

**УДК 577.212.2:595.787**

## **ИЗУЧЕНИЕ ДНК-ШТРИХКОДОВ У ВИДОВ ПОДРОДА *JORDANITA* РОДА *JORDANITA* VERITY, 1946 (LEPIDOPTERA: ZYGAENIDAE, PROCRIDINAE)**

*Ефетов К. А., Лазарева З. С., Паришкова Е. В.*

*Медицинская академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия  
E-mail: efetov@ma.cfuv.ru*

В работе представлен сравнительный анализ расположения нуклеотидов в участке гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы и соответствующих аминокислотных последовательностей (расшифрованных в рамках международного проекта по ДНК-штрихкодированию «ZYGMO») для представителей подрода *Jordanita* рода *Jordanita* Verity, 1946. У подавляющего большинства видов в семействе *Zygaenidae* обнаружена высокая видоспецифичность этих последовательностей. Однако показано, что виды подрода *Jordanita* не образуют изолированных кластеров на дендрограмме, построенной с использованием только этого митохондриального гена. Несмотря на то, что доля переменных сайтов для нуклеотидных последовательностей составила 7 %, все замены оказались синонимичными; точка изменчивости аминокислоты в 123 положении отмечена только для одного экземпляра. Необходимо секвенирование дополнительных генов (ядерных и митохондриальных) для успешной делимитации видов исследуемой группы.

**Ключевые слова:** ДНК-штрихкодирование, цитохромоксидаза, подрод, *Jordanita*, *Zygaenidae*, переменные сайты, синонимичные замены.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Семейство *Zygaenidae* (Lepidoptera) является уникальной группой животных, обладающей рядом необычных свойств, например, способностью синтезировать цианогенные гликозиды из аминокислот [1–3]. Виды этого семейства широко применяются в качестве биоиндикаторов, поэтому используются в экологических исследованиях. Среди представителей *Zygaenidae* есть как редкие виды, так и опасные вредители [3–11]. В силу вышесказанного данная группа животных находится в сфере интересов различных направлений биологии, в том числе и эволюционной [12]. Большое внимание в последние годы уделяется молекулярной филогенетике. Этот подход оказал значительное влияние на научную классификацию живых организмов. На основании полученных молекулярных данных старые представления о путях эволюции пересматриваются. Ученые описывают новые таксоны, в том числе выделяемые на основе молекулярно-филогенетических данных, некоторые группы дробят, синонимизируют и т. п. [12–20]. Эти современные методы используются для определения видов-вредителей, видов-двойников, биоиндикаторных видов, а также редких и исчезающих видов [4, 20–23].

В 2003 году профессором П. Гебертом (P. Hebert) с соавторами из Института биоразнообразия Гуэлфского университета (Канада) был предложен митохондриальный молекулярный маркер (ДНК-штрихкод) для определения видовой принадлежности животных – участок гена цитохромоксидазы [24]. Комплекс цитохромов  $a_3$ , иначе именуемый цитохромоксидазой, локализуется на внутренней мембране митохондрии и играет ключевую роль в обеспечении клетки энергией. Цитохромоксидаза является металлопротеином, содержащим ионы железа и меди, и состоит из нескольких субъединиц [25]. Для ДНК-штрихкодирования был предложен 5'-концевой участок гена первой субъединицы цитохромоксидазы длиной 658 нуклеотидов (COI) [24]. Эта нуклеотидная последовательность соответствует полипептиду длиной 219 аминокислот, представленному во вторичной структуре шестью  $\alpha$ -спиралями, соединенными пятью петлями и образующими центр взаимодействия атома меди с гемовыми структурами [26].

Ранее при изучении ДНК-штрихкодов у различных таксонов животных было показано, что межвидовая изменчивость этого участка митохондриального генома значительно превышает внутривидовую, при этом стандартный порог дивергенции составляет около 2%. Это позволяет использовать данный отрезок гена для определения видовой принадлежности исследуемых особей [27, 28].

