



## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛЮПИНОВОЙ ТЛИ *MACROSIPHUM ALBIFRONS* (HEMIPTERA, APHIDIDAE) С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Р.А. Абдуллаев\*, Н.В. Алпатьева, М.А. Вишнякова, Е.Е. Радченко

Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, Санкт-Петербург

\* ответственный за переписку, e-mail: [abdullaev.1988@list.ru](mailto:abdullaev.1988@list.ru)

Люпин узколистный – ценная кормовая высокобелковая культура, перспективная и для продовольственного использования. Видовой состав вредных организмов, питающихся на люпине изучен недостаточно. В 2019–2021 гг. на северо-западе Российской Федерации (Санкт-Петербург, г. Пушкин) исследовали видовой состав насекомых, заселяющих образцы люпина узколистного различного происхождения. На территории России была впервые обнаружена люпиновая тля *Macrosiphum albifrons* – инвазивный фитофаг североамериканского происхождения. С помощью секвенирования фрагмента митохондриального гена субъединицы 1 цитохром с-оксидазы (*COI*), традиционно используемого для диагностики Aphididae, верифицировали корректность определения видовой принадлежности насекомого. Предложены специфичные праймеры, позволяющие амплифицировать часть ДНК штрих-кода длиной 408 п.н. для идентификации фитофага.

**Ключевые слова:** *Macrosiphum albifrons*, люпин узколистный, инвазивный фитофаг, ген *COI*

Поступила в редакцию: 14.12.2023

Принята к печати: 01.06.2024

Люпиновая тля *Macrosiphum albifrons* Essig, 1911 (Hemiptera, Aphididae) – один из основных вредителей люпина во всем мире, найденный на 21 виде рода *Lupinus* L. Питание насекомого приводит к снижению урожайности растений, а при массовом размножении – к гибели (Carter et al., 1984; Hinz, 1992; Ferguson, 1994).

Вид происходит из Северной Америки, где впервые был найден на юге штата Калифорния (Essig, 1911). В 1981 г. появилось первое сообщение об обнаружении люпиновой тли в Англии (Stroyan, 1981). Позднее (Erppler, Hinz, 1987) сообщили о находке тли в материковой части Европы, в районе города Гессен (центральная Германия), и ее способности переносить вирус мозаики огурца (CMV – *Cucumber Mosaic Virus*). Вредитель быстро распространился практически по всей территории Европы (Karl et al., 1991; Vučetić et al., 2014). В начале прошлого десятилетия люпиновая тля была обнаружена в граничащей с Россией Могилевской обл. Белоруссии (Buga, Stekolshikov, 2012; Жоров и др., 2017).

*M. albifrons* имеет относительно крупные размеры (3.2–4.5 мм в длину) и хорошо выраженный восковый налет, который придает насекомому бледно-голубовато-серую окраску, без налета насекомые имеют зеленый цвет (Blackman, Eastop, 2000). Фитофаг высоко плодовит, при благоприятных условиях одна самка способна отродить около 130 личинок (Frazer, Gill, 1981). Благодаря высокой плодовитости и способности размножаться при более низких температурах, чем естественные враги, *M. albifrons* обычно наносит существенный ущерб посевам люпина до появления энтомофагов (Cohen, Maskauer, 1987).

Главная причина ограниченного использования люпина в кормовой и пищевой отраслях – высокое содержание в семенах и зеленой массе токсичных для человека и животных хинолизидиновых алкалоидов. С 1930-х гг. селекция люпина строится на создании сладких, низкоалкалоидных сортов (Вишнякова и др., 2020). *M. albifrons* способна

преодолевать токсическую защиту высокоалкалоидных форм люпина. Более того, имеются сведения о предпочтении люпиновой тлей сортов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) с высоким содержанием алкалоидов (Ferguson, 1994; Жоров и др., 2018). Питаясь на горьких растениях, *M. albifrons* накапливает алкалоиды, которые использует для защиты от энтомофагов (Wink, Roemer, 1986; Gruppe, Roemer, 1988). В организме этого насекомого обнаружено не менее 31 алкалоида, составляющих до 1.8 мг/г его веса (Wink, Witte, 1991). Полагают, что не только общее содержание, но и качественный состав алкалоидов влияет на развитие тли (Philippi et al., 2016). Так, сильное заселение насекомым растений *L. angustifolius* может быть связано с высоким содержанием наиболее токсичного алкалоида – люпанина (Жоров и др., 2018).

