

УДК 575.2:595.752.2

## МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕН *ND4* КАК МАРКЕР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ДИНАМИКИ ПОПУЛЯЦИЙ ТЛЕЙ (HEMIPTERA, APHIDIDAE)

© 2022 г. Н. В. Алпатьева,\* И. Н. Анисимова,\*\* Е. Е. Радченко\*\*\*

Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова  
ул. Большая Морская, 42, 44, С.-Петербург, 190000 Россия

\*e-mail: alpatievanatalia@mail.ru, \*\*e-mail: irina\_anisimova@inbox.ru,

\*\*\*e-mail: eugene\_radchenko@rambler.ru (автор для переписки)

Поступила в редакцию 18.05.2021 г.

После доработки 31.03.2022 г.

Принята к публикации 1.07.2022 г.

С использованием технологии высокопродуктивного секвенирования нового поколения (NGS) изучали полиморфизм фрагмента гена *ND4*, кодирующего субъединицу 4 НАДН-дегидрогеназы. Оценивали спектр точечных замен в образцах из популяций люцерновой (*Aphis craccivora* C. L. Koch), большой злаковой (*Sitobion avenae* F.), черемухово-злаковой (*Rhopalosiphum padi* L.) и обыкновенной злаковой (*Schizaphis graminum* Rondani) тлей. Насекомых собирали в Краснодарском крае и на Северо-Западе России. Выявлены митохондриальные гаплотипы, нуклеотидные последовательности которых совпадали с референсными на 96–100 %. Уровень внутривидового полиморфизма гена *ND4* у *A. craccivora* составил 0.2–4.0, *S. avenae* – 0.2–1.9, *Rh. padi* – 0.9–3.3, и у *Sch. graminum* – 0.2–0.9 %. Доля полиморфных сайтов в последовательности гена *ND4* у разных видов тлей оказалась выше, чем в пределах одного вида. Анализ соотношения митохондриальных гаплотипов позволяет исследовать влияние различных факторов (например, устойчивость растения-хозяина) на структуру популяций насекомых. Выявлено существенное различие между образцами, собранными одновременно на различающихся по устойчивости к *Sch. graminum* сортах сорго, по соотношению гаплотипов Sg1–Sg3, а на умеренно устойчивом образце Ефремовское белое обнаружен уникальный гаплотип Sg4.

*Ключевые слова:* Aphididae, популяции, ген *ND4*, нуклеотидные замены, транзиции, трансверсии.

**DOI:** 10.31857/S0367144522030029, **EDN:** HNRAUP

В последнее время на многих сельскохозяйственных культурах существенно увеличилась вредоносность тлей. Так, в результате интродукции ячменной (русской пшеничной) тли *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) в США потери урожая пшеницы и ячменя только на западе страны с 1986 г. (первое обнаружение вредителя) за 20 лет превысили 1 миллиард долларов (Mittal et al., 2008). Генетическая однородность агроценозов способствует ускорению микроэволюции вредных организмов (Жученко, 2012). В ряде случаев идентифицировано весьма значительное число генов устойчивости растений к тлям, однако далеко не все аллели эффективны. Способность тлей приспособля-

ваться к устойчивому растению-хозяину обуславливает необходимость изучения изменчивости генетической структуры популяции, источником которой могут быть иммиграция вирулентных клонов в локальную популяцию, мутационный процесс и комбинативная изменчивость внутри локальной популяции. Знание структуры популяций и эколого-генетических механизмов микроэволюции насекомых необходимо для разработки принципов регулирования экосистем и эффективного управления популяциями вредителей.

В последнее время для идентификации видов и изучения популяционной структуры растительноядных насекомых используют однонуклеотидный полиморфизм (SNP) митохондриальных и ядерных генов. Наиболее популярны в подобного рода исследованиях гены, кодирующие субъединицы 1, 4 и 5 фермента НАДН-дегидрогеназы (*ND1*, *ND4*, *ND5*), субъединицы 1 и 2 цитохромоксидазы (*CO1*, *CO2*), а также гены рибосомальной РНК (*5.8S rRNA* и *28S rRNA*); применяют и транскриптомный анализ митохондриального генома в целом (Song et al., 2016; Toju, Baba, 2018; Marquina et al., 2019; Ponce et al., 2021). Ген, кодирующий субъединицу 1 цитохромоксидазы (*CO1*), чаще других используют при исследовании популяций насекомых, в том числе различных видов тлей (Song et al., 2016; Wongsu et al., 2017). Кроме того, значительный нуклеотидный полиморфизм в последовательности этого гена позволяет использовать его как штрих-код для идентификации видов животного царства (Ratnasingham, Hebert, 2007).