**Цель исследования.** Проанализировать возможность использования ДНК-штрихкодов представителей подрода *Jordanita* рода *Jordanita* Verity, 1946 (семейство Zygaenidae, подсемейство Procridinae) для дифференциации видов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для изучения ДНК от представителей различных видов рода *Jordanita* получен в результате собственных сборов авторов, в некоторых случаях предоставлен зарубежными учёными или кураторами европейских музеев. Стерильными инструментами отделяли часть тела имаго (чаще использовалась одна из ног) каждого исследуемого экземпляра и помещали в отдельную микропробирку. Выделение, амплификацию и секвенирование ДНК для большей части образцов проводили в Канадском центре ДНК-штрихкодирования (The Canadian Centre for DNA Barcoding, Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Гуэлф, Канада) в соответствии со стандартными протоколами [27, 28].

Для четырех образцов представителей изучаемого подрода эти исследования проводили в Институте проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (Москва) в рамках проекта программы развития Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского «Академическая мобильность молодых ученых России – АММУР». В этом случае выделение, амплификацию и секвенирование ДНК осуществляли по отличающемуся оригинальному протоколу. Выделение проводили набором NucleoSpin® DNA Insect фирмы Macherey-Nagel (Германия) согласно инструкции производителя ([http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM\\_gDNAInsect.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNAInsect.pdf)). Биологический материал гомогенизировали с использованием вибрационной мельницы Retsch MM400 (Германия) в специальных пробирках со стальными шариками NucleoSpin® с элюирующими буферами и протеиназой К. Затем

осаждали ДНК на кремниевой мембране в колонках NucleoSpin®. После промывки и высушивания колонок высокоочищенную ДНК получали элюирующим буфером. Далее экстракт ДНК хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Участок митохондриального гена цитохромоксидазы амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию проводили в ABI 2720 (Applied Biosystems, США) по следующей программе. Начальная денатурация при  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 30 секунд; 5 циклов:  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 40 секунд,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 1 минута; затем 32 цикла:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 30 секунд,  $52,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 1 минута и  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 30 секунд; финальная элонгация:  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 7 минут. Результаты выделения ДНК и ПЦР отслеживали при помощи электрофореза в 1,5 % агарозном геле в ТАЕ буфере, в камере для горизонтального электрофореза Helicon SE-2 (Россия) со стабилизацией тока по напряжению (80 В). Для визуализации процесса электрофореза использовали краситель бромфеноловый синий. Окраску ДНК проводили бромистым этидием. Определение нуклеотидной последовательности ПЦР-продуктов проводили по методу Сэнгера с использованием набора для циклического секвенирования ДНК Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Секвенс-ПЦР проводили по следующей схеме: начальный прогрев  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 1 минута; затем 30 циклов:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 10 секунд,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 10 секунд,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 2 минуты; финальное охлаждение  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 10 минут. Продукты секвенсированной реакции очищали методом пересаживания этанолом. Очищенный продукт растворяли в 12 мкл формамида и анализировали на автоматическом секвенаторе AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Консенсусные последовательности получали, используя редактор последовательностей ChromasPro. Полученные нуклеотидные последовательности переводили в соответствующие аминокислотные. Для анализа последовательностей использовали аналитические инструменты сайта проекта канадского Центра ДНК-штрихкодирования, а также программы BioEdit и MEGA 6.0.

В большинстве случаев использовались стандартные праймеры:

LepF1: ATTC AACCAATCATAAAGATATTGG,

LepR1: TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA.

