

## Kod kreskowy DNA – praktyczne narzędzie taksonomii i inwentaryzacji entomofauny

DNA barcoding: A practical tool for taxonomy and species identification of entomofauna

Iwona Szyp-Borowska<sup>1\*</sup> , Katarzyna Sikora<sup>2</sup> 

Instytut Badawczy Leśnictwa, <sup>1</sup>Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych, <sup>2</sup>Zakład Ochrony Lasu; Sękocin Stary,  
ul. Braci Leśnej 3, 05–090 Raszyn

\*Tel. +48 22 7150481, e-mail: I.Szyp@ibles.waw.pl

**Abstract.** DNA barcoding is an innovative system designed to provide rapid, accurate, and automatable species identification by using short, standardized gene regions as internal species codes. The mitochondrial cytochrome C oxidase I (COI) gene was proposed by Paul Hebert as an official marker for animals, because of its small intraspecific but large interspecific variation. Since the launch of the project Barcode of Life, this simple technique has caught the interest of taxonomists, ecologists and plant-quarantine officers charged with the control of pests and invasive species.

The great diversity of insects and their importance have made this group a major target for DNA barcoding. In most cases, the identification of insect species by traditional methods based on morphological features requires specialist knowledge and is labor-intensive. DNA barcoding aims at meeting the challenge of monitoring and documenting the biodiversity of insects. The utility of DNA barcoding for identifying small insects, cryptic taxa or rare species, as well as many species of forest entomofauna that are impossible to discriminate morphologically throughout all of their life stages, is a subject discussed in this review.

Due to its usefulness, also in Poland in the Forestry Research Institute, a method for identifying selected species of saproxylic beetles based on the sequence of the COI region was developed. In the future, this method will be used to assess the state of biodiversity and the naturalness of forest ecosystems. Therefore, this and other future implications of this promising new technique are also discussed here.

**Keywords:** DNA barcodes, entomofauna, species identification, taxonomy

**Słowa kluczowe:** kod kreskowy DNA, entomofauna, taksonomia, identyfikacja gatunkowa

### 1. Wstęp

Owady stanowią najbardziej zróżnicowaną grupę zwierząt, z opisanym ponad milionem gatunków i kolejnym milionem oczekujących na opis lub po prostu nieodkrytych (Grimaldi, Engel 2005). W zdobywaniu użytecznej wiedzy o jakiegokolwiek grupie organizmów podstawowym wymogiem jest zdolność opisywania, klasyfikowania, a następnie identyfikowania poszczególnych taksonów tej grupy. Identyfikacja licznych gatunków owadów metodami tradycyjnymi, opartymi na cechach morfologicznych, wymaga specjalistycznej wiedzy i jest czasochłonna. Co więcej, diagnostyka ta opiera się często na różnicach morfologicznych postaci dorosłych owadów, co stwarza poważne ograniczenia w identyfikacji okazów w fazach młodocianych (Balakrishnan 2005). W wielu przypadkach, ze względu na brak cech diagnostycznych lub

dużą zmienność tych cech, metoda kodu kreskowego DNA stwarza możliwość szybkiej i precyzyjnej identyfikacji organizmów (Hebert et al. 2003, 2004). Wykorzystanie sekwencji DNA do uzyskania informacji na temat podobieństwa taksonomicznego nieznanego okazu polega na sekwencjonowaniu krótkiego fragmentu mitochondrialnej sekwencji kodującej podjednostkę I genu oksydazy cytochromowej (cox1 CO1) i na porównaniu z biblioteką referencyjną kodów kreskowych znanych gatunków. Metoda ta jest skuteczna, zwłaszcza w identyfikacji owadów o małych rozmiarach, kryptycznych (Burns et al. 2008, Huemer et al. 2014) lub gatunków rzadkich, (Hebert et al. 2004; Sinclair, Gresens 2008; Sweeney et al. 2011; Anderson et al. 2013, Jackson et al. 2014) oraz prób łączących różne stadia rozwojowe owadów (Carew et al. 2005; Ekrem et al. 2007, 2010; Zhou et al. 2007, 2009; Stur, Ekrem 2011; Webb et al. 2012).

Wpłynięcie: 12.06.2019 r., recenzowano: 30.07.2019 r., zaakceptowano: 9.09.2019 r.

## 2. Identyfikacja taksonomiczna owadów

Rozwój filogenetyki molekularnej zrewolucjonizował taksonomię. Liczne prace badawcze pokazują, w jaki sposób analiza mitochondrialnego locus COI może zakwestionować dotychczasowe granice taksonomiczne. Dla chrząszczy z rodziny jelonkowatych barkoding DNA potwierdził różnice pomiędzy kilkoma gatunkami *Lucanus* i podgatunkami *L. cervus* L. (Cox et al. 2013). Podobnie na podstawie analizy COI udało się rozgraniczyć gatunki w dwóch grupach chrząszczy z rodziny Hydrophilidae i Scarabaeidae (Monaghan et al. 2005). Jordal i Kambestad (2014) na podstawie analiz mtDNA dokonali rewizji taksonomicznej dwóch gatunków korników *Pityophthorus micrographus* L. i *P. pityographus* Ratz. Kody kreskowe DNA zostały użyte także do identyfikacji motyli tropikalnych z rodzaju *Perichares* (Lepidoptera, Hesperidae). Od czasu ich pierwszego opisanie w 1775 roku, często do grupy tej zaliczano okazy, które tylko powierzchownie pasowały do opisanych gatunków. Po analizie mtDNA okazało się, że niektóre gatunki są błędnie przypisane, a wiele z nich należy do kompleksu złożonego z gatunków kryptycznych (Burns et al. 2008). Prawidłowe przypisanie okazów do gatunku, zwłaszcza w przypadku gatunków kryptycznych, ma ważne następstwa dla badań taksonomicznych, ewolucyjnych i bioróżnorodności, a ich obecność pośród szkodników ma również konsekwencje ekonomiczne.

