毛蚜属 *Chaitophorus* 蚜虫（半翅目：蚜科：毛蚜亚科）与初级内共生菌 *Buchnera* 的演化关系*

杨 雪[1, 2**] 姜立云[1] 陈 静[1***] 乔格侠[1, 2***]

（1. 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；
2. 中国科学院大学生命科学学院，北京 100049）

摘 要 **【目的】** 蚜虫体内共生菌种类丰富，二者关系十分密切。几乎所有蚜虫都具有一类专性的初级内共生菌 *Buchnera aphidicola*，二者的专性共生关系使蚜虫-*Buchnera* 成为研究共生关系演化的理想模型。本研究对蚜虫-*Buchnera* 在低级阶元水平上的“平行演化假说”进行了验证。**【方法】** 选取在杨属 *Populus* 或柳属 *Salix* 植物上营同寄主全周期生活的毛蚜属 *Chaitophorus* 蚜虫作为研究对象，基于不同来源的分子标记（蚜虫线粒体基因、核基因和内共生菌基因），运用最大似然法和贝叶斯法重建蚜虫和 *Buchnera* 的系统树，并利用 TreeMap、Jane 和 ParaFit 检验二者是否具有协同系统发生关系。**【结果】** TreeMap 和 Jane 分析检测到毛蚜属蚜虫与 *Buchnera* 具有显著的共成种信号，ParaFit 分析结果表明二者的总体关联极为显著。**【结论】** 毛蚜属蚜虫与其初级内共生菌 *Buchnera* 在种级及以下水平上符合“平行演化假说”，并且二者的演化关系不会受到寄主植物差异的影响。

关键词 蚜虫，*Buchnera*，共生菌，系统发育，平行演化

Study of the evolutionary relationship between *Chaitophorus* aphids and their primary endosymbiont *Buchnera* (Hemiptera: Aphididae: Chaitophorinae)

YANG Xue[1, 2**] JIANG Li-Yun[1] CHEN Jing[1***] QIAO Ge-Xia[1, 2***]

(1. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract **[Objectives]** Aphids harbor various symbionts, all of which have a close endosymbiotic relationship with their hosts. For example, almost all aphids harbor an obligatory primary endosymbiont, *Buchnera aphidicola*. Due to this almost universal, obligate, endosymbiotic relationship, *Buchnera* is an ideal model for studying the evolution of mutualism. This study tested the parallelism hypothesis between aphids and *Buchnera*. **[Methods]** Species from the aphid genus *Chaitophorus*, which are monocious and holocyclic on *Populus* and *Salix*, were chosen for study. We reconstructed the phylogenies of *Chaitophorus* and *Buchnera* based on different kinds of molecular markers (i.e., mitochondrial and nuclear genes of aphids and genes derived from *Buchnera*), using both maximum likelihood and Bayesian methods. The phylogenetic congruence between aphids and *Buchnera* was tested with TreeMap, Jane and ParaFit. **[Results]** TreeMap and Jane analyses confirmed a significant pattern of cophylogeny between *Chaitophorus* and *Buchnera*. ParaFit analyses indicated that their overall correlation was extremely significant. **[Conclusion]** Our results provide strong evidence for the parallel evolution of

*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：yangxue315@mails.ucas.ac.cn

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

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

Chaitophorus and *Buchnera* at the intraspecific, and interspecific, and taxonomic levels. In addition, the evolutionary relationships between *Chaitophorus* and *Buchnera* are not affected by host plants.

Key words Aphids, *Buchnera*, symbiont, phylogeny, parallel evolution

蚜虫类隶属于半翅目 Hemiptera，包括卵胎生的蚜科 Aphididae 以及卵生的球蚜 Adelgidae 和根瘤蚜科 Phylloxeridae，世界已知 5 000 余种，大多数蚜虫物种生活在北半球的温带和亚热带地区（Heie，1994；Remaudière and Remaudière，1997；Blackman and Eastop，2000；Favret，2016）。蚜虫体内具有一类专性初级内共生菌 *Buchnera aphidicola*，对维持蚜虫的营养代谢、生长繁殖具有重要作用（Buchner，1965；Douglas and Prosser，1992；Baumann *et al.*，1995；Nakabachi and Ishikawa，1997）。此外，蚜虫还感染多种次级共生菌，这些次级共生菌能够提高蚜虫对环境的耐受性和适合度（Montllor *et al.*，2002；Tsuchida *et al.*，2002；Oliver *et al.*，2005；Scarborough *et al.*，2005）。

Buchnera aphidicola 隶属于变形菌门 Proteobacteria、γ-变形菌纲 Gammaproteobacteria、肠杆菌科 Enterobacteriaceae 布赫纳氏属 *Buchnera* Muson，Baumann & Kinsey，是该属唯一的物种，仅生活于蚜虫特化的含菌胞内（Unterman *et al.*，1989；Munson *et al.*，1991a）。蚜虫与 *Buchnera* 之间严格专性共生，二者在营养代谢方面紧密关联，*Buchnera* 从宿主蚜虫体内获取营养物质，并为蚜虫提供其生长繁殖所必需但自身无法合成的氨基酸与维生素（Nakabachi and Ishikawa，1999；McCoy *et al.*，2005；Nieberding and Olivieri，2007）。*Buchnera* 在蚜虫亲代和子代之间垂直传播，由亲代的卵巢传至正在发育的卵或胚胎中（Harrison *et al.*，1989；Brough and Dixon，1990）。二者的共生关系可能起源于 160~280 百万年前的一次独立侵染事件（Munson *et al.*，1991b；Moran *et al.*，1993）。

共生关系一直是生态学与进化学领域的研究热点，对于理解生物间关系的演化具有重要意义（黄晓磊等，2011）。蚜虫与 *Buchnera* 是研究共生关系演化的理想模型。Munson 等（1991b）、Moran 等（1993）基于蚜科 Aphididae 的有限类群提出蚜虫-*Buchnera* 平行演化假说（Parallelism hypothesis）。然而，随着取样量、分子标记和分析方法的不断完善，越来越多的研究发现蚜虫与 *Buchnera* 的系统发育格局并非总是一致（van Ham *et al.*，1997；Martinez-Torres *et al.*，2001；Pérez-Brocal *et al.*，2006）。黄晓磊等（2011）综述了蚜虫-*Buchnera* 进化关系的研究进展，并提出二者在低级阶元水平上具有系统发育一致性，而在高级阶元水平上可能并不存在平行演化关系，这对“平行演化假说”提出了质疑。在低级阶元水平上，蚜虫-*Buchnera* 共生关系研究主要集中于瘿绵蚜族 Pemphigini（Liu *et al.*，2014）、短尾蚜属 *Brachycaudus* van der Goot（Jousselin *et al.*，2009）、指网管蚜属 *Uroleucon* Mordvilko（Clark *et al.*，2000；Funk *et al.*，2000）、声毛管蚜属 *Mollitrichosiphum* Suenaga（Liu *et al.*，2013）以及豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* (Harris)（Peccoud *et al.*，2009a，2009b）等族级、属级、种级阶元水平上。研究结果均支持蚜虫与 *Buchnera* 在低级阶元水平具有平行演化关系。

在共生体系中，生态因子可能对共生关系产生直接或间接的影响（Guay *et al.*，2009；Anbutsu and Fukatsu，2011）。Liu 等（2013，2014）分别以具有多样化寄主植物、营同寄主全周期生活的声毛管蚜属，以及仅在杨属 *Populus* 植物上诱导形成虫瘿或伪虫瘿、营异寄主全周期生活的瘿绵蚜属 *Pemphigus* Harting 及其近缘属为研究对象，探讨了具有不同生物学背景的蚜虫与其初级内共生菌 *Buchnera* 之间的演化关系，研究结果表明二者的平行演化关系并未受到寄主植物或虫瘿这一隔离生境的影响。

毛蚜属 *Chaitophorus* Koch 隶属于毛蚜亚科 Chaitophoridae 毛蚜族 Chaitophorini，世界已知

110 余种，中国记录 36 种（张广学等，1999；Favret，2016）。该属蚜虫广泛分布于全北区（Blackman and Eastop，1994），在杨柳科 Salicaceae 杨属 *Populus* 或柳属 *Salix* 植物上营同寄主全周期生活，主要取食植物嫩叶和嫩梢，个别北美物种寄生于植物根部或树干上（Richards，1972；张广学等，1999）。