В 2019 г. на полях научно-производственной базы «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (ППЛ ВИР, Санкт-Петербург, г. Пушкин) в ходе фитосанитарного мониторинга коллекции образцов *L. angustifolius* различного происхождения впервые на территории России была обнаружена люпиновая тля *M. albifrons*, которая сильно повредила сорта люпина узколистного (Абдуллаев и др., 2021).

Таксономическую принадлежность насекомого определяли с помощью онлайн определителя (Brightwell, Dransfield, 2013). Необходимо было верифицировать корректность определения вида по морфологическим признакам. Для идентификации, а также изучения структуры популяций насекомых, в настоящее время анализируют однонуклеотидный полиморфизм (SNP) митохондриальных и ядерных генов, при этом чаще других используют ген *COI*, кодирующий субъединицу 1 цитохром с-оксидазы. Показано, что короткий фрагмент гена является надежным инструментом для идентификации видов животных, в том числе и тлей. Так, анализируя SNP фрагмента гена длиной 658 п.н., дифференцировали 96% из 300 изученных видов тлей и показали, что внутривидовые вариации

последовательностей незначительны, составляя в среднем всего 0.2% (Footitt et al., 2008).

Цель работы – идентификация нового для России инвазивного вида с помощью секвенирования фрагмента

последовательности субъединицы 1 цитохром с-оксидазы (*COI*), традиционно используемого для диагностики Aphididae.

#### Материалы и методы

В 2021 г. на опытном поле ППЛ ВИР колонии тли с заселённых растений *L. angustifolius* собирали в пластиковые пробирки два раза в течение полевого сезона. Суммарную ДНК каждой колонии выделяли SDS-буфером (100 мМ трис-НСl, рН 9.0; 100 мМ ЭДТА; 1.0% SDS). Протокол представлен в методических указаниях (Алпатьева и др., 2019). Анализировали фрагменты гена *COI* *M. albifrons* длиной 408 п.н. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли с помощью разработанных нами праймеров *COI*-408 (F): 5'-TGATCAGGTATAATTGGATCATCTC-3' и *COI*-408 (R): 5'-TCCTAAAATTGATGAGATTCCTGCT-3'. ПЦР проводили в 25 мкл смеси, содержащей ДНК (100–200 нг), 1× ПЦР буфер, 1.7 μL 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2.2 μL 10 мМ dNTP, 1 единица Taq DNA полимеразы (Диалат, Москва) и по 0.7 μL 10 рМ каждого праймера (Евроген, Москва). Использовали следующий режим ПЦР: денатурация ДНК в течение 2 мин при 94 °С, далее 35 циклов: 94 °С – 30 сек., 59 °С – 30 сек., 72 °С – 1.5 мин. и финальный этап 72 °С в течение 20 мин. Ампликон выделяли из смеси ПЦР и клонировали в pAL-TA Vector (Евроген, Moscow). Лигирование вектора со вставкой проводили согласно протоколу, рекомендованному фирмой Евроген (<http://evrogen.ru/>

kit-user-manuals/pAL-TA.pdf). Для трансформации использовали штамм DH5α *E. coli*; клоны отбирали при помощи ПЦР с праймерами M13. По два клон каждой колонии секвенировали на приборе ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Выравнивание полученных последовательностей и их сравнение проводили с помощью программ MEGA version 7 (Kumar et al. 2016) и BioEdit (<https://softfamous.com/bioedit>). После удаления праймеров длина фрагментов составила 358 п.н. Последовательности идентифицировали с помощью международной базы нуклеотидных последовательностей NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве референсных использовали последовательности гена *COI* люпиновой *M. albifrons* (GenBank: EU701721.1 и GenBank: HM416712.1), а также бобовой *Aphis fabae* Scop (GenBank: MN319800.1), люцерновой *Aphis craccivora* Koch (GenBank: MN320340.1), гороховой *Acyrtosiphon pisum* Harris (GenBank: MN320302.1) тлей (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

