

两种毛蚜线粒体基因组比较分析*

牛芳芳^{1,2**} 陈 静² 姜立云² 任国栋¹ 乔格侠^{2***}

(1. 河北大学生命科学学院, 保定 071002;

2. 中国科学院动物研究所, 动物进化与系统学院重点实验室, 北京 100101)

摘 要 【目的】线粒体基因组分析已被应用于昆虫系统发育研究。本研究以蚜科 Aphididae 重要类群毛蚜亚科物种为代表, 测定并比较分析了该类蚜虫的线粒体基因组特征, 探讨了基于线粒体基因组信息的蚜虫系统发育关系重建。【方法】以毛蚜亚科三角枫多态毛蚜 *Periphyllus acerihabitans* Zhang 和针茅小毛蚜 *Chaetosiphella stipae* Hille Ris Lambers, 1947 为研究对象, 利用长短 PCR 相结合的方法测定线粒体基因组的序列, 分析了基因组的基本特征; 基于在线 tRNAscan-SE Search Server 搜索方法预测了 tRNA 的二级结构; 基于 12 个物种(本研究获得的 2 个物种和 10 个 GenBank 上下载的物种数据)的蛋白编码基因(PCGs)序列, 利用最大似然法和贝叶斯法重建了蚜科的系统发育关系。【结果】两种毛蚜均获得了约 94% 的线粒体基因组数据, *P. acerihabitans* 获得了 14 908 bp, 控制区为 1 205 bp; *C. stipae* 获得了 13 893 bp, 控制区为 609 bp。两种毛蚜同时获得 33 个基因, 包含接近完整的 13 个蛋白编码基因(PCGs) (*nad5* 不完整), 18 个 tRNA, 2 个 rRNA 基因; *ka/ks* 值表明, *C. stipae* 的进化速率更快。从基因组组成、基因排列顺序、核苷酸组成分析、密码子使用情况、tRNA 二级结构等特征来分析, 两种蚜虫线粒体基因组基本特征相似。系统发育重建结果表明毛蚜亚科、蚜亚科的单系性得到了支持, 毛蚜亚科位于蚜科的基部位置。【结论】两种毛蚜线粒体基因组的基本特征相似, 符合蚜虫线粒体基因组的一般特征, 两种线粒体基因组的长度差异主要来自控制区长度的不同; 系统发育重建支持毛蚜亚科与蚜亚科的单系性, 毛蚜亚科位于蚜科较为基部的位。研究结果为蚜虫类系统发育重建提供了参考。

关键词 毛蚜亚科, 三角枫多态毛蚜, 针茅小毛蚜, 线粒体基因组, 系统发育关系

Comparative analysis of the mitochondrial genomes of two Chaitophorine species (Hemiptera: Aphididae)

NIU Fang-Fang^{1,2**} CHEN Jing² JIANG Li-Yun² REN Guo-Dong¹ QIAO Ge-Xia^{2***}

(1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Key Laboratory

of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract 【Objectives】The mitochondrial genome has been widely used in studies of insect phylogeny. We conducted a comparative analysis of the mitochondrial genomes of two aphid species in the Chaitophorinae and used these data to reconstruct the phylogenetic relationship between these species. 【Methods】We used a combination of long and short PCR methods to sequence the mitochondrial genomes of *Periphyllus acerihabitans* Zhang and *Chaetosiphella stipae* Hille Ris Lambers, 1947. We sequenced and predicted tRNA secondary structures using the online tRNAscan-SE Search Server. We also used BI and ML approaches to reconstruct the phylogenetic relationships between 12 Aphididae species based on variation in protein-coding genes sequences (PCGs). 【Results】We obtained about 94% of the mitochondrial genome sequences of the two aphid species. That of *P. acerihabitans* was 14 908 bp long, with a control region length of 1 205 bp, whereas that of *C. stipae* was 13 893 bp long with a control region length of 609 bp. The mitochondrial genome of these two aphids each has 33

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (Nos. 31620103916, 31572307, 31430078); 中国科学院对外合作交流重点项目 (No. 152111KYSB20130012)

**第一作者 First author, E-mail: fangfangk1990@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: qiaogx@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2016-08-26, 接受日期 Accepted: 2016-11-8

genes, including 13 almost complete PCGs (*nad5* incomplete), 18 tRNA and 2 rRNA. A *ka/ks* analysis indicates that *C. stipae* evolved faster than *P. acerihabitans*. The organization of the mitochondrial genome, gene order, nucleotide composition, codon usage, and secondary tRNA structures, were similar in both species. The associated phylogenetic analysis supports the monophyly of the Chaitophorinae and Aphidinae, because of the basal relationship of the Chaitophorinae within Aphididae.

[Conclusion] *P. acerihabitans* and *C. stipae* have similar mitochondrial genomes, which are also mostly similar to those previously reported for other aphids. There are, however, differences in the control regions in each species which may lead to variation in size of the whole genome. Phylogenetic reconstruction supports the monophyly of the Chaitophorinae and Aphidinae. These results will benefit reconstructing the phylogeny of all aphid species.

Key words Chaitophorinae, *Periphyllus acerihabitans*, *Chaetosiphella stipae*, mitochondrial genome, phylogenetic relationship

昆虫线粒体基因组为闭合环状双链 DNA, 大小为 15~18 kb。共编码 37 个基因: 13 个蛋白质编码基因、2 个核糖体 RNA (rRNA) 和 22 个转运 RNA (tRNA), 此外还有一段大小不固定的非编码区域, 称为控制区。由于其组成稳定、基因排列保守、一般为母系遗传、极少发生基因重排等, 广泛应用于分子系统学, 系统发育和种群遗传等研究 (Wilson *et al.*, 1985; Boore, 1999)。其中应用最广泛的分子标记类型是核酸序列和氨基酸序列 (魏书军和陈学新, 2011)。

蚜虫类 Aphidinea 隶属于半翅目 Hemiptera, 世界记录 5 000 余种 (Favret, 2016), 中国分布 1 000 余种。蚜虫具有独特的生物学特性, 如孤雌生殖, 复杂的生活周期类型, 普遍的多型现象、丰富的内共生菌等, 这使其成为研究进化问题的理想材料 (Huang and Qiao, 2014)。同时, 蚜虫也是重要的害虫, 给农林业生产带来了严重的经济损失。麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 是第一个获得全线粒体基因组的蚜虫 (Thao *et al.*, 2004)。目前, GenBank 共收录 13 种完整的或接近完整的蚜虫线粒体基因组数据 (Zhang *et al.*, 2014, 2016a, 2016b; Li *et al.*, 2015), 但若基于线粒体基因组数据解决蚜虫类系统发育关系, 目前的数据远远不够。

三角枫多态毛蚜 *Periphyllus acerihabitans* 和针茅小毛蚜 *Chaetosiphella stipae* 隶属于半翅目隶属于半翅目 Hemiptera 蚜科 Aphididae 毛蚜亚科 Chaitophorinae, *P. acerihabitans* 隶属于毛蚜亚科毛蚜族 Chaitophorini 多态毛蚜属 *Periphyllus*,