Значительно меньше изучен полиморфизм *ND4*. Субъединица, кодируемая этим геном, входит в состав гидрофобного комплекса НАДН-убихинон-оксидоредуктазы – первого мультибелкового комплекса дыхательной цепи переноса электронов. В аннотированной последовательности митохондриальной ДНК люцерновой тли *Aphis craccivora* C. L. Koch (KX447142.10) ген *ND4* расположен между 6791-й и 8048-й нуклеотидными позициями. Аикхионбаре и Майо (Aikhionbare, Mayo, 2000) анализировали популяции обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* Rondani в США и охарактеризовали фрагмент этого гена как высокополиморфный по сравнению с фрагментами цитохрома *b* (*cytb*) и субъединицей 1 НАДН-дегидрогеназы (*ND1*). Аналогичные результаты получены и с помощью транскриптомного анализа 37 митохондриальных генов: в популяции люцерновой тли в Китае обнаружили около 4 % полиморфных сайтов в последовательности гена *ND4* (Song et al., 2016). Ранее нами при сравнении образцов из популяций обыкновенной злаковой тли, собранных в Дагестане и Краснодарском крае на разных культурах и в разное время года, был выявлен значительный полиморфизм фрагмента этого гена (Radchenko et al., 2019).

Цель настоящей работы – с помощью высокопродуктивного секвенирования нового поколения (NGS) оценить диагностическую ценность однонуклеотидного полиморфизма фрагмента гена *ND4* для исследования популяций видов тлей, различающихся по особенностям биологии и специфичности к растениям-хозяевам.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили 5 выборок из популяций тлей, питавшихся на различных растениях-хозяевах в 2019 г. Большая злаковая *Sitobion avenae* (F.) и черемухово-злаковая *Rhopalosiphum padi* (L.) тли заселяли посевы ячменя (*Hordeum vulgare* L.) научно-производственной базы «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (С.-Петербург, Пушкин), люцерновая тля *Aphis craccivora* C. L. Koch заселяла посевы гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.)

Тaub.) в Краснодарском крае (Гулькевичский р-н, Кубанская опытная станция ВИР – КОС ВИР). На КОС ВИР была собрана и обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum* (Rondani), питающаяся на сортах зернового сорго, которые различались по устойчивости к вредителю: Ефремовском белом (умеренно устойчивом) и СЛВ-2 (восприимчивом). В каждом случае было собрано не менее 300 насекомых в нескольких (5–20) точках. Насекомых помещали в пробирки с завинчивающимися крышками с 70%-ным этанолом и хранили при температуре –20 °С. Таксономическую принадлежность насекомых определяли в лаборатории с помощью определителя Г. Х. Шапошникова (Шапошников, 1964).

Изучали полиморфизм фрагмента гена *ND4* длиной 438 пар нуклеотидов (п. н.), который расположен между 7048-й и 7485-й позициями референсной последовательности KX447142.1 в информационной базе нуклеотидных последовательностей NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Перед выделением ДНК заспиртованный материал сушили при комнатной температуре. Суммарную ДНК выделяли SDS-буфером (100 мМ трис-НСl, рН 9.0; 100 мМ ЭДТА; 1.0 % SDS) по разработанному нами протоколу (Алпатьева и др., 2019). Секвенирование фрагментов митохондриального гена *ND4* проводили на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США) с помощью набора реактивов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2 × 300 п. н.). Работа выполнялась с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии. Праймеры для амплификации фрагмента указаны в табл. 1. Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывали с использованием пакетов программного обеспечения «Trimmomatic» (Bolger et al., 2014) и «QIIME» (Caporaso et al., 2010). На первом этапе проводили первичный анализ качества прочтения, отбор последовательностей на основе качества чтения отдельных оснований (basepairquality), объединение парно-концевых последовательностей с участком перекрытия не менее 35 оснований, а также удаление последовательностей, длина которых составляет менее 180 п. н. На втором этапе обработки из библиотек удаляли все служебные участки (праймеры), а также последовательности, содержащие протяженные гомополимерные повторы. Для получения таблицы частот уникальных последовательностей (ASV, Amplicon Sequence Variant) проводились процедуры деноезинга и удаления химер с помощью программного пакета dada2 (Callahan et al., 2016).

Последовательности идентифицировали с помощью международной базы нуклеотидных последовательностей NCBI GenBank и поисковой системы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Варианты, которые встречались с низкой (менее 1 %) частотой, исключались из анализа. Выравнивание и кластерный анализ последовательностей проводили с помощью программы MEGA7 (Kumar et al., 2016). В качестве референсных использовали последовательности гена *ND4* из аннотированных митохондриальных геномов насекомых: KX447142.1 (*A. craccivora*), KJ742384.1 (*S. avenae*), KT447631.1 (*Rh. padi*) и AY531391.1 (*Sch. graminum*). Для трансляции использовали код 5.

Попарное сравнение последовательностей по числу нуклеотидных замен на каждый сайт проводили с помощью метода *максимального* комбинированного правдоподобия (*maximum composite likelihood method*) (Tamura et al., 2004) в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016).

