

## ПОЛИМОРФИЗМ РОССИЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ *Rhopalosiphum padi* L. ПО ДНК-МАРКЕРАМ

© 2024 г. Е. Е. Радченко<sup>1</sup>, \*, И. Н. Анисимова<sup>1</sup>, Н. В. Алпатьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия

\*e-mail: eugene\_radchenko@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.02.2024 г.

После доработки 22.02.2024 г.

Принята к публикации 29.02.2024 г.

С помощью технологии высокопродуктивного секвенирования нового поколения (NGS) в 14 выборках из трех популяций черемухово-злаковой тли (*Rhopalosiphum padi* L.) изучали полиморфизм фрагмента гена *ND4*, кодирующего субъединицу 4 NADH-дегидрогеназы, и определяли спектр точечных замен. Насекомых собирали на северо-западе России (окрестности С.-Петербурга) и на Северном Кавказе (Краснодарский край и Дагестан). Идентифицировали гаплотипы митохондриальной ДНК (мтДНК), нуклеотидные последовательности которых на 97.95–99.80% совпадали с референсной (GenBank accession KT447631.1). Уровень внутривидового полиморфизма данного фрагмента гена *ND4* длиной 438 пн варьировал от 0.2 до 4.3%. В течение двух лет в последовательностях *ND4* найдено 33 полиморфных сайта (17 транзиций и 16 трансверсий), что позволило идентифицировать 30 гаплотипов мтДНК. Популяции *Rh. padi*, собранные одновременно на разных растениях-хозяевах или в разное время на черемухе (весной) и злаках (летом), различались по соотношению основного гаплотипа, а также по составу уникальных минорных гаплотипов. Анализ соотношений митохондриальных ДНК гаплотипов свидетельствует о важной роли генотипа растения-хозяина при формировании структуры популяций *Rh. padi*.

**Ключевые слова:** *Rhopalosiphum padi*, популяции, ген *ND4*, нуклеотидный полиморфизм, гаплотип митохондриальной ДНК.

DOI: 10.31857/S0016675824080068 EDN: BFPTNK

На многих сельскохозяйственных культурах и прежде всего на злаках существенно увеличилась вредоносность тлей. Повсеместно наблюдающаяся генетическая однородность агроценозов способствует ускорению микроэволюции насекомых. Характерная для злаковых тлей возможность приспособления к питающему растению вызывает необходимость изучения изменчивости насекомых, источником которой могут быть иммиграция клонов в локальную популяцию извне, мутационный процесс и комбинативная изменчивость внутри локальной популяции по генам вирулентности к растениям-хозяевам. Понятно, что для этого требуются исследования по определению границ популяций фитофагов, направления и дальности их миграций. Известно, что тли могут переноситься воздушными потоками на дальние расстояния. Так, отмечен частый перенос тлей в Швецию через Балтийское море из Дании, Германии и Польши [1]. Поэтому вновь образовавшийся биотип вредителя может довольно быстро расселиться на обширной

территории. Весенние миграции злаковых тлей обычно происходят с юга на север и связаны преимущественно с переносом насекомых воздушными течениями. Летние и осенние миграции злаковых тлей обусловлены главным образом фенологией зерновых культур [2]. Сведения о границах популяций тлей в России очень скудны. Между тем такого рода сведения имеют ключевое значение для разработки целесообразных программ территориального размещения сортов зерновых культур, защищенных разными генами устойчивости к фитофагам.

Для изучения структуры популяций насекомых в настоящее время широко используют однонуклеотидный полиморфизм (SNP) митохондриальных и ядерных генов. Сравнение популяций тлей по нуклеотидным последовательностям полиморфных фрагментов митохондриального, нерекombинирующего генома становится все более популярным. При исследовании популяций насекомых, в том числе и тлей, чаще других используют ген *COI*, кодирующий субъединицу 1 цитохромоксидазы

[3–5]. Полиморфизм гена *ND4*, кодирующего субъединицу 4 фермента NADH-дегидрогеназы, изучен значительно меньше. В аннотированной последовательности митохондриальной ДНК люцерновой тли *Aphis craccivora* C.L. Koch этот ген находится между 6791-й и 8048-й нуклеотидными позициями. При анализе популяции обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* Rondani в США фрагмент *ND4* был описан как высокополиморфный в сравнении с *ND1* (ген, кодирующий субъединицу 1 NADH-дегидрогеназы) и фрагментом цитохрома *b* (*cytb*) [6]. В популяции люцерновой тли в Китае обнаружили около 4% полиморфных сайтов в последовательности гена *ND4* [3]. Значительный полиморфизм фрагмента *ND4* был выявлен и нами при сравнении образцов из популяций обыкновенной злаковой тли, собранных на Северном Кавказе в разное время года на разных культурах [7].