营同寄主全周期, 寄主植物是三角枫 *Acer buergerianum* Miq., 主要在寄主的叶背及嫩茎取食, 是行道树的重要害虫; *C. stipae* 隶属于毛蚜亚科伪毛蚜族 Siphini 的小毛蚜属 *Chaetosiphella*, 寄主植物为芡草属 *Achnatherum* spp., 针茅属 *Stipa* spp. 等植物, 主要在寄主植物的茎秆和叶子正面取食, 并有蚂蚁伴生。

目前关于蚜虫系统发育相关研究仍然存在很多争议。早期相关的研究主要基于形态和生态特征 (张广学和钟铁森, 1983; 乔格侠, 1996; 张广学, 1999)。Von Dohlen 和 Moran (2000) 利用线粒体核糖体基因数据, Ortiz-Rivas 和 Martinez-Torres (2010) 基于核基因 (LWO 和 EF-1 α) 和线粒体基因 (ATP6 和 COII)、Papasotiropoulos 等 (2013) 基于 CO 和 12S rRNA 基因探讨了蚜科的系统发育关系, 结果仅验证了部分亚科的单系性, 但蚜科内部亚科间的系统发育关系并没有得到很好的解决, 仍存在取样覆盖度与数据量不足的问题。因此, 需要积累更丰富的分子数据, 并结合形态学证据和生物学信息来全面阐释蚜虫类的系统发育关系。

本研究选取了毛蚜亚科两个物种, 即三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜, 基于线粒体基因组序列的测定, 比较分析两种毛蚜线粒体基因组组成与结构、核苷酸组成、密码子使用、进化速率等方面的异同, 并基于蛋白编码基因构建蚜科系统发育树, 初步探讨蚜科不同亚科之间的系统发育关系, 为蚜虫类系统发育研究提供基础数据, 这也是毛蚜类首次开展线粒体基因组的比较研究。

1 材料与方法

1.1 样品采集、鉴定与保存

三角枫多态毛蚜 *P. acerihabitans* 的样品于 2015 年 4 月 22 日采自北京中国科学院奥运园区 (乔格侠采集), 寄主植物为五角枫; 针茅小毛蚜 *C. stipae* 则于 2012 年 7 月 9 日采自内蒙古清水河县城关镇 (张斌采集), 寄主植物为针茅。样品浸泡在 95% 的酒精中, 置于 -20℃ 冰箱中保存; 其中一部分制作成永久玻片标本, 用于形态鉴定; 一部分用于分子生物学实验。两个物种的形态鉴定通过比对已定名标本和详细的形态描述来完成。凭证标本和分子生物学样品均保存在中国科学院动物研究所国家动物博物馆。

1.2 DNA 提取

取单头整体蚜虫研磨, 用 QIAGEN 试剂盒

提取 DNA。

1.3 PCR 反应与测序

使用蚜虫通用引物和特异性引物进行 PCR 扩增蚜虫线粒体片段。实验共用 10 对引物 (表 1), 在扩增 ND4-rrnL 区域时两种毛蚜使用的引物不同, 三角枫多态毛蚜用到 N4-J-8944 和 CB-N11010, 而针茅小毛蚜使用特异性引物 28282-N4-F 和 28282-N4-R 扩增该区域的缺失片段, 其他片段使用的引物都一样。PCR 反应条件为 96℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 60 s, 44~52℃ 退火 30 s, 60℃ 延伸 1~3 min, 30 个循环; 60℃ 终延伸 10 min; 4℃ 保存。对于不同物种退火温度可能需要做微调。

1.4 序列拼接、注释、核苷酸和密码子分析

在 NCBI 上通过 BLAST 对获得的序列进行比对, 确认是目的片段后, 使用 SeqMan 软件拼

表 1 PCR 使用的引物
Table 1 PCR primers used in this study

基因 Gene	引物名称 Primer ID	引物序列 (5'-3') Primer sequences	来源 References
tRNA ^{leu} -CO	TI-J34	GCCTGATAAAAAGGRTTAYYTTGATA	Simon <i>et al.</i> , 2006
	C1-N2353	GCTCGTGTATCAACGTCTATWCC	Simon <i>et al.</i> , 2006
COI-CO	C1-J2195	TGATTCTTTGGWCACCCWGAAGT	Simon <i>et al.</i> , 2006
	C2-N3665	CCACAAATTTCTGAACATTG	Simon <i>et al.</i> , 2006
COII-ND3	C2-J3399	ACAATTGGTCAYCAATGATAYTG	Simon <i>et al.</i> , 2006
	N3-N5731	TTAGGGTCAAATCCRCAYTC	Simon <i>et al.</i> , 2006
ND5-ND4	N5-J7572	AAAGGGAATTTGAGCTCTTTTWTG	Simon <i>et al.</i> , 2006
	N4-N8727	AAATCTTTTRATTGCTTATTCWTC	Simon <i>et al.</i> , 2006
ND4-rrnL	N4-J8641x	CCAGAAGAACATAAACCATG	Simon <i>et al.</i> , 2006
	CB-N10608	CCAAGTARTGAWCCAAARTTTCA	Simon <i>et al.</i> , 2006
	N4-J-8944	GGAGCTTCAACATGAGCTTT	Simon <i>et al.</i> , 2006
	CB-N11010	TATCTACAGCRAATCCYCCYCA	Simon <i>et al.</i> , 2006
	28282-N4-F	GAAATAGGAGCTTCCACAT	—
	28282-N4-R	AAGTTAGAAGATAATGGAGAT	—
	CP1	GATGATGAAATTTTGGATC	Harry <i>et al.</i> , 1998
	12sai	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT	Simon <i>et al.</i> , 1994
rrnL-rrnS	LR-J12888	CCGGTTTGAACCTCARATCATGTAA	Simon <i>et al.</i> , 2006
	SR-N14745	GTGCCAGCAGYYGCGGTTANAC	Simon <i>et al.</i> , 2006
rrnS-CO	SR-J14610	ATAATAGGGTATCTAATCCTAGT	Simon <i>et al.</i> , 2006
	C1-N2353	GCTCGTGTATCAACGTCTATWCC	Simon <i>et al.</i> , 2006

接序列。用在线版的 tRNAscan-SE Search Server (Lowe and Eddy, 1997), 对 tRNA 基因进行注释并预测其二级结构, 大多数 tRNA 都可以得到, 个别 tRNA 需要和同源序列比对得到。蛋白质编码基因搜索在 GenBank 中进行。rRNA 基因是根据上下游基因位置以及与同源序列比对得到, 控制区位置是根据上下游基因得到。用 MEGA version 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) 计算三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜的核苷酸组成和密码子使用情况。

1.5 计算两种蚜虫的进化速率

用 DNASP version 5.0 (Librado and Rozas, 2009) 计算两种蚜虫的蛋白编码基因的简约信息位点 Pi (Parsimony-informative site); 基于非同义替换率 ka、同义替换率 ks、ka 与 ks 的比值 ka/ks 以及校正后的 Jka、Jks、Jka/Jks, 比较两种蚜虫的进化速率。

1.6 系统发育关系

利用本实验测得的 2 种毛蚜线粒体基因组数据以及从 GenBank 中下载的 10 种蚜虫线粒体基因组数据(表 2), 用 MAFFT version 7.037 (Katoh and Standley, 2013) 进行比对用于建树。本研究