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидов, разработанные для амплификации фрагментов *ND4* у *Aphis craccivora* С. L. Koch, *Sitobion avenae* (F.), *Rhopalosiphum padi* (L.) и *Schizaphis graminum* (Rondani)

Вид тли	Праймер	Последовательность прямого праймера F 5' → 3'	Последовательность обратного праймера R 5' → 3'
<i>A. craccivora</i>	AeND4	ACCAAAAAGCTCATGTTGAAGC	CCAAATAAAATTAAAAGAAGGAGGA
<i>S. avenae</i>	SaND4	ACSTAAGGGCTCATGTTGAAGC	CCAAATAAAATTAAAAGAAGGAGGA
<i>Rh. padi</i>	RpND4	TCCAAAAGGCTCATGTTGAGGC	CCAAATAAAATTAAAAGATGGGGGA
<i>Sch. graminum</i>	SgND4	TCCAAAAGCTCATGTTGAAGC	CCAAATAAAATTAAAAGAAGGAGGA

Пр и м е ч а н и е. Длина ампликона у всех перечисленных видов равна 483 п. н.

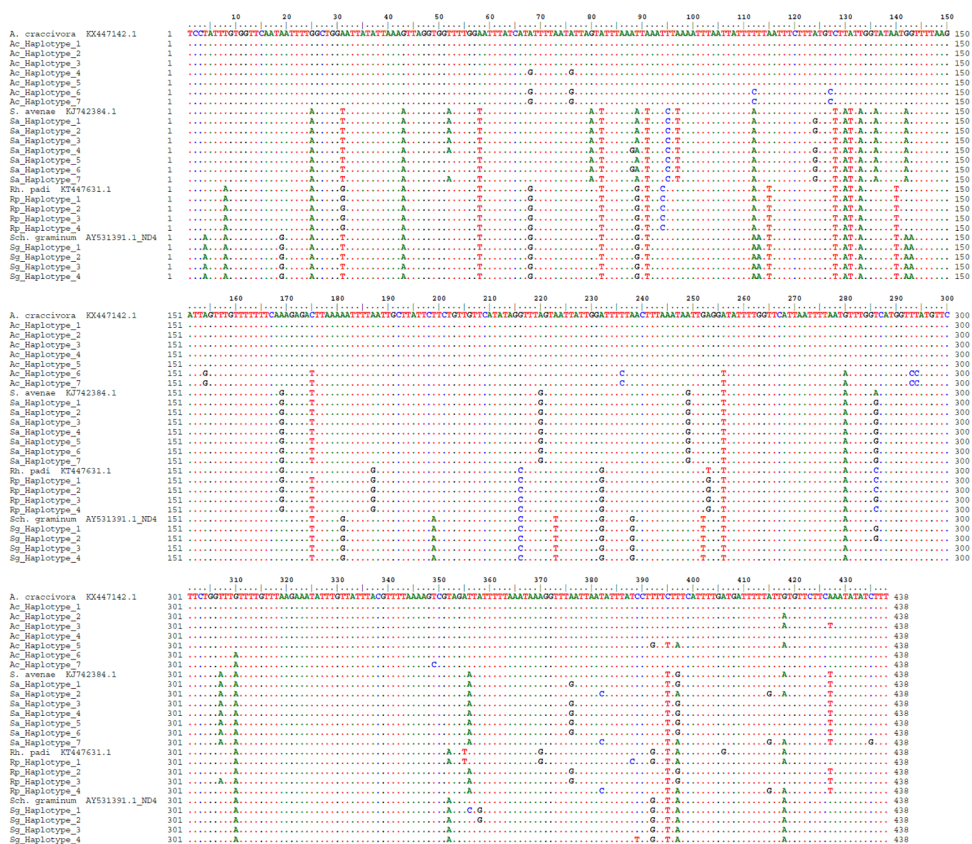
**Таблица 2.** Анализ полиморфизма фрагмента гена *ND4* в выборках *Aphis craccivora* С. L. Koch, *Sitobion avenae* (F.), *Rhopalosiphum padi* (L.) и *Schizaphis graminum* (Rondani)

Вид тли	Число выявленных гаплотипов	Число транзаций в разных нуклеотидах			Число трансверсий в разных нуклеотидах			T <sub>b</sub>	Число синонимических замен	Число несинонимических замен		
		1-й	2-й	3-й	Σ	1-й	2-й				3-й	Σ
<i>A. craccivora</i>	7	4	1	9	14	1	0	3	4	22.2	11	5
<i>S. avenae</i>	7	0	0	7	7	0	1	1	2	28.6	8	1
<i>Rh. padi</i>	4	0	0	7	7	2	0	5	7	50.0	12	2
<i>Sch. graminum</i>	4	2	0	1	3	0	0	1	1	25.0	2	1