В качестве дополнительных, при необходимости, использовались также следующие праймеры:

MLepF1: GCTTTCCACGAATAAATAATA,

MLepR1: CCTGTTCCAGCTCCATTTTC,

LCO1490 (C\_LepFolF): GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG,

HCO2198 (C\_LepFolR): TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С 2009 года кафедра биохимии Медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» участвует в международном проекте по секвенированию ДНК «ZYGMO», осуществляемом под руководством профессора К. А. Ефетова. В рамках этого проекта проводится изучение нуклеотидных последовательностей фрагмента ДНК митохондриального гена цитохромоксидазы I у различных представителей

семейства Zygaenidae (модельной группы для молекулярно-генетических исследований) с изучением возможности использования этих данных для идентификации биологических видов. К настоящему моменту определены COI-последовательности ДНК у 1030 особей, относящихся к 242 биологическим видам. В подавляющем большинстве случаев обнаружена высокая видовая специфичность этих последовательностей. Тем не менее, в некоторых группах при построении дендрограмм мы обнаружили отсутствие изолированных видовых кластеров. В рамках этой публикации мы обсудим такие результаты, полученные для 6 видов подрода *Jordanita* рода *Jordanita*. Нами были расшифрованы последовательности гена COI длиной 658 пар оснований для 51 особи. Экземпляры принадлежали к 6 видам изучаемого подрода. Количество последовательностей для каждого вида, а также регионы сбора образцов представлены в таблице 1. Для сравнения исследованы 4 особи двух биологических видов подрода *Tremewania* Efetov & Tarmann, 1999: *Jordanita (Tremewania) notata* Zeller, 1847 и *Jordanita (Tremewania) splendens* Staudinger, 1887.

Таблица 1  
Список экземпляров, включенных в анализ ДНК-штрихкодов

Вид	Количество последовательностей	Географические регионы находок
<i>Jordanita (Jordanita) chloros</i>	10	Россия (Крым) и Турция
<i>Jordanita (Jordanita) globulariae</i>	14	Греция, Россия (Крым) и Македония
<i>Jordanita (Jordanita) graeca</i>	15	Армения, Болгария, Россия (Крым) и Турция
<i>Jordanita (Jordanita) syriaca</i>	1	Иордания
<i>Jordanita (Jordanita) tenuicornis</i>	10	Италия
<i>Jordanita (Jordanita) vartianae</i>	1	Испания

Обнаружено, что при анализе только этого фрагмента митохондриального гена на дендрограмме, отражающей генетические дистанции, виды *Jordanita (Jordanita) graeca* (Jordan, 1907) и *Jordanita (Jordanita) chloros* (Hübner, 1813) не образуют изолированные ветви (Рис. 1).

Несмотря на то, что *J. chloros* и *J. graeca* хорошо различаются морфологически, молекулярные отличия в гене COI оказались недостоверными. При дальнейшем анализе ДНК-штрихкодов этих двух видов было выявлено 44 переменные нуклеотидные позиции и 614 консервативных, различия в анализируемых последовательностях составили 7%. Также были выявлены области с повышенной вариабельностью – это позиции с 40 по 59 и с 268 по 286.