采用贝叶斯 (BI) 法和最大似然法 (ML) 构建系统发育树, 分别在软件 MrBayes3.2 (Ronquist *et al.*, 2012) 和 RaxML8.0 (Stamatakis, 2006) 中运行。BI 分析用 Jmodel Test version 0.1.1 (Posada, 2008) 选择核苷酸替代模型。4 条马尔可夫链独立运行 (3 条热链 1 条冷链), 同时运行的独立分析次数为 2。运行 100 万代, 每 100 代取一次树, 舍弃前 25% 的树。

2 结果与分析

2.1 两个物种线粒体基因组的基本组成

研究获得了三角枫多态毛蚜 *P. acerihabitans* (图 1) 和针茅小毛蚜 *C. stipae* (图 2) 约 94% 的线粒体基因组数据, 长度分别为 14 908 bp 和 13 893 bp, 共获得 33 个基因: 包含接近完整的 13 个蛋白编码基因 (*nad5* 不全), 2 个 rRNA 基因, 18 个 tRNA 基因以及完整的控制区。基因排列顺序和祖先排列顺序一致, 正链编码 20 个基因, 包括 9 个 PCG (*coxI*、*cox2*、*atp8*、*atp6*、*cox3*、*nad3*、*nad6*、*cob*) 基因, 11 个 tRNA 基因 (*tRNA-Leu*、*tRNA-Lys*、*tRNA-Asp*、*tRNA-Gly*、*tRNA-Ala*、*tRNA-Arg*、*tRNA-Thr*、*tRNA-Ser*、*tRNA-Ile*、*tRNA-Trp*、*tRNA-Met*); 负链编码 13 个

表 2 本研究系统发育分析使用的物种和序列信息
Table 2 The species and related sequence information used in phylogenetic analysis in this study

种 Species	科 Family	亚科 Subfamily	GenBank 序列号 No. of GenBank	长度 (bp) Length (bp)
<i>Aphis gossypii</i>	Aphididae	Aphidinae	NC_024581	15 869
<i>Aphis glycines</i>	Aphididae	Aphidinae	KC840675	13 002
<i>Schizaphis graminum</i>	Aphididae	Aphidinae	AY531391	15 721
<i>Sitobion avenae</i>	Aphididae	Aphidinae	NC_024683	15 180
<i>Cavariella salicicola</i>	Aphididae	Aphidinae	NC_022682	16 317
<i>Diuraphis noxia</i>	Aphididae	Aphidinae	NC_022727	15 784
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Aphididae	Aphidinae	FJ411411	16 971
<i>Pterocomma pilosum</i>	Aphididae	Pterocommatinae	KC840676	15 477
<i>Cervaphis quercus</i>	Aphididae	Greenideinae	NC_024926	15 272
<i>Chaetosiphella stipae</i>	Aphididae	Chaitophorinae	KX822748	13 893
<i>Periphyllus acerihabitans</i>	Aphididae	Chaitophorinae	KX765172	14 908
<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>	Phylloxeridae		DQ021446	12 349

表 3 三角枫多态毛蚶和针茅小毛蚶线粒体基因组结构

Table 3 Organization of *Periphyllus acerihabitans* and *Chaetosiphella stipae* mitochondrial genomes

基因 Gene	编码链 Strand	位置 Position	长度 (bp) Length (bp)	反/起始密码子 Anti/Start codon	终止密码子 Stop codon	基因间隔 Intergenic nucleotides (bp)
<i>cox1</i>	J	1-1531/1-1531	1 531/1 531	ATA/ATT	T	0
<i>tRNA-Leu</i>	J	1532-1597/1532-1599	66/68	TAA		3
<i>cox2</i>	J	1601-2272/1603-2274	672/672	ATA	TAA	3/6
<i>tRNA-Lys</i>	J	2276-2348/2281-2353	73/73	CTT		4/0
<i>tRNA-Asp</i>	J	2353-2419/2354-2416	67/63	GTC		9
<i>Atp8</i>	J	2429-2578/2426-2575	150/150	ATA	TAA	- 20
<i>Atp6</i>	J	2559-3212/2556-3209	654/654	ATT	TAA	- 1/0
<i>cox3</i>	J	3212-3997/3210-3995	786/786	ATG	TAA	- 1
<i>tRNA-Gly</i>	J	3997-4057/3995-4057	61/63	TCC		- 3
<i>nad3</i>	J	4055-4411/4055-4411	357/357	ATA	TAA	1/5
<i>tRNA-Ala</i>	J	4413-4476/4417-4483	64/67	TGC		4
<i>tRNA-Arg</i>	J	4481-4547/4488-4554	67/67	TCG		44/38
<i>nad5</i>	N	4592-5594/4599-5220	1 003/622	ATT/ATA	T	45/38
<i>tRNA-His</i>	N	5640-5703/5259-5326	64/68	GTG		0
<i>nad4</i>	N	5704-7018/5327-6641	1 315/1 315	ATT	T	2
<i>nad4L</i>	N	7021-7311/6644-6934	291/291	ATG/ATA	TAA	1
<i>tRNA-Thr</i>	J	7313-7374/6936-7001	62/66	TGT		33/5
<i>tRNA-Pro</i>	N	7408-7471/7007-7074	64/68	TGG		4
<i>nad6</i>	J	7476-7967/7079-7570	492/492	ATA	TAA	- 1
<i>cob</i>	J	7967-9094/7570-8688	1 128/1 119	ATG	TAA	0/15
<i>tRNA-Ser</i>	J	9095-9159/8704-8770	65/67	TGA		8/17
<i>nad1</i>	N	9177-10112/8779-9714	936/936	ATT	TAA	0
<i>tRNA-Leu</i>	N	10113-10177/9715-9779	65/65	TAG		- 11/4
<i>rrnL</i>	N	10167-11441/9784-11053	1 275/1 270			1/0
<i>tRNA-Val</i>	N	11443-11505/11054-11117	63/64	TAC		1/5
<i>rrnS</i>	N	11507-12275/11123-11889	769/767			0
CR		12276-13480/11890-12498	1 205/609			0
<i>tRNA-Ile</i>	J	13481-13546/12499-12564	66/66	GAT		6/2/
<i>tRNA-Gln</i>	N	13553-13621/12567-12633	69/67	TTG		37/6
<i>tRNA-Met</i>	J	13659-13724/12640-12705	66/66	CAT		0
<i>nad2</i>	J	13725-14705/12706-13689	981/984	ATT	TAA	2
<i>tRNA-Trp</i>	J	14704-14770/13689-13755	67/67	TCA		- 8
<i>tRNA-Cys</i>	N	14763-14830/13748-13819	68/72	GCA		10/6
<i>tRNA-Tyr</i>	N	14841-14907/13826-13892	67/67	GTA		1

CR : 控制区 ; J : 正链 ; N : 反链 ; / 左边是三角枫多态毛蚶的内容 , 右边是针茅小毛蚶。下表同
CR : Control region ; J : Majority strand ; N : Minority strand ; / *P. acerihabitans* in left , *C. stipae* in right. The same below.