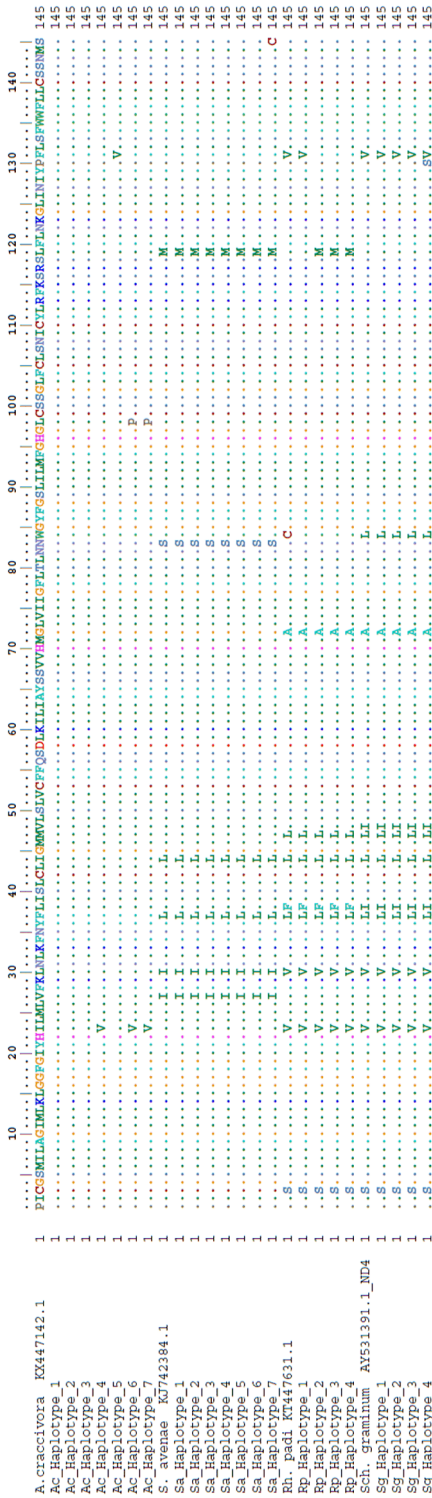
Пр и м е ч а н и е. T<sub>b</sub> – частота трансверсий, %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS) в пяти суммарных пробах ДНК *A. craccivora*, *S. avenae*, *Rh. padi* и *Sch. graminum* было получено более 50 000 последовательностей. После удаления праймеров, используемых для ПЦР, длина «полезного» фрагмента *ND4* составила 438 п. н. Однонуклеотидный (SNP) полиморфизм, обнаруженный в изученных образцах, позволил идентифицировать гаплотипы по гену *ND4*. Так, в анализируемых последовательностях *A. craccivora* найдено 18 полиморфных сайтов, которые позволили идентифицировать 7 гаплотипов *ND4*, в выборках *S. avenae* – 9 полиморфных сайтов и 7 гаплотипов, *Rh. padi* – 14 полиморфных сайтов и 4 гаплотипа, в двух образцах *Sch. graminum* – 4 полиморфных сайта и 4 гаплотипа (рис. 1). В кодируемых белковых последовательностях были найдены точечные замены (рис. 2). Две субпопуляции *Sch. graminum*, сформировавшиеся на разных сортах сорго, различались по соотношению гаплотипов Sg1–Sg3, а на уме-



**Рис. 1.** Выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагмента *ND4*, выявленных в популяциях *Aphis craccivora* C. L. Koch, *Sitobion avenae* (F.), *Rhopalosiphum padi* (L.) и *Schizaphis graminum* (Rondani). Для сравнения приведены сиквенсы KX447142.1, KJ742384.1, KT447631.1 и AY531391.1 из международной базы последовательностей BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



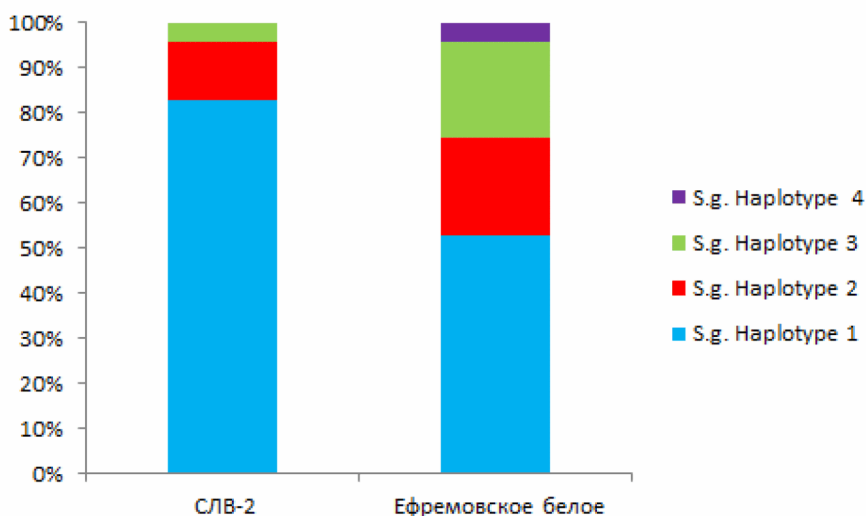
**Рис. 2.** Выравнивание кодируемых фрагментов ND4 аминокислотных последовательностей, выявленных в популяциях *Aphis crassivora* С. Л. Кош, *Stibion avenae* (F.), *Rhopalosiphum padi* (L.) и *Schizaphis graminum* (Ronand). Для сравнения приведены сиквенсы AOR53753.1, AP03065.1, AMV74158.1 и AAS00822.1 из международной базы последовательностей BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Нумерация аминокислот соответствует последовательности AOR53753.1 (*A. crassivora*).