Analiza kodu kreskowego DNA pozwala także usunąć niejednoznaczności w określeniu gatunku, wynikające z różnic morfologicznych między przedstawicielami różnych kast w przypadku owadów społecznych, takich jak mrówki (Smith et al. 2008), czy różnic w morfologii samców i samic gatunków o dużym dymorfizmie płciowym (Janzen 2005). Analiza mtDNA jest ważnym narzędziem w inwentaryzacji przyrodniczej i ochronie bioróżnorodności, ułatwiając zarówno identyfikację okazów dziś żyjących, jak i opisanie taksonów ze zbiorów muzealnych, a co najważniejsze, pozwala na łączenie tych próbek w celu odtworzenia historii gatunków. Projekt inwentaryzacji motyli z rodziny miernikowcowatych (Geometridae) na Kostaryce demonstruje możliwość wykorzystania kodów kreskowych DNA do opisanie nowych gatunków (Chacon et al. 2012). Gąsienice pięciu gatunków motyli – *Opsiphanes quiteria* Stoll, *O. tamarindi* Felder, *O. bogotanus* Dist., *O. invirae* Hübner i *O. fabricii* Boisduval – należą do bardzo często spotykanych. Szósty gatunek, należący do rodzaju *Opsiphanes*, którego dorosłe samce są bardzo podobne do okazów męskich pospolitego *O. fabricii*, oznaczono jako *O. cassina fabricii* (DeVries 1987; Bristow 1991). Analiza kodu kreskowego DNA tych gatunków wykazała, że *O. cassina fabricii* jest gatunkiem nowym dla Kostaryki, który przez swoje morfologiczne podobieństwo do gatunków powszechnie występujących, był dotychczas pomijany.

Skuteczność metody sekwencjonowania DNA w wybranym, standardowym regionie genomu do rozróżniania gatunków (Hebert et al. 2003, 2004) zainicjowała międzynarodowe programy badawcze, których efektem są biblioteki

kodów kreskowych dostępne w międzynarodowych bazach danych GenBank (Clark et al. 2016) i systemie BOLD (Barcode of Life Datasystems) (Ratnasingham, Hebert 2007). W ciągu pierwszych lat działalności zebrano 430 000 kodów kreskowych owadów reprezentujących około 50 000 gatunków (30% wszystkich znanych gatunków) (Silva-Brandão et al. 2009; International Barcode of Life 2010b). Największy zestaw danych do kodów kreskowych DNA dla owadów wodnych dostarczył Webb (2012). Zebrał on 4165 sekwencji z regionu mitochondrialnego genu podjednostki COI, reprezentujących 354 gatunki jętek (Ephemeroptera) z Kanady, Meksyku i Stanów Zjednoczonych. Pozwoliło to na skorygowanie wcześniej błędnie zidentyfikowanych gatunków i pogłębienie wiedzy na temat poziomów zmienności locus COI, zarówno w obrębie gatunku, jak i między gatunkami. Dzięki projektowi wykorzystującemu barkoding DNA do przygotowania genetycznych i morfologicznych kluczy do oznaczania gatunków muchówek z plemienia Tanytarsini na Spitsbergenie i Wyspie Niedźwiedziej (Stur, Ekrem 2011) stworzono biblioteki kodów kreskowych DNA dla wszystkich gatunków arktycznych. Tanytarsini stanowią dużą i zróżnicowaną grupę wodnych muchówek należącą do rodziny ochotkowatych (Chironomidae). Opracowane klucze umożliwiają identyfikację larw, poczwerek i okazów po ostatecznym przeobrażeniu gatunków Tanytarsini znalezionych na Svalbardzie.

## 3. Ochrona gatunków zagrożonych

W kontekście ochrony gatunków zagrożonych warto wspomnieć, że metoda kodów kreskowych DNA ma dodatkową zaletę, pozwalając na wykorzystywanie w badaniach jedynie małych fragmentów anatomicznych zamiast całych osobników (Svensson et al. 2009). Eliminuje to potrzebę pozyskiwania całych okazów, co ma szczególnie duże znaczenie w przypadku małych populacji. Sztandarowym taksonem mającym znaczenie dla ochrony bezkręgowców w Europie jest rodzaj *Osmoderma* (pachnica), obejmujący kompleks czterech gatunków, w tym *Osmoderma barnabita* Motsch. – ściśle związany ze starymi, dziuplastymi drzewami, który był intensywnie badany przez Landvik (2017). W powyższym opracowaniu autorzy koncentrują się na wyjaśnieniu struktury filogeograficznej wschodnioeuropejskiej populacji *O. barnabita*, bazując na okazach z terenu Łotwy i Finlandii oraz na wcześniej opublikowanych sekwencjach i okazach muzealnych. Analiza sekwencji mitochondrialnego genu COI pozwoliła na identyfikację 26 blisko spokrewnionych haplotypów, których różnorodność zmniejsza się z południa na północ. Obserwowana dystrybucja *O. barnabita* wskazała także na niedawną ekspansję tego gatunku w Europie Wschodniej. Wiedza ta ma ogromny wpływ na ochronę i kontrolę gatunku, który zarówno w Polsce, jak i we wszystkich innych państwach, podlega ochronie prawnej. Problem identyfikacji gatunków rzadkich i zagrożonych dotyczy także chrząszczy z rodziny jelonkowatych (Lucanidae). Opisano ponad 90 gatunków rodzaju *Lucanus*, jednak w wielu przy-

