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Santa Porto Moniz
Madeira 210	<i>Rubus sp.</i>	<i>aphis ruborum</i>	Aphididae	Ribeira da Janela
Madeira 211	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Ribeira da Janela
Madeira 212	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Ribeira da Janela
Madeira 213	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Ribeira da Janela
Madeira	<i>Galium aparine</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Ribeira da Janela

214				
Madeira 215	<i>Vitis sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Ribeira da Janela
Madeira 216	<i>Rumex sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Ribeira da Janela
Madeira 217	<i>Salix canariensis</i>	<i>Aulacorthum solani</i>	Aphididae	Ribeira da Janela
Madeira 218	Asteraceae	NI	Aphididae	Garachico - Câmara de Lobos
Madeira 219	<i>Coprosma sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Garachico - Câmara de Lobos
Madeira 220	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphididae	Madalenas - Santo António
Madeira 221	<i>Cymbidium sp. (insigne?)</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Funchal
Madeira 222	<i>Cymbidium sp. (insigne?)</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Funchal
Madeira 223	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Nazaré (CAB)
Madeira 224	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Penteada -Uma
Madeira 225	<i>Anthurium andraeanum</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Imaculado Coração
Madeira 226	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	Caníço
Madeira 227	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Levada do Rei - São Jorge
Madeira 228	<i>Cedronella canariensis</i>	<i>Neomyzus circumflexus</i>	Aphididae	Lugar de Baixo
Madeira 229	<i>Ageratina adenophora</i>	<i>Aulacorthum solani</i>	Aphididae	Ribeiro Frio - Balcões
Madeira 230	<i>Hypericum grandifolium</i>	<i>Neomyzus circumflexus</i>	Aphididae	Ribeiro Frio - Balcões
Madeira 231	<i>Digitalis purpurea</i>	<i>Aulacorthum solani</i>	Aphididae	Ribeiro Frio - Balcões
Madeira 232	<i>Geranium maderensis</i>	<i>Acyrtosiphon malvae</i>	Aphididae	Ribeiro Frio - Balcões
Madeira 233	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphididae	Ribeiro Frio - Balcões
Madeira 234	<i>Fushia sp. (?)</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Ribeiro Frio - Balcões
Madeira 235	<i>Senecio sp.</i>	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphididae	Ribeiro Frio - Balcões
Madeira 236	<i>Taraxacum sp.</i>	<i>Uroleucon sp.</i>	Aphididae	Ribeiro Frio - Balcões
Madeira 237	<i>Vicia sp. (sativa?)</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphididae	Ribeiro Frio - Balcões
Madeira 238	<i>Helminthotheca echiodides</i>	<i>Uroleucon picridis</i>	Aphididae	Faial
Madeira 239	Asteraceae	<i>Uroleucon sonchi</i>	Aphididae	Faial
Madeira 240	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphididae	Faial
Madeira 241	Asteraceae	<i>Uroleucon picridis</i>	Aphididae	Faial
Madeira 242	NI	<i>Aulacorthum solani</i>	Aphididae	Faial
Madeira 243	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Aphis sarothamni</i>	Aphididae	Levada do Blandy
Madeira 244	NI	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	Levada do Blandy
Madeira	NI	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	Levada do Blandy

245				
Madeira 246	<i>Vaccinium padifolium</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Levada do Blandy
Madeira 247	NI	<i>Brachycaudus cardui</i>	Aphididae	Estrada Pico do Areeiro - Poiso
Madeira 248	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Estrada Pico do Areeiro - Poiso
Madeira 249	<i>Crocasmia crocosmiiflora</i> (?)	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Estrada Pico do Areeiro - Poiso
Madeira 250	<i>Cedronella canariensis</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Estrada Pico do Areeiro - Poiso
Madeira 251	<i>Pinus</i> sp.	<i>Cinara pinea</i>	Lachnidae	Estrada Fanal - Rib. Janela
Madeira 252	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Jardim Parque Ecológico
Madeira 253	<i>Sonchus fruticosus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Jardim Parque Ecológico
Madeira 254	<i>Argyranthemum pinnatifidum</i>	<i>Brachycaudus cardui</i>	Aphididae	Jardim Parque Ecológico
Madeira 255	<i>Geranium</i> sp.	<i>Acyrtosiphon malvae</i>	Aphididae	Jardim Parque Ecológico
Madeira 256	<i>Erica arborea</i>	<i>Aphis spiraeicola</i>	Aphididae	Parque ecológico
Madeira 257	Asteraceae	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	Pico do Areeiro
Madeira 258	<i>Erica maderensis</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Pico do Areeiro
Madeira 259	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Aphis sarothamni</i>	Aphididae	Pico do Areeiro
Madeira 260	Asteraceae	<i>Brachycaudus helichrysi</i>	Aphididae	Poço da Neve - Pico do Areeiro
Madeira 261	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Jardim Universidade - Penteadá
Madeira 262	NI	<i>Greenidia ficicola</i>	Greenideidae	Jardim Universidade - Penteadá
Madeira 263	NI	<i>Acyrtosiphon malvae</i>	Aphididae	Caminho do Lombo
Madeira 264	Asteraceae	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	Caminho do Lombo
Madeira 265	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Caminho do Lombo
Madeira 266	<i>Aeonium</i> sp.	<i>Nasonovia dasyphylli</i>	Aphididae	Caminho do Lombo
Madeira 267	<i>Genista</i> sp.	<i>Aphis sarothamni</i>	Aphididae	Assomada/Porto Novo
Madeira 268	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphididae	Assomada/Porto Novo
Madeira 269	<i>Arundo donax</i>	<i>Melanaphis donacis</i>	Aphididae	Praia S. Pedro/Gaula
Madeira 270	<i>Andriola</i> sp.	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	Eira do Serrado
Madeira 271	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Vicente
Madeira 272	Asteraceae	<i>Acyrtosiphon malvae</i>	Aphididae	Miradouro Ribeira Brava
Madeira 273	<i>Helminthotheca echioides</i>	<i>Uroleucon picridis</i>	Aphididae	Cabo Girão
Madeira 274	NI	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	Santa Porto Moniz
Madeira 275	NI	<i>Uroleucon</i> sp.	Aphididae	Santa Porto Moniz
Madeira	NI	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	Santa Porto Moniz