鉴于毛蚜属物种寄主专一性强、物种多样性丰富、营同寄主全周期生活等特性，本研究以该属蚜虫为研究对象，基于蚜虫线粒体基因、核基因以及内共生菌基因，运用最大似然法和贝叶斯法重建并比较了毛蚜属蚜虫与其初级内共生菌 *Buchnera* 的系统发育树，检验了二者的系统发生关系一致性，探讨了寄主植物对毛蚜属与 *Buchnera* 演化关系的影响。

1 材料与方法

1.1 研究样品的选择

本研究所用样品的相关信息见表 1。其中，内群包括毛蚜属 16 种 38 号样品。对于蚜虫类群，外群选取京枫多态毛蚜 *Periphyllus diacervorus* Zhang、栾多态毛蚜 *Periphyllus koelreuteriae* (Takahashi) 以及弯刺三毛蚜 *Trichaitophorus recurvispinus* Hille Ris Lambers & Basu。对于共生菌 *Buchnera*，选取大肠杆菌 *Escherichia coli*、肺炎杆菌 *Klebsiella pneumoniae* 和肠道沙门氏菌 *Salmonella enterica* 作为外群。

所有蚜虫样品在野外采集时保存在 75%和 95%乙醇液体中，室内置于 －20°C 低温保存，分别用于凭证标本制作、形态鉴定和分子实验。在光学显微镜下基于玻片标本鉴定蚜虫物种。所有液浸标本和玻片凭证标本均保存于中国科学院动物研究所国家动物博物馆（中国，北京）。

1.2 目的片段的获取

采用动物组织 DNA 提取试剂盒（QIAGEN，Germany）提取蚜虫总 DNA。蚜虫的分子标记选取核基因翻译延伸因子 1α 基因（EF-1α）和线粒体细胞色素氧化酶Ⅰ亚基基因（COⅠ）、Leu-tRNA 与细胞色素氧化酶Ⅱ亚基基因（tRNA-COⅡ）以及细胞色素 b 基因（Cytb）。初级内共生菌 *Buchnera* 的分子标记选取 ATP 合成酶 β-亚基基因（atpD）、6 磷酸葡萄糖脱氢酶基因（gnd）、色氨酸合成酶 β 亚基基因（trpB）以及 16S 核糖体 DNA 基因（16S rDNA）。各分子标记的引物序列见表 2。

表 1 本研究所用样品信息

Table 1 Information of aphid and bacteria samples used in this study

物种名 Species	标本号 Voucher	采集地 Location	寄主植物 Host plant	GenBank 登录号 GenBank accessions	
				COⅠ/tRNA-COⅡ/Cytb/EF-1α	atpD/gnd/trpB/16S rDNA
Chaitophorus capreae (Mosley, 1841)	21279	中国吉林延边州	柳	KX620547/KX645846/KX620588/KX645805	KX620658/KX620694/KX620731/KX620629
Chaitophorus indicus Ghosh, Ghosh & Raychaudhuri, 1970	13505	中国西藏波密县	杨	KX620551/KX645850/KX620592/KX645809	KX620662/KX620698/KX620735/KX620633
Chaitophorus inouyei Hille Ris Lambers, 1976	33090	中国陕西西安市	杨	KX620550/KX645849/KX620591/KX645808	KX620661/KX620697/KX620734/KX620632
白曲毛蚜 *Chaitophorus leucomelas* Koch, 1854	20003	中国新疆塔城市	杨	KX620524/KX645823/KX620565/KX645784	KX620642/KX620671/KX620709/KX620606
白曲毛蚜 *Chaitophorus leucomelas* Koch, 1854	27142	俄罗斯圣彼得堡	杨	KX620525/KX645824/KX620566/KX645785	KX620643/KX620672/KX620710/KX620607
白曲毛蚜 *Chaitophorus leucomelas* Koch, 1854	28717	中国内蒙古巴彦淖尔市	小叶杨	KX620526/KX645825/KX620567/KX645786	KX620644/KX620673/KX620711/KX620608

续表 1 (Table 1 continued)

物种名 Species	标本号 Voucher	采集地 Location	寄主植物 Host plant	GenBank 登录号 GenBank accessions	
				CO Ⅰ/tRNA-CO Ⅱ/Cytb/EF-1α	atpD/gnd/trpB/16S rDNA
白曲毛蚜 *Chaitophorus leucomelas* Koch, 1854	31119	中国河北承德市	杨	KX620527/KX645826/KX620568/KX645787	KX620645/KX620674/KX620712/KX620609
白曲毛蚜 *Chaitophorus leucomelas* Koch, 1854	31213	中国四川雅安市	杨	KX620528/KX645827/KX620569/KX645788	KX620646/KX620675/KX620713/KX620610
Chaitophorus nigricantis nigricantis Pintera, 1987	31725	中国陕西宝鸡市	灰叶柳	KX620530/KX645829/KX620571/KX645790	KX620648/KX620677/KX620715/KX620612
Chaitophorus nigricantis nigricantis Pintera, 1987	32298	中国吉林长春市	柳	KX620531/KX645830/KX620572/KX645791	KX620649/KX620678/KX620716/KX620613
Chaitophorus nigricantis nigricantis Pintera, 1987	34141	中国青海门源县	柳	KX620532/KX645831/KX620573/KX645792	KX620650/KX620679/KX620717/KX620614
白杨毛蚜 *Chaitophorus populeti* (Panzer, 1801)	15653	中国贵州道真县	杨	KX620534/KX645833/KX620575/KX645794	-/KX620681/KX620719/KX620616
白杨毛蚜 *Chaitophorus populeti* (Panzer, 1801)	17709	中国黑龙江密山市	杨	KX620535/KX645834/KX620576/KX645795	-/KX620682/KX620720/KX620617
白杨毛蚜 *Chaitophorus populeti* (Panzer, 1801)	23661	中国新疆阿克苏市	白杨	KX620536/KX645835/KX620577/KX645796	-/KX620683/KX620721/KX620618
白杨毛蚜 *Chaitophorus populeti* (Panzer, 1801)	28112	中国宁夏六盘山	白杨	KX620537/KX645836/KX620578/KX645797	-/KX620684/KX620722/KX620619
白杨毛蚜 *Chaitophorus populeti* (Panzer, 1801)	33104	中国陕西西安市	毛白杨	KX620538/KX645837/KX620579/KX645798	-/KX620685/-/KX620620
白毛蚜 *Chaitophorus populialbae* (Boyer de Fonscolombe, 1841)	16587	中国新疆吉木乃县	杨	KX620539/KX645838/KX620580/KX645799	KX620651/KX620686/KX620723/KX620621
Chaitophorus pruinosae Narzikulov, 1954	20070	中国新疆阜康市	胡杨	KX620548/KX645847/KX620589/KX645806	KX620659/KX620695/KX620732/KX620630
Chaitophorus pruinosae Narzikulov, 1954	28773	中国内蒙古额济纳旗达镇	胡杨	KX620549/KX645848/KX620590/KX645807	KX620660/KX620696/KX620733/KX620631
Chaitophorus saliapterus quinquemaculatus Bozhko, 1976	13793	中国新疆尼勒克市	胡杨	KX620529/KX645828/KX620570/KX645789	KX620647/KX620676/KX620714/KX620611
柳黑毛蚜 *Chaitophorus saliniger* Shinji, 1929	25009	中国陕西西安市	柳	KT237841*/KX645842/KT236787*/KT238323*	KX620655/KX620690/KX620727/KX620625
柳黑毛蚜 *Chaitophorus saliniger* Shinji, 1929	26680	中国浙江杭州市	柳	KX620544/KX645843/KX620585/KX645803	-/KX620691/KX620728/KX620626
柳黑毛蚜 *Chaitophorus saliniger* Shinji, 1929	27541	中国北京中国科学院生物物理所	柳	KX620545/KX645844/KX620586/KX645804	KX620656/KX620692/KX620729/KX620627
柳黑毛蚜 *Chaitophorus saliniger* Shinji, 1929	30494	中国云南昆明市	柳	KT237859*/KX645845/KT236805*/KT238341*	KX620657/KT237272*/KX620730/KX620628
切毛蚜 *Chaitophorus truncatus* (Hausmann, 1802)	21332	韩国乌山市	柳	KX620552/KX645851/KX620593/KX645810	KX620663/KX620699/KX620736/KX620634

续表 1 (Table 1 Continued)