ренно устойчивом образце Ефремовское белое выявлен уникальный гаплотип Sg4. Соотношение идентифицированных в субпопуляциях *Sch. graminum* гаплотипов представлено на рис. 3. Все полученные последовательности сходны с референсными KX447142.1 (*A. craccivora*), KJ742384.1 (*S. avenae*), KT447631.1 (*Rh. padi*) и AY531391.1 (*Sch. graminum*) на 96–100 %.

В пределах изученных выборок изменчивость фрагментов (рассчитанная по числу замен на каждый сайт последовательности и выраженная в процентах) варьировала в диапазоне 0.2–4.0 % у *A. craccivora*, 0.2–1.9 % – у *S. avenae*, 0.9–3.3 % – у *Rh. padi*, и 0.2–0.9 % – у *Sch. graminum*. Идентифицированные варианты различались точечными мутациями разных типов (транзиции и трансверсии). Транзиции – замены одного пуринового (аденин или гуанин) (A↔G) либо пиримидинового (цитозин или тимин) (C↔T) основания на другое. Трансверсии – это замены между пуринами и пиримидинами (A↔T, A↔C, G↔T, G↔C). Следовательно, ожидаемым отношением числа транзиций к числу трансверсий является 1 : 2 (если предположить, что все замены одинаково вероятны). Однако показано, что скорость таких мутаций варьирует у разных организмов (Keller et al., 2006). Оба типа мутаций могут приводить к заменам аминокислот (смысловые замены) или, напротив, вследствие вырожденности генетического кода могут быть синонимическими (не приводят к аминокислотным заменам). В каждой изученной нами выборке насекомых были обнаружены как смысловые, так и синонимические замены в кодирующих триплетях. В табл. 2 приведена характеристика обнаруженных в выборках замен.

У *A. craccivora* выявлено 18 полиморфных сайтов, среди которых 14 транзиций: пять G↔A и четыре T↔C в третьем положении кодонов, одна транзиция G↔A в первом положении, три T↔C – в первом и одна T↔C – во втором, а также 4 транс-



**Рис. 3.** Соотношение гаплотипов фрагмента гена *ND4* (%) в субпопуляциях *Schizaphis graminum* (Rondani), собранных одновременно на образцах сорго СЛВ-2 и Ефремовское белое.

версии: три  $A \leftrightarrow T$  находятся в третьем положении, а одна  $T \leftrightarrow G$  – в первом. В пяти случаях нуклеотидные замены приводят к аминокислотным, т. е. являются смысловыми. Все они относятся к консервативным заменам и обуславливают функционально эквивалентную замену аминокислот. Например, в позиции 211 предполагаемой аминокислотной последовательности белка ND4 замена изолейцина на валин происходит благодаря транзиции  $A \leftrightarrow G$  первого нуклеотида в соответствующем кодоне, а для аминокислоты в позиции 286  $T \leftrightarrow C$  замены нуклеотидов в первом и втором положениях кодона приводят к замещению лейцин/пролин (см. рис. 2). Все смысловые замены в вариантах ND4, выявленных у *A. craccivora*, связаны с взаимным обменом незаряженных гидрофобных аминокислот, что не приводит к существенным изменениям физико-химических свойств белка.

В выборке из популяции *S. avenae* обнаружено 9 полиморфных сайтов. Среди них – 7 транзиций (шесть  $G \leftrightarrow A$  и одна  $T \leftrightarrow C$  в третьем положении кодонов), а также две трансверсии ( $A \leftrightarrow T$  находится в третьем положении кодонов и  $C \leftrightarrow G$  – во втором). Последняя замена является смысловой и приводит к смене полярных незаряженных аминокислот: серин  $\leftrightarrow$  цистеин (позиция 333) (см. рис. 2).

В выборке из популяции *Rh. padi* найдено 14 полиморфных сайтов: 7 транзиций (пять  $G \leftrightarrow A$  и две  $T \leftrightarrow C$  в третьем положении кодонов) и 7 трансверсий (четыре  $A \leftrightarrow T$  и одна  $C \leftrightarrow G$  находятся в третьем положении кодонов, а одна  $A \leftrightarrow T$  и одна  $T \leftrightarrow G$  – в первом). Две транзиции в первом кодоне привели к смене неполярных гидрофобных лейцина и метионина в позиции 307, а также валина и фенилаланина – в позиции 319 предполагаемой белковой последовательности фрагмента гена ND4 (см. рис. 2).

В субпопуляциях *Sch. graminum* обнаружено 4 полиморфных сайта, среди которых 3 транзиции ( $G \leftrightarrow A$  в третьем положении кодонов и две  $T \leftrightarrow C$  – в первом) и одна  $A \leftrightarrow T$  трансверсия в третьем положении кодона. У варианта Sg4 одна из  $T \leftrightarrow C$  трансверсий в первом кодоне привела к кардинальной замене полярной незаряженной аминокислоты серин на неполярный, гидрофобный фенилаланин в позиции 318 (см. рис. 2). Такой вариант замены с частотой 4.1 % обнаружен только в субпопуляции *Sch. graminum*, питающейся на сорте Ефремовское белое (см. рис. 3).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Доля нуклеотидных замен в исследованных выборках тлей составила 0.2–3.3 %, что позволило идентифицировать у разных видов от 4 до 7 митохондриальных гаплотипов. По литературным данным, сходные результаты были получены и для фрагмента митохондриального гена COI, уровень полиморфизма которого варьировал от 0.2 до 2.7 % при исследовании люцерновой тли в Таиланде и достигал 1.04 % в популяциях *A. craccivora*, *Aphis fabae* Scopoli, *A. gossypii* Glover, *Acyrtosiphon pisum* (Harris), *Brevicoryne brassicae* (L.), *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) и *Myzus persicae* (Sulzer) в Кении (Kinyanjui et al., 2016; Wongsa et al., 2017). Большинство выявленных нами замен – синонимические (не приводят к смене аминокислот), что также согласуется с результатами предыдущих исследований (Song et al., 2016).