276				
Madeira 277	<i>Conyza sp. (?)</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	Caminho para Sto da Serra
Madeira 278	<i>Asteraceae</i>	<i>Uroleucon miera</i>	Aphididae	Caminho para Sto da Serra
Madeira 279	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara maritimae</i>	Lachnidae	Caminho para Sto da Serra
Madeira 280	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphididae	Ribeiro Frio
Madeira 281	<i>Conyza sp. (?)</i>	<i>Illinoia goldamaryae</i>	Aphididae	Ribeiro Frio
Madeira 282	<i>Genista sp.</i>	<i>Aphis sarothamni</i>	Aphididae	Parque ecológico
Madeira 283	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphididae	Santa Porto Moniz
Madeira 284	<i>Asteraceae com espinhos</i>	<i>Uroleucon picridis</i>	Aphididae	Santa Porto Moniz
Madeira 285	<i>Brassica oleraceae</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i>	Aphididae	Santa Porto Moniz
Madeira 286	<i>Rosaceae (Prunus sp.?)</i>	<i>Tuberolachnus salignus</i>	Lachnidae	Santa Porto Moniz
Madeira 287	<i>Vicia faba</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Santa Porto Moniz
Madeira 288	NI	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	Aphididae	Eira do Serrado
Madeira 289	<i>Asteraceae</i>	<i>Uroleucon sp.</i>	Aphididae	Eira do Serrado
Madeira 290	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Curral das Freiras
Madeira 291	<i>Asteraceae</i>	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphididae	Curral das Freiras
Madeira 292	NI	<i>Neotrama maritima</i>	Lachnidae	Gaula
Madeira 293	<i>Cymbidium insigne (?)</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Caminho do Lombo
Madeira 294	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Camacha
Madeira 295	<i>Laurus azorica</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Camacha
Madeira 296	<i>Euphorbia piscatoria</i>	<i>Aphis paralius auct.</i>	Aphididae	Canico
Madeira 297	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Cavariella aegopodi</i>	Aphididae	Camacha
Madeira 298	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Camacha
Madeira 299	<i>Rubus sp.</i>	<i>aphis ruborum</i>	Aphididae	Encumeada
Madeira 300	<i>Cryptomeria japonica (?)</i>	<i>Cinara fresai</i>	Lachnidae	Encumeada
Madeira 301	<i>Acalypha wilkesiana (?)</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Tecnopolo
Madeira 302	<i>Bauhinia variegata</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Penteada
Madeira 303	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphididae	Penteada
Madeira 304	NI	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	Penteada
Madeira 305	<i>Cassia didymobotrya</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aphididae	Penteada
Madeira 306	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Penteada
Madeira	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Penteada

307				
Madeira 308	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphididae	Penteada
Madeira 309	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Penteada
Madeira 310	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	Encumeada
Madeira 311	<i>Allium cepa</i>	<i>Neotoxoptera formosana</i>	Aphididae	Universidade da Madeira
Madeira 312	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Universidade da Madeira
Madeira 313	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphididae	Universidade da Madeira
Madeira 314	<i>Camellia japonica</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	Garajau
Madeira 315	<i>Glycine sinensis</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphididae	Garajau
Madeira 316	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Garajau
Madeira 317	<i>Zea mays</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Aphididae	Covão - casa
Madeira 318	<i>Magnolia</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	Garajau
Madeira 319	<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Pentalonia nigronervosa</i>	Aphididae	Universidade da Madeira
Madeira 320	Asteraceae	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphididae	Serras da Alegria
Madeira 321	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	Serras da Alegria
Madeira 322	<i>Rumex sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Serras da Alegria
Madeira 323	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Aphis ulicis</i>	Aphididae	Serras da Alegria
Madeira 324	<i>Galium aparine</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Serras da Alegria
Madeira 325	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Aphis sarothamni</i>	Aphididae	Serras da Alegria
Madeira 326	Asteraceae	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	São Vicente
Madeira 327	<i>Acacia sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Vicente
Madeira 328	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Vicente
Madeira 329	Asteraceae	<i>Uroleucon picridis</i>	Aphididae	Posto Florestal Santa Porto Moniz
Madeira 330	Asteraceae	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	Posto Florestal Santa Porto Moniz
Madeira 331	<i>Pericallis aurita</i>	<i>Brachycaudus cardui</i>	Aphididae	Fonte da Pedra
Madeira 332	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Santa Porto Moniz
Madeira 333	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Santa Porto Moniz
Madeira 334	Asteraceae	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphididae	Estreito C <sup>a</sup> Lobos
Madeira 335	<i>Rubus sp.</i>	<i>aphis ruborum</i>	Aphididae	Estreito C <sup>a</sup> Lobos
Madeira 336	Asteraceae	<i>Aphis craccivora</i>	Aphididae	Estreito C <sup>a</sup> Lobos
Madeira 337	<i>Rumex sp.</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphididae	Estreito C <sup>a</sup> Lobos
Madeira	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Estreito C <sup>a</sup> Lobos

338				
Madeira 339	<i>Brassica oleraceae</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i>	Aphididae	Estreito C <sup>a</sup> Lobos
Madeira 340	<i>Zea mays</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aphididae	Estreito C <sup>a</sup> Lobos
Madeira 341	<i>Solanum mauritianum</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Estreito C <sup>a</sup> Lobos
Madeira 342	<i>Senecio serpens</i>	<i>Myzus persicae</i>	Aphididae	Estreito C <sup>a</sup> Lobos
Madeira 343	<i>Asteraceae</i>	<i>Uroleucon picridis</i>	Aphididae	Canical
Madeira 344	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Canical
Madeira 345	<i>Cypripedium insigne</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Garajau
Madeira 346	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinea</i>	Lachnidae	Fanal
Madeira 347	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinea</i>	Lachnidae	Fanal
Madeira 348	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Ribeira da Janela
Madeira 349	<i>Asteraceae</i>	<i>Uroleucon picridis</i>	Aphididae	Ribeira da Janela
Madeira 350	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Sta Porto Moniz
Madeira 351	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Sta Porto Moniz
Madeira 352	<i>Conyza sp. (?)</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	Sta Porto Moniz
Madeira 353	<i>Asteraceae</i>	<i>Uroleucon mieraе</i>	Aphididae	Sta Porto Moniz
Madeira 354	<i>Rubus sp.</i>	<i>aphis ruborum</i>	Aphididae	Sta Porto Moniz
Madeira 355	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Aphis ulicis</i>	Aphididae	Sta Porto Moniz
Madeira 356	<i>Bituminaria bituminosa</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphididae	Sta Porto Moniz
Madeira 357	<i>Asteraceae</i>	<i>Uroleucon picridis</i>	Aphididae	Sta Porto Moniz
Madeira 358	<i>Pinus sp.</i>	<i>Cinara pinea</i>	Lachnidae	Ribeira da Janela
Madeira 359	NI	<i>Myzus persicae</i>	Aphididae	Canico
Madeira 360	NI	<i>Macrosiphoniella sanborni</i>	Aphididae	Santana
Madeira 361	<i>Physalis sp. (?)</i>	<i>Neomyzus circumflexus</i>	Aphididae	Boaventura
Madeira 362	<i>Agathis robusta</i>	?	?	Canico
Madeira 363	<i>Solandra grandiflora</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aphididae	Funchal
Açores 1	<i>Acer sp.</i>	<i>Drepanosiphum sp.</i>	Drepanosiphinae	Jardim Univ. - Terra Chã
Açores 2	<i>Lolium sp.</i>	<i>Sitobion fragariae</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
Açores 3	NI	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
Açores 4	NI	<i>Pterocomma sp.</i>	Drepanosiphinae	Jardim Univ. - Terra Chã
Açores 5	<i>Arrhenatherum sp.</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã

<b>Açores 6</b>	<i>Agapanthus sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 7</b>	NI	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 8</b>	<i>Annona cherimola</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 9</b>	<i>Hedera sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 10</b>	<i>Rumex sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 11</b>	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Aphis solanella</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 12</b>	<i>Mentha sp.</i>	<i>Aphis affinis</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 13</b>	<i>Strelitzia sp.</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 14</b>	<i>Kniphofia sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 15</b>	<i>Rubia sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 16</b>	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 17</b>	NI	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 18</b>	<i>Acanthus mollis</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Jardim Univ. - Terra Chã
<b>Açores 19</b>	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Aterro Sanitário
<b>Açores 20</b>	<i>Sonchus sp.</i>	<i>Uroleucon sonchi</i>	Aphidinae	Aterro Sanitário
<b>Açores 21</b>	<i>Sonchus sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Cimenteira
<b>Açores 22</b>	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Monte Brasil - Angra
<b>Açores 23</b>	<i>Rubus sp.</i>	<i>Aphis ruborum</i>	Aphidinae	Monte Brasil - Angra
<b>Açores 24</b>	<i>Lotus sp.</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphidinae	Monte Brasil - Angra
<b>Açores 25</b>	<i>Vicia sp.</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphidinae	Monte Brasil - Angra
<b>Açores 26</b>	<i>Spartium junceum</i>	<i>Aphis cytisorum</i>	Aphidinae	Monte Brasil - Angra
<b>Açores 27</b>	<i>Umbilicus sp.</i>	<i>Aphis sedi</i>	Aphidinae	Monte Brasil - Angra
<b>Açores 28</b>	<i>Arundo donax</i>	<i>Melanaphis donacis</i>	Aphidinae	Monte Brasil - Angra
<b>Açores 29</b>	<i>Tamarix sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphidinae	Monte Brasil - Angra
<b>Açores 30</b>	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphidinae	Monte Brasil - Angra
<b>Açores 31</b>	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Praia da Vitória
<b>Açores 32</b>	NI	<i>Myzus ornatus</i>	Aphidinae	Praia da Vitória
<b>Açores 33</b>	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Praia da Vitória
<b>Açores 34</b>	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Praia da Vitória
<b>Açores 35</b>	NI	NI	Macrosiphinae	Praia da Vitória
<b>Açores 36</b>	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Praia da Vitória
<b>Açores 37</b>	NI	Macrosiphinae	Aphidinae	Praia da Vitória
<b>Açores 38</b>	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Praia da Vitória
<b>Açores 39</b>	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphidinae	Praia da Vitória
<b>Açores 40</b>	<i>Lavatera cretica</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphidinae	Praia da Vitória
<b>Açores 41</b>	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	São Miguel - Lagoa das Furnas
<b>Açores 42</b>	<i>Rubus sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Lagoa das Furnas

Açores 43	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Lagoa das Furnas
Açores 44	<i>Nerium sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	Relva
Açores 45	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	Sete Cidades
Açores 46	<i>Pino bravo</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	Igreja-sete Cidades
Açores 47	<i>Persea indica</i>	<i>Thelaxes suberi</i>	Drepanosiphidae	Igreja-sete Cidades
Açores 48	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	lagoa Verde
Açores 49	<i>Laurus sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Lagoa do Fogo
Açores 50	<i>Rubus sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Caldeira Velha
Açores 51	<i>Chá preto</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	Caldeira Velha
Açores 52	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	lagoa (cidade)
Açores 53	NI	NI	NI	lagoa (cidade)
Açores 54	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Universitário
Açores 55	<i>Rosacea</i>	<i>Macrosiphum rosae</i>	Aphididae	Pico de El-Rei
Açores 56	<i>Laurus sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Pico de El-Rei
Açores 57	<i>Chrysanthemum sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Lomba da Maia
Açores 58	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphididae	Lomba da Maia
Açores 59	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Lomba de São Pedro
Açores 60	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Aphididae	Lomba de São Pedro
Açores 61	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Lomba de São Pedro
Açores 62	<i>Laurus sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Lomba de São Pedro
Açores 63	<i>Cardinal</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Ribeira Grande
Açores 64	<i>Pinus sp. (pinaster?)</i>	<i>Eulachnus rileyi</i>	Lachnidae	Igreja-sete Cidades
Açores 65	<i>Nicotiana sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Lagoa Verde
Açores 66	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	Sete Cidades
Açores 67	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara cf. confinis</i>	Lachnidae	Igreja-sete Cidades
Açores 68	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara cf. confinis</i>	Lachnidae	Sete Cidades
Açores 69	<i>Magnolia</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 70	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 71	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Miguel
Açores 72	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Uroleucon sp.</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 73	<i>Rosa</i>	<i>Metopolophium dirhodum</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 74	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 75	<i>Rhododendron sp.</i>	<i>Illinoia azaleae</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 76	<i>Ficus sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 77	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis spiraeicola</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 78	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 79	<i>Glycina sp.</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 80	<i>Pyracantha angustifolia</i>	<i>Aphis spiraeicola</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 81	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	São Miguel
Açores 82	<i>Pittosporum undulatum</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Miguel

Açores 83	<i>Camelia</i>	<i>Aphis spiraeicola</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 84	<i>Pinus bravo</i>	<i>Cinara pinimarinimae</i>	Lachnidae	São Miguel
Açores 85	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	São Miguel
Açores 86	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Aphis spiraeicola</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 87	<i>Camelia</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 88	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Miguel
Açores 89	<i>Silvestres</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 90	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Miguel
Açores 91	<i>Faia</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 92	<i>Pittosporum undulatum</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 93	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 94	<i>Buxus sempervirnes</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Jorge
Açores 95	<i>Rosaceae (Rubus ...)</i>	<i>Aphis ruborum</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 96	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Jorge
Açores 97	<i>Cedrus (silver)</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Jorge
Açores 98	<i>Camelia</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 99	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 100	NI	<i>Aphis spiraeicola</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 101	<i>Punica granatum</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 102	NI	NI	Aphididae	São Jorge
Açores 103	<i>Glicina sp.</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 104	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 105	<i>Quercus sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 106	NI	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 107	<i>Banksia sp.</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 108	NI	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 109	<i>Banksia integrifolia</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 110	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Jorge
Açores 111	<i>Buxus sempervirnes</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 112	<i>Hedra azorica</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 113	<i>Rosaceae (Rubus ...)</i>	<i>Aphis ruborum</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 114	<i>Camelia</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 115	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Jorge
Açores 116	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 117	<i>Banksia integrifolia</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Jorge

Açores 118	<i>Rosa da Pedra</i>	<i>Aphis ?spiraecola</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 119	<i>Erica sp.</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 120	<i>Rhododendron sp.</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 121	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 122	<i>Faia de terra</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 123	<i>Rosaceae (Rubus ...)</i>	<i>Macrosiphum rosae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 124	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Jorge
Açores 125	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 126	<i>Bougainvillea</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 127	<i>Faia da Terra</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Jorge
Açores 128	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Pico
Açores 129	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	Pico
Açores 130	<i>Pittosporaceae</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	Pico
Açores 131	<i>Rosaceae</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Pico
Açores 132	<i>NI</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Pico
Açores 133	<i>Camelia</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	Pico
Açores 134	<i>Pyrcantha coccinea</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	Pico
Açores 135	<i>Ilex perado azorica</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	Pico
Açores 136	<i>Hedra??</i>	<i>Aphis hederae</i>	Aphididae	Pico
Açores 137	<i>Faia</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Pico
Açores 138	<i>Oenothera stricta</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	Pico
Açores 139	<i>Hedra azoriana</i>	<i>Aphis hederae</i>	Aphididae	Pico
Açores 140	<i>Bancia</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Pico
Açores 141	<i>Pinus bravo</i>	<i>Cinara pinimaritimae</i>	Lachnidae	Pico
Açores 142	<i>Cedrus (capacitas)</i>	<i>Cinara ?tujafilina</i>	Lachnidae	Pico
Açores 143	<i>Cedrus (cipreste)</i>	<i>Cinara ?tujafilina</i>	Lachnidae	Pico
Açores 144	<i>Erica sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Pico
Açores 145	<i>Faia</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	Pico
Açores 146	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Pico
Açores 147	<i>Hedra azoriana</i>	<i>Aphis hederae</i>	Aphididae	Pico
Açores 148	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	Pico