物种名 Species	标本号 Voucher	采集地 Location	寄主植物 Host plant	GenBank 登录号 GenBank accessions	
				CO Ⅰ/tRNA-CO Ⅱ/Cytb/EF-1α	atpD/gnd/trpB/16S rDNA
切毛蚜 *Chaitophorus truncatus* (Hausmann, 1802)	24796	蒙古国	柳	KX620553/KX645852/KX620594/KX645811	KX620664/KX620700/KX620737/KX620635
Chaitophorus sp. 1	13647	中国新疆乌鲁木齐市	杨	KX620559/KX645858/KX620600/KX645817	-/KX620706/KX620738/KX620641
Chaitophorus sp. 2	17556	中国辽宁鞍山市	柳	KX620560/KX645859/KX620601/KX645818	-/KX620707/KX620739/-
Chaitophorus sp. 2	28403	中国北京奥林匹克公园	柳	KX620561/KX645860/KX620602/KX645819	KX620670/KX620708/KX620740/-
Chaitophorus sp. 3	14280	中国河北承德市	杨	KX620533/KX645832/KX620574/KX645793	-/KX620680/KX620718/KX620615
Chaitophorus sp. 4	27417	中国内蒙古呼和浩特市	杨	KX620540/KX645839/KX620581/KX645800	KX620652/KX620687/KX620724/KX620622
Chaitophorus sp. 4	30858	中国河北张家口市	杨	KX620541/KX645840/KX620582/KX645801	KX620653/KX620688/KX620725/KX620623
Chaitophorus sp. 4	31589	中国甘肃定西市	杨	KX620542/KX645841/KX620583/KX645802	KX620654/KX620689/KX620726/KX620624
Chaitophorus sp. 5	14070	中国青海德令哈市	杨	KX620558/KX645857/KX620599/KX645816	KX620669/KX620705/-/KX620640
Chaitophorus sp. 5	22328	中国吉林长白山	小叶杨	KX620554/KX645853/KX620595/KX645812	KX620665/KX620701/-/KX620636
Chaitophorus sp. 5	27326	中国内蒙古阿拉善左旗	山杨	KX620555/KX645854/KX620596/KX645813	KX620666/KX620702/-/KX620637
Chaitophorus sp. 5	33181	中国北京门头沟百花山	杨	KX620556/KX645855/KX620597/KX645814	KX620667/KX620703/-/KX620638
Chaitophorus sp. 5	34139	中国青海门源县	加杨	KX620557/KX645856/KX620598/KX645815	KX620668/KX620704/-/KX620639
京枫多态毛蚜 *Periphyllus diacerivorus* Zhang, 1982	33202	中国北京门头沟百花山	五角枫	KX620562/KX645861/KX620603/KX645820	
栾多态毛蚜 *Periphyllus koelreuteriae* Takahashi, 1919	27400	中国北京中国林业科学院	栾树	KX620563/KX645862/KX620604/KX645821	
弯刺三毛蚜 *Trichaitophorus recurvispinus* Hille Ris Lambers & Basu	14764	中国福建武夷山	五裂槭	KX620564/KX645863/KX620605/KX645822	
大肠杆菌 *Escherichia coli*					V00267*/U00096*/JW1253*/J01859*
肺炎杆菌 *Klebsiella pneumoniae*					CP015822*/CP000964*/CP014647*/X87276*
肠道沙门氏菌 *Salmonella enterica*					CP012151*/CP015157*/CP007484*/CP002099*

*序列下载自 GenBank。

* Sequences downloaded from GenBank.

表 2　分子标记及引物序列
Table 2　Molecular markers and primers used in this study

类别 Type	基因 Gene	引物名称 Primers	正反向引物序列 Sequences (5′-3′)	参考文献 References
蚜虫线粒体基因	CO Ⅰ	LepF	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	Foottit *et al*., 2008
	CO Ⅰ	LepR	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	Foottit *et al*., 2008
	CO Ⅰ	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer *et al*., 1994
	CO Ⅰ	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer *et al*., 1994
	tRNA-CO Ⅱ	2993+	CATTCATATTCAGAATTACC	Stern, 1994
	tRNA-CO Ⅱ	A3772	GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT	Normark, 1996
	Cytb	CP1	GATGATGAAATTTTGGATC	Harry *et al.*, 1998
	Cytb	CP2	CTAATGCAATAACTCCTCC	Harry *et al.*, 1998
	Cytb	CB2	ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	Jermiin and Crozier, 1994
蚜虫核基因	EF-1α	EF3	GAACGTGAACGTGGTATCAC	von Dohlen *et al.*, 2002
	EF-1α	EF2	ATGTGAGCAGTGTGGCAATCCAA	Palumbi, 1996
	EF-1α	EF6	TGACCAGGGTGGTTCAATAC	von Dohlen *et al.*, 2002
Buchnera 基因	atpD	149-156	CGGGGATCCTGCAGTTTGGWGGWGCW GGWGTWGGWAAAAC	Clark *et al*., 1993
	atpD	309-308	CGGGGATCCGTCGACGCATCWARATGW GCAAAWGTWGTWGCWGG	Clark *et al*., 1993
	gnd	BamHI	CGCGGATCCGGWCCWWSWATWATGCC WGGWGG	Clark *et al.*, 1999
	gnd	ApaI	CGCGGGCCCGTATGWGCWCCAAAATAA TCWCKTTGWGCTTG	Clark *et al.*, 1999
	trpB	trpB102F	GG(TA)CC(AG)CATCCCTATCC	Rouhbakhsh *et al*, 1996
	trpB	trpB582R	CC(AT)CCACC(AT)ACACATGC	Rouhbakhsh *et al*, 1996
	16S rDNA	8-30	AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTG	Van Ham *et al.*, 1997
	16S rDNA	1507-1484	TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG	Van Ham *et al.*, 1997

PCR 扩增体系为 30 μL，包括 20 μL ddH_2O、0.4 μL *Taq* DNA 聚合酶、3 μL 10 × buffer、2.4 μL dNTPs 以及正反向引物各 0.6 μL。反应条件如下：94~95°C 预变性 5 min；94~95°C 变性 20 s~5 min，42~54°C 退火 30 s~1 min，72°C 延伸 45 s~2 min，35~40 个循环；最后 72°C 终延伸 7~10 min。PCR 产物纯化后直接测序。部分 PCR 产物使用 pMD19-T 载体（大连宝生物工程有限公司）进行克隆，每号样品选取至少 3 个阳性克隆进行测序。测序仪为 ABI 3730（Applied BioSystem，USA）。

1.3　序列分析与系统发育关系重建

利用 SeqMan Ⅱ（DNASTAR，Inc.，1996）校对并拼接序列，人工修正误读碱基，同时去除上下游引物。将蛋白质编码基因翻译为氨基酸序列，以验证基因序列的准确性。使用 ClustalX 2.1（Thompson *et al.*，1997）进行多序列比对。利用 Gblocks v.0.91b（Talavera and Castresana，2007）删除比对结果不佳的区域。使用 Mega 6.0.6（Tamura *et al*.，2013）统计各比对序列的长度、可变位点和简约信息位点的数目，并计算各序列的核苷酸组成。

基于蚜虫 CO Ⅰ/tRNA-CO Ⅱ/Cytb/EF-1α 联合基因数据集和 *Buchnera* atpD/gnd/trpB/16S rDNA 联合基因数据集，使用最大似然法（Maximum likelihood，ML）和贝叶斯法（Bayesian inference，BI）分别构建蚜虫与

Buchnera 的系统发育树。基于 BIC 信息准则（Schwarz，1978），运用 jModelTest 2.1.7（Darriba，2012）计算各基因的最优核苷酸替代模型。CO Ⅰ、tRNA-CO Ⅱ、Cytb、EF-1α、atpD、gnd、trpB 和 16S rDNA 基因序列的最优进化模型分别为：HRY+I+G、TIM3+I+G、TIM2+I+G、TrNef+G、TPM2uf+I+G、TPM1uf+G 、TIM3+G 和 TPM3uf+I 。应用 RAxML 8.1.20（Stamatakis *et al.*，2006）构建最大似然树，并进行 1 000 次 bootstrap 重抽样检验（Felsenstein，1985）。应用 MrBayes 3.2.2（Ronquist and Huelsenbeck，2003）构建贝叶斯树，每 100 代进行 1 次抽样，经过 1 000 000 和 3 000 000 代, 蚜虫和 *Buchnera* 数据集的马尔可夫链分别达到收敛状态，舍弃前 25%老化样本，基于剩余树构建合一树并计算分支后验概率（Posterior probability，PP）。