Соотношение числа транзиций и трансверсий – важный показатель, который характеризует изменчивость популяций, в нашем исследовании оказался переменным (см. табл. 2). Считается, что полиморфизм кодирующих участков генома определяется преимущественно транзициями. Так, у трех видов рода *Drosophila* Fallén – *D. melanogaster*



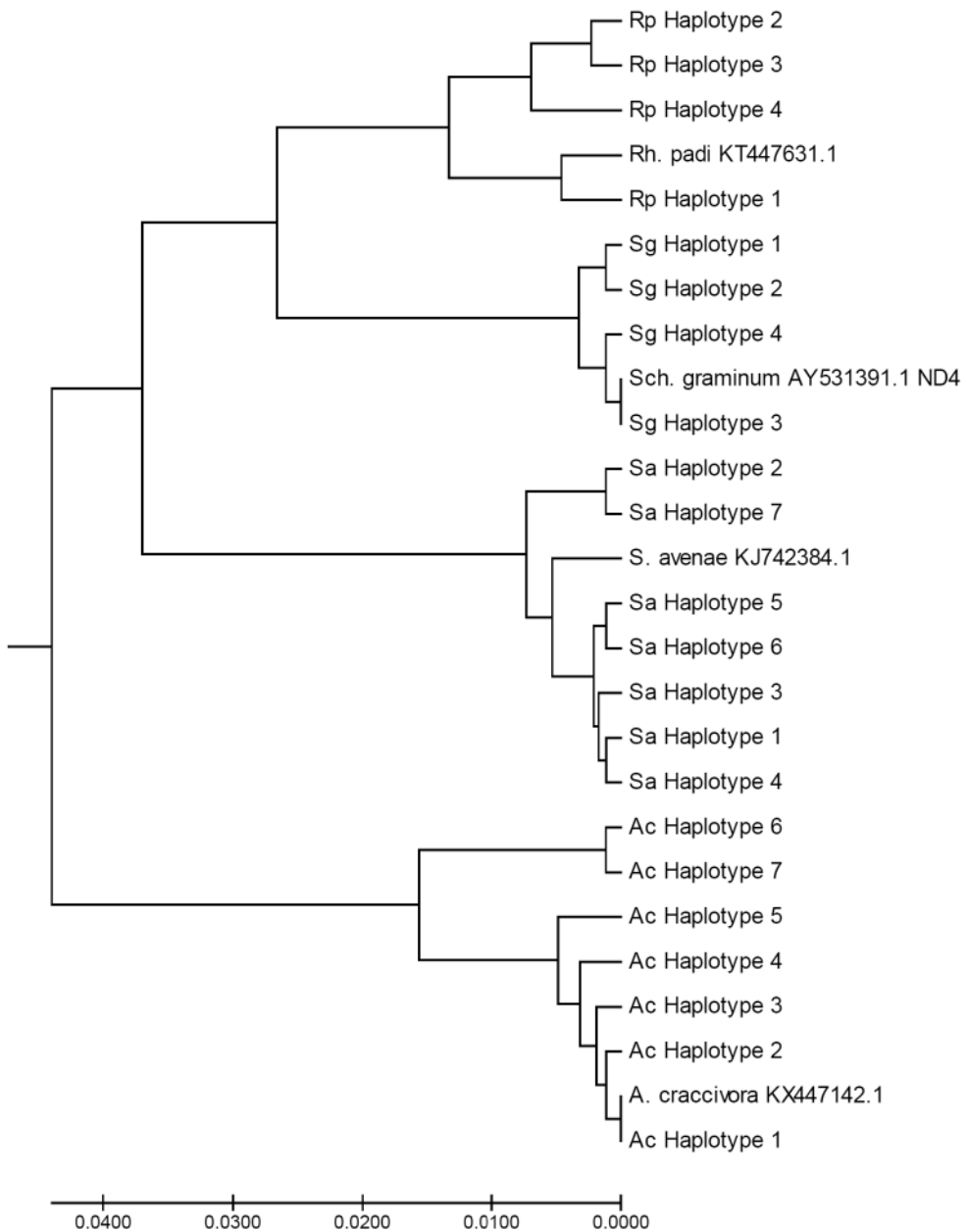
Meigen (изучен полиморфизм 24 локусов), *D. simulans* Sturtevant (12 локусов) и *D. pseudoobscura* Frolova (5 локусов) – число транзиций превышало число трансверсий вдвое (Moriyama, Powell, 1996). Широко изученный в популяциях насекомых полиморфизм гена *COI* определялся преимущественно трансверсиями (Karthika et al., 2016; Wongsu et al., 2017). При исследовании выборки *Rh. padi* частоты двух типов мутаций были тождественны, в то время как в выборках *A. craccivora*, *Sch. graminum* и *S. avenae* преобладали транзиции.