padkach zasadność wyodrębniania taksonów jest wątpliwa. Dymorfizm płciowy i zmienność rozmiarów ciała oraz brak diagnostycznych cech fenotypowych u larw dodatkowo komplikują systematykę Lucanidae. Ich klasyfikacja zmienia się i jest przedmiotem dyskusji. Ostatnie badania (Cox et al. 2013) opisują siedem gatunków *Lucanus* w zachodniej Palearktyce: *Lucanus cervus* L., *L. ibericus* Motsch., *L. orientalis* Kraatz, *L. tetraodon* Thunberg, *Lucanus (Pseudolucanus) barbarossa* Fab., *L. (P.) busignyi* Planet i *L. (P.) macrophyllus* Kraatz i niektóre z nich uznaje się za zagrożone. Trudno ustalić konkretne priorytety w zakresie ochrony bez prawidłowej identyfikacji, dlatego do rozpoznawania gatunków i podgatunków *Lucanus* posłużyła analiza końca 3' genu COI (Cox et al. 2013). Zsekwencjonowany fragment COI pozwolił rozróżnić kilka badanych gatunków *Lucanus* i rzekomych podgatunków *L. cervus*.

#### 4. Kontrola występowania szkodników drzew leśnych

W czasach wzmożonego handlu drewnem i produktami pochodzenia drzewnego wzrasta ryzyko przypadkowego zawleczenia obcych gatunków owadów. Szybka i prawidłowa identyfikacja ma kluczowe znaczenie dla wykrywania obcych gatunków inwazyjnych, które mogą wykazywać wyższą patogenność na obszarach poza ich zasięgiem. Sekwencjonowanie mtDNA regionu genu oksydazy cytochromowej I (COI) pozwoliło na utworzenie biblioteki kodów kreskowych DNA europejskich chrząszczy, wśród nich: *Ips typographus* (L.), *Plagionotus detritus* (L.), *Rhagium inquisitor* (L.), *R. mordax* (De Geer), *Saperda scalaris* (L.), *Xylotrechus rusticus* (L.), *Peltis grossa* (L.), *Protaetia* sp. Podobne projekty prowadzono w Finlandii (Pentinsaari et al. 2014) oraz w Niemczech (Hendrich et al. 2015), prezentując kody kreskowe DNA dla 4330 gatunków z Europy Północnej i Środkowej. Podobnie powstała pierwsza biblioteka referencyjna DNA dla około 100 gatunków z rodzaju *Agrilus* z półkuli północnej na podstawie trzech markerów mitochondrialnych: *cox1-5'* (fragment kodu kreskowego DNA), *cox1-3'* i *rrnL*. Wszystkie dane dostępne są w formacie bazy danych kodów kreskowych, w tym przykładowe obrazy i dane geograficzne ([dx.doi.org/10.5883/DS-AGRILUS1](https://dx.doi.org/10.5883/DS-AGRILUS1)), co stanowi jak dotąd największy zbiór danych do identyfikacji gatunków z tego rodzaju. Wszystkie, spośród ponad 3000 gatunków z rodzaju *Agrilus*, odżywiają się częściami roślin, powodując poważne uszkodzenia drzew. Szybka ich identyfikacja to pierwszy krok do stworzenia kolejnych środków ochronnych. Badania molekularne mogą więc być skutecznym narzędziem do zwalczania szkodników o globalnym zasięgu. 151 gatunków chrząszczy, szkodników występujących w Europie i Ameryce Północnej, zostało zidentyfikowanych za pomocą kodów kreskowych DNA, w tym *Ips acuminatus* (Gyll.) i *I. typographus* (Jordal, Kamberstad 2014). Analiza kodu kreskowego DNA może więc służyć nie tylko jako nowe narzędzie taksonomiczne, ale również jako standardowy system szybkiej identyfikacji i monitoringu.

Rodzaj *Xylotrechus* (Coleoptera: Cerambycidae), reprezentowany w Grecji przez cztery gatunki, w 2014 roku był przyczyną szkód na plantacjach drzew oliwnych. Szkodniki *Xylotrechus stebbingi* Gahan i *X. rusticus* (L.) zidentyfikowano na podstawie cech morfologicznych w połączeniu z analizą kodu kreskowego DNA (Levidara et al. 2018).