1.4 协同系统发生检验

使用基于系统发育树拓扑结构的 TreeMap 3.0（Charleston，2011）、Jane 4（Conow *et al.*，2010）和基于遗传距离的 ParaFit（Legendre *et al.*，2002）来检验毛蚜属蚜虫及其内共生菌 *Buchnera* 的平行演化。系统发育树采用蚜虫和 *Buchnera* 的多基因联合 ML 树（不含外群）。

TreeMap（Page，1994）基于共生菌与宿主蚜虫的系统发育树构建信息调和树，计算共生菌与宿主共同成种以及共生菌独立成种、丢失、寄主转移 4 类事件的发生次数，寻找具有最多共同成种事件的最优解集合。本研究运用基于丛林算法（Jungles algorithm）的 TreeMap 3.0（Charleston and Robertson，2002）构建宿主与共生菌间个体联系的调和树，考虑所有协同系统发生事件，评估二者间的系统发育关系一致性。

在 Jane 分析中，依据 Charleston 罚分准则（Charleston，1998），使用启发式搜索评估共生菌与宿主共同成种以及共生菌独立成种、丢失、寄主转移成种、分化失败 5 类事件的发生次数与总罚分值；对宿主与共生菌的系统发育树进行 1 000 次随机端部映射或随机生成 1 000 棵共生菌系统发育树，对总罚分值最低的最优解进行显著性检验。

在 ParaFit 分析中，基于宿主遗传距离矩阵、共生菌遗传距离矩阵以及宿主-共生菌关联矩阵评估二者协同进化的一致性水平，并计算每一宿主-共生菌关联对于总体拟合度的贡献，进行 999 次重复评估以计算显著性差异水平。

2 结果与分析

2.1 序列特征

蚜虫与 *Buchnera* 各基因序列的特征信息详见表 3。除 EF-1α 和 16S rDNA 以外，所有基因序列均具有显著的 AT 偏好性（CO Ⅰ：72.2%；tRNA-CO Ⅱ：78.6%；Cytb：75.7%；atpD：67.6%；gnd：77.0%；trpB：70.5%）。蚜虫线粒体基因

表 3 用于系统发育分析的 DNA 序列特征

Table 3 Characters of DNA sequences used in phylogenetic analyse

基因 Gene	序列数目 Number of sequences	比对长度 Length of alignments	可变位点数目 Numbers of variable sites	简约信息位点数目 Numbers of parsimony -informative sites	核苷酸组成 Nucleotide composition (T：C：A：G)
CO Ⅰ	38	658	211 (32.1%)	173 (26.3%)	38.0：17.3：34.2：10.5
tRNA-CO Ⅱ	38	769	209 (27.5%)	177 (23.3%)	38.8：13.3：39.8：8.1
Cytb	38	745	234 (31.4%)	201 (27.0%)	41.6：15.1：34.1：9.2
EF-1α	38	801	83 (10.4%)	63 (7.9%)	26.3：22.0：27.8：24.0
atpD	29	501	87 (17.4%)	71 (14.2%)	34.0：12.4：33.6：19.9
gnd	38	858	294 (34.3%)	236 (27.5%)	37.8：10.3：39.2：12.7
trpB	32	473	154 (32.6%)	124 (26.2%)	30.2：13.5：40.3：16.0
16S rDNA	36	1 404	113 (8.0%)	60 (4.3%)	22.4：20.4：29.2：28.0

CO Ⅰ、tRNA-CO Ⅱ和 Cytb 的可变位点和简约信息位点数目显著高于核基因 EF-1α。*Buchnera* 各基因序列中，gnd 和 trpB 基因的可变位点和简约信息位点数目较高。

2.2　毛蚜属与 *Buchnera* 的系统发育树

基于 CO Ⅰ/tRNA-CO Ⅱ/Cytb/EF-1α 联合基因数据集所构建的毛蚜属 ML 树与 BI 树的拓扑结构较为一致（图 1），二者仅内群基部支系有所不同：ML 树中基部分支为柳黑毛蚜 *Chaitophorus saliniger*，而 BI 树中白杨毛蚜 *Chaitophorus populeti* 与 *Chaitophorus* sp. 3 构成姐妹群共同位于内群最基部。基于 atpD/trpB/gnd/ 16S rDNA 联合基因数据集所构建的 *Buchnera* ML 树和 BI 树具有基本一致的拓扑结构（图 2），BI 树中蚜虫种下水平的系统发育关系解析度较 ML 树略低。

在蚜虫和 *Buchnera* 系统发育树中，毛蚜属各物种均形成单系分支，并且节点支持率很高。尽管蚜虫和 *Buchnera* 系统发育树的拓扑结构具有一定的差异，但是二者也反映出一些一致的系统发育关系，例如：*C. indicus* 与 *C. inouyei* 构成姐妹群；白毛蚜 *C. populialbae* 与 *Chaitophorus* sp. 4 构成姐妹群；切毛蚜 *C. truncatus* 与 *C. nigricantis nigricantis* + *C. saliapterus quinquemaculatus* 聚为一支，并与 *Chaitophorus* sp. 2、*C. capreae* 共同构成内群的端部支系。

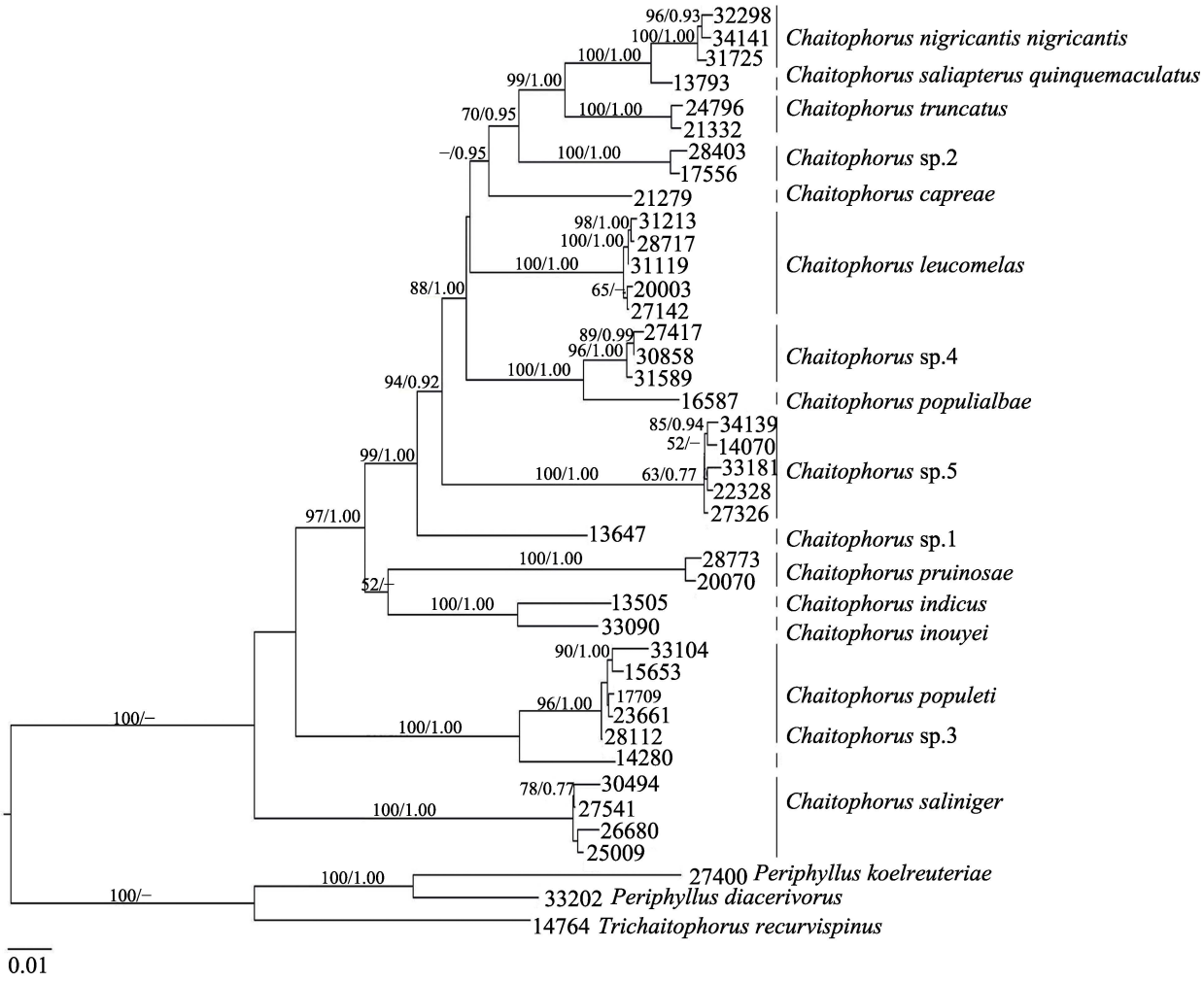

图 1　基于 CO Ⅰ/tRNA-CO Ⅱ/Cytb/EF-1α 联合基因数据集构建的毛蚜属最大似然树

Fig. 1　Aphid maximum likelihood (ML) tree based on the combined CO Ⅰ/tRNA-CO Ⅱ/Cytb/EF-1α dataset

分支上方的数值为 ML 自举值（>50）和贝叶斯后验概率值（>0.70）。

Values above branches indicate ML bootstrap values (>50) and Bayesian posterior probabilities values (>0.70).