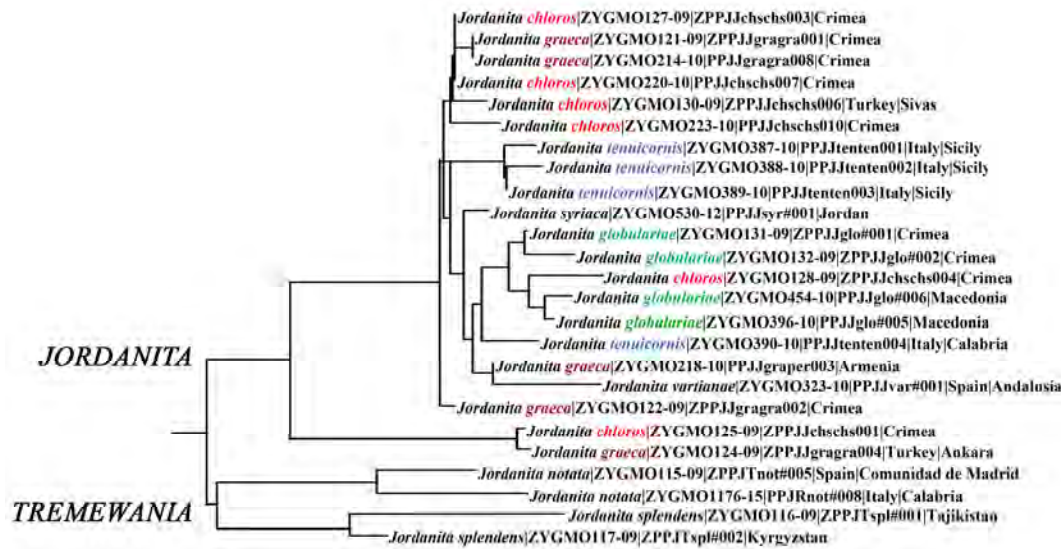


Рис. 1. Дендрограмма для подродов *Tremewanina* Efetov & Tarmann, 1999 и *Jordanita* Verity, 1946 рода *Jordanita*, построенная с использованием двухпараметрической модели Кимуры для участка гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы (включены только последовательности длиной более 550 пар нуклеотидов).

При этом более подробный анализ показал, что в точках варибельности преобладают транзиции – 73 % от общего числа замен. Из всех замен пиримидиновые транзиции составляют 78 %, а пуриновые – 22 %. Среди трансверсий (17 %) преобладают точки варибельности Т – А (83 %). При сравнении у *J. chloros* и *J. graeca* 219-ти аминокислот в последовательностях, соответствующих ДНК-штрихкодам, оказалось, что большинство нуклеотидных замен являются синонимичными, так как межвидовых различий не было выявлено во всех случаях, кроме одного. А именно у экземпляра *J. chloros* (окр. Севастополя, Мекензиевы горы) определена точка варибельности аминокислоты: в позиции 123 обнаружен глицин, в то время как у всех других экземпляров изученных видов в этом положении находится аланин. Интересно, что для всех анализируемых последовательностей у представителей рода *Zygaena* Fabricius, 1775 (как было показано нами ранее [27]) также обнаружена позиция 123 в качестве точки варибельности, с тем различием, что в роде *Zygaena* в этом положении были обнаружены аминокислоты серин и глицин, но не аланин. Все эти три аминокислоты характеризуются малым размером радикала, хотя серин является гидрофильной аминокислотой, а глицин и аланин – гидрофобными.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что применение митохондриального ДНК-штрихкода в исследуемом подроде не позволяет эффективно проводить делимитацию видов, хорошо различающихся морфологически. Поэтому для этой группы целесообразно использование дополнительных маркеров (ядерных, митохондриальных).

Оказалось, что нуклеотидные замены в ДНК-штрихкоде у *J. chloros* и *J. graeca* в подавляющем большинстве случаев не приводят к изменению аминокислотного состава изученного участка цитохромоксидазы.

Считаем своим долгом выразить благодарность П. Д. Н. Геберту (Prof. P. D. N. Hebert) (Канада) и Р. Руже (Dr R. Rougerie) (Франция), а также О. Г. Горбунову и И. Г. Мещерскому (Россия) за плодотворное сотрудничество и техническую поддержку при проведении исследований.

Эта исследовательская работа была частично поддержана проектом программы развития ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» «Академическая мобильность молодых ученых России – АММУР» в 2017 году.