Zapobieganie wprowadzaniu inwazyjnych gatunków obcych do ekosystemów leśnych jest celem o wysokim priorytecie dla krajów o rozległych zasobach leśnych. Badania kodów kreskowych DNA, w obrębie rodziny Erebidae (Lepidoptera), ujawniły wewnątrzgatunkowe rozbieżności pomiędzy *Lymantria dispar* (L.), *L. mathura* Moore i *L. sinica* Moore (Stewart et al. 2016). Aby pomóc w identyfikacji tych owadów opracowano zestaw testów TaqMan®, które mogą identyfikować wszystkie trzy podgatunki *L. dispar* oraz pięć dodatkowych gatunków *Lymantria* stanowiących zagrożenie dla lasów w Ameryce Północnej. Zestaw testów stanowi "klucz molekularny" (analogiczny do klucza taksonomicznego) i obejmuje kilka równoległych pojedynczych i multipleksowych reakcji qPCR. Każda reakcja wykorzystuje kombinację starterów i sond zaprojektowanych do oddzielania taksonów, umożliwia szybką i dokładną ich identyfikację. Analiza danych molekularnych może szybko identyfikować nieznaną próbkę, w tym stadia młodociane owadów. Kolejne badania potwierdzają wysoki potencjał kodów kreskowych COI do identyfikacji larw chrząszczy z rodziny zgniotkowatych i kózkowatych: *Cucujus cinnaberrinus* (Scop.), *Rhagium mordax* i *R. inquisitor* (Ziganshina et al. 2018). W badaniach z wykorzystaniem kodu kreskowego DNA możliwość identyfikacji gatunków rzadkich i leśnych szkodników dotyczy także okazów w różnych stadiach rozwoju. Wu i in. (2017) zastosowali zintegrowane podejście, które nie było wcześniej stosowane, a pozwala na krzyżową weryfikację wyników przez jednoczesną hodowlę larw do stadium dorosłego. Kody kreskowe DNA wygenerowane w tych badaniach uzupełniają dane na wypadek nieumyślnie przetransportowanych szkodników, takich jak *Saperda* sp. i *Xylotrechus* sp.

#### 5. Kontrowersje dotyczące użyteczności kodów kreskowych DNA

Kod kreskowy DNA ma wiele zalet, które pozwalają na szybką identyfikację dużej liczby próbek, nawet przez osoby niebędące ekspertami. Istnieją jednak pewne kontrowersje dotyczące wykorzystywania kodów kreskowych DNA w systemie klasyfikacji organizmów, zarówno na etapie identyfikacji okazów, jak i odkrywania nowych gatunków (Meier 2008). Przypisanie nazw taksonomicznych nieznanym okazom dokonuje się przy użyciu bibliotek referencyjnych DNA i zależy od liczby przedstawicieli każdego gatunku, zawartych w bazie danych. Proces ten może być obarczony błędem, gdy próbki zawarte w bibliotece zostały nieprawidłowo opisane lub nie odzwierciedlają ogólnego zróżnicowania genetycznego gatunku. Najważniejszym czynnikiem decydującym o dokładności identyfikacji gatunków jest więc zasob-

ność dostępnych bibliotek kodów kreskowych (Ekrem et al. 2007). W rzeczywistości większość błędów w identyfikacji wynika z braku danych referencyjnych (Virgilio et al. 2010). Identyfikacja nowych gatunków, dzięki kodom kreskowym DNA, wymaga dużej dokładności i przestaje być efektywna na skutek dużego zróżnicowania genetycznego wewnątrz danego gatunku (Davis, Nixon 1992; DeSalle et al. 2005). Na wyniki identyfikacji może negatywnie wpłynąć zjawisko heteroplazmii (Song et al. 2008), czyli współistnienia kilku haplotypów mitochondrialnych u jednego osobnika, zgłaszane w przypadku wielu owadów (Gellissen, Michaelis 1987; Bensasson et al. 2000; Brower 2006; Rubinoff et al. 2006; Magnacca, Brown 2010a, b). Szacuje się, że jedna czwarta taksonów opisanych zwierząt nie jest monofiletyczna (Funk, Omland 2003), co także może być źródłem błędów w analizach. Różne gatunki mogą wydawać się także polifiletyczne lub parafiletyczne z powodu niepełnego sortowania linii mitochondrialnego DNA lub introgresji. Takie sytuacje są dość powszechne (np. Kaila, Ståhls 2006; Burns et al. 2010; Žurovcová et al. 2010). Problematiczny jest także dobór odpowiednich metod statystycznych oraz interpretacja wyników zmienności genetycznej między okazami. Opracowanie algorytmów do identyfikacji opartej na kodzie kreskowym DNA stanowi wciąż wyzwanie w dziedzinie bioinformatyki.

Pomimo tych kwestii, Collins i Cruickshank (2013) są optymistami co do przyszłości kodów kreskowych DNA, ponieważ zalety metody przewyższają jej wady. A sama identyfikacja oparta na kodzie kreskowym DNA może przebiegać dwuetapowo: początkowa identyfikacja za pomocą kodu kreskowego COI i szczegółowa identyfikacja z wykorzystaniem dodatkowych danych molekularnych i morfologicznych dla określonej grupy owadów.