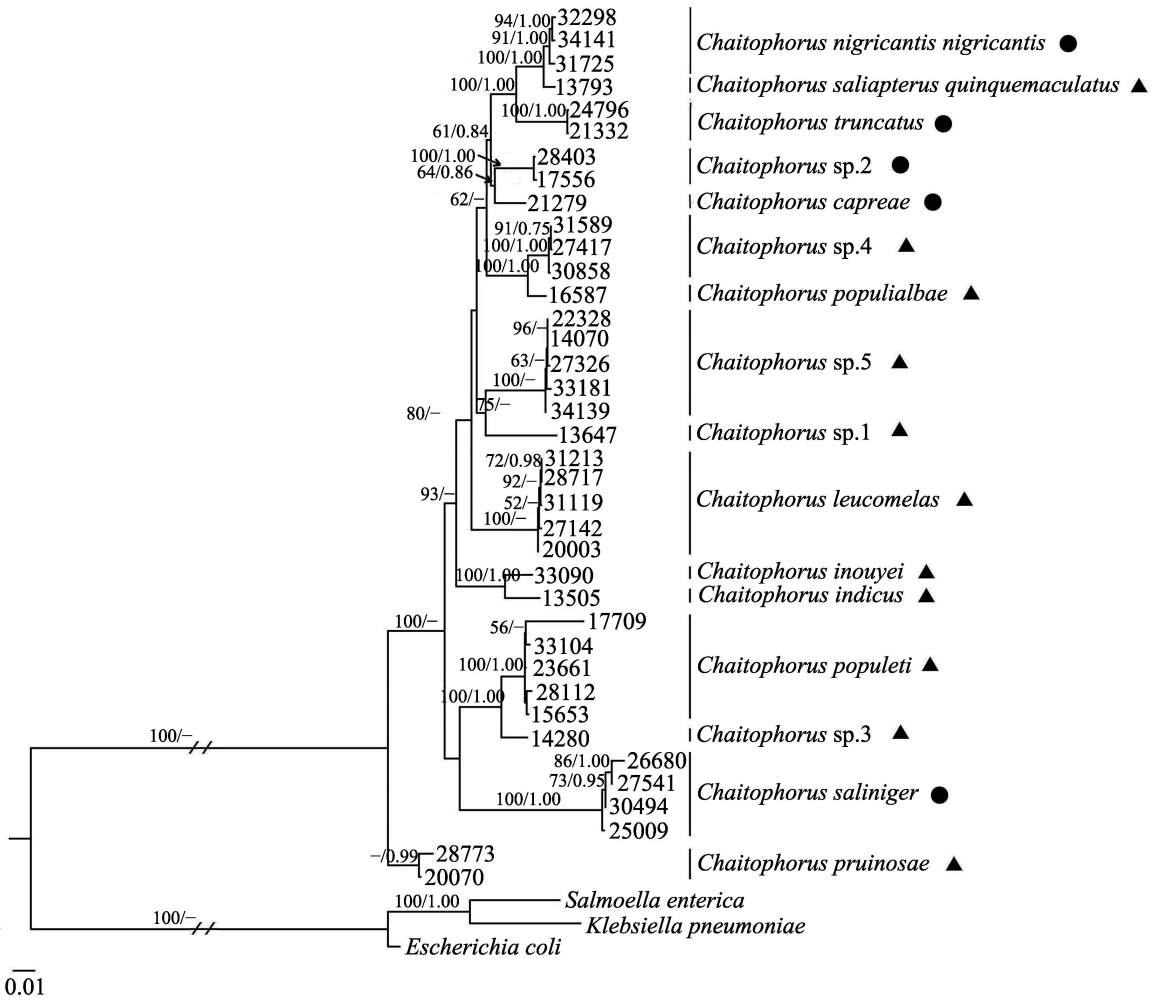

图 2 基于 **atpD/gnd/trpB/16S rDNA** 联合基因数据集构建的 ***Buchnera*** 最大似然树

Fig. 2 *Buchnera* maximum likelihood (ML) tree based on the combined atpD/gnd/trpB/16S rDNA dataset

分支上方的数值为 ML 自举值（>50）和贝叶斯后验概率值（>0.70）。

毛蚜属各物种所含 *Buchnera* 的名称用相应蚜虫物种名表示。

杨属 *Salix* 和柳属 *Populus* 植物分别用黑色的三角形和圆形表示。

Values above branches indicate ML bootstrap values (>50) and Bayesian posterior probabilities values (>0.70).

Buchnera species are represented by the names of corresponding aphid hosts.

Different host plants (*Salix* and *Populus*) are shown by black triangles and circles.

2.3 协同系统发生检验

TreeMap 分析中，基于蚜虫与 *Buchnera* 系统发育树所构建的个体关联的信息调和树得到较好匹配。红色实心圆的数量与宿主和共生菌的系统发育一致性呈正相关。如图 3 所示，毛蚜属蚜虫-*Buchnera* 间的系统发生具有明显的相关性。TreeMap 启发式搜索得到的最优解揭示蚜虫内共生菌 *Buchnera* 共发生了 48 次与宿主共同成种、26 次独立成种、46 次丢失与 0 次寄主转移事件。Jane 分析结果（图 4）揭示毛蚜属初级内共生菌 *Buchnera* 共发生了 22 或 23 次与宿主蚜虫的共同成种、0 次独立成种、4~6 次丢失、13 或 14 次寄主转移成种以及 0 次分化失败事件，总罚分值为 34。统计检验结果显示最优解总罚分值与随机检测总罚分值差异显著（P<0.01），表明毛蚜属内 *Buchnera* 与其宿主蚜虫具有平行演化关系。