表 4 三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜线粒体基因组核苷酸组成分析

Table 4 Nucleotide composition of *Periphyllus acerihabitans* and *Chaetosiphella stipae* mitochondrial genome

基因 Gene	T 含量 (%) T	C 含量 (%) C	A 含量 (%) A	G 含量 (%) G	A+T 含量 (%) A+T%	AT 偏斜 AT-skew	GC 偏斜 GC-skew	长度 (bp) Length (bp)
Whole genome	46.6/46.4	7.4/8.5	38.4/37.1	7.7/8.0	85/84	- 0.096/ - 0.111	0.022/ - 0.026	14 908/13 893
Whole PCG	48.0/47.5	8.3/9.6	36.0/35.0	7.7/7.8	84/83	- 0.143/ - 0.151	- 0.039/ - 0.103	10 296/9 914
Whole tRNA	41.7/41.1	5.7/6.1	44.1/44.9	8.6/7.9	86/86	0.028/0.043	0.202/0.124	1 178/1 204
rRNA	44.6/44.7	5.2/4.9	40.4/40.2	9.8/10.3	85/85	- 0.050/ - 0.053	0.303/0.353	2 044/2 037
CR	43.1/45.2	4.6/7.4	48.0/43.3	4.3/4.1	91/89	0.055/ - 0.020	- 0.028/ - 0.286	1 205/609
<i>Atp6</i>	44.0/45.0	11.3/13.9	39.4/36.2	5.2/4.9	83/81	- 0.055/ - 0.107	- 0.370/ - 0.480	654/654
<i>Atp8</i>	46.7/48.0	4.0/7.3	48.7/44.0	0.7/0.7	95/92	0.021/ - 0.043	- 0.714/ - 0.833	150
<i>coxI</i>	42.3/40.4	12.3/14.4	35.1/34.8	10.3/10.5	77/75	- 0.093/ - 0.074	- 0.090/ - 0.158	1531
<i>cox2</i>	40.8/40.8	10.9/13.1	40.8/38.5	7.6/7.6	82/79	0.000/ - 0.028	- 0.177/ - 0.266	672
<i>cox3</i>	45.2/44.5	9.9/11.8	38.0/37.4	6.9/6.2	83/82	- 0.086/ - 0.087	- 0.182/ - 0.310	786
<i>cob</i>	44.4/43.3	10.0/12.0	37.1/36.5	8.4/8.2	82/80	- 0.089/ - 0.086	- 0.087/ - 0.186	1 128/1 119
<i>nad1</i>	54.6/54.7	5.8/5.4	30.3/28.8	9.3/11.0	85/84	- 0.286/ - 0.309	0.234/0.338	936
<i>nad2</i>	49.0/47.4	6.8/8.7	40.4/40.3	3.8/3.6	89/88	- 0.097/ - 0.080	- 0.288/ - 0.421	981/984
<i>nad3</i>	49.6/47.9	7.0/8.4	38.4/38.7	5.0/5.0	88/87	- 0.127/ - 0.107	- 0.163/ - 0.250	357
<i>nad4</i>	55.1/56.3	4.9/4.6	30.7/28.6	9.2/10.5	86/85	- 0.284/ - 0.327	0.301/0.394	1315
<i>nad4L</i>	56.4/56.4	2.7/2.4	33.7/33.3	7.2/7.9	90/90	- 0.252/ - 0.257	0.448/0.533	291
<i>nad5</i>	52.3/53.4	7.0/7.0	30.9/30.6	9.8/8.9	83/84	- 0.257/ - 0.271	0.167/0.120	1 003/627
<i>nad6</i>	45.1/46.7	7.3/7.7	43.9/42.1	3.7/3.5	89/89	- 0.014/ - 0.053	- 0.333/ - 0.382	492

毛蚜则分别为 92%和 75%。

三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜均使用 ATN 为起始密码子 (表 3)。三角枫多态毛蚜以 ATA、ATT、ATG 为起始密码子的蛋白编码基因的数量分别为 5、5、3, 针茅小毛蚜以 ATA、ATT、ATG 为起始密码子的蛋白编码基因的数量分别为 6、5、2。三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜的 *coxI*、*nad5*、*nad4L* 基因的起始密码子分别是 ATA/ATT、ATT/ATA、ATG/ATA。除此之外, 两种蚜虫的其他蛋白编码基因的起始密码子都相同; 终止密码子也一致, 都为 TAA 或 T, 终止密码子为 T 的基因是 *cox1*、*nad5* 和 *nad4*, 其余 10 个蛋白编码基因的终止密码子为 TAA。

2.3.2 密码子使用 三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜的密码子使用见表 5。除去终止密码子, 三角枫多态毛蚜包含 3 421 个密码子, 针茅小毛蚜

包含 3 294 个密码子。三角枫多态毛蚜使用频率排前 4 位的密码子是 UUA(Leu2)>AUU(Ile)>UUU(Phe)>AUA(Met), 出现次数分别是 470、464、416、283; 针茅小毛蚜使用频率排前 4 位的密码子是 AUU(Ile)>UUU(Phe)>UUA(Leu2)>AUA (Met), 出现的数量分别是 441、406、391、267。三角枫多态毛蚜使用频率排前 4 位的氨基酸是 Leu(L2)>Ile(I)>Phe(F)>Met(M), 4 种氨基酸分别占总氨基酸的 14.2%、14.2%、12.6%、8.8%, 共占总氨基酸的 49.8%。针茅小毛蚜使用频率排前 4 位的氨基酸是 Ile(I)>Phe(F)>Leu(L2)>Met(M), 4 种氨基酸分别占总氨基酸的 14.7%、13.4%、12.4%、8.1%, 共占总氨基酸的 48.6%。从使用频率较高的密码子组成来看, A、U 出现的频率最多, NNU 和 NNA 的 RSCU 几乎都大于 1, 表明密码子第 3 位点富含碱基 AT。

表 5 三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜的密码子使用
Table 5 Codon usage in mitogenome of *Periphyllus acerihabitans* and *Chaetosiphella stipae*