## 6. Podsumowanie

Znaczenie badań różnorodności biologicznej w lasach wzrasta, czego przykładem jest prowadzona obecnie wielkoskalowa inwentaryzacja dużych kompleksów leśnych w wybranych nadleśnictwach oraz w Puszczy Białowieskiej. Wynika to z konieczności poznania liczby gatunków związanych z ekosystemami leśnymi, co jest kluczowe między innymi dla wyznaczenia obszarów cennych przyrodniczo, prowadzenia zrównoważonej gospodarki leśnej, określenia jej wpływu na bioróżnorodność oraz poznania przyczyn zmian zasięgów, w tym ekspansji lub zaniku pewnych gatunków. Jak dotąd przeważającą część badań inwentaryzacyjnych prowadzono tradycyjnymi metodami, a więc na podstawie identyfikacji taksonomicznej cech morfologicznych, rzadziej anatomicznych. W badaniach często napotymano trudności z: identyfikacją, brakiem specjalistów, objęciem badaniami większych obszarów leśnych, wysokimi kosztami realizacji. Z pomocą mogą tutaj przyjść techniki analiz molekularnych. Niekiedy jest to jedyna metoda mogąca dać jednoznaczny wynik, np. dla rozróżnienia gatunków kryptycznych (bliźniaczych) czy form trudnych do identyfikacji, takich jak np. larwy. Techniki molekularne są również niezastąpione w przypadku,

zw. prób trudnych, jak np. fragmentów ciał owadów pozostałych w próchnie, na podstawie których określenie gatunku macierzystego w sposób tradycyjny jest często niemożliwe. Technika kodu kreskowego DNA jest obecnie powszechną praktyką w celu wsparcia identyfikacji i klasyfikacji żywych organizmów (Hebert et al. 2003), ponieważ kod ten jest taki sam na każdym etapie cyklu życia określonego organizmu dla obu płci. Sekwencje kodów kreskowych, przesłane do baz danych, są łatwo dostępne, a kolejne analizy mogą być powtórzone przez każdego. Bazy danych mają jednak wiele luk wśród taksonów. Intensywnie badane grupy i organizmy modelowe mają zgromadzonych wiele sekwencji lub nawet całe dostępne genomy, ale zdecydowana większość gatunków nie ma żadnych danych dotyczących sekwencji i czeka na opisanie (Sanderson et al. 2003).

## Konflikt interesów

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów.

## Źródło finansowania badań

Badania sfinansowano z funduszu leśnego Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasy Państwowe – DGLP 500-449.

## Literatura

- Anderson A.M., Stur E., Ekrem T. 2013. Molecular and morphological methods reveal cryptic diversity and three new species of Nearctic *Micropsectra* (Diptera: Chironomidae). *Freshwater Science* 32: 892–921. DOI 10.1899/12-026.1.
- Balakrishnan R. 2005. Species concepts, species boundaries and species identification: a view from the Tropics. *Systematic Biology* 54: 689–693. DOI 10.1093/nar/gki023.
- Bensasson D., Zhang D.X., Hewitt G.M. 2000. Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17: 406–415. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026320.
- Bristow C.R. 1991. A revision of the brassoline genus *Opsiphanes* (Lepidoptera: Rhopalocera). *Zoological Journal of the Linnean Society* 101: 203–293. DOI 10.1111/j.1096-3642.1991.tb00282.
- Brower A.V.Z. 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: “ten species” of *Astrartes fulgurator* reassessed (Lepidoptera: Hesperidae). *Systematics and Biodiversity* 4: 127–132. DOI 10.1017/S147720000500191X.
- Burns J.M., Janzen D.H., Hajibabaei M., Hallwachs W., Hebert P.D.N. 2008. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 6350–6355. DOI 10.1073/pnas.0712181105.
- Burns J.M., Janzen D.H., Hajibabaei M., Hallwachs W., Hebert P.D.N. 2007. DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperidae) can differ by only one to three nucleotides. *Journal of the Lepidopterists Society* 61: 138–153.
- Carew M.E., Pettigrove V., Hoffmann A.A. 2005. The utility of DNA markers in classical taxonomy: using cytochrome oxidase I mar-