ParaFit 分析结果表明，毛蚜属蚜虫与 *Buchnera* 之间的总体关联极为显著（P=0.001）。

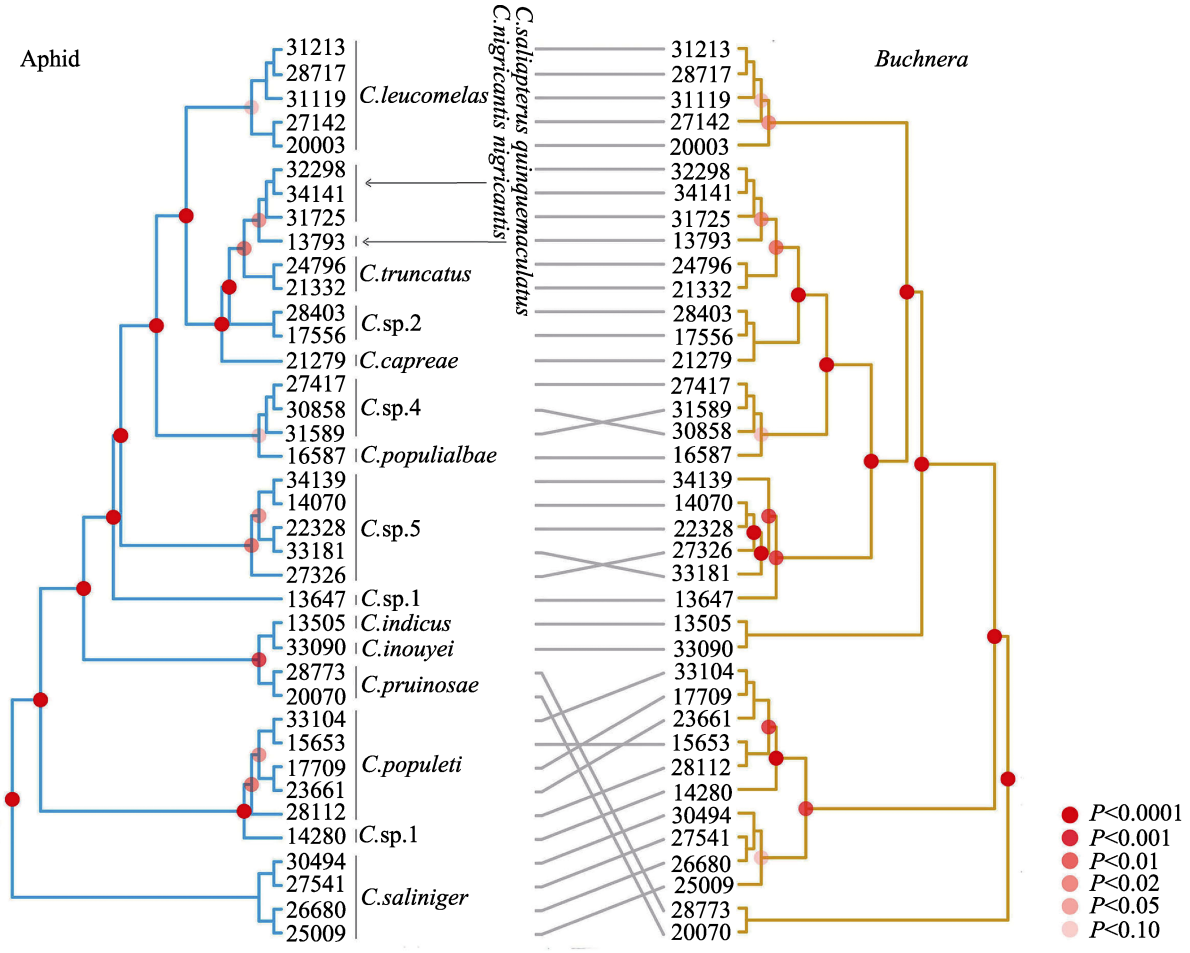

图 3　TreeMap 蚜虫-*Buchnera* 系统发育树对比图

Fig. 3　TreeMap comparison of aphid and *Buchnera* phylogenies

左：基于 CO Ⅰ/tRNA-CO Ⅱ/Cytb/EF-1α 联合基因构建的毛蚜属蚜虫最大似然树；
右：基于 atpD/gnd/trpB/16S rDNA 联合基因构建的 *Buchnera* 最大似然树。
实心圆表示蚜虫-*Buchnera* 个体对间的一致性水平。

Left: Maximum likelihood tree of *Chaitophorus* aphids based on the combined CO Ⅰ /tRNA-CO Ⅱ/Cytb/EF-1α dataset; right: *Buchnera* maximum likelihood tree based on the combined atpD/gnd/trpB/16S rDNA dataset. Solid circles indicate congruence levels between pairs of aphid and *Buchnera*.

在个体关联水平上，所评估的 38 对关联中 37 对达到显著水平（$P \leq 0.05$），其中 24 对达到极显著水平（$P \leq 0.01$），这表明蚜虫-*Buchnera* 在不同个体间同样具有强烈的关联性。

3　讨论

3.1　毛蚜属蚜虫与 *Buchnera* 的平行演化关系

本研究采用基于不同原理的 3 种方法对毛蚜属与 *Buchnera* 的协同系统发生关系进行了检测。分析结果均表明毛蚜属蚜虫与其初级内共生菌 *Buchnera* 之间具有平行演化关系，从而为低级阶元水平蚜虫-*Buchnera* 的“平行演化假说”提供了新的例证（Clark *et al.*，2000；Funk *et al.*，2000；Wernegreen *et al.*，2001；Jousselin *et al.*，2009；Peccoud *et al.*，2009a，2009b；Liu *et al.*，2013，2014）。

基于联合基因数据集所构建的毛蚜属与 *Buchnera* 系统发育树虽然在拓扑结构上具有一定差异，但是二者也揭示了一些一致的系统发育关系。Jane 分析检测到 *Buchnera* 在毛蚜属内发生了 13 或 14 次寄主转移成种事件（图 4），7 次发

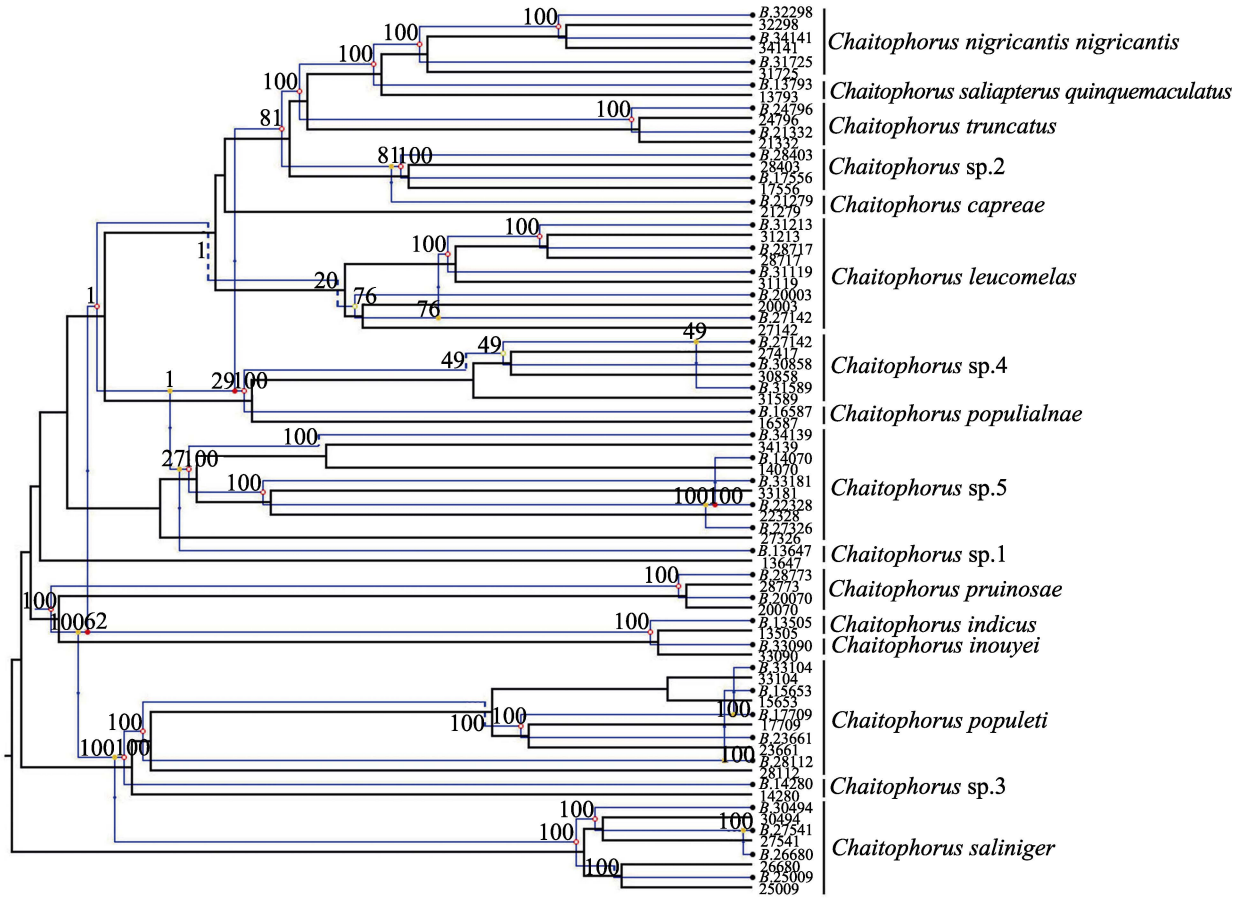

图 4 **Jane 蚜虫-*Buchnera* 系统发育树对比图**

Fig. 4 Cophylogeny of *Chaitophorus* aphids and *Buchnera* from Jane

黑色系统树为毛蚜属蚜虫最大似然树，蓝色系统树为 *Buchnera* 最大似然树。空心圆表示 *Buchnera* 与宿主蚜虫共同成种事件，实心圆表示 *Buchnera* 独立成种事件，实心圆附带箭头表示 *Buchnera* 寄主转移成种事件，虚线表示 *Buchnera* 丢失事件。各标识旁的数字表示各事件发生的支持率。

Blue and black trees indicate the phylogeny of *Buchnera* and aphid, respectively. Hollow circles indicate cospeciation events; solid circles indicate duplications; arrows indicate host switch events; dashed lines indicate sorting events. Support values for each event are shown.