氨基酸 AA	密码子 Codon	Number	RSCU	氨基酸 AA	密码子 Codon	Number	RSCU
Phe(F)	UUU	416/406	1.93/1.84	His(H)	CAU	51/40	1.89/1.54
	UUC	15/35	0.07/0.16		CAC	3/12	0.11/0.46
Leu(L2)	UUA	470/391	5.43/4.94	Gln(Q)	CAA	49/44	1.96/1.91
	UUG	19/18	0.22/0.23		CAG	1/2	0.04/0.09
Leu(L1)	CUU	14/29	0.16/0.37	Asn(N)	AAU	264/235	1.83/1.71
	CUC	2/3	0.02/0.04		AAC	24/40	0.17/0.29
	CUA	14/33	0.16/0.42	Lys(K)	AAA	131/113	1.98/1.87
	CUG	0/1	0/0.01		AAG	1/8	0.02/0.13
Ile(I)	AUU	464/441	1.9/1.83	Asp(D)	GAU	42/37	1.79/1.68
	AUC	24/40	0.1/0.17		GAC	5/7	0.21/0.32
Met(M)	AUA	283/267	1.89/1.89	Glu(E)	GAA	62/56	1.91/1.87
	AUG	17/16	0.11/0.11		GAG	3/4	0.09/0.13
Val(V)	GUU	36/36	2.09/2.29	Cys(C)	UGU	23/20	1.84/1.74
	GUC	0/1	0/0.06		UGC	2/3	0.16/0.26
	GUA	33/25	1.91/1.59	Trp(W)	UGA	74/75	1.87/1.90
	GUG	0/1	0/0.06		UGG	5/4	0.13/0.10
Ser(S1)	UCU	79/80	2.37/2.40	Arg(R)	CGU	12/15	1.54/1.30
	UCC	3/7	0.09/0.21		CGC	0/0	0/0
	UCA	105/100	3.15/3.00		CGA	22/25	2.26/2.70
	UCG	0/0	0/0		CGG	2/0	0.21/0
Pro(P)	CCU	61/51	2.24/1.89	Ser(S2)	AGU	23/26	0.69/0.78
	CCC	5/12	0.18/0.44		AGC	0/1	0/0.03
	CCA	43/45	1.58/1.67		AGA	57/50	1.71/1.50
	CCG	0/0	0/0		AGG	0/3	0/0.09
Thr(T)	ACU	38/45	1.48/1.89	Gly(G)	GGU	50/42	1.56/1.32
	ACC	4/3	0.16/0.13		GGC	2/4	0.06/0.13
	ACA	61/47	2.37/1.98		GGA	64/69	2/2.17
	ACG	0/0	0/0		GGG	12/12	0.38/0.38
Ala(A)	GCU	33/31	1.86/1.88	Tyr(Y)	UAU	144/136	1.83/1.80
	GCC	3/5	0.17/0.30		UAC	13/15	0.17/0.20
	GCA	34/30	1.92/1.82				
	GCG	1/0	0.06/0				

Number：密码子使用的次数；RSCU：相对同义密码子使用频率。
Number：The number of codon usage; RSCU: Relative synonymous codon usage.

2.4 蛋白编码基因的进化速率

以粉毛蚜 *Pterocomma pilosum* 为参考, 计算三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜蛋白编码基因的简约信息位点 P_i , 得到了两种蚜虫的 k_a 、 k_s 、 k_a/k_s 值, 同时也得到了 Jukes-Cantor 校正的

Jka 、 Jks 、 Jka/Jks 值。由图 3 可知, 两种蚜虫的所有参数值都小于 1, 说明两种蚜虫的蛋白编码基因受纯化选择。针茅小毛蚜的 k_a/k_s 和 Jka/Jks 值都大于三角枫多态毛蚜的 k_a/k_s 和 Jka/Jks 值, 表明针茅小毛蚜的进化速率更高。

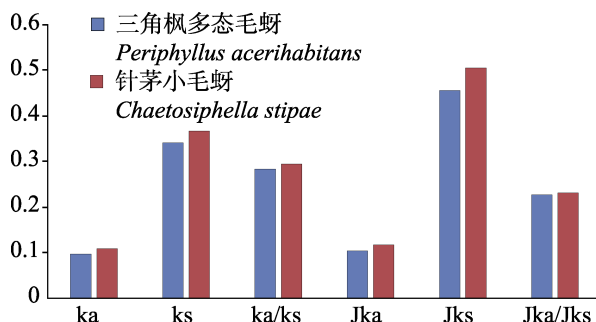


图3 三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜的进化速率

Fig. 3 Evolution rates of *Periphyllus acerihabitans* and *Chaetosiphella stipae*

X 轴表示两种蚜虫的进化速率参数, Y 轴表示进化速率参数值。ka: 非同义替换率; ks: 同义替换率; ka/ks: 非同义替换率与同义替换率的比率; Jka、Jks、Jka/Jks: Jukes-Cantor 矫正后的 ka, ks, ka/ks。

X-axis indicates the evolutionary rate parameters of two aphids, Y-axis indicates the evolution rate parameters value. ka: The rate of nonsynonymous substitutions; ks: The rate of synonymous substitutions; ka/ks: the ratio of ka/ks; Jka, Jks, Jka/Jks: The Jukes-Cantor adjusting ka, ks., ka/ks.

2.5 RNA 基因和控制区

2.5.1 tRNA 基因 三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜都获得了 18 个 tRNA 基因 (表 3), 长度分别是 1 178 bp 和 1 204 bp, A+T 含量分别是 85.7% 和 86% (表 4)。三角枫多态毛蚜 tRNA 基因长度范围是 61~73 bp, 针茅小毛蚜则是 63~73 bp。两种毛蚜 7 个 tRNA 基因位于负链上 (*tRNA-His*、*tRNA-Pro*、*tRNA-Leu*、*tRNA-Val*、*tRNA-Gln*、*tRNA-Cys*、*tRNA-Tyr*), 其余 11 个则位于正链上。

18 个 tRNA 基因的结构都为典型的三叶草型 (图 4, 图 5)。三角枫多态毛蚜的 *tRNA-Ala*、*tRNA-His*、*tRNA-Leu2*、*tRNA-Gln*、*tRNA-Tyr* 和 *tRNA-Met* 出现了 G-U 的非经典配对, 在 *tRNA-Asp*、*tRNA-Gly*、*tRNA-Leu1* 和 *tRNA-Pro* 中分别出现了 A-A、U-G、U-U、G-A 的非经典配对。针茅小毛蚜的 *tRNA-Ala*、*tRNA-His*、