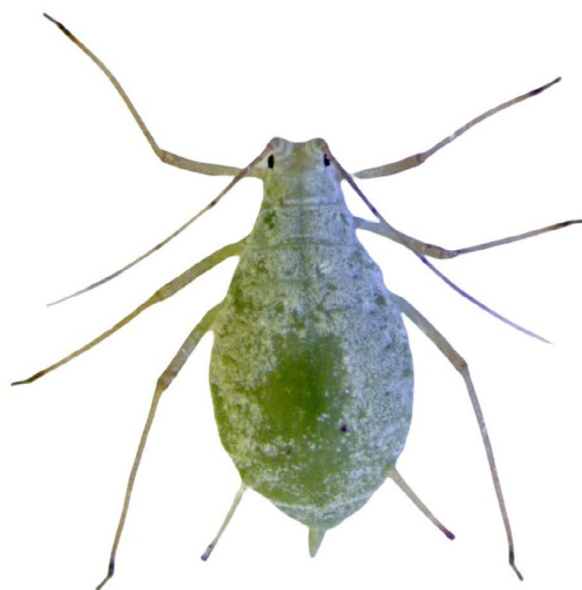
#### Результаты и обсуждение

В течение трех лет наблюдений (2019–2021 гг.) самым многочисленным и вредоносным насекомым на посевах люпина узколистного оказалась люпиновая тля (рис. 1). Наиболее высокая численность вредителя на полях наблюдалась в 2019 г.: в период плодообразования и созревания бобов люпина, начиная со второй половины августа, на

отдельных растениях насчитывалось свыше 1.5 тыс. особей на побег. Распространение *M. albifrons* в 2020 и 2021 гг. было незначительным, однако чрезвычайно высокая плотность популяции *M. albifrons* на люпине в первый год наблюдений свидетельствует о том, что фитофаг уже в течение ряда лет обитает на северо-западе России.