Açores 149	NI	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	Pico
Açores 150	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	Pico
Açores 151	<i>Pinus bravo</i>	<i>Cinara pinimaritimae</i>	Lachnidae	Pico
Açores 152	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	Pico
Açores 153	<i>Nerium sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	Pico
Açores 154	<i>Oenothera stricta</i>	<i>Aphis oenotherae</i>	Aphididae	Pico
Açores 155	Chá do Brazil	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 156	<i>Pittosporum undulatum</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 157	<i>Hedra azoriana</i>	<i>Aphis hederae</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 158	<i>Nerium sp.</i>	<i>Aphis nerii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 159	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Aphis sp.</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 160	<i>Camelia</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 161	<i>Glicina sp.</i>	<i>Aphis craccivora</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 162	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	São Miguel
Açores 163	<i>Buxus sempervirnes</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 164	<i>Arundo donax</i>	<i>Melanaphis donacis</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 165	<i>Raphiolepis umbelata</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 166	<i>Banksia integrifolia</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 167	Faia	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 168	<i>Camelia</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 169	<i>Pittosporum undulatum</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 170	<i>Rhododendron sp.</i>	<i>Illinoia lambersi</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 171	<i>Cedrus sp.</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Miguel
Açores 172	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	São Miguel
Açores 173	<i>Pinus bravo</i>	<i>Cinara pinimaritimae</i>	Lachnidae	São Miguel
Açores 174	<i>Pinus bravo</i>	<i>Eulachnus rileyi</i>	Lachnidae	São Miguel
Açores 175	<i>Ilex perado</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 176	<i>Prunus lusitanica</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 177	<i>Vaccinium cylindraceum</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 178	<i>Myrsine africana</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Miguel
Açores 179	Folhado	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	São Miguel

<b>Açores 180</b>	<i>Erica sp.</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Aphididae	São Miguel
<b>Açores 181</b>	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	São Miguel
<b>Açores 182</b>	<i>Pittosporum undulatum</i>	<i>Aphis fabae</i>	Aphididae	São Miguel
<b>Açores 183</b>	<i>Juniperos brevifolia</i>	<i>Cinara sp.</i>	Lachnidae	São Miguel
<b>Açores 184</b>	<i>Pyracantha angustifolia</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	Aphididae	São Miguel
<b>Barcelona 1</b>	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	Drepanosiphidae	Barcelona

**Anexo 2 – Sequências das amostras infetadas com *Wolbachia***– sequências em formato fasta para cada um dos genes estudados (*16S rRNA*, *ftsZ*, *gatB*, *coxA* e *hcpA*)

### RNA Ribossomal (16S rRNA)

Amostra 80Az - *Aphis spiraecola*

```
NNNNNNNNNNNANNNNNTTGGGAGCTCTCNATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGT
TGATTAGCTTCGAGTGAAACCAATTCCCATGGCGTGACGGGCAGTGTGTACAAGACCCGAGAACGTA
TTCACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGCTCTCGAGTTGCAGAGAACA
ATCCGAACAGATGATTTTTTAGGATTAGCTCAGCCTTGCGACCTTGAGCCCATTTGTAATCACCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCACTCCATAAGGGCCATGATGACTTGACATCATCCCCACCTTCCTCCAGTT
TACTACTGGCAGTTTCCTTAAAGTCCCCAGCATAACCTGATGGTAACTAAGGATGAGGGTTGCGCTCG
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAACACCTGTGTGAAATC
CGGCCAAACCGACCTATCCCTTGAATAGGTATAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCG
GGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAA
```

Amostra 85Az - *Neophyllaphis podocarpi*

```
NNNNNNNNNNCNCNCNNTTGGGANCTCTCNATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGT
TGATTAGCTTCGAGTGAAACCAATTCCCATGGCGTGACGGGCAGTGTGTACAAGACCCGAGAACGTA
TTCACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTACA
ATCCGAATTGAGATGTCTTTTAGGGATTAGCTTAGGCTTGCGCACCTTGAGCCCACTGTAGACACCA
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCACTTCATAAAGGCCATGATGACTTGACATCATCCCCATCTCCTCCAG
CTTACTACTGGCAGTTTCCTTAAAGTGCTCAGCATTACCTGATGGCAACTAAGGATGAGGGTTGCGCT
CGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAACACCTGTGTAAAA
TCCGGCCGAACCGACCTATCCCTTGAATAGGTATAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCC
GGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCNTATAGTGAGTCGTATTAA
```

Amostra 100Az - *Aphis spiraecola*

NNNNNNNNCNCNNNNNGGGAGCTCTCNNTATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTG  
ATTAGCTTCGAGTGAAACCAATTCCCATGGCGTGACGGCAGTGTGTACAAGACCCGAGAGCGTATT  
CACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTACAAT  
CCGAAGTGAAGTGTCTTTTAGGGATTAGCTTAGGCTTGCGCACCTTGACGCCACTGTAGACACCATT  
GTAGCACGTGTGTAGCCACTTCATAAAGGCCATGATGACTTGACATCATCCCCATCTTCTCCAGCT  
TACTACTGGCAGTTTCTTAAAGTGCTCAGCATTACCTGATGGCAACTAAGGATGAGGGTTGCGCTCG  
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAACACCTGTGTAAAATC  
CGGCCGAACCGACCCTATCCCTTGAATAGGTATAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCG  
GGAGCATGCGACGTCGGGCCCNNTTCNCACTATANNAGTCGNATNAN

Amostra 129Az - *Aphis spiraecola*

NNNNNNNNNNCNCGCGTTGGGAGCTCTCNNTATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTG  
ATTTATACCTATTCGAAGGGATAGGGTCGGTTTGGCCGGATTTACACAGGTGTTGCATGGCTGTCTG  
CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCATCCTTAGTTACCATC  
AGGTTATGCTGGGGACTTTAAGGAACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAG  
TCATCATGGCCCTTATGGAGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGATTACAATGGGCCGCAAGGTC  
GCAAGGCTGAGCTAATCCTAAAAATCATCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAG  
TTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACTGC  
CCGTCACGCCATGGGAATTGGTTTCACTCGAAGCTAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCG  
GGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTGCCCCTATAGTGAGTCGTATTAA

Amostra 134Az - *Aphis spiraecola*

NNNNNNNNNNCAGCNCNNNGGAGCTCTCNNTATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGT  
GATTTATACCTATTCGAAGGGATAGGGTCGGTTTGGCCGGATTTACACAGGTGTTGCATGGCTGTCTG  
GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCATCCTTAGTTACCA  
TCAGGTTATGCTGGGGACTTTAAGGAACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCA  
AGTCATCATGGCCCTTATGGAGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGATTACAATGGGCTGCAAGG  
TCGCAAGGCTGAGCTAATCCTAAAAATCATCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGA  
AGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTCGTACACACT  
GCCCCGTCACGCCATGGGAATTGGTTTCACTCGAAGCTAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGC  
CGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTGCCCCTATAGTGAGTCGTATTAA