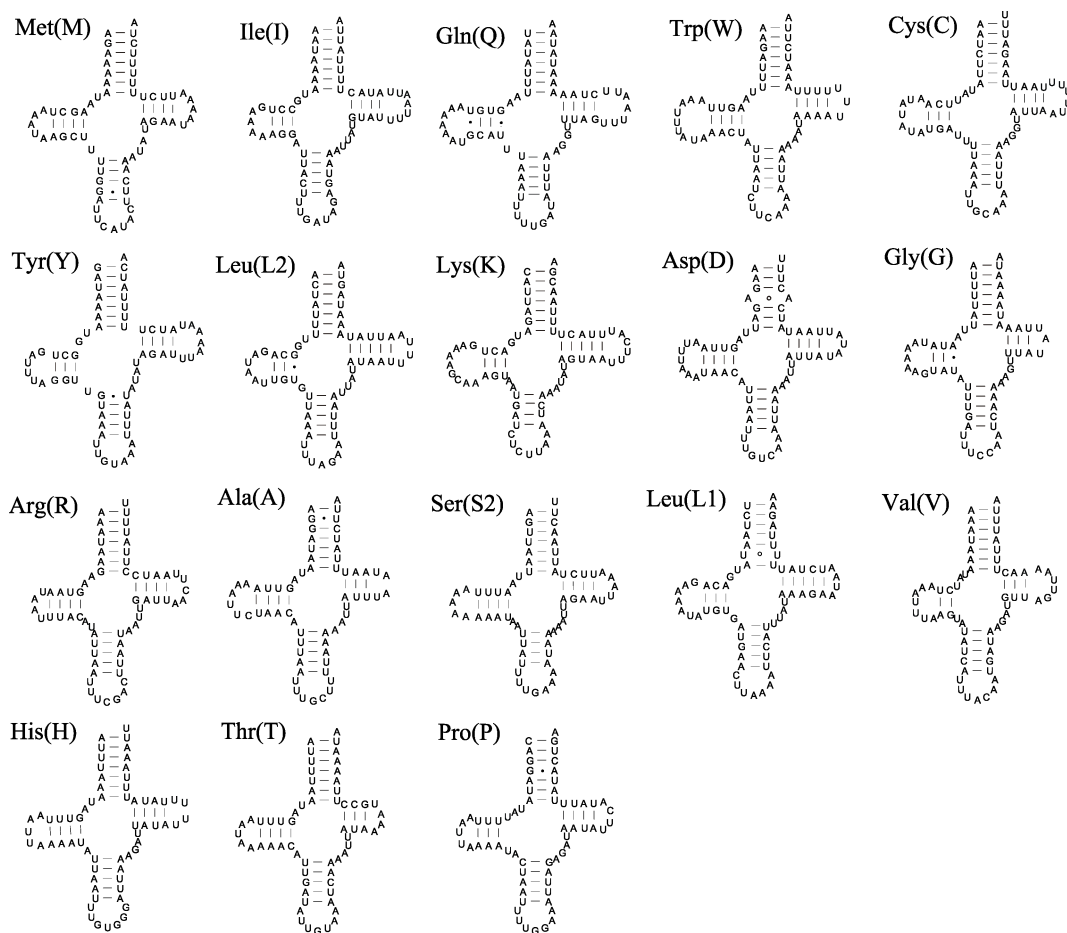


图4 三角枫多态毛蚜的 tRNA 二级结构

Fig. 4 The secondary structures of tRNA of *Periphyllus acerihabitans*

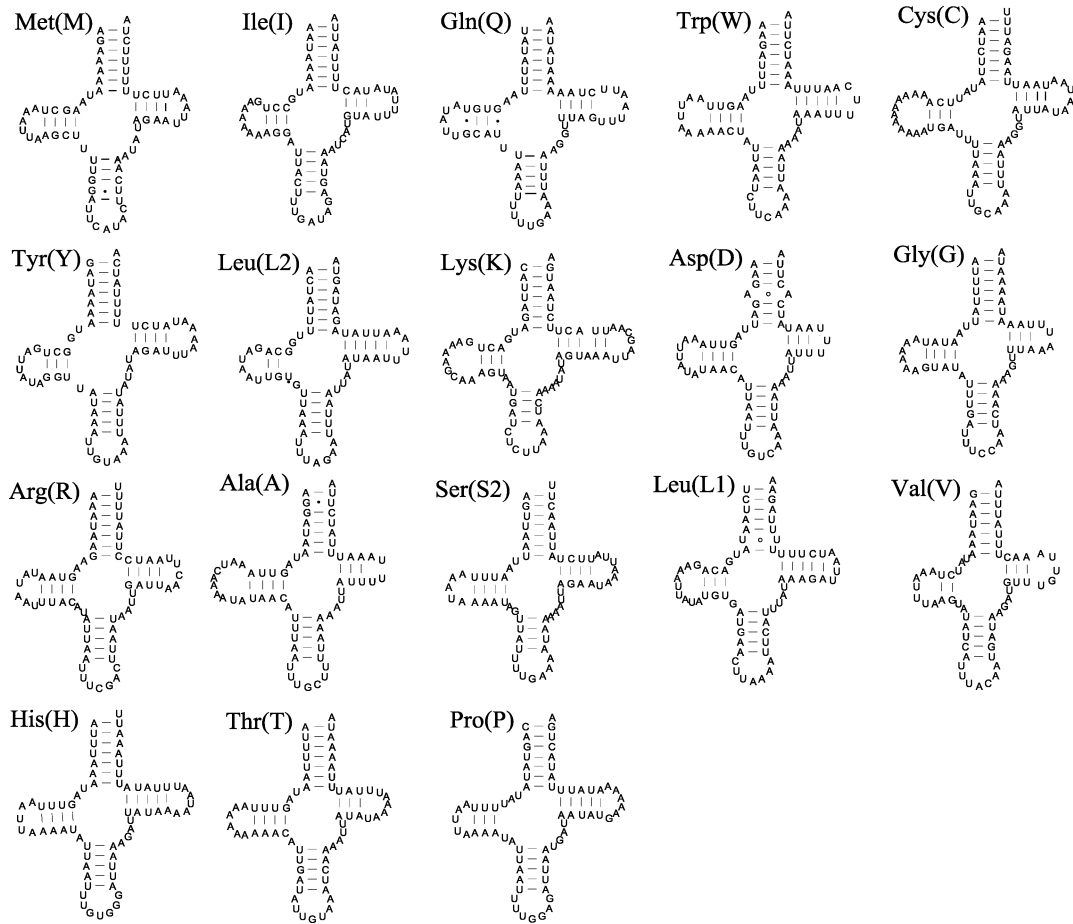


图5 针茅小毛蚜的 tRNA 二级结构

Fig. 5 The secondary structures of tRNA of *Chaetosiphella stipae*

tRNA-Leu2、*tRNA-Gln*、*tRNA-Tyr* 和 *tRNA-Met* 出现了 G-U 的非经典配对, 在 *tRNA-Asp*、*tRNA-Gly*、*tRNA-Leu1* 中分别出现了 A-A、U-G、U-U 的非经典配对。

2.5.2 rRNA 基因 三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜 *rrnL*、*rrnS* 基因都位于负链上。*rrnL* 基因位置是由上下游基因 *tRNA-Leu*、*tRNA-Val* 的位置以及与同源序列比对得到的, 而 *rrnS* 基因是由 *tRNA-Val* 和 control region 的位置以及与同源序列比对得到。三角枫多态毛蚜 *rrnL* 和 *rrnS* 的长度分别是 1 275 bp、769 bp, A+T 含量为 85%; 针茅小毛蚜则分别为 1 270 bp、767 bp, A+T 含量为 85%。

2.6 控制区

三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜均得到了完整的控制区, 长度分别为 1 205 bp 和 609 bp, 位

于 *rrnS* 和 *tRNA-Ile* 之间。三角枫多态毛蚜控制区 A+T 含量为 91.1%, 针茅小毛蚜控制区的 A+T 含量为 89%, 两种毛蚜控制区的 A+T 含量大于总 A+T 含量。三角枫多态毛蚜控制区长度比针茅小毛蚜控制区长 596 bp, 这也是引起两种蚜虫线粒体基因组长度差异的主要原因。

2.7 系统发育关系

基于本研究获得的两种毛蚜线粒体基因组数据, 结合 GenBank 中下载的 10 种蚜虫线粒体基因组数据 (表 2), 构建蚜科的系统发育关系框架。由于 *Aphis glycines*、*Pterocomma pilosum*、*Daktulosphaira vitifoliae* 缺少 *nad5* 基因, 且三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜只拿到了 *nad5* 基因的一部分 (分别为 1 003 bp 和 622 bp), 因此在系统发育分析时排除了 *nad5* 基因。以根瘤蚜科物种作为外群, 选择 12 个蛋白编码基因序列进行