1



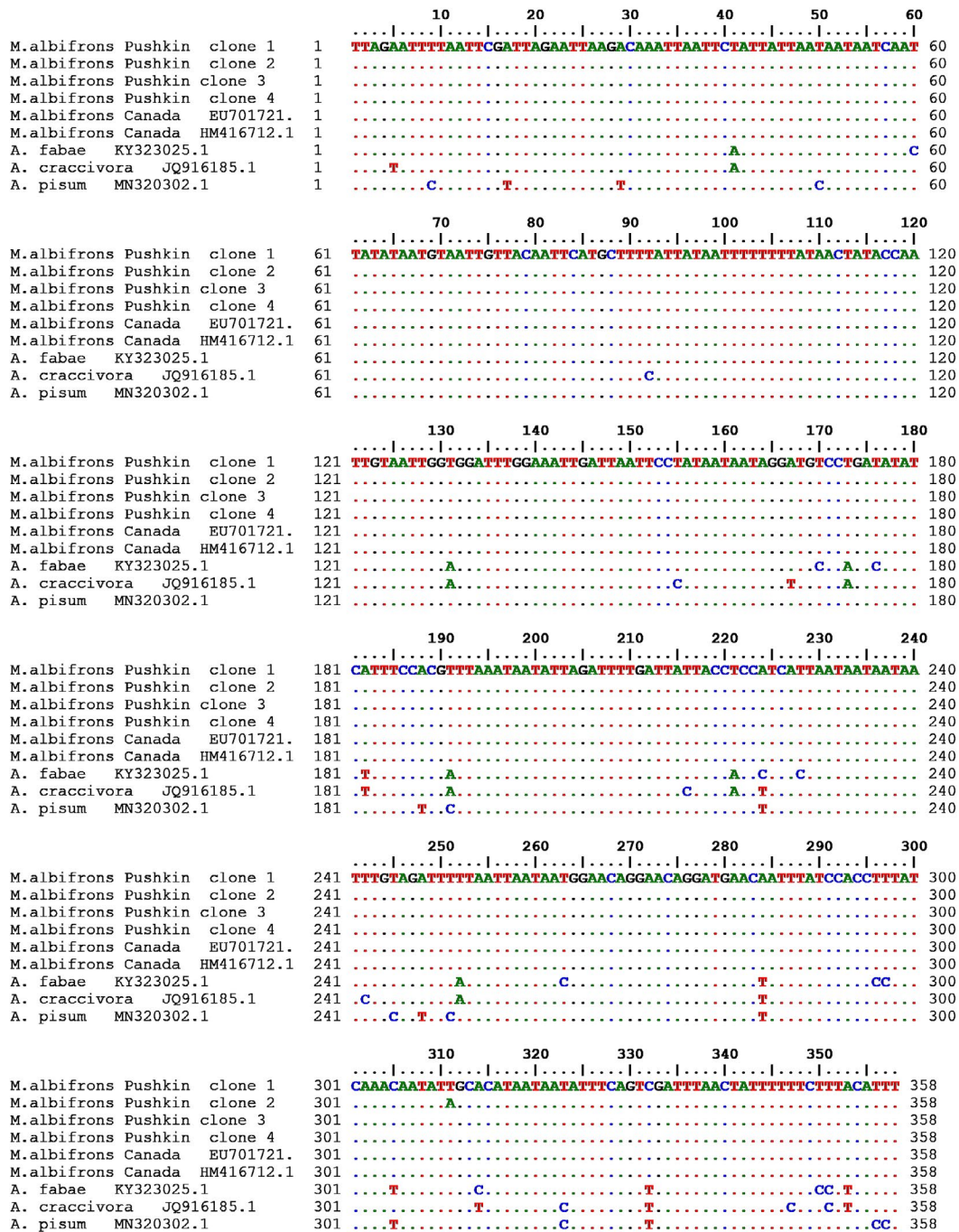
2

**Рисунок 1.** Люпиновая тля: 1 – колония *M. albifrons*; 2 – бескрылая самка *M. albifrons*  
**Figure 1.** Lupine aphid: 1 – colony of *M. albifrons*; 2 – wingless female *M. albifrons*

Проанализировали нуклеотидные последовательности 5'-области митохондриального гена цитохром с-оксидазы 1 (*COI*). В базе нуклеотидных последовательностей представлены два фрагмента гена *COI* длиной 658 и 645 п.н. (EU701721.1 и HM416712.1 соответственно) люпиновой тли, собранной в Канаде.

Нам не удалось получить ампликон удовлетворительного качества с праймерами, предлагаемыми Footitt с соавторами (2008). С помощью последовательности

фрагмента митохондриального гена *COI* (NCBI Blast:gb HM416712.1 (nih.gov)) мы разработали и использовали праймеры, позволяющие амплифицировать часть ДНК штрих-кода длиной 408 п.н. Получили 4 последовательности, которые были идентифицированы как *M. albifrons*: три последовательности на 100% идентичны фрагментам EU701721.1 и HM416712.1, а в одной нашли Т/А синонимическую замену (рис. 2). Отличия от других питающихся на люпине видов тлей были существенны: 21 SNP



**Рисунок 2.** Выравнивание нуклеотидных последовательностей ПЦР-фрагмента *COI* люпиновой тли (без участков праймирования). *M. albifrons* Pushkin clone 1–4 – пробы ДНК из колоний тли, собранных в 2021 г.

Последовательности люпиновой тли *M. albifrons*, гороховой тли *A. pisum*, бобовой тли *A. fabae*, люцерновой тли *A. craccivora* из международной информационной базы нуклеотидных последовательностей NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) взяты в качестве референсных

**Figure 2.** Alignment of nucleotide sequences of the PCR fragment *COI* of the lupine aphid (without taking into account the priming site). *M. albifrons* Pushkin clone 1–4 – DNA samples from aphid colonies collected in 2021.

Sequences of the lupine aphid *M. albifrons*, pea aphid *A. pisum*, legume aphid *A. fabae*, alfalfa aphid *A. craccivora* from the international database of nucleotide sequences NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) are taken as reference

отличали исследованные образцы от *Acyrtosiphon pisum* Harris (GenBank: MN320302.1), 24 – от *Aphis fabae* Scop (GenBank: MN319800.1) и 21 – от *Aphis craccivora* Koch (GenBank: MN320340.1).

Таким образом, не только по морфологическим признакам, но и по результатам секвенирования последовательностей фрагмента гена *COI*, собранные на посевах люпина узколистного в ППЛ ВИР насекомые относятся к виду *Macrosiphum albifrons* Essig.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного проекта № FGEM-2022-0002 «Выявление возможностей генофонда бобовых культур для оптимизации их селекции и диверсификации использования в различных отраслях народного хозяйства».