## Список литературы

1. Zagrobелny M. Evolution of the Biosynthetic Pathway for Cyanogenic Glucosides in Lepidoptera / M. Zagrobелny, M. K. Jensen, H. Vogel, R. Feyereisen, S. Bak // Journal of Molecular Evolution. – 2018. – V. 86, № 6. – P. 379–394.
2. Briolat E. S. Sex differences but no evidence of quantitative honesty in the warning signals of six-spot burnet moths (*Zygaena filipendulae* L.) / E. S. Briolat, M. Zagrobелny, C. E. Olsen, J. D. Blount, [et al.] // Evolution; International Journal of Organic Evolution. – 2018. – V. 72, № 7. – P. 1460–1474.
3. Hofmann A. F. The Natural History of Burnet Moths (*Zygaena* Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Zygaenidae). Part 1 / A. F. Hofmann, W. G. Tremewan. – Munich: Museum Witt, 2017. – 631 p.
4. Efetov K. A. Two new species of the genus *Artona* Walker, 1854 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) / K. A. Efetov // Entomologist's Gazette. – 1997. – V. 48, № 3. – P. 165–177.
5. Efetov K. A. Three new species of the genus *Illiberis* Walker, 1854, from Taiwan and Vietnam (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) / K. A. Efetov // Entomologist's Gazette. – 1997. – V. 48, № 4. – P. 231–244.
6. Efetov K. A. A revision of the genus *Goe* Hampson, [1893] (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae), with descriptions of two new species / K. A. Efetov // Entomologist's Gazette. – 1998. – V. 49, № 1. – P. 49–62.
7. Efetov K. A. Nine new species of the genus *Chrysartona* Swinhoe, 1892 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) / K. A. Efetov // Entomologist's Gazette. – 2006. – V. 57, № 1. – P. 23–50.
8. Efetov K. A. On the chaetotaxy of the first instar larva of *Artona martini* Efetov, 1997 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae, Artonini) / K. A. Efetov, E. Hayashi // Entomologist's Gazette. – 2008. – V. 59, № 2. – P. 101–104.
9. Efetov K. A. A checklist of the Palaearctic Procridinae (Lepidoptera: Zygaenidae) / K. A. Efetov, G. M. Tarmann. – Simferopol – Innsbruck: CSMU Press: Nata, 2012. – 108 p.
10. Litman J. A DNA barcode reference library for Swiss butterflies and forester moths as a tool for species identification, systematics and conservation / J. Litman, Y. Chittaro, S. Birrer, C. Praz, [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – V. 13, № 12. – P. 1–31.
11. Subchev M. (2R)-butyl (7Z)-dodecenoate, a main sex pheromone component of *Illiberis (Primilliberis) pruni* Dyar (Lepidoptera: Zygaenidae: Procridinae)? / M. Subchev, C. Koshio, T. Toshova, K. A. Efetov, W. Francke // Acta Zoologica Bulgarica. – 2013. – V. 65, № 3. – P. 391–396.