Amostra 162Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNNNNCNCGTTGGGNGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTG  
ATTAGCTTCGAGTGAAACCAATTCCCATGGCGTAACGGCAGTGTGTACAAGACCCGAGGACGTATT  
CACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTACAAT  
CCGAAGTGAAGTGTCTTTTAGGGATTAGCTTAGGCTTGCGCACCTTGACGCCACTGTAGACACCATT  
GTAGCACGTGTGTAGCCACTTCATAAAGGCCATGATGACTTGACATCATCCCCATCTTCTCCAGCT

TATCACTGGCAGTTTCCTTAAAGTGCTCAGCATTACCTGATGGCAACTAAGGATGAGGGTTGCGCTCG  
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAACTCCTGTGAAAATC  
CGGCCGAACCGACCCTATCCCTTGAATAGGTATAAATCGAATTCCCGCGGGCCGATGGCGGCCG  
GGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTGCCCCTATAGTGAGTCGTATTAA

Amostra 181Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNTCANGCGTTNGGNGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTG  
ATTAGCTTCGAGTGAAACCAATTCCCATGGCGTGACGGGCAGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATT  
CACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTACAAT  
CCGAACTGAGATGTCTTTTAGGGATTAGCTTAGGCTTGCACACCTTGCAGCCCACTGTAGACACCATT  
GTAGCACGTGTGTAGCCCACTTCATAAAGGCCATGATGACTTGACATCATCCCCATCTTCTCCAGCT  
TATCACTGGCAGTTTCCTTAAAGTGCTCAGCATTACCTGATGGCAACTAAGGATGAGGGTTGCGCTCG  
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAACACCTGTGAAAATC  
CGGCCGAACCGACCCTATCCCTTGAATAGGTATAAATCGAATTCCCGCGGGCCGATGGCGGCCG  
GGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTGCCCCTATAGTGAGTTCGTATTAA

Amostra 184Az - *Aphis spiraecola*

NNNNNNNNNNNNNNNTTGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTG  
ATTAGCTTCGAGTGAAACCAATTCCCATGGCGTGACGGGCAGTGTGTACAAGACCCGAGAACGTATT  
CACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGCTCTCGAGTTGCAGAGAACAAT  
CCGAACTGAGATGATTTTTTAGGATTAGCTCAGCCTTGCACCTTGCAGCCCACTTGTAAATCACCATTG  
TAGCACGTGTGTAGCCCACTCCATAAGGGCCATGATGACTTGACATCATCCCCACCTTCTCCAGTTT  
ATCACTGGCAGTTTCCTTAAAGTCCCAGCATAACCTGATGGTAACTAAGGATGAGGGTTGCGCTCGT  
TGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAACACCTGTGTGAAATCC  
GGCCAAACCGACCCTATCCCTTGAATAGGTATAAATCGAATTCCCGCGGGCCGATGGCGGCCG  
GAGCATGCGACGTCGGGCCAATTGCCCCTATAGTGAGTCGTATTAA

### **Proteína da divisão celular (*ftsZ*)**

Amostra 81Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNNNNNANGNNTTNGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAC  
TAGTGATTTCAAGTAATGGATTGGATATCGCAGCCTCTGCAGCGCTAATTGCCCTATCTTCTCCTTCTG  
CCTCTCCAGTACCAATCATTGCTTTACCCATCTCACTCATTACCGTTTCTATATCAGCAAAATCAAGATT  
AATCAGTCCTGGCATGATCATCAAATCAGTTACTCCTCTTATGCCAATATGCAGAACATTATCGGCGAG  
TTGAAATGCGTCAGCAAATGTAGTTTTCTCGTTAGCAATTCTAAATAAATTTTGATTGGGAATGACAATA  
AGTGATCTACGTATTTTTGCAACTCTTCAAGTCCAAGCTCTGCAATGCGCATAACGTCGCACACCTTCA  
AAACCGAACGGCTTAGTTACAACCTCAACAGTCAGTATCTTTTTTCTTTTGTCTTTTATCTTTAACTA  
CCGCTCTTGCTTCTCTGGCTGCTTTTGAATTACCGGTGCAGCACCTGTTCCAGTACCACCACCCATC  
CCTGCTGTGATAAAGAGCATATGGCTATCCTTTATATGCTCCATGATAATCGAATTCCCGCGGGCCG  
ATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTGCCCCTATAGTGAGTCGTATTAA

Amostra 85Az - *Neophyllaphis podocarpi*

GNNNNNNNCNNNNNNCGTGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTG  
ATTTTCGAGTAATGGATTAGATATCGCAGCCTCTGCAGCGCTAATTGCCCTATCTTCTCCTTCTGCCTCT  
CCAGTACCAATCATTGCTTTACCCATCTCACTCATTACCGTTTTCTATATCAGCAAAAATCAAGATTAATCA  
GTCCTGGCATGATCATCAAATCAGTTACTCCTCTTATGCCAATATGCAGAACATTATCGGGCAGTTGAA  
ATGCGTCAGCAAATGTAGTTTTCTCGTTAGCAATTCTAAATAAATTTTGATTGGGAATGACAATAAGTG  
TATCTACGTATTTTTGCAACTCTTCAAGTCCAAGCTCTGCAATGCGCATAACGTGCGCACACCTTCAAAC  
CGAACGGCTTAGTTACAACCTCCAACAGTCAGTATCTTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTACTACCGC  
TCTTGCTTCTCTGGCTGCTTTTGCAATTACCGGTGCAGCACCTGTTCCAGTACCACCACCCATCCCTG  
CTGTGATAAAGAGCATATGGCTATCTTTTATATGCTCCATGATAATCGAATCCCAGCGGCCGCGCATGG  
CGGCCGGGAGCATGCGACGTGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTTCGTATNA

Amostra 86Az - *Aphis spiraeola*

NNNNNNNNNTCNANNCNTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGT  
GATTTCAAGTAATGGATTAGATATATCGCAGCCTCTGCAGCGCTAATTGCCCTATCTTCTCCTTCTGCC  
TCTCCAGTACCAATCATTGCTTTACCCATCTCACTCATTACCGTTTTCTATATCAGCAAAAATCAAGATTAA  
TCAGTCCTGGCATGATCATCAAATCAGTTACTCCTCTTATGCCAATATGCAGAACATTATCGGGCAGTT  
GAAATGCGTCAGCAAATGTAGTTTTCTCGTTAGCAATTCTAAATAAATTTTGATTGGGAATGACAATAA  
GTGTATCTACGTATTTTTGCAACTCTTCAAGTCCAAGCTCTGCAATGCGCATAACGTGCGCACACCCTCA  
AAACCGAACGGCTTAGTTACAACCTCCAACAGTCAGTATCTTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTACTA  
CCGCTCTTGCTTCTCTGGCTGCTTTTGCAATTACCGGTGCAGCACCTGTTCCAGTACCACCACCCATC  
CCTGCTGTGATAAAGAGCATATGGCTATCCTTTATATGCTCCATGATAATCGAATCCCAGCGGCCGCGC  
ATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTTCGTATTAA

Amostra 136Az – *Aphis hederæ*

NNNNNNNNNTCCACGCNTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGT  
AGTGATTTCAAGTAATGGATTGGATATTGCAGCCTCTGCAGCACTAATTGCCCTATCTTCTCCTTCTGC  
CTCTCCAGTACCAATCATTGCTTTACCCATCTCACTCATTACTGTTTCTATATCAGCAAAAATCAAGATTA  
ATCAGTCCTGGCATGATCATCAAATCAGTTACTCCTCTTATGCCAATATGCAGAACATTATCGGGCAGT  
TGAAATGCGTCAGCAAATGTAGTTTTCTCGTTAGCAATTCTAAATAAATTTTGATTGGGAATGACAATAA  
GTGTATCTACGTATTTTTGCAACTCTTCAAGTCCAAGCTCTGCAATGCGCATAACGTGCGCACACCTTCAA  
AACCGAACGGCTTAGTTACAACCTCCAACAGTCAGTATCTTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTACTAC  
CGCTCTTGCTTCTCTGGCTGCTTTTGCAATTACCGGTGCAGCACCTGTTCCAGTACCACCACCCATCC  
CTGCTGTGATAAAGAGCATATGGCTATCCTTTATATGTTCCATGATAATCGAATCCCAGCGGCCGCGCA  
TGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGNNNTCGTATTA

Amostra 162Az - *Neophyllaphis podocarpi*

GNNNNNNNNNNNNNANGCGTTNGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAC  
TAGTGATTTTCGAGTAATGGATTGGATATCGCAGCCTCTGCAGCGCTAATTGCCCTATCTTCTCCTTCT  
GCCTCTCCAGTACCAATCATTGCTTTACCCATCTCACTCATTACCGTTTCTATATCAGCAAAATCAAGA  
TTAATCAGTCCTGGCATGATCATCAAATCAGTTACTCCTCTTATGCCAATATGCAGAACATTATCGGCG  
AGTTGAAATGCGTCAGCAAATGTAGTTTTCTCGTTAGCAATTCTAAATAAATTTTGATTGGGAATGACA  
ATAAGTGATCTACGTATTTTTGCAACTCTTCAAGTCCAAGCTCTGCAATGCGCATAACGTCGCACACCT  
TCAAAACCGAACGGCTTAGTTACAACCTCAACAGTCAGTATCTTTTTTCTTTTGCTCCTTTATCTTTAA  
CTACCGCTCTTGCTTCTCTGGCTGCTTTTGAATTACCGGTGCAGCACCTGTTCCAGTACCACCACCC  
ATCCCTGCTGTGATAAAGAGCATATGGCTATCCTTTATATGCTCCATAATAATCGAATCCCGCGGCC  
GCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTAA

Amostra 172Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNNNCACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTA  
GTGATTTTCGAGTAATGGATTGGATATCGCAGCCTCTGCAGCGCTAATTGCCCTATCTTCTCCTTCTGC  
CTCTCCAGTACCAATCATTGCTTTACCCATCTCACTCATTACCGTTTCTATATCAGCAAAATCAAGATTA  
ATCAGTCCTGGCATGATCATCAAATCAGTTACTCCTCTTATGCCAATATGCAGAACATTATCGGCGAGT  
TGAAATGCGTCAGCAAATGTAGTTTTCTCGTTAGCAATTCTAAATAAATTTTGATTGGGAATGACAATAA  
GTGTATCTACGTATTTTTGCAACTCTTCAAGTCCAAGCTCTGCAATGCGGATACGTCGCACACCTTCAA  
AACCGAACGGCTTAGTTACAACCTCAACAGTCAGTATCTTTTTTCTTTTGCTCCTTTATCTTTAACTAC  
CGCTCTTGCTTCTCTGGCTGCTTTTGAATTACCGGTGCAGCACCTGTTCCAGTACCACCACCCATCC  
CTGCTGTGATAAAGAGCATATGGCTATCCTTTATATGTTCCATGATAATCGAATCCCGCGGCCGCCA  
TGCGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTAA

Amostra 181Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNATCNNGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTA  
GTGATTTCAAGTAATGGATTGGATATCGCAGCCTCTGCAGCGCTAATTGCCCTATCTTCTCCTTCTGC  
CTCTCCAGTACCAATCATTGCTTTACCCATCTCACTCATTACCGTCTCTATATCAGCAAAATCAAGATTA  
ATCAGTCCTGGCATGATCATCAAACAGTTACTCCTCTTATGCCAATATGCAGAACATTATCGGCGAG  
TTGAAATGCGTCAGCAAATGTAGTTTTCTCGTTAGCAATTCTAAATAAATTTTGATTGGGAGTGACAAT  
AAGTGATCTACGTATTTTTGCAACTCTTCAAGTCCAAGCTCTGCAATGCGCATAACGTCGCACACCTTC  
AAAACCGAACGGCTTAGTTACAACCTCAACAGTCAGTATCTTTTTTCTTTTGCTCCTTTATCTTTAACT  
ACCGCTCTTGCTTCTCTGGCTGCTTTTGAATTACCGGTGCAGCACCTGTTCCAGTACCACCACCCAT  
CCCTGCTGTGATAAAGAGCATATGGCTATCCTTTATATGCTCCATGATAATCGAATCCCGCGGCCGCGC  
CATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATANNNGNNNCGTATTAA

## Glutamyl-tRNA amidotransferase - subunidade B (*gatB*)

Amostra 80Az - *Aphis spiraecola*

NNNNNNNNNCANNCNTTGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTG  
ATTTGGTAATTCGGGTAAAGATGATCTAATAAGATCAATTTTGTCTTGGCTTATCTCAACAGGCAGTAA  
ATCTGGCTCAGGAAAGTATCTATAGTCGCTTGCATCTTCTTTATTTTCGCATTACTTTTGTTCCTGAA  
GCAGTATCAAATAATAAGGTATCTTGACTTATCTCTTTTCCACTTTCTAAAATCTCAATTTGCCTTTGTAT  
TTCATAATCTATAGCTTGAACAATATGGCGGATTGAGTTGAGATTTTTTATCTCACAACGGGTACCAAA  
TTTATCACTACCTCTTGGGCGCACAGAAACATTTGCATCACAACGAAGAGAGCCTTTTTCTATATCACC  
ATCACAAGAGCCAACATAACGCAAAATTTGCCTCAGTTTCTTCATAAATTCTGCCACTTCTGCAGATGA  
TCTTAAATCTGGCTCAGAGACAATTTCCATCAACGCAACACCTGCGCGATTTAACTCAATCGAATTCCC  
GCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATANNNNNNC

Amostra 129 Az - *Aphis spiraecola*

NNNNANNNNNNCNANNCNTNNGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAC  
GTGATTTGGTAATTCGGGCAAAGATGATCTAATAAGATCAATTTTGTCTTGGCTTATCTCAACAGGCAG  
TAAATCTGGCTCAGGAAAGTATCTATAGTCGCTTGCATCTTCTTTATTTTCGCATTACTTTTGTTCCT  
GAAGCAGTATCAAATAATAAGGTATCTTGACTTATCTCTTTTCCACTTTCTAAAATCTCAATTTGCCTTT  
GTATTTTATAATCTATAGCTTGAACAATATGGCGGATTGAGTTGAGATTTTTTATCTCACAACGGGTAC  
CAAATTTATCACTACCTCTTGGGCGCACAGAAACATTTGCATCACAACGAAGAGAGCCTTTTTCCATAT  
CACCATCACAAGAGCCAACATAACGCAAAATTTGCCTCAGTTTCTTCATAAATTCTGCCACTTCTGCAG  
ATGATCTTAAATCTGGCTCAGAGACAATTTCCATCAACGCAACACCTGCACGATTTAACTCAATCGAAT  
TCCC GCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATAGNGAGTCG  
TATTAA