### Библиографический список (References)

- Абдуллаев РА, Вишнякова МА, Егорова ГП, Радченко ЕЕ (2021) Фитосанитарный мониторинг коллекции люпина узколистного ВИР на северо-западе Российской Федерации. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции 182(3):167–173. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-3-167-173>
- Алпатьева НВ, Антонова ОЮ, Радченко ЕЕ, Абдуллаев РА, Карабицина ЮИ, Анисимова ИН (2019) ПЦР-диагностика вредных организмов гуара. Методические указания. Санкт-Петербург: ВИР. 36 с. <https://doi.org/10.30901/978-5-907145>
- Вишнякова МА, Кушнарева АВ, Шеленга ТВ, Егорова ГП (2020) Алкалоиды люпина узколистного как фактор, определяющий альтернативные пути использования и селекции культуры. Вавиловский журнал генетики и селекции 24(6):625–635. <https://doi.org/10.18699/VJ20.656>
- Жоров ДГ, Синчук ОБ, Буга СВ (2017) Люпиновая тля (*Macrosiphum albifrons*) – новый для Беларуси опасный вредитель и переносчик вирусных заболеваний люпина. Земледелие и защита растений 2:26–28.
- Жоров ДГ, Анохина ВС, Романчук ИЮ (2018) Заселяемость разных видов и форм люпина (*Lupinus* spp.) люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911) в условиях Минской области. Журнал Белорусского государственного университета: Биология 1:82–94.
- Blackman RL, Eastop VF (2000) Aphids on the World's Crops. An Identification and Information Guide, 2nd edition. Chichester: John Wiley & Sons. 476 p.
- Brightwell R, Dransfield R (2013) Influential Points.com URL: [https://influentialpoints.com/Gallery/Macrosiphum\\_aphids.htm](https://influentialpoints.com/Gallery/Macrosiphum_aphids.htm) [retrieval 2021 Nov 11].
- Bunsupa S, Yamazaki M, Saito K (2012) Quinolizidine alkaloid biosynthesis: Recent advances and future prospects. *Frontiers in Plant Science* 3:239. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00239>
- Buga SV, Stekolshchikov AV (2012) Aphids of the tribe *Macrosiphini* (Insecta: Homoptera: Aphididae) in Belarus. *Zoosystematica Rossica* 21(1):63–96. <https://doi.org/10.31610/zsr/2012.21.1.63>
- Carter CI, Fourn DF, Bartlett PW (1984) The lupin aphid's arrival and consequences. *Antenna* 8:129–132.
- Cohen M, Mackauer M (1987) Intrinsic rate of increase and temperature coefficients of the aphid parasite *Ephedrus californicus* Baker (Hymenoptera: Aphididae). *Canadian Entomologist* 119(3):231–237. <https://doi.org/10.4039/Ent119231-3>
- Eppler A, Hinz U (1987) Die Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons* Essig, ein neuer Schaderreger und Virusvektor in Deutschland. *Journal of Applied Entomology* 104(1-5):510–518. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1987.tb00553.x>
- Essig EO (1911) Aphididae of Southern California. VII. *Pomona College Journal of Entomology* 3(3):523–557.
- Ferguson AW (1994) Pests and plant injury on lupins in the South of England. *Crop Protection* 13(3):201–210. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0261-2194(94)90079-5)
- Frazer BD, Gill B (1981) Age, fecundity, weight, and the intrinsic rate of increase of the lupine aphid, *Macrosiphum albifrons* (Homoptera: Aphididae). *Canadian Entomologist* 113(8):739–745. <https://doi.org/10.4039/Ent113739-8>
- Footitt RG, Maw HEL, Von Dohlen CD, Hebert PDN (2008) Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources* 8(6):1189–1201. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02297.x>
- Gruppe A, Roemer P (1988) The lupin aphid (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911) (Hom., Aphididae) in West Germany: its occurrence, host plants and natural enemies. *Journal of Applied Entomology* 106(1-5):135–143. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1988.tb00576.x>
- Hinz B (1992) Versuche zur Schadensbewertung der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) an Kulturlupinen. *Journal of Applied Entomology* 113(1-5):214–216. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1992.tb00656.x>
- Karl E, Schmidt H, Paszkiewicz Z (1991) Ein Nachweis der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) in der Republik Polen: (Kurze Mitteilung). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 27(3):243–244. <https://doi.org/10.1080/03235409109439076>
- 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>
- Lee MJ, Pate JS, Harris DJ, Atkins CA (2007) Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *Lupinus angustifolius* L. *Journal of Experimental Botany* 58(5):935–946. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl254>
- Philippi J, Schliephake E, Jürgens HU, Jansen G, Ordon F (2016) Correlation of the alkaloid content and composition of narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius* L.) to aphid susceptibility. *Journal of Pest Science* 89(2):359–373. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0710-y>
- Stroyan HLG (1981) A North American lupin aphid found in Britain. *Plant Pathology* 30(4):253–253. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.1981.TB01266.X>
- Vučetić A, Jovičić I, Petrović-Obradović O (2014) Several new and one invasive aphid species (Aphididae, Hemiptera)