- kers to differentiate Australian *Cladopelma* (Diptera: Chironomidae) midges. *Annals of the Entomological Society of America* 98: 587–594. DOI 10.1603/0013-8746(2005)098[0587:TUODMI]2.0.CO;2.
- Chacon I.A., Montero-Ramirez J., Janzen D.H., Hallwachs W., Blandin P., Bristow C.R., Hajibabaei M. 2012. A new species of *Opsiphanes* Doubleday, (1849) from Costa Rica (Nymphalidae: Morphinae: Brassolini), as revealed by its DNA barcodes and habitus. *Bulletin of the Allyn Museum* 166: 1–15. DOI 10.1139/gen-2016-0005.
- Clark K., Karsh J., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. 2016. GeneBank. *Nucleic Acids Resources* 4(44): 234–241. DOI 10.1093/nar/gkv1276.
- Collins R.A., Cruickshank R.H. 2013 The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 13: 969–975. DOI 10.1111/1755-0998.12046.
- Cox K., Thomaes A., Antonini G., Zilioli M., De Gelas K., Harvey D. Solano E. Audisio P. McKeown N., Shaw P., Minetti R., Bartolozzi L., Mergeay J. 2013. Testing the performance of a fragment of the COI gene to identify western Palaearctic stag beetle species (Coleoptera, Lucanidae). *ZooKeys* 365(365): 105–126. DOI 10.3897/zookeys.365.5526.
- Davis J.I., Nixon K.C. 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology* 41: 421–435. DOI 10.2307/2992584.
- De Salle R., Egan M.G., Siddall M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 360: 1905–1916. DOI 10.1098/rstb.2005.1722.
- DeVries P.J. 1987. Butterflies of Costa Rica and Their Natural History: Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae. Princeton University Press, 327 s. ISBN 0691024030.
- Ekrem T., Stur E., Hebert P.D.N. 2010. Females do count: documenting Chironomidae (Diptera) species diversity using DNA barcoding. *Organisms Diversity & Evolution* 10: 397–408. DOI 10.1016/j.ympev.2010.06.006.
- Ekrem T., Willassen E., Stur E. 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 530–542. DOI 10.1016/j.ympev.2006.11.021.
- Funk D.J., Omland K.E. 2003. Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 397–423. DOI 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421.
- Gellissen G., Michaelis G. 1987. Gene-transfer – mitochondria to nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 503: 391–401. DOI 10.1111/j.1749-6632.1987.tb40625.x.
- Grimaldi D., Engel M.S. 2005. Evolution of the Insects. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN 0521821495.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313–321. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812–14817. DOI 10.1073/pnas.0406166101.
- Hendrich L., Moriniere J., Haszprunar G., Hebert P.D.N., Hausmann A., Kohler F. 2015. A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: adding more than 3500 identified species to BOLD. *Molecular Ecology Resources* 15(4): 795–818. DOI 10.1111/1755-0998.12354.
- Huemer P., Mutanen M., Sefc K.M., Hebert P.D.N. 2014. Testing DNA Barcode Performance in 1000 Species of European Lepidoptera: Large Geographic Distances Have Small Genetic Impacts. *PLoS One* 9(12): e115774. DOI 10.1371/journal.pone.0115774.
- Jackson J.K., Battle J.M., White B.P., Pilgrim E.M., Stein E.D., Miller P.E., Sweeney B.W. 2014. Cryptic biodiversity in streams: a comparison of macroinvertebrate communities based on morphological and DNA barcode identifications. *Freshwater Science* 33: 312–324. DOI 10.1086/675225.
- Janzen D.H., Hajibabaei M., Burns J.M., Hallwachs W., Remigio E., Hebert P.D.N. 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462): 1835–1846. DOI 10.1139/gen-2016-0005.
- Jordal B.H., Kambestad M. 2014. DNA barcoding of bark and ambrosia beetles reveals excessive NUMTs and consistent east-west divergence across Palearctic forests. *Molecular Ecology Resources* 14(1): 7–17. DOI 10.1111/1755-0998.12150.
- Kaila L., Ståhls G. 2006. DNA barcodes: evaluating the potential of COI to differentiate closely related species of *Elachista* (Lepidoptera: Gelechioidea: Elachistidae) from Australia. *Zootaxa* 1170: 1–26.
- Landvik M., Miraldo P., Niemelä U., Valainis R., Cibulskis T. 2017. Evidence for geographic substructuring of mtDNA variation in the East European Hermit beetle (*Osmoderma barbanita*). *Nature Conservation* 19: 171–189. DOI 10.3897/natureconservation.19.12877.
- Levidara E., Levidaras I., Vontas I., Artizis D.N. 2018. First record of *Xylotrechus chinensis* in Greece and in the EPPO region. *Bulletyn OEPP/EPPO*. DOI 10.1111/epp.12468.
- Magnacca K.N., Brown M.J.F. 2010a. Tissue segregation of mitochondrial haplotypes in heteroplasmic Hawaiian bees: implications for DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 10: 60–68. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02724.
- Magnacca K.N., Brown M.J.F. 2010b. Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (*Nesoprosopis*) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evolutionary Biology* 10: 174. DOI 10.1186/1471-2148-10-174.
- Monaghan M., Balke M., Gregory T., Vogler A. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1925–9. DOI 10.1076/aqin.24.4.247.8238.
- Pentinsaari M., Hebert P.D.N., Mutanen M. 2014. Barcoding beetles: a regional survey of 1872 species reveals high identification success and unusually deep interspecific divergences. *PLoS One* 9: e108651. DOI 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- Ratnasingham S., Hebert P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7(3): 355–364. DOI 10.1111/j.1755-0998.2011.03067.
- Rubioff D. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology* 20: 1026–1033.
- Sanderson M.J., Driskell A.C. 2003. The challenge of constructing large phylogenetic trees. *Trends in Plant Science* 8: 374–379. DOI 10.1007/978-3-540-27810-823.
- Sinclair C.S., Gresens S.E. 2008. Discrimination of *Cricotopus* species (Diptera: Chironomidae) by DNA barcoding. *Bulle-*