生在蚜虫不同物种间，其中 3 次发生的支持率较高（*P*>80%）：白杨毛蚜 *C. populeti* + *Chaitophorus* sp. 3 的共同祖先分支和柳黑毛蚜 *C. saliniger* 分支之间（*P*=100）、白杨毛蚜 + *Chaitophorus* sp. 3 的共同祖先分支和 *C. indicus* + *C. inouye* 的共同祖先分支之间（*P*=100）以及 *C. capreae* 分支和 *Chaitophorus* sp. 2 的分支之间（*P*=81）；另有 6 或 7 次发生在蚜虫种下水平。*Buchnera* 寄主转移可能是导致其系统发育树与蚜虫系统发育树拓扑结果存在差异的原因之一。

此外，取样有限、不同分子标记的解析度存在差异、解析关键分支节点所需的有效信息不足（Clark *et al.*，2000；Jousselin *et al.*，2009）等也可能造成二者系统发育树拓扑结构的不一致。蚜虫线粒体基因进化速度较快，前人主要将 COⅠ应用于蚜虫低级阶元的系统发育分析（Lunt *et al.*，1996；张合彩和乔格侠，2006）；tRNA-COⅡ和 Cytb 常与其他基因联合分析。核基因 EF-1α 相对保守，在不同的分类阶元研究中都具有较高的建树效力（Lin and Danforth，2004）。*Buchnera* 具有比蚜虫更快的进化速率（Clark and Baumann，1999；Jousselin *et al.*，2009），为宿主蚜虫提供补充的进化信息（Nováková *et al.*，2013）。本研究选取的联合数据集包括上述 3 种来源的分子

标记，基本反映了毛蚜属与 *Buchnera* 在系统发育水平的相互关系。鉴于两者系统发育树之间的差异与不同基因的建树效力以及选样原则有关，且本研究近涉及 1 个核基因，因此未来的研究在增加样品覆盖度的同时，需要筛选更多合适的核基因标记。

3.2　寄主植物对毛蚜属-*Buchnera* 演化关系的影响

生态因子或生物学背景可能直接或间接对共生关系产生影响（Guay *et al.*，2009；Anbutsu and Fukatsu，2011）。目前相关研究多集中于温度、紫外线、寄主植物等因子对宿主生理生化以及体内菌胞数量的影响（Wilkinson *et al.*，2001；李献辉和李保平，2006；Guay *et al.*，2009；Anbutsu and Fukatsu，2011）。

蚜虫吸食植物韧皮部汁液，*Buchnera* 从蚜虫体内获取营养物质并为其提供生长繁殖所必需的氨基酸与维生素（Nakabachi and Ishikawa，1999；McCoy *et al.*，2005；Nieberding and Olivieri，2007），植物、蚜虫与共生菌由此构成了三级营养关系。其中，宿主蚜虫对寄主植物的适合度会在一定程度上受到体内共生菌的影响。Adams 和 Douglas（1997）研究发现，*Buchnera* 会影响甜菜蚜 *Aphis fabae* 对寄主植物的适应性。人工去除 *Buchnera* 后的豌豆蚜 *Acyrthosiphom piaum* 对原有寄主植物的适应性降低（Wilkinson，1993）。而植物对蚜虫体内的共生菌也具有一定影响。例如 Wilkinson 等（2001）研究结果表明取食紫野芝麻 *Lamium purpureum* 的甜菜蚜体内 *Buchnera* 的数量显著高于取食白藜 *Chenopodium album* 和罂粟 *Papaver dubium* 的甜菜蚜。这暗示不同寄主植物会对蚜虫与共生菌的共生关系产生影响。

目前，生态因子对蚜虫-*Buchnera* 演化关系影响的研究较少。Liu 等（2014）在研究中推测具有隔离生境的成瘿蚜虫与不成瘿蚜虫相比，可能因虫瘿能够提供更丰富的营养而具有与 *Buchnera* 不一致的系统发育关系；然而研究结果表明虫瘿相对独立的生境并不影响瘿绵蚜族 Pemphigini 蚜虫与 *Buchnera* 的进化关系。本研究选取的 16 种毛蚜属蚜虫分别取食杨属和柳属植物，*C. capreae*、*C. nigricantis nigricantis*、柳黑毛蚜 *C. saliniger*、切毛蚜 *C. truncatus* 和 *Chaitophorus* sp. 2 取食柳属植物，其余 11 个物种取食杨属植物。如图 2 所示，杨属与柳属植物在 *Buchnera* 系统发育树上并未呈现特定的分布格局，例如 *C. nigricantis nigricantis* 与 *C. saliapterus quinquemaculatus*，尽管两个物种取食不同的寄主植物，但是它们的 *Buchnera* 却具有较近的亲缘关系，且结果与蚜虫系统发育树所揭示的系统发育关系一致。因此，研究表明不同寄主植物并不会对毛蚜属蚜虫与其初级内共生菌 *Buchnera* 之间的系统发育关系产生影响。

致谢：感谢王渊、陈睿、刘庆华、唐秀娟、朱喜超采集蚜虫样品；感谢杨分地制作蚜虫玻片标本。

参考文献 (References)

Adams D, Douglas AE, 1997. How symbiotic bacteria influence plant utilization by the polyphagous aphid aphis fabae. *Oecologia*, 110(4): 528–532.

Anbutsu H, Fukatsu T, 2011. Spiroplasma as a model insect endosymbiont. *Environmental Microbiology Reports*, 3(2): 144–153.

Baumann PL, Lai CY, Rouhbakhsh D, 1995. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annual Review of Microbiology*, 49(1): 55–94.

Blackman RL, Eastop VF, 1994. Aphids on the world's trees. An identification and information guide. CAB International. 1–987.

Blackman RL, Eastop VF, 2000. Aphids on the World's Crops: An Identitification and Information Guide, seconded. John Wiley & Sons Ltd., Chichester. 1–466.

Brough CN, Dixon AFG, 1990. Ultrastructural features of egg development in oviparae of the vetch aphid, *Megoura viciae* Buckton. *Tissue and Cell*, 22(1): 51–63.

Buchner P, 1965. Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. New York: Interscience Publishers Campbell, B C. 297–332.

Charleston MA, 1998. Jungles: a new solution to the host/parasite phylogeny reconciliation problem. *Mathematical Biosciences*, 149(2): 119–123.

Charleston MA, Robertson DL, 2002. Preferential host switching by primate lentiviruses can account for phylogenetic similarity with the primate phylogeny. *Systematic Biology*, 51(3): 528–535.

Charleston MA, 2011. Cophylogeny. Available at: http://sites.google.

com/site/cophylogeny.

Clark MA, Baumann P, 1993. Aspects of energy-yielding metabolism in the aphid, Schizaphis graminum, and its endosymbiont: Detection of gene fragments potentially coding for the ATP synthase beta-subunit and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Current Microbiology*, 26(4): 233–237.

Clark MA, Moran NA, Baumann P, 1999. Sequence evolution in bacterial endosymbionts having extreme base composition. *Molecular Biology and Evolution*, 16(11): 1586–1598.

Clark MA, Moran NA, Baumann P, Wernegreen JJ, 2000. Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. *Evolution*, 54(2): 517–525.

Conow C, Fielder D, Ovadia Y, Libeskind-Hadas R, 2010. Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms for Molecular Biology*, 5(1): 16–25.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D, 2012. iModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.

Douglas AE, Prosser WA, 1992. Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) symbiosis. *Journal of Insect Physiology*, 38(8): 565–568.

Favret C, 2016. Aphid Species File. Version 5.0/5.0.Available at: http://Aphid.SpeciesFile.org

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome coxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.

Foottit RG, Maw HEL, von Dohlen CD, Herbert PDN, 2008. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 8(6): 1189–1201.

Funk DJ, Helbling L, Wernegreen JJ, Moran NA, 2000. Intraspecific phylogenetic congruence among multiple symbiont genomes. *Proceedings of the Royal Society, Series B: Biological Science*, 267(1461): 2517–2521.

Guay JF, Boudreault S, Michaud D, Cloutier C, 2009. Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: role of Hamiltonella defensa bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. *Journal of Insect Physiology*, 55(10): 919–926.