分析, 构建了 BI 和 ML 系统发育树 (图 6), BI 分析中的核苷酸替代模型是 GTR+I+G。两种构树方法得到的拓扑结构一致, 因此将两棵树的信息整合到一棵树上。结果表明蚜科的单系性, 蚜亚科和毛蚜亚科的单系性都得到了支持; 在蚜科内部, 毛蚜亚科位于蚜科较基部的位罝; 在蚜亚科内部, *Cavariella salicicola* 和 *Pterocomma pilosum* 构成了姐妹群关系。

3 讨论

目前 Genbank 中已公布了 10 种蚜虫的完整线粒体基因组, 三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜均获得约 94% 的线粒体基因组数据, 未得到的序列位于 *nad3-nad5* 区域内, 包括 *nad5* 的部分序列以及 *nad5* 基因上游的 4 个 tRNA 基因, 尝试设计特异性引物、升高退火温度、扩增长片段等实

验方案扩增该片段, 但都失败了。分析失败的主要原因可能有以下几个方面: (1) 连续的 tRNA 基因, 其二级结构在扩增时很难打开; (2) *nad3~nad5* 区域内有很高的 AT 含量, 连续的 poly 结构导致测序很困难, 这也是半翅目昆虫普遍存在的问题 (Hua *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012); (3) 非特异性扩增, 该区域在扩增时曾多次扩增到同源性极高的序列, 分析可能是线粒体假基因 (Nuclear mitochondrial pseudogenes, Numts) (Hlaing *et al.*, 2009)。Numts 是在核基因组中发现的与线粒体基因组相似度极高的 DNA 片段, 一般是由线粒体基因组向核基因组转移的结果, 在真菌、无脊椎动物、脊椎动物、植物中都有线粒体假基因的存在或者内共生菌的同源序列 (Lopez *et al.*, 1994; Richly and Leister, 2004; Sacerdot *et al.*, 2008; Hazkani-Covo *et al.*, 2010)。

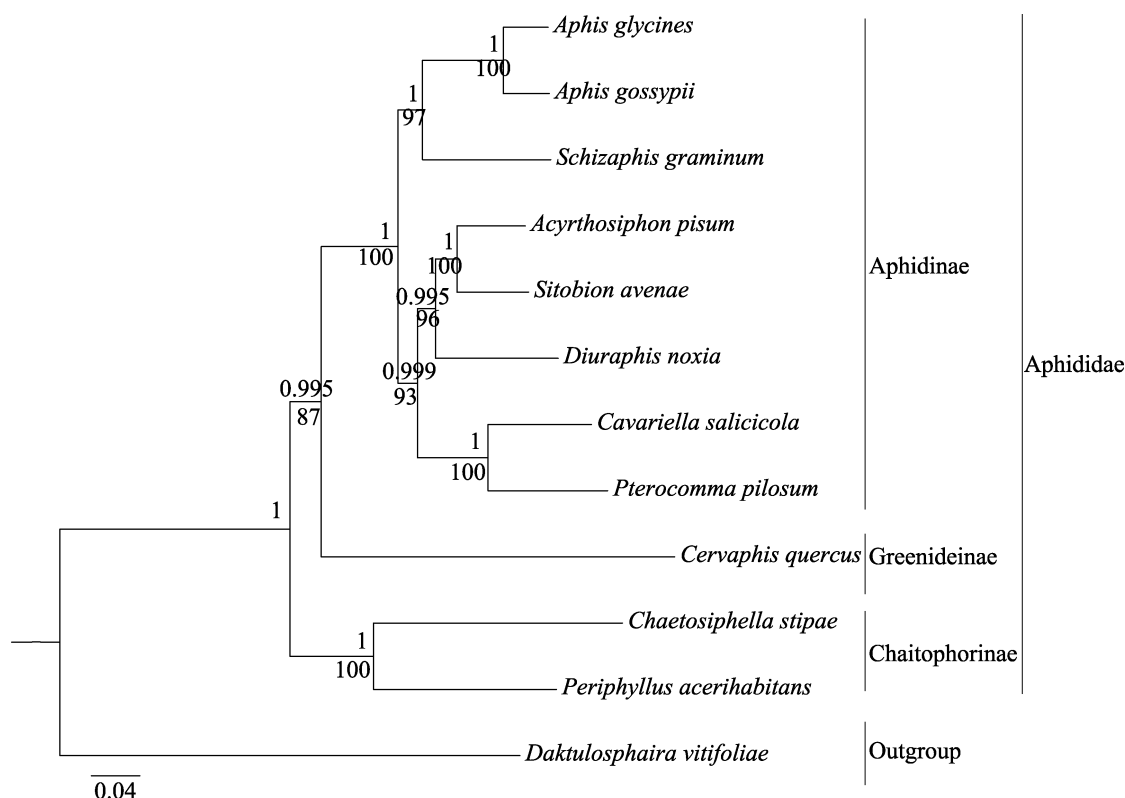


图 6 基于蚜虫线粒体基因组的 BI 与 ML 系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on mitochondrial genome data

两种构树方法得到的拓扑结构一致, 分支上方是 BI 树的后验概率, 下方是 ML 树的自举值。

Two methods, ML and BI showed similar topologies; the node support values above the branches are the BI posterior probabilities, the node support values below the branches are the ML bootstrap.

从获得的基因排列顺序来看, 两种蚜虫线粒体基因的排列顺序与祖先昆虫线粒体基因排列顺序一致 (Clary and Wolstenholme, 1985)。33 个基因的长度也在昆虫线粒体基因的长度范围内。基因间存在 26 处基因间隔区和重叠区, *atp8* 和 *atp6* 之间的重叠区高达 20 bp, 这也是蚜虫线粒体基因组普遍存在的特点 (Thao *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013, 2014, 2015;), 而在其他昆虫的线粒体基因组中, *atp8* 和 *atp6* 之间的重叠区一般都小于 10 bp (Du *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2016a, 2016b; Wei *et al.*, 2016)。

从核苷酸组成来看, 三角枫多态毛蚜和针茅小毛蚜的 A+T 含量分别是 85%、84%, 符合已报道蚜虫的 A+T 含量范围 (Wang *et al.*, 2013, 2015)。两种蚜虫的碱基组成与 A+T 含量基本一致。两种毛蚜的起始密码子是 ATN, 终止密码子完全一致为 TAA 或 T, 这也是在大多数昆虫中使用最普遍的起始密码子和终止密码子。从使用频率较高的密码子组成来看, A、U 出现的频率最多, NNU 和 NNA 的 RSCU 几乎都大于 1, 表明密码子第 3 位点富含碱基 AT。

通过计算 ka/ks 、 Jka/JKs 等参数比较两种蚜虫的进化速率, 针茅小毛蚜的 ka/ks 、 Jka/JKs 值均大于三角枫多态毛蚜, 表明针茅小毛蚜的进化速率较快。tRNA 是典型的三叶草结构, 长度范围为 61~73 bp, 存在碱基错配现象, 符合蚜虫类 tRNA 的特点。

基于蛋白编码基因构建的 BI 和 ML 系统发育树拓扑结构一致, 研究结果与之前的相关研究一致 (Wang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015), 仅蚜科、蚜亚科和毛蚜亚科的单系性得到支持, 蚜科内部的系统发育关系还有待扩大取样。增加分子数据, 并结合形态性状与生物学特征来较为全面的分析和探讨。尽管数据量有限, 但是本研究还是为基于线粒体基因组的蚜虫类系统发育研究积累了基础数据, 对蚜虫类系统发育关系的解析提供了支撑。