12. Efetov K. A. The hypothetical ground plan of the Zygaenidae, with a review of the possible autapomorphies of the Procridinae and the description of the Inouelinae subfam. nov. / K. A. Efetov, G. M. Tarmann // Journal of the Lepidopterists' Society. – 2017. – V. 71, № 1. – P. 20–49.
13. Efetov K. A. *Adscita (Procriterna) pligori* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) from Afghanistan / K. A. Efetov // Entomologist's Gazette. – 2012. – V. 63, № 2. – P. 99–105.
14. Efetov K. A. Application of two molecular approaches (use of sex attractants and DNA barcoding) allowed to rediscover *Zygaenoprocris eberti* (Alberti, 1968) (Lepidoptera, Zygaenidae, Procridinae), hitherto known only from the female holotype / K. A. Efetov, A. Hofmann, G. M. Tarmann // Nota Lepidopterologica. – 2014. – V. 37, № 2. – P. 151–160.
15. Efetov K. A. *Illiberis (Alterasvenia) cernyi* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) from northern Thailand / K. A. Efetov, G. M. Tarmann // Entomologist's Gazette. – 2013. – V. 64, № 1. – P. 33–39.
16. Efetov K. A. *Illiberis (Alterasvenia) banmauka* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) from China and Myanmar / K. A. Efetov, G. M. Tarmann // Entomologist's Gazette. – 2014. – V. 65, № 1. – P. 62–70.
17. Efetov K. A. A new European species, *Adscita dujardini* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) confirmed by DNA analysis / K. A. Efetov, G. M. Tarmann // Entomologist's Gazette. – 2014. – V. 65, № 3. – P. 179–200.
18. Efetov K. A. A new *Illiberis* species: *I. (Alterasvenia) kislovskyi* (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) from Myanmar / K. A. Efetov, G. M. Tarmann // Entomologist's Gazette. – 2016. – № 67. – P. 137–142.
19. Mutanen M. Species-Level Para- and Polyphyly in DNA Barcode Gene Trees: Strong Operational Bias in European Lepidoptera / M. Mutanen, S. M. Kivelä, R. A. Vos, C. Doorenweerd, S. Ratnasingham, A. Hausmann, P. Huemer, V. Dincă, E. J. van Nieuwerkerken, C. Lopez-Vaamonde, R. Vila, L. Aarvik, Th. Decaëns, K. A. Efetov, [et al.] // Systematic Biology. – 2016. – V. 65, № 6. – P. 1024–1040.
20. Zahiri R. Molecular phylogenetics of Erebidae (Lepidoptera, Noctuoidea) / R. Zahiri, J. D. Holloway, I. J. Kitching, J. D. Lafontaine [et al.] // Systematic Entomology. – 2011. – V. 37, № 1. – P. 102–124.
21. Efetov K. A. *Pseudophacusa multidentata* Efetov & Tarmann, a new genus and species of Procridini from Myanmar, China and Laos (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) / K. A. Efetov, G. M. Tarmann // SHILAP Revista de Lepidopterología. – 2016. – V. 44, № 173. – P. 81–89.
22. Mitchell A. DNA barcoding the Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae) of Australia and utility of DNA barcodes for pest identification in *Helicoverpa* and relatives / A. Mitchell, D. Gopurenko // PLoS ONE. – 2016. – V. 11, № 8. – P. 1–18.
23. Nazari V. Century-old DNA barcodes reveal phylogenetic placement of the extinct Jamaican Sunset Moth, *Urania sloanus* Cramer (Lepidoptera: Uraniidae) / V. Nazari, B. C. Schmidt, S. Prosser, [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – V. 11, № 10. – P. 1–13.
24. Hebert P. D. N. Biological identifications through DNA barcodes / P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. deWaard // Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. – 2003. – V. 270. – P. 313–322.
25. Blomberg M. R. Mechanism of Oxygen Reduction in Cytochrome c Oxidase and the Role of the Active Site Tyrosine / M. R. Blomberg // Biochemistry. – 2016. – V. 55, № 3. – P. 489–500.
26. Pentinsaari M. Molecular evolution of a widely adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life / M. Pentinsaari, H. Salmela, M. Mutanen, T. Roslin // Scientific Reports. – 2016. [Электронный ресурс]. 6:35275. doi: 10.1038/srep35275.
27. Ефетов К. А. Вариабельность аминокислотных последовательностей первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы, кодируемых 658bp-участком гена COI, у видов рода *Zygaena* Fabricius, 1775 / Ефетов К. А., Лазарева З. С., Паршкова Е. В., Тарман Г. М. // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2017. – Т. 7, № 4. – С. 29–34.
28. Ефетов К. А. Изучение нуклеотидных последовательностей гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы и решение некоторых вопросов биосистематики Zygaenidae (Lepidoptera) / Ефетов К. А., Кирсанова А. В., Лазарева З. С., Паршкова Е. В., Тарман Г. М. // Таврический медико-биологический вестник. – 2016. – Т. 19, № 1. – С. 28–33.

**A STUDY OF DNA BARCODES IN SPECIES OF THE SUBGENUS *JORDANITA*  
OF THE GENUS *JORDANITA* VERITY 1946 (LEPIDOPTERA: ZYGAENIDAE,  
PROCRIDINAE)**

*Efetov K. A., Lazareva Z. S., Parshkova E. V.*

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia*  
*E-mail: efetov@ma.cfuv.ru*

The Zygaenidae are the group of Lepidoptera, which includes pest-species as well as important bioindicative, rare, endemic species. It also has interesting biochemical features. Currently, this family is in the focus of evolutionary genetic studies aimed, in particular, to sequencing of various regions of the genome. This paper presents a comparative analysis of the nucleotides sequences of the first subunit of mitochondrial cytochrome oxidase gene and corresponding amino acidic sequences (obtained within the framework of the international project on DNA barcoding “ZYGMO”) for specimens of the subgenus *Jordanita* of the genus *Jordanita* Verity, 1946. In most cases in the family Zygaenidae these sequences show a high degree of species level specificity. However, it has been found that the species of the studied subgenus do not form isolated species clusters on the Kimura 2-parameter dendrogram based on the COI sequences only, despite a high degree of divergence in morphological and biological characters. The percentage of variable sites is 7 %, with prevalence of transitions (78 % of them are pyrimidine). Almost all mononucleotide substitutions are synonymous, but only one amino acid variability point (at position 123) was detected in *Jordanita chloros*: in one specimen glycine-coding triplet is situated in the place where in all other analyzed sequences alanine-coding triplet is located. It is necessary to sequence additional nuclear and mitochondrial genes for successful genetic delimitation of the species within the target group. It has been noted that in a vast majority of cases nucleotide substitutions in the DNA barcodes of *Jordanita chloros* and *Jordanita graeca* do not lead to amino acid composition changes of the studied site of cytochrome oxidase.

**Keywords:** DNA barcoding, cytochrome oxidase, subgenus, *Jordanita*, Zygaenidae, variable sites, synonymous substitution.

#### References

1. Zagobelny M., Jensen M. K., Vogel H., Feyereisen R., Bak S. Evolution of the Biosynthetic Pathway for Cyanogenic Glucosides in Lepidoptera, *Journal of Molecular Evolution*, **86** (6), 379 (2018).
2. Briolat E. S., Zagobelny M., Olsen C. E., Blount J. D., Stevens M. Sex differences but no evidence of quantitative honesty in the warning signals of six-spot burnet moths (*Zygaena filipendulae* L.), *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, **72** (7), 1460 (2018).
3. Hofmann A. F., Tremewan W. G. *The Natural History of Burnet Moths (Zygaena Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Zygaenidae). Part 1.* (Munich.: Museum Witt, 2017).
4. Efetov K. A. Two new species of the genus *Artona* Walker, 1854 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae), *Entomologist's Gazette*, **48** (3), 165 (1997).
5. Efetov K. A. Three new species of the genus *Illiberis* Walker, 1854, from Taiwan and Vietnam (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae), *Entomologist's Gazette*, **48** (4), 231 (1997).