Нами выявлено существенное различие между образцами, собранными одновременно на различающихся по устойчивости к *Sch. graminum* сортах сорго, по соотношению гаплотипов Sg1–Sg3, а на умеренно устойчивом образце Ефремовское белое обнаружен уникальный гаплотип Sg4 (см. рис. 3). Ранее при изучении северокавказских (краснодарской и дагестанской) популяций *Sch. graminum* мы выявили 16 вариантов последовательностей гена *ND4*, причем подавляющее число замен относилось к транзициям. В краснодарской популяции по соотношению гаплотипов различались выборки клонов тли, собранные как одновременно на восприимчивом и умеренно устойчивом к фитофагу генотипах сорго, так и в разные периоды вегетации на одном образце растения-хозяина (Radchenko et al., 2019). Выявленный нами значительный однонуклеотидный полиморфизм фрагмента гена *ND4* может быть использован при изучении структуры популяций тлей.

Доля полиморфных сайтов в последовательности гена *ND4* у разных видов тлей оказалась выше (4.5–10.4 %), чем у образцов одного вида (до 4.0 %).

Некоторые сайты, вариабельные у одного вида, оказались мономорфными у другого. Например, только у *A. craccivora* встречались замены, которые вызывали синонимические и смысловые замены аминокислот в позициях 211, 213, 225, 230, 239, 267, 273, 281, 286, 291, 304, у *S. avenae* – в позициях 205 и 333, у *Rh. padi* – 390, 305, 306, 311, 317 и 323, у *S. graminum* – 318. В исследованных выборках сочетание 38 замен в 30 кодирующих триплетах было уникально для изученных видов, что согласуется с результатами кластерного анализа. На кладограмме (рис. 4) все найденные нуклеотидные последовательности образуют 4 четко различимые группы, соответствующие изученным видам *A. craccivora*, *S. avenae*, *Rh. padi* и *Sch. graminum*. Около 30 % замен являются смысловыми и обуславливают 10 видоспецифичных замен аминокислот в последовательности белка. Таким образом, как нуклеотидные, так и аминокислотные последовательности *ND4* позволяют определить видовую принадлежность любого гаплотипа. При попарном сравнении видов соотношение типов замен (транзиций и трансверсий) было примерно одинаковым. Лишь *A. craccivora* отличался от *Sch. graminum* бóльшим числом трансверсий по сравнению с транзициями. Возможно, не только SNP, но и тип замены в последовательности гена *ND4* является видоспецифичным признаком.

Значительный полиморфизм и особенности нуклеотидных замен характеризуют фрагмент митохондриального гена *ND4* не только как эффективный маркер для видовой идентификации, но также и как инструмент для изучения внутривидовой изменчивости разных видов тлей при воздействии биотических и абиотических факторов среды.



**Рис. 4.** Степень сходства нуклеотидной последовательности фрагмента *ND4* длиной 438 п. н. у *Aphis craccivora* C. L. Koch, *Sitobion avenae* (F.), *Rhopalosiphum padi* (L.) и *Schizaphis graminum* (Rondani). Кладограмма построена в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016) с помощью алгоритма UPGMA (метод невзвешенной попарной группировки с усреднением – unweighted pair group method using arithmetic averages) (Sneath, Sokal, 1973).

Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0481-2022-0001 «Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве» и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-016-00048).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алпатьева Н. В., Антонова О. Ю., Радченко Е. Е., Абдуллаев Р. А., Карабицина Ю. И., Анисимова И. Н. 2019. ПЦР-диагностика вредных организмов гуара. Методические указания. СПб.: ВИР, 36 с. <https://doi.org/10.30901/978-5-907145-44-3>
- Жученко А. А. 2012. Роль мобилизации генетических ресурсов цветковых растений, их идентификации и систематизации в формировании адаптивно-интегрированной системы защиты агроценозов, агроэкосистем и агроландшафтов. Саратов: ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока, 527 с.
- Шапошников Г. Х. 1964. Подотряд Aphidinea – гли. В кн.: Г. Я. Бей-Биенко (ред.). Определитель насекомых европейской части СССР в 5 томах. Т. 1. Низшие, древнекрылые, с неполным превращением. М.: Л.: Наука, с. 489–616.
- Aikhionbare F. O., Mayo Z. B. 2000. Mitochondrial DNA sequences of greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Biomolecular Engineering* **16** (6): 199–205. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(99\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(99)00054-4)
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30** (15): 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., Holmes S. P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13** (7): 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N., Peña A. G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7** (5): 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Karthika P., Krishnaveni N., Vadivalagan C., Murugan K., Nicoletti M., Benelli G. 2016. DNA barcoding and evolutionary lineage of 15 insect pests of horticultural crops in South India. *Karbala International Journal of Modern Science* **2** (3): 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2016.03.006>
- Keller I., Bensasson D., Nichols R. A. 2007. Transition-transversion bias is not universal: a counter example from grasshopper pseudogenes. 2007. *PLoS Genetics* **3** (2): e22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030022>
- Kinyanjui G., Khamis F. M., Mohamed S., Ombura L. O., Warigia M., Ekese S. 2016. Identification of aphid (Hemiptera: Aphididae) species of economic importance in Kenya using DNA barcodes and PCR-RFLP-based approach. *Bulletin of Entomological Research* **106** (1): 63–72. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000796>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33** (7): 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Marquina D., Andersson A. F., Ronquist F. 2019. New mitochondrial primers for metabarcoding of insects, designed and evaluated using in silico methods. *Molecular Ecology Resources* **19** (1): 90–104. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12942>
- Martinez-Torres D., Moya A., Hebert P. D. N., Simon J.-C. 1997. Geographic distribution and seasonal variation of mitochondrial DNA haplotypes in the aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* **87** (2): 161–167. <https://doi.org/10.1017/S0007485300027309>
- Mittal S., Dahleen L. S., Mornhinweg D. 2008. Locations of quantitative trait loci conferring Russian wheat aphid resistance in barley germplasm STARS-9301B. *Crop Science* **48** (4): 1452–1458. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.11.0651>
- Moriyama E. N., Powell J. R. 1996. Intraspecific nuclear DNA variation in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* **13** (1): 261–277. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025563>

- Ponce P., Muñoz-Tobar S., Carrasco-Montalvo A., Villota S. D., Coloma J., Wang C., Holecchek S., Cevallos V. 2021. Two haplotypes of *Aedes aegypti* detected by ND4 mitochondrial marker in three regions of Ecuador. *Insects* **12**: 200. <https://doi.org/10.3390/insects12030200>
- Radchenko E. E., Alpatieva N. V., Chumakov M. A., Abdullaev R. A. 2019. Variability of the North Caucasian populations of the greenbug for host virulence and discovered by molecular markers. *Russian Journal of Genetics* **55** (11): 1417–1425. <https://doi.org/10.1134/S1022795419110127>
- Radchenko E. E., Kuznetsova T. L., Zubov A. A. 2012. Longterm seasonal polymorphism of the Krasnodar greenbug population for virulence to sorghum varieties carrying different resistance genes. *Russian Journal of Ecology* **43** (3): 204–209. <https://doi.org/10.1134/S1067413612030137>
- Ratnasingham S., Hebert D. N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* **7** (3): 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. 1973. *Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: Freeman, 573 p.
- Song N., Zhang H., Li H., Cai W. 2016. All 37 Mitochondrial genes of aphid *Aphis craccivora* obtained from transcriptome sequencing: implications for the evolution of aphids. *PLoS One* **11** (6): e0157857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157857>
- Tamura K., Nei M., Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (30): 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Toju H., Baba Y. G. 2018. DNA metabarcoding of spiders, insects, and springtails for exploring potential linkage between above- and below-ground food webs. *Zoological Letters* **4** (4): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0088-9>
- Wongsa K., Duangphakdee O., Rattanawanee A. 2017. Genetic structure of the *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae) from Thailand inferred from mitochondrial COI gene sequence. *Journal of Insect Science* **17** (4): 84. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex058>

## MITOCHONDRIAL *ND4* GENE AS A MARKER TRAIT FOR STUDYING STRUCTURE AND DYNAMICS OF APHID (HEMIPTERA, APHIDIDAE) POPULATIONS

N. V. Alpatieva, I. N. Anisimova, E. E. Radchenko

*Key words:* Aphididae, populations, gene *ND4*, nucleotide substitutions, transitions, transversions.

### SUMMARY

The polymorphism in a fragment of the gene *ND4* encoding NADH dehydrogenase subunit 4 was investigated using next-generation sequencing (NGS) technology. The spectrum of point substitutions was evaluated in the populations of alfalfa (*Aphis craccivora* C. L. Koch), English grain (*Sitobion avenae* Fabricius), bird cherry-oat (*Rhopalosiphum padi* L.) aphids and greenbug (*Schizaphis graminum* Rondani) collected in Krasnodar Territory and in the Russian North-West. The mitochondrial haplotypes have been identified, whose nucleotide sequences coincided with the reference ones by 96–100%. The level of intraspecific polymorphism of the gene *ND4* was 0.2–4.0% in *A. craccivora*, 0.2–1.9% in *S. avenae*, 0.9–3.3% in *Rh. padi*, and 0.2–0.9% in *Sch. graminum*. The proportion of polymorphic sites in the *ND4* gene sequences among different aphid species was higher than within one species. The analysis of the ratio of mitochondrial haplotypes makes it possible investigating the influence of various factors (for example, the resistance of the host plant) on the structure of insect populations. A significant difference in the ratio of Sg1–Sg3 haplotypes was revealed between the samples collected simultaneously on sorghum cultivars differing in resistance to *Sch. graminum*, and a unique Sg4 haplotype was found on a moderately resistant sample of Efremovskoe white.