- tin of Entomological Research* 98: 555–563. DOI 10.1017/S0007485308005865.
- Smith J., Reijnen B., Stokvis F. 2008. Half of the European fruit fly species barcoded (Diptera, Tephritidae); a feasibility test for molecular identification. *ZooKeys* 365: 279–305. DOI 10.3897/zookeys.365.5819.
- Song H., Buhay J.E., Whiting M.F., Crandall K.A. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(13): 486–491. DOI 10.1073/pnas.0803076105.
- Stewart D., Zahiri R., Djoumad A., Freschi L., Lamarche J., Holden D., Cervantes S., Ojeda D., Potvin A., Nisole A., Béliveau C., Capron A., Kimoto T., Day B., Yueh H., Duff C., Levesque R.C., Hamelin R., Cusson M. 2016. A Multi-Species TaqMan PCR Assay for the Identification of Asian Gypsy Moths (*Lymantria* spp.) and Other Invasive Lymantriines of Biosecurity Concern to North America. *PLoS One* 11(8): e0160878. DOI 10.1371/journal.pone.0160878.
- Stur E., Ekrem T. 2011. Exploring unknown life stages of Arctic Tanytarsini (Diptera: Chironomidae) with DNA barcoding. *Zootaxa* 2743: 27–39. DOI 10.11646/zootaxa.2743.1.2.
- Svensson G.P., Oleksa A., Gawroński R., Lassance J.-M., Larsson M.C. 2009. Enantiomeric conservation of the male-produced sex pheromone facilitates monitoring of threatened European hermit beetles (*Osmoderma* sp.). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 133(3): 276–282. DOI 10.1007/s10841-012-9499-7.
- Sweeney B.W., Battle J.M., Jackson J.K., Dapkey T. 2011. Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? *Journal of the North American Benthological Society* 30: 195–216.
- Virgilio M., Bäckeljau T., Nevado B., Meyer M.D. 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics* 11: 206. DOI 10.1186/1471-2105-11-206.
- Webb J.M., Jacobus L.M., Funk D.H., Zhou X., Kondratieff B., Geraci C.J., Dewalt R.E., Baird D.J., Richard B., Phillips I. 2012. A DNA barcode library for North American Ephemeroptera: progress and prospects. *PLoS One* 7: e38063. DOI 10.1371/journal.pone.0038063.
- Wu Y., Trepanowski N.F., Molongoski J.J., Reagel P.F., Lingafelter S.V., Nadel H., Myers S.W., Ray A.M. 2017. Identification of woodboring beetles (Cerambycidae and Buprestidae) intercepted in trade associated solid wood packaging material using DNA barcoding and morphology. *Scientific Reports* 7: 40316–40321.
- Zhou X., Adamowicz S.J., Jacobus L.M., Dewalt R.E., Hebert P.D. 2009. Towards a comprehensive barcode library for arctic life – Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada. *Frontiers in Zoology* 6: 1–9. DOI 10.1186/1742-9994-6-30.
- Zhou X., Kjer K.M., Morse J.C. 2007. Associating larvae and adults of Chinese *Hydropsychidae caddisflies* (Insecta: Trichoptera) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society* 26: 719–742. DOI 10.11646/zoosymposia.14.1.21.
- Ziganshina E.E., Mohammed W.S., Shagimardanova E.I., Vankov P.Y., Gogoleva N.E., Ziganshin A.M. 2018. Fungal, Bacterial, and Archaeal Diversity in the Digestive Tract of Several Beetle Larvae (Coleoptera). *BioMed Research International*: 15 s. DOI 10.1155/2018/6765438.
- Meier R., Zhang G.Y., Ali F. 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. *Systematic Biology* 57: 809–813. DOI 10.1080/10635150802406343.
- Žurovcová M.A., Havelka J., Starý P., Vechtová P.A., Chundelová D.A. 2010. “DNA barcoding” is of limited value for identifying adelgids (Hemiptera: Adelgidae) but supports traditional morphological taxonomy. *European Journal of Entomology* 107: 147–156.

## Wkład autorów

I. Sz-B. – koncepcja, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu; K.S. – przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu, korekta

## DNA barcoding: A practical tool for the taxonomy and species identification of entomofauna

Iwona Szyp-Borowska<sup>1\*</sup> , Katarzyna Sikora<sup>2</sup> 

Forest Research Institute, <sup>1</sup>Department of Silviculture and Genetics of Forest Trees, <sup>2</sup>Department of Forest Protection; Sękocin Stary,  
ul. Braci Leśnej 3, 05–090 Raszyn, Poland

\*Tel. +48 22 7150481, e-mail: [I.Szyp@ibles.waw.pl](mailto:I.Szyp@ibles.waw.pl)

**Abstract.** DNA barcoding is an innovative system designed to provide rapid, accurate, and automatable species identification by using short, standardized gene regions as internal species codes. The mitochondrial cytochrome C oxidase I (COI) gene was proposed by Paul Hebert as an official marker for animals, because of its small intraspecific but large interspecific variation. Since the launch of the project Barcode of Life, this simple technique has caught the interest of taxonomists, ecologists and plant-quarantine officers charged with the control of pests and invasive species.

The great diversity of insects and their importance have made this group a major target for DNA barcoding. In most cases, the identification of insect species by traditional methods based on morphological features requires specialist knowledge and is labor-intensive. DNA barcoding aims at meeting the challenge of monitoring and documenting the biodiversity of insects. The utility of DNA barcoding for identifying small insects, cryptic taxa or rare species, as well as many species of forest entomofauna that are impossible to discriminate morphologically throughout all of their life stages, is a subject discussed in this review. Due to its usefulness, also in Poland in the Forestry Research Institute, a method for identifying selected species of saproxylic beetles based on the sequence of the COI region was developed. In the future, this method will be used to assess the state of biodiversity and the naturalness of forest ecosystems. Therefore, this and other future implications of this promising new technique are also discussed here.