Amostra 162Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNNNCNACGCGTGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAG  
TGATTTGGTAATTCGGGCAAAGATGATTTAATAAGAATCAATTTTGTCTTGGCTTATTTCAACAGGTAGC  
AAATCAGTTTCAGGAAATATCTATAGTCACTTGAATCTTCTTTGCTTCTCATCACTTTTGTTCCTA  
AAGTGACATCAAACAATAAGGTATCTTGACTTATTTCTCCTCCGCTTTCCAAAATTTGATCTGCCTTTG  
TGCTTCATAATCTATAGCTTGTACAATAAACGTATTGAATTTAAGTTTTTTATTTCAACAACGAGTGCCA  
AATGTGTTACTACCCTTTTGGCGAACAGAAACATTTGCATCACAGCGAAGTGACCCCTTTTCCATATCA  
CCATCACATGAACCGATGTAACGCAAAATCTGCCTCAATTTTTTTCATGAATTCTGCAGCTTCTGCAGAT  
GAACGGAGATCTGGCTCTGAAACAATTTCCATTAAGCAACCCCTGCACGATTTAACTCAATCGAATT  
CCC GCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGT  
ATTAA

Amostra 181Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNGNGTNTNNNNNNCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTG  
ATTTGGTAATTCGGGTAAAGATGATCTAATAAGATCAATTTTGTCTTGGCTTATCTCAACAGGCAGTAA  
ATCTGGCTCAGGAAAGTATCTATAGTCGCTTGCATCTTCTTTATTTTCGCATTACTTTTGTTCCTGAA  
GCAGTATCAAATAATAAGGTATCTTGACTTATCTCTTTTCCACTTTCTAAAATCTCAATTTGCCTTTGTAT  
TTCATAATCTATAGCTTGAACAATATGGCGGATTGAGTTGAGATTTTTTATCTCACAACGGGTACCAAA  
TTTATCACTACCTCTTGGGCGCACAGAAACATTTGCATCACAACGAAGAGAGCCTTTTTCCATATCACC  
ATCACAAGAGCCAACATAACGCAAAATTTGCCTCAGTTTCTTCATAAATCTGCCACTTCTGCAGATGA  
TCTTAAATCTGGCTCAGAGACAATTTCCATCAACGCAACACCTGCACGATTTAACTCAATCGAATTTCC  
GCGGCCGCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCNGGCCAATTCGCNCTATAGTGAGTCATATTA  
ANCANTCGAATTNCCCGCGGCCGCCAATGGCGNCCGGGNANCNATGCGACGTCCGGCCCCAATT  
CGCCCTATNAGTGGAGTCNNTAATAAAA

Amostra 172Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNCANNNNTGGGAGCTCTNNNGATGGTGGACCTGCAGGCGGCCGCGGTTCACTAATGT  
TTTTCGAGTCTAGAGGAGCGTGCACGTCGGGCCAATTCNCCCTATAGTGAGTCGTATTAANNTGCN  
GCCGCNCGTGCTTGTGCAAAAACGTTCCATCAAGCTGCCAAGGGCGCCAAGAGTAAATAGGAGCAT  
GTGTTTGTAGGGTTCTGAATAGCATTAAAATGTTTTTAAAGTTTATGTTAGACATCCAGAACTTGCTCAA  
CTTTAATCGAATTTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCT  
ATACTGAGTCATATTAACCTCTTGGGCGCACAGAAACATTTGCATCACAACGAAGAGAGCCTTTTTCC  
ATATCACCATCACAAGAGCCAACATAACGCAAAATTTGCCTCAGTTTCTTCATAAATCTGCCACTTCT  
GCAGATGATCTTAAATCTGGCTCAGAGACAATTTCCATCAACGCAACCCCTGCACGATTTAACTCAAT  
CGAATTTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTGA  
GTCGTANNA

### **Citocromo c oxidase - subunidade I (coxA)**

Amostra 81Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNCACGCNTTGGGAGCTCTCNNTATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTG  
ATTCTAAAGACTTTTACACCAGTTATAACGCCAATAAAAATTGTTGTAGTGCTAAAAATATAGCAGCAT  
CTTCGCTAAGCCCAACAGTAAACATATGGTGAGCCCAAACCATAAAGCCAAATGCTGCTATGCCTATC  
ATTGCATAAACCATTCTTTATAGCCAAATACTGGCCTATGGGAAAAAGTTGATACGACTTGGCTTATG  
ATGCCAAATGCAGGAAAAATAATTATGTAACTTCTGGATGACCAAAAAACCAAAACAGGTGTTGAAAT  
AACACAGGATCACCGCCACCAGCAGGATCAAAAAAGGAAGTACCTATATTACGATCAGTTAGCAGCAT  
AGTTATAGCACCAGCAAGTACCGGTAAGGCAACAATTAACATAAACGACGTTAATAAACAGACCAAA  
CAAATAGTGGCATCTTGGTCAATGACATGCCTTTTGCACGCATATTAATATAGTGACTATAAAGTTGA  
TTGCCCAAAATCGAATTTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTC  
GCCCTATAGTNNNNTCGTATTA

Amostra 85Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNTCNACGCGTTGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCCTAG  
TGATTCTAAAGACTTTTACGCCAGTTATAACGCCAATAAAAAATTGTTGTAGTGCTAAAAAATATAGCAG  
CATCTTCGCTAAGCCCAACAGTAAACATATGGTGAGCCCAAACCATAAAGCCAAATGCTGCTATGCCT  
ATCATTGCATAAACCATTCCCTTTATAGCCAAATACTGGCCTATGGGAAAAAGTTGATACGACTTGGCTT  
ATGATGCCAAATGCAGGAAAAATAATTATGTAACTTCTGGATGACCAAAAAACCAAAACAGGTGTTGA  
AATAACACAGGATGACCGCCACCAGCAGGATCAAAAAAGGAAGTACCTATATTACGATCAGTTAGCAG  
CATAGTTATAGCACCAGCAAGTACCGGTAAGGCAACAATTGACATAAACGACGTTAATAAACAGACC  
AAACAAATAGTGGCATCTTGGTCAATGACATGCCTTTTGCACGCATATTAATATAGTGACCATAAAGT  
TGATCGCCCCAAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAA  
TTCGCNNNATAGNNNNNTCGTATTAA