Цель настоящей работы – оценить диагностическую ценность однонуклеотидного полиморфизма фрагмента гена *ND4* для исследования популяций черемухово-злаковой тли *Rhopalosiphum padi* L., обитающих в различных эколого-географических регионах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Выборки насекомого

Черемухово-злаковая тля – повсеместно распространенный олигофаг (повреждает злаковые культуры) с четко выраженной клоновой структурой популяций (преимущественное размножение партеногенезом, одно амфигонное поколение осенью). *Rh. padi* зимует на черемухе, хотя на юге возможна зимовка и на злаках, предпочитает для питания зерновые колосовые злаки, изредка питается на сорго. Сбор насекомых проводили в 2021–2022 гг. в контрастных по климатическим условиям зонах Европейской части России:

на северо-западе России – в окрестностях Санкт-Петербурга (Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР, г. Пушкин) – влажный холодный климат, небольшие площади посевов зерновых;

на Северном Кавказе – в Дагестане, в окрестностях г. Дербента (Дагестанская опытная станция ВИР) – теплый климат, поливное земледелие, высокая влажность воздуха вследствие искусственного орошения и близости моря, очаговые посевы злаковых; в Гулькевичском районе Краснодарского края (Кубанская опытная станция ВИР) – теплый и крайне изменчивый по увлажнению климат, широкое возделывание озимых зерновых культур.

В нашем распоряжении было 14 выборок *Rh. padi*. В 2021 г. на посевах зерновых в Дагестане численность тли была очень низкая, насекомых собрали лишь на диком сорго (апрель). В Краснодарском

крае тлю собрали в июле на созревающем ячмене и две выборки – на разных сортах сорго. В С.-Петербурге одна выборка была собрана на черемухе (май), две – на коллекционных посевах ячменя и пшеницы (июнь). В 2022 г. *Rh. padi* собрали в Дагестане на пшенице в конце полевого сезона (май). В С.-Петербурге одна выборка была собрана на черемухе в мае перед миграцией *Rh. padi* на посевы зерновых, а пять выборок – в июле и августе на разных сортах пшеницы (Ленинградка, Дельфи 400), ячменя (Белогорский) и овса (Воггус). Сорт Ленинградка восприимчив к насекомому, тогда как Дельфи 400 защищен двумя доминантными комплексными генами устойчивости к *Rh. padi* [8].

В каждом случае было собрано не менее 300 насекомых в нескольких (5–20) точках. Насекомых помещали в 70%-ный этанол в пробирку с завинчивающейся крышкой. Перед выделением ДНК заспиртованный материал подсушивали при комнатной температуре. Образцы, собранные в С.-Петербурге, немедленно замораживали и хранили при –20 °С.

### Молекулярно-генетический анализ

Суммарную ДНК выделяли из 300–500 особей каждой выборки с помощью SDS-буфера (100 мМ трис-НСl, pH 9.0; 100 мМ ЭДТА; 1.0% SDS) по протоколу, разработанному для тканей насекомых и детально описанному в методических указаниях [9]. Фрагмент гена *ND4* длиной 438 пн, локализованный в интервале 8672–8252 пн последовательности митогенома *Rh. padi* (GenBank: KT447631.1 в базе нуклеотидных последовательностей NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)), амплифицировали с помощью праймеров F: 5'-TCCAAAGGCTCATGTTGAGGC-3' и R: 5'-CCAAATAAATTTAAAGATGGGGGA-3' при температуре отжига 59 °С. Фрагменты секвенировали на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США) согласно инструкции производителя с помощью набора реактивов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2 \* 300 н). Работа проводилась в ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ. Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывали с помощью программного обеспечения “Trimmomatic” [10] и “QIIME” [11]. Полученные последовательности были отфильтрованы по качеству, очищены и обрезаны с использованием пакета Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2) в программной среде R [12]. Редкие аллельные варианты с частотой менее 1% были исключены из анализа.

Последовательности были таксономически идентифицированы по степени сходства с помощью международной базы нуклеотидных последовательностей NCBI GenBank и поисковой системы

BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве референсной использовали последовательность гена *ND4* частично секвенированного митогенома черемухово-злаковой тли, собранной в Китае (GenBank: KT447631.1). Выравнивание и анализ полученных последовательностей проводили с помощью программы MEGA version 7 [13]. Парное сравнение по числу нуклеотидных замен на каждый сайт рассчитывали с использованием метода максимального комбинированного правдоподобия (maximum composite likelihood method) [14] в программе MEGA7 [13]. Для трансляции использовали код 5.

Генетические различия между 14 выборками тли оценивали с помощью индекса фиксации Райта  $F_{st}$  [15], который рассчитывали в программе GenAlEx 6.5 (Genetic analysis in Excel, 6.5 <http://biology.anu.edu.au/GenAlEx>) [16]. Многомерная диаграмма сходства между выборками *Rh. padi* по минорным гаплотипам мтДНК построена с помощью опции Principal Coordinates (PCoA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью высокопроизводительного секвенирования в 14 пробах ДНК *Rh. padi* мы получили свыше 200 000 последовательностей фрагмента гена *ND4* длиной 438 пн. Найдено 33 полиморфных сайта, что позволило идентифицировать 30 гаплотипов мтДНК (рис. 1, доп. таблица). Ни один из гаплотипов не был идентичен референсному фрагменту гена *ND4 Rh. padi* (GenBank: KT447631.1), однако сходство оказалось значительным и его степень варьировала от 97.95% (девять нуклеотидных замен) до 99.80% (одна замена). Варианты нуклеотидных последовательностей, обозначенные нами seq1\_2021/2022, seq2\_2021/2022, seq3\_2021/2022 и seq12\_2021/2022, встречались во всех выборках, собранных в 2021 и 2022 гг., причем всегда преобладал seq1.

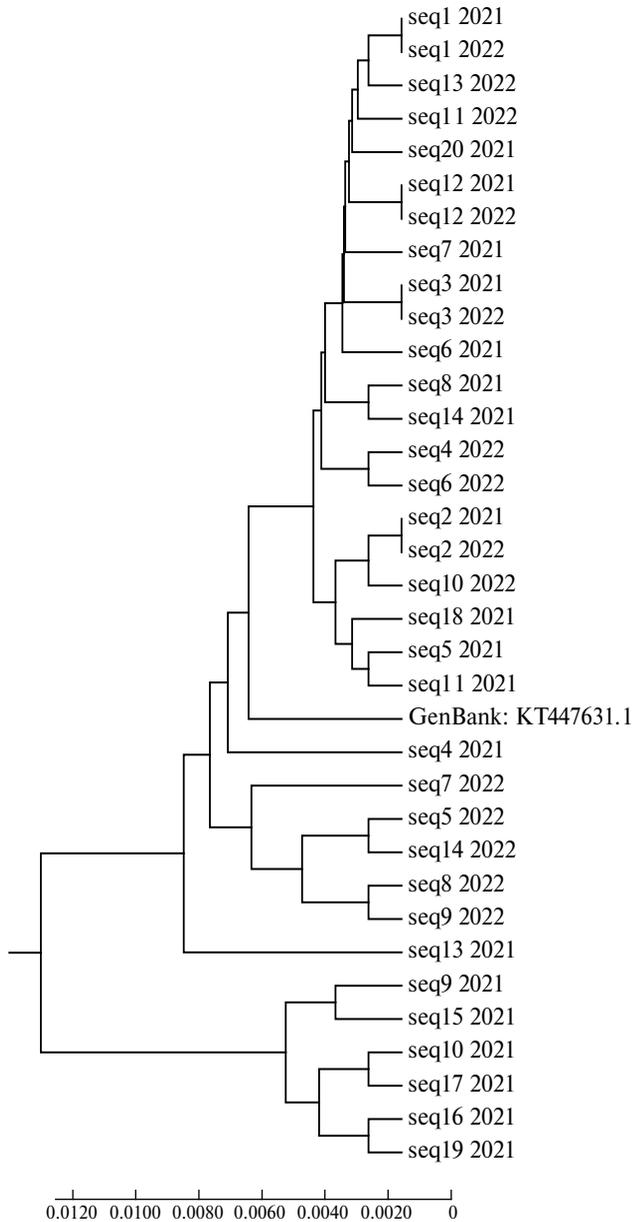
Показатель изменчивости фрагмента гена *ND4* в исследованных выборках *Rh. padi* (рассчитанный по числу замен на каждый сайт последовательности и выраженный в процентах) варьировал в диапазоне 0.2–4.3%, что соответствует 1–19 SNP. Идентифицированные варианты различались точечными мутациями разных типов (транзиции и трансверсии). Выявили 17 транзиций (восемь G→A и девять T→C) и 16 трансверсий (пять A→T, девять T→G и две A→C), т. е. частоты двух типов мутаций тождественны. Идентифицировали 20 синонимических замен и 13 миссенс-мутаций. Смысловые замены в большинстве случаев обусловили функционально эквивалентную замену гидрофобных незаряженных аминокислот M, L, I, V, F, W и G, а также гидрофильных незаряженных аминокислот S и Y. Только в северо-западной популяции насекомого, питавшейся на черемухе в 2021 г. и на сорте пшеницы

Дельфи 400 в 2022 г., обнаружены гаплотипы, у которых в позиции 320 идентифицирована смысловая замена пролина с гидрофобным незаряженным радикалом на серин с гидрофильным незаряженным радикалом (P→S) (нумерация приведена в соответствии с последовательностью субъединицы 4 митохондриальной NADH-дегидрогеназы *Rh. padi*, референсный образец GenBank:AMV74158.1). Уникальными оказались шесть гаплотипов мтДНК насекомого seq\_9, seq\_15, seq\_10, seq\_17, seq\_16 и seq\_19, выявленных в образцах, собранных в июне 2021 г. на пшенице, которые отличались от остальных семью заменами: тремя трансверсиями и четырьмя транзициями (рис. 2). Замены нуклеотидов в трех триплетах TTT/ATT, TTG/TTT и GTT/ATT оказались смысловыми и привели к заменам гидрофобных незаряженных аминокислот F→I, L→F, V→I. Суммарная доля таких гаплотипов в выборке была существенной и составила 6.7% (2033 последовательности из 30503). На кладограмме они сформировали отдельную группу (рис. 1).

Мы исследовали выборки *Rh. padi*, питавшиеся в северо-западном регионе России в 2021 г. на разных растениях: весной на черемухе, летом на разных сортах пшеницы и ячменя, и обнаружили, что при переходе с черемухи на злаки варьирует суммарная доля гаплотипов seq1 и seq2: от 95.6 до 85.8 и 97.3% соответственно, а также состав минорных гаплотипов в выборке. Уникальными для собранной на черемухе выборки оказались гаплотипы seq3 и seq7, которые “терялись” при миграции популяции летом на злаки, где были выявлены “новые”: 11 гаплотипов – на пшенице и два – на ячмене. Суммарная доля “новых” гаплотипов варьировала и составила 12.4% на пшенице и 2.8% на ячмене (рис. 3).

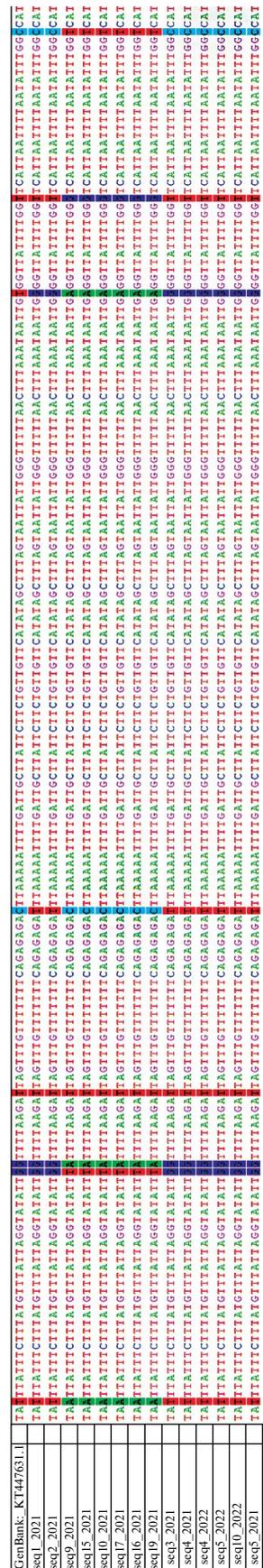
В шести выборках тли, собранных на северо-западе России в 2022 г., вариабельность минорных гаплотипов была значительной. На черемухе обнаружено семь гаплотипов, что вдвое выше, чем в 2021 г. Выборки *Rh. padi*, собранные на неустойчивом к тле сорте Ленинградка в июле и августе, различались незначительно. В августе появились два новых гаплотипа, однако доля каждого из них не превышала 1%. Различия между выборками тли, питавшимися на устойчивом (Дельфи 400) и восприимчивом (Ленинградка) сортах пшеницы в августе, были существенны как по содержанию основного гаплотипа (94 и 89.4%), так и по наборам уникальных минорных гаплотипов. Лишь гаплотип seq4 присутствовал в обеих выборках. Уникальный гаплотип (встречаемость 2.4%) был найден в выборке, собранной на овсе (рис. 4).

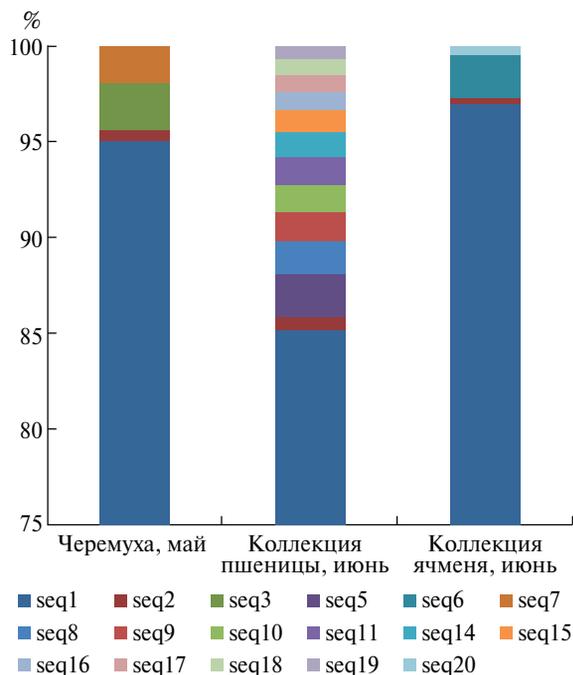
Сходные результаты получены и при анализе краснодарской популяции тли. Три выборки *Rh. padi* были собраны в июле одновременно на ячмене и сортах сорго Ефремовское белое и СЛВ2. На созревающем ячмене, с которого тля активно



**Рис. 1.** Разнообразие фрагмента митохондриального гена *ND4* длиной 438 пн в выборках *Rh. padi*. Анализ 34 нуклеотидных последовательностей выполнен в программе MEGA7 [13] с помощью алгоритма UPGMA (метод невзвешенной попарной группировки с усреднением) [17].

**Рис. 2.** Выравнивание некоторых нуклеотидных последовательностей, обнаруженных в выборках *Rh. padi*. Уникальные замены, обнаруженные в выборке насекомого, собранной в 2021 г. на пшенице, выделены цветом.



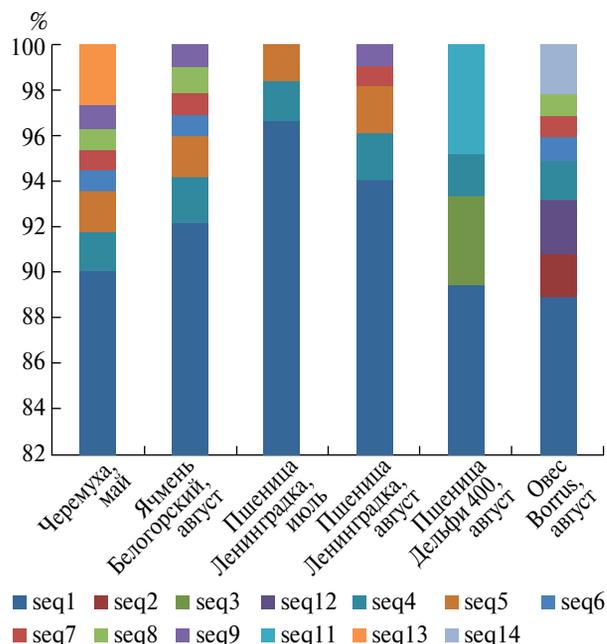


**Рис. 3.** Встречаемость гаплотипов мтДНК в выборках *Rh. padi*, собранных в Санкт-Петербурге на черемухе, пшенице и ячмене в 2021 г.

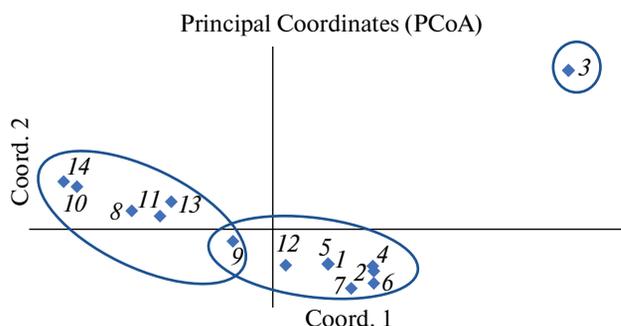
мигрировала на сорго, обнаружен лишь один основной гаплотип, а на сортах сорго выявлены уникальные для каждого сорта минорные гаплотипы, составляющие от 1 до 6.6% в выборке.

Значительно различались и выборки, собранные в Дагестане на злаках в 2021 и 2022 гг. В выборке *Rh. padi*, питавшейся на диком сорго, выявлен один основной гаплотип, а на пшенице – шесть минорных гаплотипов (12.8%).

На многомерной дендрограмме, построенной на основании значений индекса фиксации  $F_{st}$ , изученные выборки кластеризовались в две группы (рис. 5). Ни в одну из групп не вошла выборка из северо-западной популяции *Rh. padi*, питавшейся на образцах коллекции пшеницы в 2021 г. Все остальные выборки, собранные в 2021 г. на разных хозяевах в Дагестане, Краснодарском крае и на северо-западе России, сходны друг с другом. Очень близкими оказались выборки, которые собирали на северо-западе в течение двух лет на черемухе и ячмене. На пшенице в 2022 г. питались насекомые, существенно отличающиеся от собранных на ячмене и черемухе. Необходимо отметить и различие *Rh. padi*, питавшейся на устойчивом и восприимчивом сортах пшеницы, которое к концу сезона стало отчетливо выраженным. Собранная в Дагестане *Rh. padi* была сходна с питавшимся на овсе и восприимчивом сорте пшеницы насекомым.



**Рис. 4.** Встречаемость гаплотипов мтДНК в выборках *Rh. padi*, собранных в Санкт-Петербурге на черемухе, ячмене, овсе и двух сортах пшеницы в 2022 г.



**Рис. 5.** Многомерная диаграмма генетического сходства по гаплотипам мтДНК между выборками *Rh. padi* (1–14) по индексу фиксации  $F_{st}$ . 1 – Дагестан, дикое сорго, 04.2021; 2 – С.-Петербург, черемуха, 05.2021; 3 – С.-Петербург, коллекция пшеницы, 06.2021; 4 – С.-Петербург, коллекция ячменя, 06.2021; 5 – Краснодарский край, коллекция ячменя, 07.2021; 6 – Краснодарский край, сорго (сорт СЛВ-2), 07.2021; 7 – Краснодарский край, сорго (Ефремовское белое), 07.2021; 8 – Дагестан, пшеница (Безостая 1), 05.2022; 9 – С.-Петербург, пшеница (Ленинградка), 07.2022; 10 – С.-Петербург, ячмень (Белогорский), 08.2022; 11 – С.-Петербург, пшеница (Ленинградка), 08.2022; 12 – С.-Петербург, пшеница (Дельфи 400), 08.2022; 13 – С.-Петербург, овес (Borrus), 08.2022; 14 – С.-Петербург, черемуха, 05.2022.

Сравнение объединенных выборок насекомых, собранных в пределах одной популяции, продемонстрировало существенное различие всех изученных популяций *Rh. padi* (рис. 6). Варьирование частот гаплотипов мтДНК оказалось значимым как для эколого-географически разобщенных популяций (Дагестан, Краснодарский край, Санкт-Петербург), так и по годам (Дагестан 2021 г. – Дагестан 2022 г., С.-Петербург 2021 г. – С.-Петербург 2022 г.). Несущественно различались лишь популяции *Rh. padi* из Дагестана и Краснодарского края в 2021 г.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованных нами 14 выборках *Rh. padi* из различных регионов России доля нуклеотидных замен во фрагменте митохондриального гена *ND4* длиной 438 пн варьировала от 0.2 до 4.3%. Идентифицировали 30 митохондриальных гаплотипов (20 – в семи выборках, собранных в 2021 г., и 14 гаплотипов в 2022 г.), среди них четыре варианта были найдены в 2021 и 2022 гг.

По литературным данным, сходный размах изменчивости характерен и для наиболее часто используемого при изучении популяций насекомых фрагмента гена *COI*. В популяциях *Rhopalosiphum* spp., *Aphis craccivora*, *A. fabae* Scopoli, *A. gossypii* Glover, *Acyrtosiphon pisum* Harris, *Brevicoryne brassicae* L., *Lipaphis pseudobrassicae* Davis и *Myzus persicae* Sulzer уровень его полиморфизма варьировал от 0.2 до 2.7% [4, 5, 18]. Однако, исследуя разнообразие 275 особей *Rh. padi*, собранных в 15 пунктах в Китае, Wang с соавт. [19] нашли низкий уровень нуклеотидного полиморфизма *COI* и *cytb* (0.147 и 0.160% соответственно).