- caught by yellow water traps in Serbia. *Phytoparasitica* 42(2):247–257. <https://doi.org/10.1007/s12600-013-0357-2>
- Wink M, Roemer P (1986) Acquired toxicity – the advantages of specializing on alkaloid-rich lupins to *Macrosiphum albifrons* (Aphidae). *Naturwissenschaften* 73(4):210–212. <https://doi.org/10.1007/Bf00417727>
- Wink M, Witte L (1991) Storage of quinolizidine alkaloids in *Macrosiphum albifrons* and *Aphis genistae* (Homoptera: Aphididae). *Entomologia Generalis* 15(4):237–254. <https://doi.org/10.1127/entom.gen/15/1991/237>

#### Translation of Russian References

- Abdullaev RA, Vishnyakova MA, Egorova GP, Radchenko EE (2021) Phytosanitary monitoring of the narrow-leaved lupine collection of VIR in the northwest of Russia. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding* 182(3):167–173. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-3-167-173> (In Russian)
- Alpatieva NV, Antonova OYu, Radchenko EE, Abdullaev RA et al (2019) PCR diagnostics for harmful or guar. Guidelines. St. Petersburg. 36 p. <https://doi.org/10.30901/978-5-907145> (In Russian)
- Vishnyakova MA, Kushnareva AV, Shelenga TV, Egorova GP (2020) Alkaloids of narrow-leaved lupine as a factor determining alternative ways of the crop's utilization and breeding. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 24(6):625–635. <https://doi.org/10.18699/VJ20.656> (In Russian)
- Zhorov DG, Sinchuk OV, Buga SV (2017) Lupine aphid (*Macrosiphum albifrons*) – a new for Belarus dangerous pest and the carrier of viral diseases. *Agriculture and plant protection* 2(111):26–28 (In Russian)
- Zhorov DG, Anokhina VS, Ramanchuk IY (2018) The colonization of different lupine taxon (*Lupinus* spp.) by *Macrosiphum albifrons* Essig, 1911 in Minsk region, Belarus. *Journal of the Belarusian State University: biology* 1:82–94 (In Russian)

Plant Protection News, 2024, 107(1), p. 11–15

OECD+WoS: 1.06+IY (Entomology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2024-107-1-16220>

#### Short communication

### IDENTIFICATION OF THE LUPINE APHID *MACROSIPHUM ALBIFRONS* (HEMIPTERA, APHIDIDAE) USING MOLECULAR MARKERS

R.A. Abdullaev\*, N.V. Alpatieva, M.A. Vishnyakova, E.E. Radchenko

*N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia*

\*corresponding author, e-mail: [abdullaev.1988@list.ru](mailto:abdullaev.1988@list.ru)

Narrow-leaved lupine is a valuable high-protein fodder crop, also promising for food use. The species composition of harmful organisms feeding on lupine has not been sufficiently studied. In 2019–2021 in the north-west of the Russian Federation (St. Petersburg, Pushkin), the species composition of insects inhabiting accessions of lupine of various origins was studied. The lupine aphid *Macrosiphum albifrons*, an invasive phytophagous pest of North American origin, was discovered for the first time in Russia. Using sequencing of a fragment of the mitochondrial gene for cytochrome c-oxidase subunit 1 (*COI*), traditionally used for diagnosing Aphididae, the correctness of determining the species identity of the insect was verified. Specific primers have been proposed that allow amplification of a 408 bp portion of the barcode DNA to identify the pest.

**Keywords:** *Macrosiphum albifrons*, narrow-leaved lupine, invasive phytophagous insect, *COI* gene

Submitted: 14.12.2023

Accepted: 01.06.2024