Amostra 86Az - *Aphis spiraecola*

NNNNNNNNNNNNNANGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCCT  
AGTGATTCTAAAGACTTTGACACCAGTTATAACGCCAATAAAAAATTGTTGTAGTGCTAAAAAATATAGC  
AGCATCTTCGCTAAGCCCAACAGTAAACATATGGTGAGCCCAAACCATAAAGCCAAATGCTGCTATGC  
CTATCATTGCATAAACCATTCCCTTTATAGCCAAATACTGGCCTATGGGAAAAAGTTGATACGACTTGGC  
TTATGATGCCAAATGCAGGAAAAATAATTATGTAACTTCTGGATGACCAAAAAACCAAAACAGGTGTT  
GAAATAACACAGGATCACCGCCACCAGCAGGATCAAAAAAGGAAGTACCTATATTACGATCAGTTAGC  
AGCATAGTTATAGCACCAGCAAGTACCGGTAAGGCAACAATTAACATAAACGACGTTAATAAACAGA  
CCAAACAAATAGTGGCATCTTGGTCAATGACATGCCTTTTGCACGCATATTAATATAGTGACTATAAA  
GTTAATTGCCCCAAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCC  
AATTCGCCCTATAGTGGNNTCGTATNA

Amostra 136Az – *Aphis hederæ*

NNNNNNNNNTCNNNCGTTGGGAGCTCTNNATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCCTAGT  
GATTCTAAAGACTTTGACGCCAGTTATACACCAATGAAAATTGTGCTAGTGCTAAAAAATATAGCAGCAT  
CCTCGCTAAGCCCAACAGTAAACATATGGTGAGCCCAAACCATGAAGCCAAACGTTGCTATTCCTATC  
ATGGCATAAACCATTCCCATATAACCAATACTGGCCTATGAGAAAAAGTTGACACAATCTGACTGATG  
ATACCAATGCAGGAAAAATAATTATGTAACTTCTGGATGACCAAAAAACCAAAACAGATGTTGAAAT  
AACACAGGATCACACCACCAGCAGGATCAAAAAAGGAGGTACCTATATTACGATCAGTGAGCAGCA  
TAGTTATAGCACCAGCAAGTACCGGTAAGGCAACAATTAACATAAATGACGTGAGTAAAATAGACCA  
ACAAATAGTGGTATCTTAGTTAGTGACATACCTTTTGCACGCATATTGAATATGGTAACTATAAAGTTG  
ATCGCCCCAAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAA  
CGCCNANANTGNNTT

Amostra 162Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNTCNCGCGTTGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTG  
ATTCTAAAGACTTTTACGCCAGTTATAACGCCAATAAAAAATTGTTGTAGTGCTAAAAAATATAGCAGCAT  
CTTCGCTAAGCCCAACAGTAAACATATGGTGAGCCCAAACCATAAAGCCAAATGCTGCTATGCCTATC  
ATTGCATAAACCATTCCTTTATAGCCAAATACTGGCCTATGGGAAAAAGTTGATACGACTTGGCTTATG  
ATGCCAAATGCAGGAAAAATAATTATGTAAACTTCTGGATGACCAAAAAACCAAAACAGGTGTTGAAAT  
AACACAGGATCACCGCCACCAGCAGGATCAAAAAAGGAAGTACCTATATTACGATCAGTTAGCAGCAT  
AGTTATAGCACCAGCAAGTACCGGTAAGGCAACAATTAACATAAACGACGTTAATAAACAGACCAAAA  
CAATAGTGGCATCTTGGTCAATGACATGCCTTTTGCACGCATATTAATATAGTGACTATAAAGTTAA  
TCGCCCAAAATCGAATTCGCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGGGCCCAATTC  
GCNNTATANNGNNNNCGTATAAAA

### **Proteína hipotética conservativa (*hcpA*)**

Amostra 81Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNNNNNCCACGCGTTGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCA  
CTAGTGATTAAGTTGAGCAAGTTCTGGTTCTCCAAATTTGTATAGAAAGCGTCACGTACTTTACCAAA  
GTCTTTTACTTCACAAGTTATAACATATAATTCTTCTTTGTTATTTTCTCAACATTCAACTTCTAATT  
CAATTCATAGTTAAATAAATCTTCAAAATTCATATCCTCTGCTTTATAGATAATTAAGCCTACATGATC  
GAAAAGGTAACACACCTCCTGTTTCTCCAAATTACCGCCTTTGCGAGAAAAGATATAACGTATCTC  
AGAAGCAGTTCGGTTGCGATTATTTGTCAGAGCATGAACAATAAGTGCAGTACCAGAAGGTCCGCAG  
CCTTCATATTGATTTCTTCATAACTTTCTCCAGCAACGTCACCAGCTGCATTTTTTATTGCTGTTTCTA  
TTTTATCTTTTGGTAGATTTTCTTTTCGCGCAGCAAAGATAGCAGAGCGAAGACGTGGATTGAGTTCCG  
GGATCAGGCAGCCCTTGTTTTGCAGCAACTGCTATTTCAATCGAATTCGCGCGGCCGCCATGGCGGC  
CGGGAGCATGCGACGTGGGCCCAATTCGCCCTATANNGNNNNCCNNATTA

Amostra 172Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNATCNCGCGTTNGGNGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAG  
GATTGAAAGTTAAGCAAGTTCTGGTTCTCCAAATTTGTATAGAAAGCGTCACGTACTTTACCAAGTC  
TTTTACTTCACAAGTTATAACATATAATTCTTCTTTGTTATTTTCTCAACATTCAACTTCTAATTCAAT  
TCCATAGTTAAATAAATCTTCAAAATTCATATCCTCTGCTTTATAGACAATTAAGCCTACATGATCGAAA  
AGGTAACACACCTCCTGTTTCTCCAAATTACCGCCTTTGCGAGAAAAGATATAACGTATCTCAGAA  
GCAGTTCGGTTGCGATTATTTGTCAGAGCATGAACAATAAGTGCAGTACCAGAAGGTCCGCAGCCTTC  
ATATTGATTTCTTCATAACTTTCTCCAGCAACGTTACCAGCTGCATTTTTTATTGCTGTTTCTATTTTAT  
CTTTTGGTAGATTTTCTTTTCGCGCAGCAAAGATAGCAGAGCGAAGACGTGGGTTGAGTTCCGGGATC  
AGGCAGCCCTTGTTTTGCAGCAACTGCTATTTCAATCGAATTCGCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGA  
GCATGCGACGTGGGCCCAATTCGCCCTATANNGNNNTCGTATTA

Amostra 181Az - *Neophyllaphis podocarpi*

NNNNNNNNNNNNNTCNACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTC  
ACTAGTGATTGAAATAACAGTTGCTGCAAAACAAGGGCTGCCTGATCCCGAACTCAATCCACGTCTTC  
GCTCTGCTATCTTTGCTGCGCGAAAGGAAAATCTACCAAAGATAAAAATAGAAACAGCAATAAAAAATG  
CAGCTGGTAACGTTGCTGGAGAAAGTTATGAAGAAATACAATATGAAGGCTGCGGACCTTCTGGTACT  
GCACTTATTGTTTCATGCTCTGACAAATAATCGCAACCGAACTGCTTCTGAGATACGTTATATCTTTTCT  
CGCAAAGGCGGTAATTTGGGAGAAACAGGAGGTGTGAGTTACCTTTTCGATCACGTAGGCTTAATTGT  
CTATAAAGCAGAGGATATGAATTTTGAAGATTTATTTAACTATGGAATTGAATTAGAAGTATTGAATGTT  
GAGGAAAATAACAAAGAAGAATTATATGTTATAACTTGTGAAGTAAAAGACTTTGGTAAAGTACGTGAC  
GCTTTCTATACAAAATTTGGAGAACCAGAACTTGCTTGACTTTCAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATG  
GCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTAA