

**ЛАЗАРЕВА ЗОЯ СТАНИСЛАВОВНА**

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И ЯДЕРНЫХ ГЕНОВ У  
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ZYGAEINIDAE И ЕЁ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ  
ИЗУЧЕНИЯ СИСТЕМАТИКИ И ФИЛОГЕНИИ ДАННОГО СЕМЕЙСТВА**

1.5.7. Генетика (биологические науки)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Молекулярно-генетические подходы всё большее значение приобретают в решении вопросов эволюционной биологии, биосистематики, таксономии (Blaxter, 2003; Blaxter et al., 2004; DeSalle et al., 2005; Hebert, Gregory, 2005; De Moya et al., 2017). Результаты секвенирования ДНК представляют интерес также для биогеографии, агроэкологии и для биологии сохранения живой природы (Vernooij et al., 2010; Stein et al., 2014; Nazari et al., 2016; Souza et al., 2016). Виды являются основными единицами биологического разнообразия, но их идентификация и разграничение часто затруднено. Степень выраженности затруднений различна, в частности, достаточно высока в таксоне Insecta. Штрихкоды ДНК, короткие стандартизированные участки генома, стали популярным инструментом для корректной делимитации видов (Неретина, Мюге, 2013; Pentinsaari, 2016; Pentinsaari et al., 2016). Сравнение секвенсов определённых участков ДНК позволяет определять степень филогенетической близости исследуемых таксонов, разграничивать морфологически сходные виды, виды-двойники, описывать новые виды и т. д. (Chapple, Ritchie, 2013; Efetov, Tarmann, 2013a; Ratnasingham, Hebert, 2013; Mitchell, Gopurenko, 2016). Также результаты секвенирования митохондриального и/или ядерного геномов используются в решении вопросов популяционной генетики и селекции (Hajibabaei et al., 2007; Ilyasov et al., 2018).

В семейство Zygaenidae (Пестрянки) в настоящее время включают пять подсемейств: Inouelinae Efetov & Tarmann, 2017; Procrarinae Boisduval, 1898; Chalcosiinae Walker, 1865; Callizygaeninae Alberti, 1954 и Zygaeninae Latreille, 1809, образующих монофилетическую группу, каждое из подсемейств имеет хорошо выраженные аутапоморфии и сильно отличается от других (Ефетов, 2005; Efetov, 2004, 2005; Hofmann, Tremewan, 2010; Efetov, Tarmann, 2017). Представители Zygaenidae широко распространены во всех зоогеографических регионах. К настоящему времени известно более 1000 видов, и многие ещё ожидают своего описания. Семейство Zygaenidae является крайне интересной группой из-за обширного индивидуального и географического разнообразия их ярко окрашенных видов, а также широкого распространения и способности к цианогенезу (Efetov, 2004; Niehuis et al., 2006c; Briolat et al., 2018; Zagrobelny et al., 2018). Пестрянки имеют большое народнохозяйственное значение (Efetov, 2004) и являются хорошими индикаторными видами для природных сообществ животных и растений (ярко окрашены, заметны днём) (Schmitt, 2003). Некоторые виды являются вредителями сельскохозяйственных культур (Tarmann, 2009). Систематика этого таксона находится в динамике, всё время совершенствуется, при этом большое внимание в последние годы уделяется и

молекулярным признакам (Niehuis et al., 2006c; Efetov, Tarmann, 2017; Hofmann, Tremewan, 2017; Litman et al., 2018).

**Степень разработанности темы исследования.** Комплексное изучение Zygaenidae с использованием молекулярных данных предпринималось Niehuis с соавторами (2006a, 2006b, 2006c, 2007). К сожалению, эти исследования фокусировались в основном только на подсемействе Zygaeninae, род *Zygaena* Fabricius, 1775 (Niehuis et al., 2006a, 2007), с единичными включениями видов Procridinae и Chalcosiinae (Niehuis et al., 2006b). Некоторые ДНК- и РНК-последовательности Zygaenidae получены в рамках научных проектов, направленных на изучение других групп насекомых, и чаще всего эти последовательности использованы в качестве дополнительного аспекта исследований (Huemer et al., 2014; Ashfaq et al., 2017; Peng et al., 2017; Litman et al., 2018); эти работы в основном включали данные для видов рода *Zygaena* (Huemer et al., 2014), в то время как представители других родов представлены в них единично (Ashfaq et al., 2017; Peng et al., 2017; Litman et al., 2018).

**Цель исследования** – изучить изменчивость митохондриальных и ядерных генов у видов семейства Zygaenidae и показать возможность использования для изучения систематики и филогении видов данного семейства.

**Для достижения цели были поставлены следующие задачи:**

- расшифровать нуклеотидные последовательности участков митохондриального гена COI и провести их сравнительный анализ.
- определить эффективность ДНК-штрихкода как молекулярного маркера для дифференцировки таксонов в семействе Zygaenidae.
- оценить информативность ядерных генов: EF-1 $\alpha$ , GAPDH, IDH, MDH, RpS5, wingless, для видовой делимитации представителей семейства Zygaenidae.
- выявить изменения в аминокислотном составе и степень вариабельности аминокислотных последовательностей, соответствующих участку ДНК-штрихкода видов семейства Zygaenidae.

**Научная новизна исследований.** Впервые в мире была создана библиотека штрихкодов видов семейства Zygaenidae для 242 видов, представляющих 4 подсемейства Procridinae, Chalcosiinae, Callizygaeninae и Zygaeninae, а также расшифрованы соответствующие 5'-участку гена COI (ДНК-штрихкоду) аминокислотные последовательности (длиной 219 аминокислот). Впервые в мире были

получены последовательности генов EF-1 $\alpha$ , GAPDH, IDH, MDH, RpS5 и wingless для 33 видов Zygaenidae. Показана необходимость сочетанного применения митохондриальных и ядерных маркеров для молекулярно-генетического анализа биоразнообразия.

На основе исследования последовательности гена цитохромоксидазы построены дендрограммы и проанализированы данные, полученные с помощью этих дендрограмм, с целью выяснения возможности использования молекулярных признаков для улучшения существующей систематики данного таксона, а также применения этих признаков для разделения криптических видов, выяснения систематического положения некоторых родов, подродов, видов и подвидов семейства Zygaenidae.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Полученные результаты важны для понимания микроэволюционных процессов, происходящих в геноме животных, данные о несинонимичных заменах позволяют оценить их вклад в функционирование белковых молекул. Результаты исследования вносят существенный вклад в область систематики и филогении Zygaenidae. Работа может служить фундаментальной основой для проведения ревизии таксономической структуры семейства Zygaenidae. Результаты диссертационной работы могут быть использованы при чтении курсов лекций для студентов биологических специальностей вузов и для проведения практических занятий.

**Методология и методы исследования.** В работе были использованы современные методы молекулярной биологии, а именно: выделение ДНК, амплификация ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфичными праймерами для 5'-участка гена COI и ядерных генов (EF-1 $\alpha$ , GAPDH, IDH, MDH, RpS5, а также wingless), подготовка проб и секвенирование. Для качественного, количественного и филогенетического анализов полученных последовательностей были использованы специальные компьютерные программы, позволяющие выравнивать последовательности, переводить их в соответствующие аминокислотные, строить дендрограммы и анализировать состав полученных последовательностей. Детали используемых методов молекулярного и молекулярно-филогенетического анализа опубликованы в нашей работе (Efetov et al., 2019).

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Молекулярные методы (например, ДНК-штрихкодирование) могут быть использованы для решения задач филогении и таксономии Zygaenidae.

2. ДНК-штрихкоды и ядерные гены являются дополнительными молекулярными критериями для делимитации видов Zygaenidae.

**Апробация результатов исследования.** Результаты работы докладывались и обсуждались на украинских, российских и международных конференциях: X Украинском биохимическом съезде (Одесса, Украина, 2010); XII, XIII, XV, XVI International Symposia on Zygaenidae (Hatay, Turkey, 2010; Innsbruck, Austria, 2012; Mals, Italy, 2016; İzmir, Turkey, 2018); XVII, XVIII European Congresses of Lepidopterology (Luxembourg, Luxembourg, 2011; Blagoevgrad, Bulgaria, 2013), 89-ой и 90-ой Международных научно-практических конференциях студентов и молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, Россия, 2017, 2018), IV научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых «Дни науки КФУ им. В. И. Вернадского» (Симферополь, Россия, 2018), VIII научно-практической конференции «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, Россия, 2019), II объединённом научном форуме: VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи – Дагомыс, Россия, 2019).

**Связь работы с научными программами и темами.** Диссертационная работа выполнялась в рамках научно-исследовательских работ кафедры биохимии института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» по темам: «Применение комплекса биохимических, иммунологических, молекулярно-генетических и спектральных методов для изучения иммуноглобулинов человека при патологии, а также решения вопросов эволюционной биологии и хемокоммуникации биологических видов» (№ государственного учёта НИОКТР РФ АААА-А19-119011790032-0); Исследования проведены в рамках международных научных проектов: «Study of DNA molecules of different biological species with the purpose to reconstruct phylogeny and create a proper biological system» совместно с Tiroler Landesmuseen, Ferdinandeum (Австрия), и «DNA barcoding of Zygaenidae moths» [ZYGMO], руководитель – профессор К. А. Ефетов, совместно с Biodiversity Institute of Ontario (University of Guelph, Канада). Эта 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.

**Личное участие автора.** Автор лично участвовал в планировании, проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке и написании научных публикаций, апробации результатов и представлении их на конференциях. Сбор материала проводился научным руководителем и лично автором, морфологический анализ проводился научным руководителем. Некоторые результаты анализа ДНК получены лично автором. Вся работа по молекулярному анализу была проведена лично автором. Выводы сделаны на основании собственных оригинальных данных. Подготовка рукописи настоящей диссертационной работы и автореферата, а также материалов для публикаций лично проводились автором.

**Публикации.** По теме исследования опубликовано 18 работ, в том числе пять статей в журналах, перечня ВАК Минобрнауки России, из них 2 в журналах, включенных в системы цитирования Scopus и / или Web of Science. Также результаты исследований представлены в материалах международных конференций, съездов, конгрессов и симпозиумов (13 публикаций).

**Соответствие научно-квалификационной работы паспорту научной специальности.** Диссертационная работа «Вариабельность митохондриальных и ядерных генов у представителей семейства Zygaenidae и её значение для изучения систематики и филогении данного семейства» соответствует паспорту научной специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки), охватывающей проблемы структурной, функциональной и эволюционной геномики, геносистематики, частной генетики животных.

**Структура и объём работы.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы и трёх приложений. Работа изложена на 256 страницах, проиллюстрирована 11 рисунками и содержит 34 таблицы в основной части и две таблицы в приложении. Список литературы насчитывает 310 наименований, из них 262 на иностранном языке.

**Благодарности.** Автор искренне благодарит научного руководителя профессора К. А. Ефетова за обучение, помощь, поддержку на всех этапах исследования и многолетнее сотрудничество. Автор благодарен исследователям: А. Н. Замесову (Россия), Dr G. M. Targmann (Австрия), В. Mollet, E. Drouet и J.-M. Desse (Франция) за предоставленный биологический материал. Также автор считает своим долгом выразить благодарность Prof. P. D. N. Hebert (Канада) и Dr R. Rougerie (Франция), И. Г. Мещерскому (Россия) за плодотворное сотрудничество.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использован биологический материал, полученный от представителей семейства Zygaenidae (Lepidoptera). Всего были выбраны 1235 экземпляров изучаемого семейства. Профессором К. А. Ефетовым и Dr G. M. Tarmann было проведено определение экземпляров, в большинстве случаев на основании изучения гениталий. Секвенирование ядерных генов EF-1 $\alpha$ , GAPDH, IDH, MDH, RpS5 и wingless было осуществлено для 51 образца. Тотальная геномная ДНК выделена из высушенных или фиксированных в 96 % этаноле конечностей. Выделение ДНК в различных случаях проводили с использованием различных наборов фирм: Литех (Россия), Macherey-Nagel (Германия). Для получения ДНК-штрихкодов использованы универсальные праймеры Lepidoptera. Для амплификации ядерных генов использованы праймеры из работы Rota и соавторы (2016). ПЦР проводили по стандартным методикам. 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. Продукты реакции анализировали на автоматическом секвенаторе AB 3500 Genetic Analyzer. Для каждого экземпляра получены антипараллельные последовательности, формирование консенсусных последовательностей проведено в программах BioEdit и Chromas. Гетерозиготные сайты в последовательностях отслеживались в программе BioEdit. Различия в последовательностях гена COI оценивали с помощью программного инструментария BOLD 3.0–4.0 с применением NJ-алгоритма (Saitou, Nei, 1987) и двухпараметрической модели Кимуры – Kimura 2-Parameter distance model (K2P) (Kimura, 1980). Для анализа ядерных генов использовали следующие программы: для построения филогенетических деревьев использовали NJ метод для построения деревьев по принципу MP и ML в программе MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Для анализа последовательностей нуклеотидов и аминокислот использовали программы BioEdit (Hall, 1999), DNAsp v.5 (Librado, Rozas, 2009) и MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для сравнительного молекулярно-генетического анализа использованы экземпляры, принадлежащие к 242 видам семейства Zygaenidae (часть ещё не известных науке на момент исследования, с дальнейшим описанием на основе, в том числе, молекулярных данных). 171 вид подсемейства Procridinae, 24 – Chalcosiinae, 1 –



Callizygaeninae и 32 – Zygaeninae из 60 стран. Вся информация об экземплярах, использованных для секвенирования 5'-участка гена COI, собрана и доступна на сайте проекта ZYGMO ([http://www.boldsystems.org/index.php/MAS\\_Management\\_DataConsole?codes=ZYGMO](http://www.boldsystems.org/index.php/MAS_Management_DataConsole?codes=ZYGMO)).

В общей сложности для исследования было получено 1094 последовательности COI. Большая часть материала с 2009 года отправлялась на выделение ДНК и секвенирование гена COI в Канадский центр ДНК-штрихкодирования Института биоразнообразия Университета штата Онтарио в городе Гуэлфе в рамках научной программы «Barcode of Life», проект: «DNA barcoding of Zygaenidae moths» [ZYGMO], руководитель – профессор К. А. Ефетов. После элиминирования неполных и не соответствующих критериям ДНК-штрихкодов последовательностей их число сократилось до 1023. Длина у всех была 550 и более нуклеотидов. Во многих публикациях показано, что секвенирование образцов возрастом более 10 лет часто сопряжено с определёнными трудностями или является неуспешным вследствие деградации ДНК (Hajibabaei et al., 2005; Абрамсон, 2013; Pohjoismäki et al., 2016). В нашем исследовании для 432 образцов возрастом 16 и более лет были получены качественные ДНК последовательности (самый старый экземпляр, результаты секвенирования которого оказались хорошего качества, датируется 1982 годом).

При анализе в программе DNAsp v.5 в последовательностях инделов не обнаружено. По результатам исследования все полученные образцы распределились между 238 BIN-кластерами. Эти кластеры демонстрируют высокое соответствие с видами. (Ratnasingham, Hebert, 2013). В результате распределения образцов между BIN выяснилось, что 69,3 % этих кластеров являются уникальными для проекта ZYGMO, в то время как 30,7 % BIN уже присутствовало в электронной базе портала BOLD. 41,4 % последовательностей проекта ZYGMO распределились среди уникальных BIN. При этом в 92,2 % один BIN включал в себя последовательности для экземпляров одного вида, но в 7,8 % кластеров в одном BIN оказалось 2 и более видов. Все полученные в рамках инициативы iVOL (проект ZYGMO) последовательности распределились следующим образом: из 238 BIN-кластеров противоречивыми оказалось 18 BIN, а одиночными (включающими только одну последовательность) – 99 BIN.

В результате анализа состава азотистых оснований показано, что в среднем в исследованных последовательностях гена COI больше всего тимина и аденина, а меньше – цитозина и гуанина. Второе положение триплетов характеризуется наиболее высоким содержанием ГЦ пар (42,74 %), а самое низкое содержание ГЦ пар (8,14 %) детектировано в третьем положении. Следовательно можно говорить о снижении мутационного давления на этот участок COI (Бутвиловский, 2009; Бутвиловский и соавт., 2012). Определение стандартной ошибки показывает выраженность

межвидовой изменчивости нуклеотидного состава последовательностей гена COI. Нуклеотидный состав второй позиции триплетов характеризуется самой низкой вариабельностью (SE – 0.018), третьей позиции – максимальным межвидовым полиморфизмом (SE – 0.093).

Таблица 1 – Суммарная статистика частоты встречаемости нуклеотидов (с указанием % GC в каждой позиции кодона) для исследованных ДНК-штрихкодов представителей семейства *Zygaenidae*

	Минимальная	Средняя	Максимальная	SE
G %	12.92	14.90	16.57	0.0172
C %	13.68	15.98	20.12	0.0345
A %	26.98	30.15	32.67	0.0313
T %	35.28	38.96	42.71	0.0331
GC %	27.51	30.89	35.74	0.0373
GC % (1 позиция в кодоне)	36.99	41.88	46.12	0.0409
GC % (2 позиция в кодоне)	41.10	42.74	44.62	0.0176
GC % (3 позиция в кодоне)	2.73	8.14	20.18	0.0934

Анализируемые последовательности ДНК подтвердили АТ-смещение (среднее содержание АТ > 60 % в среднем во всех последовательностях), характерное для митохондриальной ДНК животных, что согласуется с литературными данными (Pentinsaari et al., 2016; Pentinsaari, 2016). Этими авторами также показано, что смещение в сторону АТ немного выше у *Lepidoptera*, чем у других таксонов.

Анализ полученных ДНК-штрихкодов в свете традиционной таксономии показал для большого числа образцов специфичность последовательностей данного участка ДНК на видовом уровне (70 % видов, для которых получены последовательности длиной более 550 нуклеотидов). Средняя внутривидовая K2P дистанция составила 1,36 %, межвидовая (в рамках одного рода) – 7,44 %, межродовая (в рамках семейства) – 13,91 %. Полученные последовательности анализировались с помощью метода ближайшего связывания (NJ) с использованием K2P модели. Однако неэффективность использования ДНК-штрихкодов продемонстрирована для делимитации некоторых групп видов.

K2P дендрограмма проиллюстрировала монофилию подродов *Molletia* Efetov, 2001 (род *Zygaenoprocris* Hampson, 1900), *Procriterna* Efetov and Tarmann, 2004 (род *Adscita* Retzius, 1783), *Tarmannita* Efetov, 2000 (род *Adscita*) (рисунок 1), *Tremewania* Efetov and Tarmann, 1999 (род *Jordanita*), *Roccia* Alberti, 1954 (после исключения трёх видов из последнего подрода и включения их в отдельный подрод *Tremewania* рода *Jordanita*) (Ефетов и соавт., 2010).

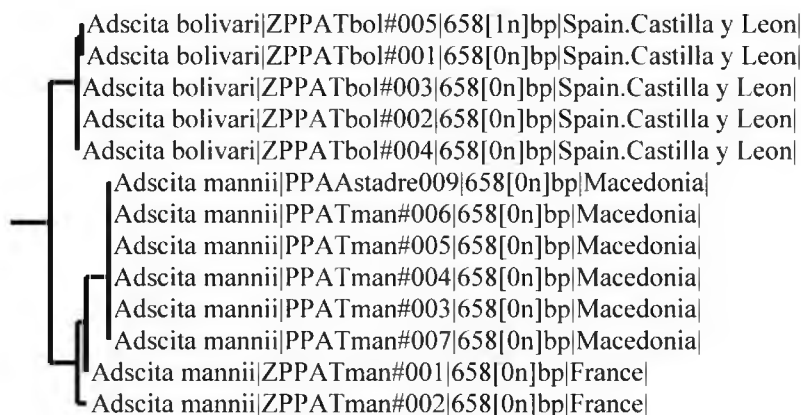


Рисунок 1 – Дендрограмма, отражающая генетические дистанции гена COI для подрода *Tarmannita* Efetov, 2000, построенная с помощью программного инструментария проекта BOLD (двухпараметрическая модель Кимуры, COI, длина > 550 п.о.).

Эти результаты согласуются с гипотезой, выдвинутой ранее и базирующейся на данных морфологии, биологии, свойствах белков гемолимфы и хемоаттрактантов и т.д. (Subchev et al., 1998, 2010, 2012, 2013; Efetov 2001a, 2004, 2005; Efetov et al., 2010b, 2011a, 2014b, 2015b; Razov et al., 2017). Согласно данным ДНК-штрихкодирования все исследованные виды подрода *Mesembrynus* Hübner, 1819 (род *Zygaena* Fabricius, 1775, Zygaeninae) формируют монофилетический кластер на дендрограмме, что является подтверждением предыдущих таксономических решений, основанных на данных морфологии (Hofmann and Tremewan 1996, 2009; Efetov et al., 2014a).

Полученные данные согласуются в целом, но в некоторых случаях позволяют улучшить подродовую концепцию Alberti в подсемействе Procridinae (Alberti, 1954) и поддерживают идею К. А. Ефетова (Efetov, 2005) о филогенетической близости родов *Illiberis* Walker, 1854 (sensu stricto) и *Rhagades* Wallengren, 1863 (Efetov, 2005; Efetov, Tarmann, 2012). На уровне родов наши результаты подтверждают ранее существующую точку зрения, о том, что род *Illiberis* (sensu lato) представляет собой полифилетическую группу (Efetov, 1995, 1996c, 1997b, 1998a, 2010; Efetov, Mollet, 2006; Efetov et al., 2010c). Таксономический статус некоторых групп видов был изменен (Efetov, Tarmann, 2012). Например, был описан род *Pseudoilliberis* Efetov & Tarmann, 2012, подроды *Hedina* Alberti, 1954, и *Zama* Herrich-Schäffer, 1855, были переведены на уровень родов (Efetov, Tarmann, 2012). Результаты молекулярных исследований свидетельствуют о монофилии рода *Rhagades* что было показано ранее (Efetov, 2001, 2004, 2005) на основе морфологических данных, в том числе – хетотаксии гусениц первого возраста. Результаты ДНК-штрихкодирования были

использованы для описания новых видов Zygaenidae, например *Adscita (Procriterna) pligori* Efetov, 2012 (Efetov, 2012).

Более 25 % исследованных видов имеют дистанцию до ближайшего соседа 2 % и менее (около 20 % видов – менее 1,0 %). Одним из возможных объяснений может быть тот факт, что эти группы видов являются эволюционно молодыми и исследуемый участок гена COI к настоящему времени не имеет статистически значимого числа различий.

Например, австралийский род *Pollanisia* Walker, 1854 характеризуется низким уровнем межвидовых дистанций, несмотря на то, что виды этого рода на дендрограмме сформировали несколько изолированных внутривидовых кластеров. Согласно работе Tarmann (2004) у этого рода также достаточно небольшие различия в строении гениталий, но, тем не менее, он характеризуется большим разнообразием биологии. Таким образом, род *Pollanisia* нуждается в дальнейшей ревизии с использованием комплекса признаков (молекулярных, морфологических и биологических).

При изучении результатов ДНК-штрихкодирования для экземпляров вида *Jordanita (Solaniterna) subsolana* (Staudinger, 1862) из различных локалитетов, а именно: южной Италии, Македонии, Турции, Армении, Крыма и Украины, было обнаружено, что последовательности экземпляров крымской, турецкой, южноитальянской и македонской популяций сформировали группу, дистанцированную от армянской и украинской популяций. Эти данные могут отражать проникновение особей *J. (S.) subsolana* в различные географические регионы в разное время (рисунок 2).

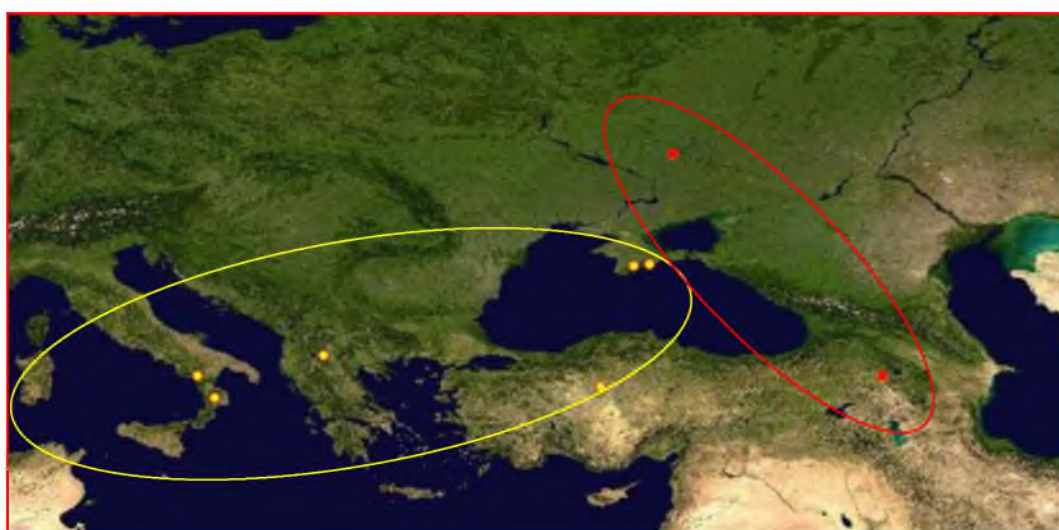


Рисунок 2 – Географическое распространение *Jordanita (Solaniterna) subsolana* (Staudinger, 1862). Две группы популяций по результатам ДНК-штрихкодирования.

Последовательности COI экземпляров североафриканского вида *Adscita (Adscita) mauretanic* (Naufock, 1932) на K2P дендрограмме оказались расположенными отдельно от всех остальных экземпляров видов рода *Adscita* Retzius, 1783, обитающих в Европе и Азии. Хотя морфологические и биологические признаки у вида *A. (A.) mauretanic* совпадают с таковыми у всех остальных представителей данного рода. При проведении анализа методом ближайшего соседа было выяснено, что дистанция между *A. (A.) mauretanic* и *A. (Tarmannita) mannii* (Lederer, 1853) составила 7,58 %. Этот факт отражает длительную географическую изоляцию *A. (A.) mauretanic*.

Дистанция между экземплярами *A. (A.) geryon* (Hübner, 1813) из Балкан и южной Италии и представителями остальных европейских популяций этого вида (включая Крым) оказалась больше, чем между крымскими экземплярами *A. (A.) geryon* и *A. (A.) albanica* (Naufock, 1926). Последний вид очень хорошо отличается морфологически и биологически от *A. (A.) geryon*. Возможно, значительное сходство последовательностей разных видов в пределах одного географического региона свидетельствует о горизонтальном переносе генов.

В некоторых родах на уровне подвидов и видов наблюдалась внутривидовая дивергенция, приближающаяся к/или превышающая стандартный межвидовой порог в 2 %. Например – результаты, полученные для видов комплекса *minos-purpuralis* рода *Zygaena* подрода *Mesembrynus* Hübner, 1819. В результате статистической обработки последовательностей COI на сайте проекта BOLD выяснилось, что дистанции между особями *Zygaena (Mesembrynus) minos persica* Burgeff, 1926 из Ирана и всеми другими экземплярами комплекса *minos-purpuralis* существенно выше средней общепринятой величины 2 %. Эта дистанция составила 4,92 % до ближайшего соседа – вида *Z. (M.) minos* ([Denis and Schiffermüller], 1775) и 4,75 % – *Z. (M.) purpuralis* (Brünnich, 1763). Данные значения превышают таковые между экземплярами комплекса *minos-purpuralis* и особями другого близкого вида *Zygaena (Mesembrynus) erythrus* (Hübner, 1806). Так, дистанция до ближайшего соседа между последовательностями *Z. (M.) erythrus* (Hübner, 1806) и *Z. (M.) minos* составила 1,86 %, между последовательностями COI *Z. (M.) erythrus* и *Z. (M.) purpuralis* – 1,86 %. Выявленная глубокая дивергенция среди экземпляров *Z. (M.) minos persica* вместе с комплексом морфологических отличий поддерживает идею о том, что статус этого таксона должен быть пересмотрен (Nahirnić, Tarmann, 2014).

Кластеры, сформированные последовательностями вида *Zygaenoprocris (Molletia) duskei* (Grum-Grshimailo, 1902), формируют одну терминальную группу с дистанцией до ближайшего соседа *Z. (M.) taftana* (Alberti, 1939) – 4,74 %, и до *Z. (M.) persepolis* (Alberti, 1938) – 5,72 %. Дистанция между экземплярами подвида *Z. (M.) duskei kliri* Keil, 2002, составляет 0,17 %, дистанция между экземплярами подвида *Z.*

(*M. duskei kermana* (Alberti, 1967) – 1,08 %, в то время как этот показатель между экземплярами подвида *Z. (M.) duskei duskei* (Grum-Grshimailo, 1902) составил 3,93 %. Таким образом, полученные результаты иллюстрируют положение о том, что на основе только молекулярных данных, особенно с использованием только одного митохондриального маркера, не всегда возможно точно установить, представлена ли популяция отдельными видами или подвидами одного вида. При изучении вида *Z. (M.) duskei* внутривидовая дистанция превысила среднюю внутривидовую, полученную на основе анализа последовательностей COI для представителей изучаемого подсемейства в наших исследованиях (1,36 %) в три раза.

Оказалось, что около 15 % видов семейства Zygaenidae продемонстрировали внутривидовую дивергенцию более 3 %, в то время как по литературным данным дивергенция более 2 % служит критерием межвидового деления изучаемых организмов (Воронова и соавт., 2012; Kekkonen et al., 2015; Hebert et al., 2016). При анализе дендрограммы, построенной для последовательностей экземпляров подрода *Zygaenoprocris* Hampson, 1900 рода *Zygaenoprocris* оказалось, что последовательности COI для некоторых экземпляров *Z. chalconchlora* образовали терминальную группу, изолированную от других экземпляров *Z. chalconchlora*. Особи из северного Ирана, чьи последовательности сформировали отдельные кластеры на дендрограмме, отличались морфологически по строению гениталий самок от экземпляров из Пакистана (в том числе из типовой для этого вида местности) и Афганистана. Полученные молекулярные данные позволили согласиться с мнением Alberti (1939) о том, что «*Procris khorassana*» и *Zygaenoprocris chalconchlora* являются различными видами. Таксон «*Procris khorassana*» был восстановлен К. А. Ефетовым и Г. М. Тарманом (2012) в качестве валидного – *Zygaenoprocris khorassana* (Alberti, 1939).

Для экземпляров вида *Adscita (Procriterna) subdolosus* (Staudinger, 1887) также была показана высокая степень дивергенции, максимальная внутривидовая дистанция составила 4,24 %. Возможно это связано с географической изоляцией популяций данного вида в различных горных системах центральной Азии.

Более сложная ситуация наблюдается в подрode *Jordanita* Verity, 1946, рода *Jordanita*. Максимальная внутривидовая дистанция между экземплярами вида *Jordanita (J.) graeca* (Jordan, 1907) составила 5,72 %, а вида *Jordanita (J.) chloros* (Hübner, 1813) – 6,08 %, в то время как дивергенция между последовательностями COI в других видах данного подрода оказалась гораздо меньше. Для вида *Jordanita (J.) globulariae* (Hübner, 1793) эта величина составила 1,86 %, а *Jordanita (J.) tenuicornis* (Zeller, 1847) – 1,58 %. Однако межвидовые дистанции для изучаемого подрода оказались очень низкими – в пределах 0,3–0,61 %. Для *Jordanita (J.) vartianae* (Malicky, 1961) и *Jordanita (J.) syriaca* (Alberti, 1937) были получены ДНК-штрихкоды только для одного экземпляра каждого

вида, поэтому мы не можем рассчитать для этих видов внутривидовые дистанции. Все виды подрода *Jordanita* рода *Jordanita* имеют хорошие морфологические отличия в строении гениталий (Efetov, 2004, 2005). Можно сделать вывод о том, что ДНК-штрихкодирование в этой группе «не работает» (рисунок 3). Подобные результаты были получены ранее и для некоторых других таксонов Insecta (Hickerson et al., 2006; Meier et al., 2006; Hausmann et al., 2011).

Как уже указывалось ранее, ДНК-штрихкодирование Zygaenidae в некоторых случаях оказались неприменимыми для изучения систематики этой группы и делимитации видов. Поэтому нами было проведено секвенирование дополнительных ядерных генов: EF-1 $\alpha$ , GAPDH, IDH, MDH, RpS5 и wingless.

Результаты проведенного исследования показали, что в некоторых случаях использование только митохондриальной ДНК приводило к невозможности корректной делимитации видов с хорошо выраженными морфологическими различиями. Так при анализе ДНК-штрихкодов подрода *Jordanita* рода *Jordanita* последовательности экземпляров видов *J. (J.) graeca* и *J. (J.) chloros* не образовали на дендрограмме, построенной с использованием двухпараметрической модели Кимуры, изолированных кластеров.

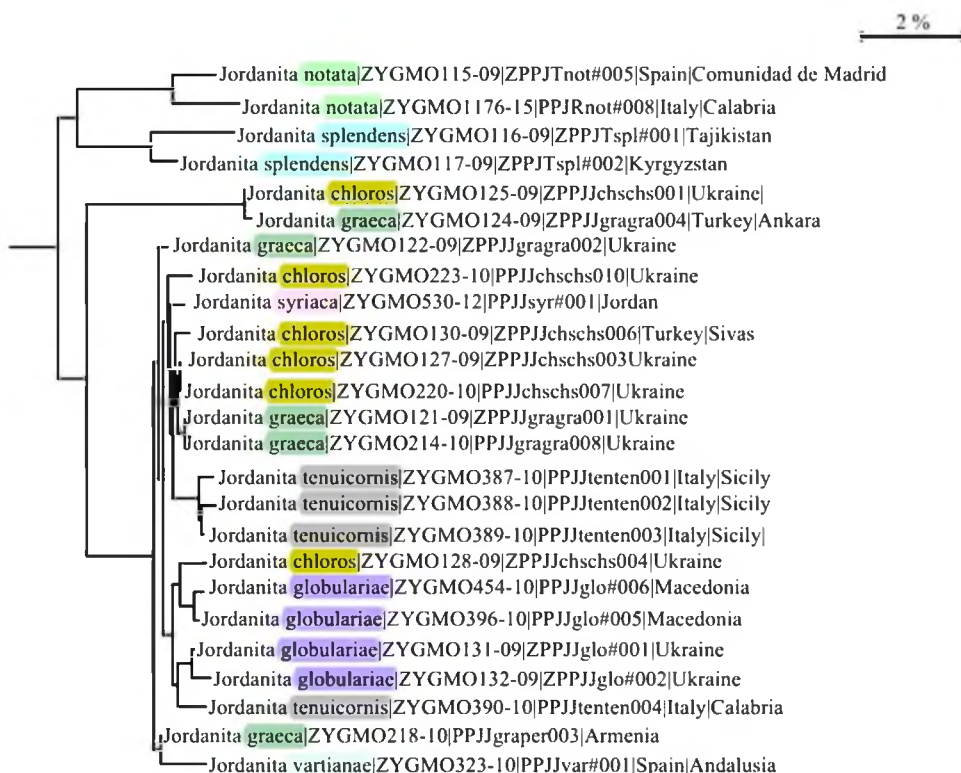


Рисунок 3 – Дендрограмма, отражающая генетические дистанции гена COI, для подродов *Tremewania* Efetov & Tarmann, 1999, и подрода *Jordanita* Verity, 1946 рода *Jordanita*, построенная с помощью программного инструментария проекта BOLD (двухпараметрическая модель Кимуры, COI, длина > 550 п.о.).



Несмотря на то, что эти биологические виды хорошо различаются морфологически, молекулярные отличия в гене COI оказались недостоверными. При дальнейшем анализе ДНК-штрихкодов этих двух видов было выявлено 44 переменных сайта 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. При этом более подробный анализ показал, что в точках вариабельности преобладают транзиции – 73% от общего числа замен, в частности, пиримидиновые транзиции Т–С – 78% от общего числа, среди трансверсий (17%) преобладают точки вариабельности Т–А – 83%. Практически все эти замены оказались синонимичными, так как при анализе соответствующих ДНК-штрихкодам аминокислотных последовательностей участка первой субъединицы цитохромоксидазы (длиной 219 аминокислот) межвидовых различий не было выявлено. У одного экземпляра *J. (J.) chloros* из Севастополя (Мекензиевы горы) определена точка вариабельности аминокислоты: в позиции 123 обнаружен глицин, в то время как у всех других экземпляров изученных видов в этом положении находится аланин. Тем не менее, при использовании дополнительных ядерных генов на построенной дендрограмме последовательности экземпляров этих видов образовали изолированные кластеры, с высоким значением бутстреп поддержки. Следовательно, применение дополнительных генов в исследовании позволило скорректировать результаты, полученные при использовании только фрагмента COI, и провести корректную делимитацию этих видов с помощью молекулярно-генетических методов (рисунок 4).

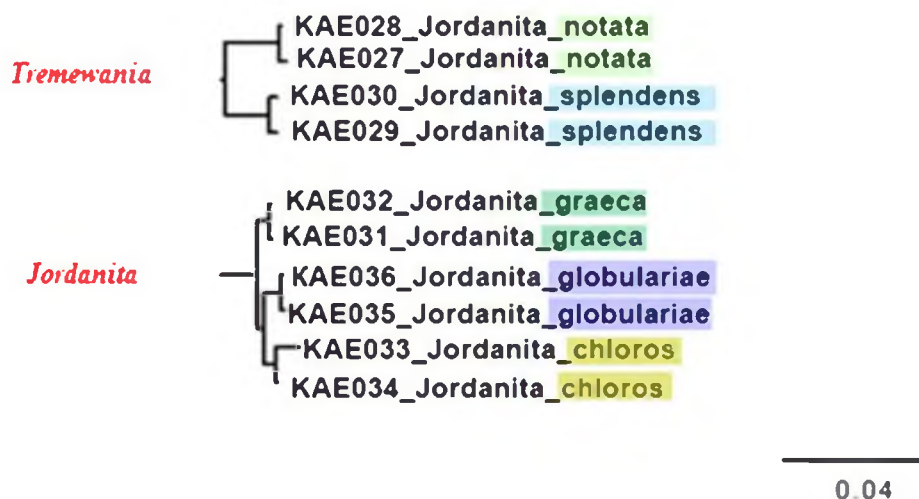


Рисунок 4 – Мультилокусная дендрограмма для подродов *Tremewania* Efetov & Tarmann, 1999, и подрода *Jordanita* Verity, 1946 рода *Jordanita*.



Определённый интерес вызывает анализ аминокислотных последовательностей, соответствующих участку ДНК-штрихкода, после исключения праймерных последовательностей этот фрагмент содержит 219 аминокислот. Согласно нуклеотидным последовательностям ДНК-штрихкодов нами были получены аминокислотные последовательности, которые сравнивались в программе BioEdit (Hall, 1999). Полученные результаты позволили выявить мутации, приводящие к появлению в белке новых аминокислот. Нами был проведен анализ этих последовательностей для некоторых родов семейства *Zygaenidae*: *Illiberis*, *Zygaenoprocris*, *Rhagades*, *Adscita*, *Jordanita*, *Zygaena*. Наши данные указывают на различную степень гетерогенности участка белка COI, соответствующего ДНК-штрихкоду. Согласно работе Pentinsaari и соавторов (2016) наиболее важные консервативные позиции в данном участке молекулы COI – это 22, 45, 110, 111, 113. Во всех проанализированных аминокислотных последовательностях эти позиции также оказались консервативными.

В роде *Illiberis* вариабельность в позиции 12 специфична для подрода *Illiberis* Walker, 1854, представленного видом *Illiberis (Illiberis) ellenae* Alberti, 1954. Позиции 67, 104, 146 и 199 специфичны для подрода *Primilliberis* Alberti, 1954. В 123 позиции варьируют глицин и серин, так как эти аминокислоты имеют малого размера радикал, то данные изменения не вносят существенного вклада в изменение активности изучаемого фермента (Betts, Russell, 2003).

Для рода *Hedina* нами было получено 5 последовательностей для трёх видов. Выявлено две позиции вариабельности. В 94 положении у представителей вида *Hedina louisii* (Efetov, 2010) определён аланин, а у представителей двух других видов – треонин. Несмотря на изменение полярности (аланин относят к гидрофобным, а треонин – к гидрофильным аминокислотам) обе эти молекулы имеют маленький радикал, поэтому такие замены не оказывают существенного влияния на функционирование белковой молекулы (Betts, Russell, 2003). В 123 позиции варьируют глицин и серин, аналогично данные изменения не вносят существенного вклада в изменение активности изучаемого фермента (Betts, Russell, 2003).

Для представителей рода *Rhagades* в участке COI длиной 219 аминокислот нами были определены 12 точек вариабельности. Ранее позиция 123 была детектирована как вариабельная для родов *Illiberis*, *Hedina*, при этом во всех исследованных последовательностях рода *Rhagades* в этой позиции обнаружена полярная аминокислота серин. Позиции 34 и 162 оказались вариабельными для вида *Rhagades (Rh.) pruni*. Позиции 30 и 33 оказались вариабельными только для *Rhagades (Naufockia) brandti* (Alberti, 1938). В шести позициях 13, 94, 104, 130, 159, 171 вариабельность наблюдается у *Rhagades (Wiegelia) amasina*, при этом позиция 171 является по нашим данным подродоспецифичной, так как вариабельность в этом положении присутствует также и в

последовательностях, полученных для экземпляров *Rhagades (Wiegelia) predotae*. Также для этого вида наблюдается вариабельность в позициях 67, 94, 104, 130, 161. В положении 159 у представителей подрода *Rhagades* Wallengren, 1863 определена отрицательно заряженная глутаминовая кислота, у представителей двух других подродов – гидрофобный глицин. Род *Rhagades* отличается большой гетерогенностью аминокислотных последовательностей, согласно ранее полученным результатам (Efetov, et al., 2015) это род характеризуется также большой гетерогенностью кариотипов. Так *Rh. (N.) brandti* (Иран) имеет в гаплоидном наборе 31 хромосому, что соответствует модальному числу у *Lepidoptera* (Efetov, et al., 2003), *Rh. (W.) amasina* (Турция) – 12 хромосом (Efetov, 2001a), *Rh. (Rh.) pruni* (Крым) – 47 (Efetov, 1998).

В общем, для экземпляров рода *Zygaenoprocris*, определено 27 вариабельных позиций, что составляет 12,3 %. Можно выделить вариабельные участки: 26–29, 156–159. В публикации Хусаинов, Фролова (2015) показаны такие же уникальные вариабельные участки для некоторых видов, но с другой последовательностью аминокислот. Ранее позиция 123 была детектирована как вариабельная для рода *Illiberis*, *Hedina*. В этой позиции у представителей *Zygaenoprocris*, так же как и у ранее описанных родов, варьируют глицин и серин; так как эти аминокислоты имеют малого размера радикал, то данные изменения не вносят существенного вклада в изменение активности изучаемого фермента (Betts, Russell, 2003).

При исследовании последовательностей аминокислот, соответствующих ДНК-штрихкодovому участку гена COI, у представителей рода *Adscita* выявлено 18 точек вариабельности, что составляет 8,2 %. Из них половина характерна и для рода *Zygaenoprocris*. Наиболее близкие к гемовому лиганду вариабельные позиции по данным литературы 8 и 57 у представителей рода *Adscita* оказались постоянными. Также выявлено, что из 6 вариабельных аминокислотных позиций, располагающихся достаточно близко к гему (расстояние менее 5 Å) у *Adscita* является вариабельной позиция 27. Но по данным литературы (Pentinsaari, 2016; Pentinsaari et al., 2016) в этой позиции у *Metazoa* находится глутамин (с энтропией более 1), а у экземпляров исследуемого рода обнаружены треонин или аланин. Позиции 13 и 67 могут рассматриваться как подродоспецифичные – у представителей подрода *Procriterna* Efetov & Tarmann, 2004 детектирован изолейцин, у представителей остальных подродов – валин, и у *A. (A.) schmidti* варьируют изолейцин/валин в 13 положении, у *A. (A.) geryon* эти аминокислоты варьируют в 67 положении.

В общем, для всех последовательностей, полученных для представителей рода *Jordanita*, определена 31 точка вариабельности, что составляет 14,2 %. Наибольшей гетерогенностью аминокислот характеризуются последовательности, полученные для представителей подрода *Roccia* (Alberti, 1954) – в 14 позициях проявляется

вариабельность аминокислот, причем в четырех из них варьируют более чем две аминокислоты. Позиция 123 детектирована как вариабельная, как и у всех ранее описанных родов *Zygaenidae* за исключением рода *Rhagades*. Из двух наиболее близких к гемовому лиганду вариабельных позиций по данным литературы 8 и 57 у представителей рода *Jordanita* последняя оказалась константной, а позиция восемь характеризуется вариабельностью с  $S=0,76729$ . На расстоянии атомарного взаимодействия от группы гема происходят два вариабельных участка: аминокислоты в 8 и 57 положении встречаются на расстояниях 3,6 Å и 4,4 Å от гема соответственно (Pentinsaari, 2016; Pentinsaari et al., 2016). У некоторых Coleoptera в одной из двух позиций (8 или 57) детектировано изменение аминокислоты на фенилаланин, с объёмным гидрофобным радикалом. Когда восьмая позиция изменена, группа гема (расположенная на расстоянии всего 1,8 Å) удаляется от фенилаланина. Когда в 57 позиции появляется фенилаланин, его боковая цепь, вероятно, ограничивает соседнюю спираль, расположенную на расстоянии всего 2,2 Å (Pentinsaari, 2016; Pentinsaari et al., 2016). В нашем исследовании мы выяснили, что для представителей исследуемого рода (подроды *Roccia*, *Tremewania*, *Gregorita*) характерна мутация в позиции 8, в этом положении обнаружен либо изолейцин, либо валин – гидрофобные аминокислоты с разветвлённым, но не циклическим ароматическим (в отличие от фенилаланина) радикалом.

При анализе аминокислотных последовательностей изучаемого участка цитохромоксидазы нами были выявлены единичные вариабельные позиции в роде *Zygaena*, доля вариабельных аминокислотных сайтов составила 5,9 %. Род *Zygaena* включает в себя четыре подрода *Mesembrynus*, *Agrumenia* Hübner, 1819, *Lictoria* Burgeff, 1926 и *Zygaena* (Efetov, 2005; Ефетов, 2019). В исследуемых последовательностях найдены отличия в позициях 10, 117, 123 в трёх подродах рода *Zygaena*, кроме *Lictoria*. В первых двух положениях обнаруживаются такие аминокислоты, как аланин и серин, в 123 положении происходит замена серина на глицин. Все эти аминокислоты характеризуются малым размером радикалов, и некоторые авторы не относят такие замены к значимым, влияющим на функциональную активность данного белка (Betts, Russell, 2003). Однако в части работ таким заменам придается больший вес, так как серин является гидрофильной (полярной), а аланин – гидрофобной (неполярной) аминокислотой (Pappalardo et al., 2016). В подродах *Mesembrynus* и *Lictoria* у всех исследованных видов в пятом положении обнаружена аминокислота лейцин, а в подроде *Agrumenia* в этом же положении – метионин. В подроде *Zygaena* в этой позиции найдены либо изолейцин, либо метионин. В позициях 104 в подроде *Mesembrynus* и 161 в подроде *Agrumenia* отмечаются серин или аспарагин, в подроде *Zygaena* в обеих позициях – только серин, а в подроде *Lictoria* позиция 104 является вариабельной – обнаружены

серин или лизин. Полученные данные подтверждают монофилию подрода *Mesembrynus* (Ефетов и соавт., 2017). Позиция 185 является вариабельной только для представителей *Lictoria* – изолейцин/валин.

Кроме уже обсуждавшихся позиций в подрode *Zygaena* найдены следующие точки вариабельности: в 8 положении изолейцин/валин, в 13 и 97 – лейцин/валин, в 95 – лейцин/метионин. Эти замены аминокислот не характеризуются сменой полярности данного участка полипептидной цепи, поэтому не должны существенно менять функциональную активность изучаемого участка цитохромоксидазы. Также для подрода *Zygaena* характерны следующие дополнительные аминокислотные замены: в 106 положении аланин/аспарагин, в 125 – серин/глицин, и в 187 – аланин/треонин. Таким образом, в положениях 106, 125, 187 происходит замена аминокислот с изменением полярности радикалов, что потенциально может влиять на пространственную структуру изучаемого белка (Ефетов и соавт., 2017; Лазарева, Белоус, 2017). Позиция 185 является вариабельной только для представителей *Lictoria* – изолейцин/валин. В нашем исследовании мы выяснили, что для представителей исследуемого рода характерна мутация в позиции 8, в этом положении обнаружен либо изолейцин, либо валин – гидрофобные аминокислоты с разветвлённым, но не циклическим ароматическим (в отличие от фенилаланина) радикалом. Такие же изменения для позиции 8 обнаружены и у последовательностей экземпляров рода *Jordanita*. Согласно данным Betts и Russell (2003) такие замены не приводят к существенным изменениям в структуре белковой молекулы, так как и изолейцин, и валин являются мало реакционноспособными, локализуются в гидрофобной сердцевине белка, при этом обе эти молекулы, имея метильный радикал при  $\beta$  углеродном атоме характеризуются одинаковой объёмностью боковой цепи. Следовательно, такие изменения не оказывают существенного влияния на функционирование белка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые расшифрованы и депонированы в международную базу данных Генбанка 1023 нуклеотидные последовательности для 242 включенных в исследование видов семейства *Zygaenidae*. Для 33 родов расшифрованы последовательности шести ядерных генов EF-1 $\alpha$ , GAPDH, IDH, MDH, RpS5, wingless. Проанализирован качественный и количественный состав полученных последовательностей, в случае COI – соответствующих аминокислотных последовательностей. В работе также рассмотрены возможные последствия аминокислотных замен, детектированных в участке белка COI, на функционирование митохондриальной цепи переноса электронов, и соответственно обеспечение организма энергией. Проведён

интегративный анализ литературных данных, результатов собственных исследований, а также информации из открытых международных баз данных. Для групп видов подсемейства Procridinae подтверждена существующая на сегодняшний момент филогенетическая гипотеза о тесных взаимоотношениях между родами *Zygaenoprocris*, *Adscita* и *Jordanita* и их филогенетической удаленности от родов *Theresimima* и *Rhagades*. Выявлены факторы, влияющие на эффективность использования ДНК-штрихкодов для делимитации видов семейства Zygaenidae. Проиллюстрирован вклад молекулярно-генетических данных в описание новых видов изучаемого семейства. Выявлены группы видов Zygaenidae, которые показали глубокую внутривидовую дивергенцию последовательностей COI, а также перекрывание ДНК-штрихкодов внутри морфологически чётко разделяемых видов Zygaenidae. Для таких групп были использованы данные секвенирования ядерных генов, которые позволили разграничить виды.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые установлены средние значения K2P дистанции для участка гена COI у 242 исследуемых видов 61 рода семейства Zygaenidae: внутривидовая – 1,36 %, межвидовая (в рамках одного рода) – 7,44 %, межродовая (в рамках семейства) – 13,91 %. Выявлено, что для 170 видов Zygaenidae (70 % случаев) ДНК-штрихкоды однозначно позволяют провести дифференцировку видов. В подсемействе Procridinae для 28 видов (15 %) показана глубокая внутривидовая дивергенция последовательностей. В 20 % случаев, 47 видов, отмечено перекрывание ДНК-штрихкодов, несмотря на значительные морфологические и биологические различия.

2. Показана эффективность ДНК-штрихкода для установления родового статуса таксонов *Hedina* и *Zama*, видового статуса *Zygaenoprocris khorassana*; описания новых видов Zygaenidae: *Adscita (Adscita) dujardini*, *Adscita (Procriterna) pligori*, *Illiberis (Alterasvenia) banmauka*, *Illiberis (Alterasvenia) cernyi*, *Illiberis (Alterasvenia) kislovskiyi*.

3. Установлено, что последовательности ядерных генов (EF-1 $\alpha$ , GAPDH, IDH, MDH, RpS5, wingless) позволяют проводить видовую делимитацию в семействе Zygaenidae в случаях, когда ДНК-штрихкод неинформативен (группы видов подрода *Jordanita* рода *Jordanita*).

4. Выявлены отличия в аминокислотных последовательностях участка COI, соответствующих ДНК-штрихкоду, на уровне подвидов, видов, подродов и родов изучаемого семейства: *Illiberis*, *Hedina*, *Rhagades*, *Zygaenoprocris*, *Adscita*, *Jordanita* и *Zygaena*. Показана различная степень гетерогенности участка белка COI, превышающая значения, известные для Lepidoptera. В важной для функционирования молекулы

цитохромоксидазы аминокислотной позиции № 8 в родах *Zygaenoprocris*, *Jordanita* и *Zygaena* выявлена замена валин/изолейцин, которая не оказывает существенного влияния на функционирование белка в силу схожести аминокислотных радикалов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ

1. Ефетов, К. А. Изучение нуклеотидных последовательностей гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы и решение некоторых вопросов биосистематики Zygaenidae (Lepidoptera) / К. А. Ефетов, А. В. Кирсанова, **З. С. Лазарева**, Е. В. Паршкова, Г. М. Тарман // Таврический медико-биологический вестник. – 2016. – Т. 19. – № 1. – С. 75–78. (ВАК, ИФ РИНЦ 0,218).

2. Ефетов, К. А. Вариабельность аминокислотных последовательностей первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы, кодируемых 658bp-участком гена COI, у видов рода *Zygaena* Fabricius, 1775 / К. А. Ефетов, **З. С. Лазарева**, Е. В. Паршкова, Г. М. Тарман // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2017. – Т. 7. – № 4. – С. 29–34. (ВАК, ИФ РИНЦ 0,16).

3. Ефетов, К. А. Изучение ДНК-штрихкодов у видов подрода *Jordanita* рода *Jordanita* Verity, 1946 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) / К. А. Ефетов, **З. С. Лазарева**, Е. В. Паршкова // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2019. – Т. 5 (71). – № 4. – С. 69–78. (ВАК, ИФ РИНЦ 0,186).

4. Efetov, K. A. DNA barcoding of Zygaenidae (Lepidoptera): results and perspectives / K. A. Efetov, A. V. Kirsanova, **Z. S. Lazareva**, E. V. Parshkova, G. M. Tarmann, R. Rougerie, P. D. N. Hebert // Nota Lepidopterologica. – 2019. – V. 42. – № 2. – P. 137–150. (WoS, SCOPUS, IF 0,794, Q3).

5. Ефетов, К. А. Молекулярно-генетические характеристики видов рода *Jordanita* Verity, 1946 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae): ДНК-штрихкоды и соответствующие им аминокислотные последовательности / К. А. Ефетов, **З. С. Лазарева**, Е. В. Паршкова, Г. М. Тарман // Генетика. – 2021. – Т. 57. – № 1. – С. 72–81. (WoS, SCOPUS, IF 0,581, Q4).

### Публикации в научных журналах, материалах и сборниках международных, всероссийских и региональных конференций, симпозиумов, конгрессов

6. Ефетов, К. А. Филогенетический сигнал в гене митохондриальной цитохромоксидазы у представителей семейства Zygaenidae / К. А. Ефетов, А. В. Кирсанова, **З. С. Лазарева**, Е. В. Паршкова // Український біохімічний журнал

(Матеріали X Українського біохімічного з'їзду. Одеса, вересень 2010). – 2010. – Т. 82.– № 4 (додаток 1). – С. 25–26.

7. Efetov, K. A. Early results in DNA barcoding of Zygaenidae (Lepidoptera) / K. A. Efetov, A. V. Kirsanova, **Z. S. Lazareva**, E. V. Parshkova, G. M. Tarmann, R. Rougerie & P. D. N. Hebert // XII International Symposium on Zygaenidae (Hatay, May 2010). – Hatay, 2010. – P. 7–8.

8. Efetov, K. A. Zygaenidae taxonomy and a DNA study: status quo / K. A. Efetov, A. V. Kirsanova, **Z. S. Lazareva**, E. V. Parshkova, G. M. Tarmann, R. Rougerie & P. D. N. Hebert // 17th European Congress of Lepidopterology (Luxembourg, May 2011). – Luxembourg, 2011. – P. 50.

9. Efetov, K. A. Variations in sequences of the 658-bp region of the COI mitochondrial gene and their importance for the investigation of the Zygaenidae (Lepidoptera) / K. A. Efetov, A. V. Kirsanova, **Z. S. Lazareva**, E. V. Parshkova, G. M. Tarmann, R. Rougerie & P. D. N. Hebert // XIII International Symposium on Zygaenidae (Innsbruck, September 2012). – Innsbruck, 2012. – P. 11–12.

10. Efetov, K. A. DNA barcoding as an efficient tool for the Zygaenidae study / K. A. Efetov, A. V. Kirsanova, **Z. S. Lazareva**, E. V. Parshkova, G. M. Tarmann, R. Rougerie & P. D. N. Hebert // XVIII European Congress of Lepidopterology (Blagoevgrad, July – August 2013). – Sofia, 2013. – P. 35–36.

11. Efetov, K. A. The primary structure of the mitochondrial cytochrome oxidase first subunit fragment: amino acids variability in species of the genus *Zygaena* Fabricius, 1775 (Zygaenidae, Zygaeninae) / K. A. Efetov, **Z. S. Lazareva**, E. V. Parshkova, G. M. Tarmann // XV International Symposium on Zygaenidae (Mals, 11–18 September 2016). – Mals, 2016. – P. 16–17.

12. Efetov, K. A. A role of the mitochondrial COI gene study in Zygaenidae biosystematics and new species descriptions / K. A. Efetov, A. V. Kirsanova, **Z. S. Lazareva**, E. V. Parshkova, G. M. Tarmann // XV International Symposium on Zygaenidae (Mals, 11–18 September 2016). – Mals, 2016. – P. 10–11.

13. **Лазарева З. С.** Вариабельность аминокислотной последовательности первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы у представителей рода *Zygaena* / **З. С. Лазарева**, В. В. Белоус // Сборник тезисов участников 89-й Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, 20 апреля 2017). – Симферополь, 2017. – С. 59.

14. **Лазарева З. С.** Изучение митохондриальных и ядерных генов у видов рода *Jordanita* Verity, 1946 / **З. С. Лазарева**, П. С. Коновалова // Сборник тезисов участников 90-й Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых

«Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, 19 апреля 2018). – Симферополь, 2018. – С. 62.

15. Efetov, K. A. New results of DNA study of the Zygaenidae / K. A. Efetov, J. Rota, **Z. S. Lazareva**, E. V. Parshkova, G. M. Tarmann // Abstracts of the XVI. International Symposium on Zygaenidae (İzmir, Turkey, 1–5 May 2018). – İzmir, 2018. – P. 24.

16. Ефетов К. А. Секвенирование гена митохондриальной цитохромоксидазы у Zygaenidae / К. А. Ефетов, **З. С. Лазарева** // Сборник тезисов участников IV научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых «Дни науки КФУ им. В. И. Вернадского» (Симферополь, 10–12 октября 2018). – Симферополь, 2018. – Т. 1. – С. 42–43.

17. Ефетов К. А. Молекулярно-генетический и цитогенетический анализ видов рода *Rhagades* Wallengren, 1863 (Lepidoptera, Zygaenidae) / К. А. Ефетов, **З. С. Лазарева** // Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019) – Ростов-на-Дону – Таганрог, 2019. – С. 219–220.

18. Ефетов К. А. Молекулярно-генетические и цитогенетические исследования рода *Jordanita* Verity, 1946 (Lepidoptera, Zygaenidae) / К. А. Ефетов, **З. С. Лазарева**, Е. В. Паршкова // II объединенный научный форум. VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX российский симпозиум «Белки и пептиды». Научные труды. (Сочи – Дагомыс, 01–06 октября 2019). Том 2. – М.: Издательство «Перо», 2019. – С. 21.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BIN (ИШ) – Индекс штрихкода

BOLD – виртуальный портал «The Barcode of Life Data Systems»

COI – I субъединица митохондриального белка цитохромоксидазы

EF-1 $\alpha$  – Фактор элонгации 1-альфа

GAPDH – глицеральдегид -3-фосфатдегидрогеназа

GC % – содержание гуанина и цитозина в изучаемых последовательностях в процентах

IDH – изоцитратдегидрогеназа

MDH – малатдегидрогеназа

NJ – метод ближайшего связывания

RpS5 – рибосомный белок S5

S – энтропия

ZYGMO – проект «DNA barcoding of Zygaenidae moths»

K2P – двухпараметрическая модель Кимуры

TAЕ – трис-ацетатный ЭДТА буфер