Harrison CP, Douglas AE, Dixon AFG, 1989. A rapid method to isolate symbiotic bacteria from aphids. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53(3): 427–428.

Harry M, Solignac M, Lachaise D, 1998. Molecular evidence for parallel evolution of adaptive syndromes in Fig-Breeding Lissocephala (Drosophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9(3): 542–551.

Heie OE, 1994. Why are there so few aphid species in the temperate areas of the southern hemisphere? *European Journal Entomology*, 91(1): 127–133.

Huang XL, Liu L, Qiao GX, 2011. Evolutionary relationships between aphids and their primary endosymbionts: hypothese and mechanisms. *Acta Entomologica Sinica*, 54(5): 582–588. [黄晓磊, 刘琳, 乔格侠, 2011. 蚜虫与其初级内共生菌进化关系: 假说及演化机理. 昆虫学报, 54(5): 582–588.]

Jermiin LS, Crozier RH, 1994. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant Tetraponera rufoniger: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution*, 38(3): 282–294.

Jousselin E, Desdevised Y, Coeur d'acier A, 2009. Fine-scale cospeciation between *Brachycaudus* and *Buchnera aphidicola*: bacterial genome helps define species and evolutionary relationships in aphids. *Proceedings of the Royal Society, Series B: Biological Science*, 276(1654): 187–196.

Legendre P, Desdevises Y, Bazin E, 2002. A statistical test for host-parasite coevolution. *Systematic Biology*, 51(2): 217–234.

Li XH, Li BP, 2006. Effect of temperature on the abundance of mycetocytes in *Aphis fabae* Scopoli (Aphididae, Homoptera) and body size of their hosts. *Acta Entomologica Sinica*, 49(3): 428–432. [李献辉, 李保平, 2006. 温度对黑豆蚜体内共生菌胞数量及宿主体型大小的影响. 昆虫学报, 49(3): 428–432.]

Lin CP, Danforth BN, 2004. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(30): 686–702.

Liu L, Huang XL, Zhang RL, Jiang LY, Qiao GX, 2013. Phylogenetic congruence between *Mollitrichosiphum* (Aphididae: Greenideinae) and *Buchnera* indicates insect-bacteria parallel evolution. *Systematic Entomology*, 38(1): 81–92.

Liu L, Li XY, Huang XL, Qiao GX, 2014. Evolutionary relationships of Pemphigini (Hemiptera: Aphididae: Eriosomatinae) and their primary endosymbionts *Buchnera aphidicola*. *Insect Science*, 21(3): 301–312.

Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewltt OM, 1996. The insect cytochrome oxidase Ⅰgene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5(3): 153–165.

Martinez-Torres D, Buades C, Latorre A, Moya A, 2001. Molecular systematics of aphids and their primary endosymbionts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(3): 437–449.

McCoy KD, Boulinier T, Tirard C, 2005. Comparative host-parasite population structures: disentangling prospecting and dispersal in the black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*. *Molecular Evolution*, 14(9): 2825–2838.

Montllor CB, Maxmem A, Purcell AH, 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27(2): 189–195.

Moran NA, Munson MA, Baumann P, Ishikawa H, 1993. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 253(1337): 167–171.

Munson MA, Baumann P, Kinsey MG, 1991a. *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(4): 566–568.

Munson MA, Baumann P, Clark MA, Baumann L, Moran NA, Voegtlin DJ, Campbell BC, 1991b. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *Journal of Bacteriology*, 173(20): 6321–6324.

Nakabachi A, Ishikawa H, 1997. Differential display of mRNAs related to amino acid metabolism in the endosymbiotic system of aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(12): 1057–1062.

Nakabachi A, Ishikawa H, 1999. Provision of riboflavin to the host aphid, Acyrthosiphon pisum, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera*. *Journal of Insect Physiology*, 45(1): 1–6.

Nieberding CM, Olivieri I, 2007. Parasites: proxies for host genealogy and ecology? *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3): 156–165.

Normark BB, 1996. Phylogeny and evolution of parthenogenetic weevils of the Aramigus tessellatus species complex (Coleoptera: Curculionidae: Naupactini): Evidence from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 50(2): 734–745.

Nováková E, Hypša V, Klein J, Foottit RG, von Dohlen CD, Moran NA, 2013. Reconstructing the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) using DNA of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(1): 42–54.

Oliver KM, Moran NA, Hunter MS, 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36): 12795–12800.

Page RD, 1994. Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics*, 10(2): 155–173.

Palumbi SR, 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular Systematics*, 2: 205–247.

Peccoud J, Ollivier A, Plantegenest M, Simon JC, 2009a. A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18): 7495–7500.

Peccoud J, Simon JC, McLaughlin HJ, Moran NA, 2009b. Post-Pleistocene radiation of the pea aphid complex revealed by rapidly evolving endosymbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38): 16315–16320.

Pérez-Brocal V, Gil R, Ramos S, Lamelas A, Postigo M, Michelena JM, Silva FJ, Moya A, Latorre A, 2006. A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science*, 314(5797): 312–313.

Remaudière G, Remaudière M, 1997. Catalogue des Aphididae du Monde: Homoptera Aphidoidea. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

Richards WR, 1972. The Chaitophorinae of Canada (Homoptera: Aphididae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 104(S87): 1–109.

Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBAYES 3, Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.

Rouhbakhsh D, Lai CY, von Dohlen CD, Clark MA, Baumann L, Baumann P, Moran NA, Voegtlin DJ, 1996. The tryptophan biosynthetic pathway of aphid endosymbionts (*Buchnera*): genetics and evolution of plasmid-associated anthranilate synthase (trpEG) within the Aphididae. *Journal of Molecular Evolution*, 42(4): 414–421.

Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HCJ, 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310(16): 1781.

Schwarz G, 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 6(2): 461–464.

Stamatakis A, 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21): 2688–2690.

Stern DL, 1994. A phylogenetic analysis of soldier evolution in the aphid family Hormaphididae. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 256(1346): 203–209.

Talavera G, Castresana J, 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56(4): 564–577.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.

Thompson K, Parkinson JA, Band S, Spencer RE, 1997. A comparative study of leaf nutrient concentrations in a regional herbaceous flora. *New Phytologist*, 136(4): 679–689.

Tsuchida T, Koga R, Shibao H, Matsumoto T, Fukatsu T, 2002. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, 11(10): 2123–2135.

Unterman BM, Baumann P, Mclean DL, 1989. Pea aphid symbiont relationships established by analysis of 16S rDNA. *Journal of Bacteriology*, 171(6): 2970–2974.

van Ham RJ, Moya A, Latorre A, 1997. Putative evolutionary origin of plasmids carrying the genes involved in leucine biosynthesis in *Buchnera aphidicola* (endosymbiont of aphids). *Journal of Bacteriology*, 179(15): 4768–4777.

von Dohlen CD, Kurosu U, Aoki S, 2002. Phylogenetics and evolution of the eastern Asian–eastern North American disjunct aphid tribe, Hormaphidini (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(2): 257–267.

Wernegreen JJ, Richardson AO, Moran NA, 2001. Parallel acceleration of evolutionary rates in symbiont genes underlying host nutrition. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(3): 479–485.

Wilkinson TL, Adams D, Minto LB, Douglas AE, 2001. The impact of host plant on the abundance and function of symbiotic bacteria in an aphid. *Journal of Experimental Biology*, 204(17): 3027–3038.

Wilkinson TW, 1993. Host plant utilization by the pea aphid (*Acyrthosiphom pisum*) symbiosis. Doctoral dissertation. Oxford: University of Oxford.

Zhang GX, Chen XL, Qiao GX, Zhong TS, Li JH, 1999. Fauna of Agricultural and Forestry Aphids of Northwest, China (Insecta: Homoptera: Aphidinea). Beijing: China Environmental Science Press. 1–563. [张广学, 陈小琳, 乔格侠, 钟铁森, 李静华, 1999. 西北农林蚜虫志 (昆虫纲, 同翅目, 蚜虫类) . 北京: 中国环境科学出版社. 1–563.]

Zhang HC, Qiao GX, 2006. Application of gene sequences in molecular phylogenetic study on Aphididae (Hemiptera). *Acta Entomologica Sinica*, 49(3): 521–527. [张合彩, 乔格侠, 2006. 基因序列在蚜虫分子系统发育研究中的应用. 昆虫学报, 49(3): 521–527.]