По нашим данным, вариабельность гена *ND4* оказалась выше, что позволило сравнить 14

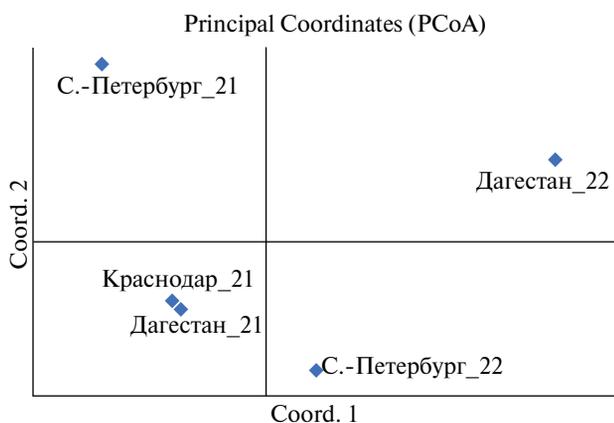
выборок из трех популяций насекомого. Во всех выборках преобладал (85–100%) один гаплотип. Сравнивая популяции, мы оценивали долю основного гаплотипа, а также число и вариабельность минорных гаплотипов, доля которых варьирует от 1 до 4%.

Ранее, исследуя полиморфизм фрагмента гена *ND4 Sch. graminum*, мы выявили существенные различия между популяциями насекомого, собранными как одновременно на восприимчивом и умеренно устойчивом к фитофагу генотипах сорго, так и в разные периоды вегетации на одном образце растения-хозяина [7]. В настоящем исследовании анализ соотношения гаплотипов мтДНК также свидетельствует о влиянии на генетическую структуру популяций *Rh. padi* прежде всего растения-хозяина.

В 2021 г. повсеместно отмечалась низкая численность вредителя. Достаточное количество насекомых в Дагестане удалось собрать только на диком сорго (*Sorghum halepense* (L.) Pers.), где выявлен лишь один митохондриальный гаплотип. В С.-Петербурге *Rh. padi* собрали в начале полевого сезона (июнь) при миграции тли на коллекционные посевы ячменя и пшеницы, после чего размножение природных энтомофагов резко уменьшило численность насекомого. Выборки, собранные на черемухе и ячмене, были очень близки и резко отличались от тли, питавшейся на пшенице, у которой выявлено 11 “новых” гаплотипов (рис. 1, 5). В Краснодарском крае на коммерческом посеве ячменя, с которого насекомое в июле мигрировало на сорго, отмечен один гаплотип насекомого, а в выборках *Rh. padi*, собранных на двух сортах сорго, идентифицированы специфичные для каждого сорта минорные гаплотипы.

Довольно высокая численность насекомого отмечалась в 2022 г. на северо-западе России. Как и ранее, выявлено высокое генетическое сходство выборок с черемухи и ячменя (рис. 5). Существенно отличались от них выборки, собранные на пшенице. Следует отметить значимое различие насекомых, собранных в конце полевого сезона (август) на восприимчивом (Ленинградка) и устойчивом (Дельфи 400) сортах пшеницы (рис. 5). Различия между географически разобщенными популяциями, а также внутри популяций по годам, как для дагестанских, так и северо-западных выборок, вполне очевидны (рис. 6).

Таким образом, нам удалось выявить достаточно высокий полиморфизм фрагмента гена *ND4*, кодирующего субъединицу 4 NADH-дегидрогеназы черемухово-злаковой тли, по частотам минорных гаплотипов мтДНК – как общий, так и сезонный. Установлено, что эта изменчивость зависит прежде всего от ботанической принадлежности и генотипа растения-хозяина. Отбор клонов *Rh. padi*



**Рис. 6.** Многомерная диаграмма генетического сходства по гаплотипам мтДНК между популяциями *Rh. padi* по индексу фиксации  $F_{st}$ .

на восприимчивом и устойчивом сортах пшеницы проходит дифференцированно. Значительный однонуклеотидный полиморфизм фрагмента гена *ND4* может быть использован при изучении структуры популяций опасного фитофага.

Наши исследования продемонстрировали значение средообразующей роли растений в биологических сообществах. Степень обеспеченности ресурсом (обилие в пространстве и во времени; площади, занятые под культурой) – важнейший параметр, определяющий внутривидовое разнообразие фитофага. Пригодность растений определяется не только их пищевой ценностью, защитными свойствами и доступностью, но и изменчивостью этих свойств во времени и пространстве.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 20-016-00048) и в рамках Государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № FGEM-2022-0009 “Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wiktelius S.* Long range migration of aphids into Sweden // *Int. J. Biometeorol.* 1984. V. 28. № 3. P. 185–200. <https://doi.org/10.1007/BF02187959>
2. *Kieckhefer R.W., Lytle W.F.* Summer and autumn flight of cereal aphids in South Dakota // *J. Econ. Entomol.* 1976. V. 69. № 3. P. 421–422. <https://doi.org/10.1093/jee/69.3.421>
3. *Song N., Zhang H., Li H., Cai W.* All 37 mitochondrial genes of aphid *Aphis craccivora* obtained from transcriptome sequencing: Implications for the evolution of aphids // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157857>
4. *Wongsa K., Duangphakdee O., Rattanawanee A.* Genetic structure of the *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae) from Thailand inferred from mitochondrial COI gene sequence // *J. Insect Sci.* 2017. V. 17. № 4. Article 84. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex058>
5. *Guo J., Li J., Massart S. et al.* Analysis of the genetic diversity of two *Rhopalosiphum* species from China and Europe based on nuclear and mitochondrial genes // *Insects.* 2023. V. 14. Article 57. <https://doi.org/10.3390/insects14010057>
6. *Aikhionbare F.O., Mayo Z.B.* Mitochondrial DNA sequences of greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes // *Biomol. Eng.* 2000. V. 16. № 6. P. 199–205. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(99\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(99)00054-4)
7. *Radchenko E.E., Alpatieva N.V., Chumakov M.A., Abdullaev R.A.* Variability of the North Caucasian populations of greenbug for the virulence to host plants and by the molecular markers // *Russ. J. Genet.* 2019. V. 55. № 11. P. 1417–1425. <https://doi.org/10.1134/S1022795419110127>
8. *Radchenko E.E., Berim M.N., Zubov A.A.* Genetic control of different types of the aphid resistance in cereal crops // *Entomol. Rev.* 2007. V. 87. № 3. P. 253–262. <https://doi.org/10.1134/S0013873807030025>
9. *Анатьева Н.В., Антонова О.Ю., Радченко Е.Е. и др.* ПЦР-диагностика вредных организмов гуара: методические указания / Под ред. Потокиной Е.К. СПб.: ВИР, 2019. <https://doi.org/10.30901/978-5-907145-44-3>
10. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 15. P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
11. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al.* QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 5. P. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
12. *Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nat. Methods.* 2016. V. 13. № 7. P. 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
13. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
14. *Tamura K., Nei M., Kumar S.* Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 30. P. 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
15. *Giraud T., Enjalbert J., Fournier E. et al.* Population genetics of fungal diseases of plants // *Parasite.* 2008. V. 15. № 3. P. 449–454. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153449>
16. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

17. *Sneath P.H.A., Sokal R.R.* Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.
18. *Kinyanjui G., Khamis F.M., Mohamed S. et al.* Identification of aphid (Hemiptera: Aphididae) species of economic importance in Kenya using DNA barcodes and PCR-RFLP-based approach // Bull. Entomol. Res. 2016. V. 106. № 1. P. 63–72. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000796>
19. *Wang K., Liu G.M., Song C.M. et al.* Mitochondrial genetic diversity in the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) in China // J. Agr. Sci. Tech. 2018. V. 20. № 1. P. 95–107.

## Polymorphism of Russian Populations of *Rhopalosiphum padi* L. Based on DNA Markers

E. E. Radchenko\*, I. N. Anisimova and N. V. Alpatieva

Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, 190000 Russia

\*e-mail: eugene\_radchenko@rambler.ru

Using the next-generation sequencing (NGS) technology, the nucleotide polymorphism in a fragment of the *ND4* gene encoding NADH dehydrogenase subunit 4 was studied in 14 samples from three populations of the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.) and the range of nucleotide polymorphism was determined. The insects were collected in 2021 and 2022 in the North-West of Russia (in the vicinity of St. Petersburg) and in the northern Caucasus (Krasnodar Territory and Dagestan). Mitochondrial DNA haplotypes were identified, which have 97.95–99.80% sequence identity with the reference GenBank accession number KT447631.1. The level of intraspecific polymorphism of a 438 bp *ND4* gene fragment in *Rh. padi* varied from 0.2 to 4.3%. In the two-year experiments, 33 polymorphic sites (17 transitions and 16 transversions) were found in the *ND4* sequences, which made it possible to identify 30 mitochondrial DNA haplotypes. The *Rh. padi* populations collected simultaneously on different host plants or at different times on bird cherry (spring) and cereals (summer) differed in the proportion of the main haplotype, as well as in the composition of unique minor haplotypes. Analysis of the ratio of mitochondrial DNA haplotypes suggests the important role of the host plant genotype in the formation of the structure of *Rh. padi* populations.

**Keywords:** *Rhopalosiphum padi*, populations, gene *ND4*, nucleotide substitutions, mitochondrial DNA haplotype.