致谢: 感谢张斌为本研究采集蚜虫样品, 感谢陈睿、王渊、朱喜超在实验与数据分析过程中提供的帮助和交流指导, 感谢杨分地制作蚜虫玻片标本。

参考文献 (References)

- Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767–1780.
- Clary DO, Wolstenholme DR, 1985. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22(3): 252–271.
- Du BZ, Niu FF, Wei SJ, 2016. The complete mitochondrial genome of the predatory bug *Orius sauteri* (Poppius) (Hemiptera: Anthocoridae). *Mitochondrial DNA*, 27(1): 777–778.
- Favret C, 2016. Aphid species file. Version 5.0/5.0. <http://Aphid.SpeciesFile.org>.
- Hazkani-Covo E, Zeller RM, Martin W, 2010. Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes. *PLoS Genetics*, 6(2): e1000834.
- Hlaing T, Tun-Lin W, Somboon P, Socheat D, Setha T, Min S, Chang MS, Walton C, 2009. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genet*, 10(2): 11.
- Hua JM, Li M, Dong PZ, Cui Y, Xie Q, Bu WJ, 2008. Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of Pentatomomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *BMC Genomics*, 9(24): 610.
- Huang XL, Qiao GX, 2014. Aphids as models for ecological and evolutionary studies. *Insect Science*, 21(3): 247–250.
- Katoh K, Standley DM, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4): 772–780.
- Li H, Liu HY, Cao LM, Shi AM, Yang HL, Cai WZ, 2012. The Complete mitochondrial genome of the damselfly bug *Alloeorhynchus bakeri* (Hemiptera: Nabidae). *International Journal of Biological Sciences*, 8(1): 93–107.
- Li YQ, Chen J, Qiao GX, 2015. Complete mitochondrial genome of the aphid *Hormaphis betulae* (Mordvilko) (Hemiptera: Aphididae: Hormaphidinae). *Mitochondrial DNA*, DOI: 10.3109/19401736.2015.1118071.
- Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.
- Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, Modi W, O'Brien SJ, 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution*, 39(2): 174–190.
- Lowe TM, Eddy SR, 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, 25(5): 955–964.
- Niu FF, Fan XL, Wei SJ, 2016a. Complete mitochondrial genome of the *Grapholita dimorpha* Komai (Lepidoptera: Tortricidae). *Mitochondrial DNA*, 27(1): 775–776.
- Niu FF, Zhu L, Wang S, Wei SJ, 2016b. The mitochondrial genome of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* (Pallas) and a phylogenetic analysis of the polyphaga (Insecta:

- Coleoptera). *Mitochondrial DNA*, 27(4): 2725–2727.
- Ortiz-Rivas B, Martinez-Torres D, 2010. Combination of molecular data support the existence of three main lineages in the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) and the basal position of the subfamily Lachninae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(1): 305–317.
- Papasotiropoulos V, Tsiamis G, Papaioannou C, Ioannidis P, Klossa-Kilia E, Papapanagiotou AP, Bourtzis K, Kiliadis G, 2013. A molecular phylogenetic study of aphids (Hemiptera: Aphididae) based on mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 20(1): 195–207.
- Posada D, 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1253–1256.
- Qiao GX, 1996. Studies on the phylogeny of Hormaphididae, Thelaxidae, Chaitophoridae and Greenideidae etc. 7 families. Doctoral dissertation. Beijing: Institute of Zoology Academia Sinica. [乔格侠, 1996. 扁蚜科、群蚜科、毛蚜科及毛蚜科等七科系统发育研究. 博士学位论文. 北京: 中国科学院动物研究所.]
- Richly E, Leister D, 2004. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6): 1081–1084.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539–542.
- Sacerdot C, Casaregola S, Lafontaine I, Tekai F, Dujon B, Ozier-Kalogeropoulos O, 2008. Promiscuous DNA in the nuclear genomes of hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*, 8(6): 846–857.
- Stamatakis A, 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21): 2688–2690.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651–701.
- Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT, 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 37(1): 545–579.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739.
- Thao ML, Baumann L, Baumann P, 2004. Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids, and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). *BMC Evolutionary Biology*, 4(26): 25.
- Von Dohlen CD, Moran NA, 2000. Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71(4): 689–717.
- Wang Y, Chen J, Jiang LY, Qiao GX, 2015. The complete mitochondrial genome of *Mindarus keteleerifoliae* (Insecta: Hemiptera: Aphididae) and comparison with other Aphididae insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 30091–30102.
- Wang Y, Huang XL, Qiao GX, 2013. Comparative analysis of mitochondrial genomes of five aphid species (Hemiptera: Aphididae) and phylogenetic implications. *PLoS ONE*, 8(10): e77511.
- Wang Y, Huang XL, Qiao GX, 2014. The complete mitochondrial genome of *Cervaphis quercus* (Insecta: Hemiptera: Aphididae: Greenideinae). *Insect Science*, 21(3): 278–290.
- Wei SJ, Chen XX, 2011. Progress in research on the comparative mitogenomics of insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1572–1585. [魏书军, 陈学新, 2011. 昆虫比较线粒体基因组学研究进展. 应用昆虫学报, 48(6): 1572–1585.]
- Wei SJ, Niu FF, Du BZ, 2016. Rearrangement of trnQ-trnM in the mitochondrial genome of *Allantus luctifer* (Smith) (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Mitochondrial DNA*, 27(2): 856–858.
- Wieczorek K, Qiao GX, Sano M, Yoshitomi H, Kanturski M, 2016. Descriptions of little-known and unknown morphs of *Periphyllus acerihabitans* Zhang (Hemiptera: Aphididae: Chaitophorinae). *Zootaxa*, 4092(4): 583–592.
- Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllensten UB, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M, 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26(4): 375–400.
- Zhang B, Ma C, Edwards O, Fuller S, Kang L, 2014. The mitochondrial genome of the Russian wheat aphid *Diuraphis noxia*: Large repetitive sequences between trnE and trnF in aphids. *Gene*, 533(1): 253–260.
- Zhang B, Zheng J, Liang L, Fuller S, Ma CS, 2016a. The complete mitochondrial genome of *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). *Mitochondrial DNA*, 27(2): 945–946.
- Zhang GX, 1999. Fauna of Agriculture and Forestry Aphids of Northwest, China. Beijing: China Environmental Science Press. 1–563. [张广学, 1999. 西北农林蚜虫志. 北京: 中国环境科学出版社. 1–563.]
- Zhang GX, Zhong TS, 1983. Economic Insect Fauna of China. Fasc. 25. Homoptera: Aphidinea, Part 1. Beijing: Beijing Science Press. 1–138. [张广学, 钟铁森, 1983. 经济昆虫志 第二十五册: 同翅目 蚜虫类 (一). 北京: 北京出版社. 1–387.]
- Zhang S, Luo J, Wang C, Lv L, Li C, Jiang W, Cui J, Rajput LB, 2016b. Complete mitochondrial genome of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Mitochondrial DNA*, 27(2): 854–855.