6. Efetov K. A. A revision of the genus *Goe* Hampson, [1893] (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae), with descriptions of two new species, *Entomologist's Gazette*, **49** (1), 49 (1998).
7. Efetov K. A. Nine new species of the genus *Chrysartona* Swinhoe, 1892 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae), *Entomologist's Gazette*, **57** (1), 23 (2006).
8. Efetov K. A., Hayashi E. On the chaetotaxy of the first instar larva of *Artona martini* Efetov, 1997 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae, Artonini), *Entomologist's Gazette*, **59** (2), 101, (2008).
9. Efetov K. A., Tarmann G. M. *A checklist of the Palaearctic Procridinae (Lepidoptera: Zygaenidae)*. (Simferopol – Innsbruck: CSMU Press: Nata, 2012).
10. Litman J., Chittaro Y., Birrer S., Praz C., Wermeille E., Fluri M., Stalling T., Schmid S., Wyler S., Gonthier Y. A DNA barcode reference library for Swiss butterflies and forester moths as a tool for species identification, systematics and conservation, *PLoS ONE*, **13** (12), 1 (2018).
11. Subchev M., Koshio C., Tshova T., Efetov K. A., Francke W. (2*R*)-butyl (7*Z*)-dodecenoate, a main sex pheromone component of *Illiberis (Primilliberis) pruni* Dyar (Lepidoptera: Zygaenidae: Procridinae)? *Acta Zoologica Bulgarica*, **65** (3), 391, (2013).
12. Efetov K. A., Tarmann G. M. The hypothetical ground plan of the Zygaenidae, with a review of the possible autapomorphies of the Procridinae and the description of the Inouelinae subfam. nov., *Journal of the Lepidopterists' Society*, **71** (1), 20 (2017).
13. Efetov K. A. *Adscita (Procriterna) pligori* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) from Afghanistan, *Entomologist's Gazette*, **63** (2), 99 (2012).
14. Efetov K. A., Hofmann A., Tarmann G. M. Application of two molecular approaches (use of sex attractants and DNA barcoding) allowed to rediscover *Zygaenoprocris eberti* (Alberti, 1968) (Lepidoptera, Zygaenidae, Procridinae), hitherto known only from the female holotype, *Nota Lepidopterologica*, **37** (2), 151 (2014).
15. Efetov K. A., Tarmann G. M. *Illiberis (Alterasvenia) cernyi* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) from northern Thailand, *Entomologist's Gazette*, **64** (1), 33 (2013).
16. Efetov K. A., Tarmann G. M. *Illiberis (Alterasvenia) banmauka* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) from China and Myanmar, *Entomologist's Gazette*, **65** (1), 62 (2014).
17. Efetov K. A., Tarmann G. M. A new European species, *Adscita dujardini* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) confirmed by DNA analysis, *Entomologist's Gazette*, **65** (3), 179 (2014).
18. Efetov K. A., Tarmann G. M. A new *Illiberis* species: *I. (Alterasvenia) kislovskiyi* (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) from Myanmar, *Entomologist's Gazette*, **67** (2), 137 (2016).
19. Mutanen M., Kivelä S. M., Vos R. A., Doorenweerd C., Ratnasingham S., Hausmann A., Huemer P., Dincă V., van Nieukerken E. J., Lopez-Vaamonde C., Vila R., Aarvik L., Decaëns Th., Efetov K. A., Hebert P. D. N., Johnsen A., Karsholt O., Pentinsaari M., Rougerie R., Segerer A., Tarmann G., Zahir R., Godfray H. C. J. Species-level para- and polyphyly in DNA barcode gene trees: strong operational bias in European Lepidoptera, *Systematic Biology*, **65** (6), 1024 (2016).
20. Zahir R., Holloway J. D., Kitching I. J., Lafontaine J. D., Mutanen M., Wahlberg N. Molecular phylogenetics of Erebiidae (Lepidoptera, Noctuoidea). *Systematic Entomology*, **37** (1), 102 (2011).
21. Efetov K. A., Tarmann G. M. *Pseudophacusa multidentata* Efetov & Tarmann, a new genus and species of Procridini from Myanmar, China and Laos (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae), *SHILAP Revista de Lepidopterología*, **44** (173), 81 (2016).
22. Mitchell A., Gopurenko D. DNA Barcoding the Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae) of Australia and Utility of DNA Barcodes for Pest Identification in *Helicoverpa* and Relatives, *PLoS ONE*, **11** (8), 1 (2016).
23. Nazari V., Schmidt B. C., Prosser S., Hebert P. D. N. Century-Old DNA Barcodes Reveal Phylogenetic Placement of the Extinct Jamaican Sunset Moth, *Urania sloanus* Cramer (Lepidoptera: Uraniidae), *PLoS ONE*, **11** (10), 1 (2016).
24. Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., deWaard J. R. Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313 (2003).
25. Blomberg M. R. Mechanism of Oxygen Reduction in Cytochrome c Oxidase and the Role of the Active Site Tyrosine, *Biochemistry*, **55** (3), 489 (2016).
26. Pentinsaari M., Salmela H., Mutanen M., Roslin T. Molecular evolution of a widely adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life, *Scientific Reports*, e-print doi: 10.1038/srep35275 (2016).

27. Efetov K. A., Lazareva Z. S., Parshkova E. V., Tarmann G. M. Variability of amino acid sequences coded by the 658bp-region of the mitochondrial cytochrome oxidase first subunit gene in species of the genus *Zygaena* Fabricius, 1775, *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine*, **7** (4), 29 (2017). (in Russian)
28. Efetov K. A., Kirsanova A. V., Lazareva Z. S., Parshkova E. V., Tarmann G. M. A study of nucleotide sequences of the mitochondrial COI gene and solution of some problems of Zygaenidae (Lepidoptera) biosystematics, *Tavrisheskiy Mediko-biologicheskiy Vestnik*, **19** (1), 28 (2016). (in Russian)