**Keywords:** DNA barcodes, entomofauna, species identification, taxonomy

### 1. Introduction

Insects are the most diverse group of animals, with over a million species described and another million pending description or simply undiscovered (Grimaldi, Engel 2005). In acquiring useful knowledge about any group of organisms, the basic requirement is the ability to describe, classify and then identify individual taxa of this group. The identification of numerous insect species by traditional methods based on morphological features requires specialist knowledge and is time consuming. Moreover, this diagnosis is often based on the morphological differences of adult insect forms, which severely restricts the identification of specimens in juvenile phases (Balakrishnan 2005). In many cases, due to the lack of diagnostic features or the large variability of these

features, the DNA barcoding method provides the possibility of identifying organisms quickly and precisely (Hebert et al. 2003, 2004). The use of DNA sequences to obtain the information on the taxonomic similarities of an unknown specimen consists of sequencing a short fragment of the mitochondrial sequence encoding the subunit of the cytochrome oxidase I gene (cox1 CO1) and comparing this with the reference library of the barcodes of known species. This method is effective, especially in identifying small, cryptic insects (Burns et al. 2008; Huemer et al. 2014) or rare species (Hebert et al. 2004; Sinclair, Gresens 2008; Sweeney et al. 2011; Anderson et al. 2013; Jackson et al. 2014) and attempting to link different stages of insect development (Carew et al. 2005; Ekrem et al. 2007, 2010; Zhou et al. 2007, 2009; Stur, Ekrem 2011; Webb et al. 2012).

Received: 12.06.2019 r., accepted after revision: 9.09.2019 r.

## 2. The taxonomic identification of insects

The development of molecular phylogenetics has revolutionised taxonomy. Numerous research studies show how the analysis of the mitochondrial cytochrome C oxidase I (COI) locus can challenge existing taxonomic boundaries. For the stag beetle family, DNA barcoding confirmed the differences between several *Lucanus* species and *Lucanus cervus* L. subspecies (Cox et al. 2013). Similarly, COI analysis enabled the species of two groups of beetles from the Hydrophilidae and Scarabaeidae families to be distinguished (Monaghan et al. 2005). Based on mtDNA analyses, Jordal and Kambestad (2014) performed a taxonomic revision of two species of bark beetles, *Pityophthorus micrographus* L. and *Pityophthorus pityographus* Ratz. DNA barcodes have also been used to identify tropical butterflies of the genus *Perichares* (Lepidoptera, Hesperiiidae). Since their first description in 1775, this group often included specimens that only superficially matched the described species. After mtDNA analysis, it turned out that some species are incorrectly assigned, and many of them belong to a complex of cryptic species (Burns et al. 2008). The correct assignment of specimens to a species, especially in the case of cryptic species, has important implications for taxonomic, evolutionary and biodiversity studies, and their presence amongst pests also has economic consequences.

DNA barcode analysis also allows ambiguities to be removed in determining species, resulting from the morphological differences between representatives of different castes in the case of social insects, such as ants (Smith et al. 2008), or differences in the morphology of male and female species with high sexual dimorphism (Janzen 2005). mtDNA analysis is an important tool in nature inventorying and biodiversity protection, facilitating both the identification of specimens living today as well as the description of taxa from museum collections, and, most importantly, it allows these samples to be linked to reconstruct the history of species. The inventory project of the geometer moth family (Geometridae) in Costa Rica demonstrates the possibility of using DNA barcodes to describe new species (Chacon et al. 2012). Caterpillars of five butterfly species – *Opsiphanes quiteria* Stoll, *Opsiphanes tamarindi* Felder, *Opsiphanes bogotanus* Dist., *Opsiphanes invirae* Hübner and *Opsiphanes fabricii* Boisduval – are very often encountered. A sixth species in the genus *Opsiphanes*, whose adult males are very similar to male specimens of the common *O. fabricii*, were identified as *Opsiphanes cassina fabricii* (DeVries 1987; Bristow 1991). An analysis of the DNA barcode of these species showed that *O. cassina fabricii* is a new species for Costa Rica, which, due to its morphological similarity to the common species, was overlooked until now.

The effectiveness of the DNA sequencing method in a selected, standard region of the genome to distinguish species (Hebert et al. 2003, 2004) was initiated by international research programmes that resulted in the barcode libraries available in the international GenBank databases (Clark et al. 2016) and the BOLDSystems (Barcode of Life Data System) (Ratnasingham, Hebert 2007). In the first years of operation, 430,000 insect barcodes were collected, representing approximately 50,000 species (30% of all known species) (Silva-Brandão et al. 2009; International Barcode of Life 2010b). Webb (2012) provided the largest set of DNA barcode data for water insects. He collected 4,165 sequences from the mitochondrial region of the COI subunit gene, representing 354 species of mayflies (Ephemeroptera) from Canada, Mexico and the United States. This allowed previously misidentified species to be corrected and extended knowledge about the levels of variation of the COI locus, both within and between species. Thanks to a project using DNA barcoding to prepare genetic and morphological keys to identify species of the Tanytarsini tribe of flies on Spitsbergen and Bear Island (Stur, Ekrem 2011), DNA barcode libraries have been developed for all Arctic species. Tanytarsini is a large and diverse group of lake flies belonging to the *Chironomidae* family. The developed keys allow the identification of the Tanytarsini species' larvae, pupae and finally metamorphosed specimens on Svalbard.

## 3. Protection of endangered species

In the context of protecting endangered species, it is worth mentioning that the DNA barcode method has the additional advantage of allowing the use of only small anatomical fragments instead of whole individuals (Svensson et al. 2009). This eliminates the need to obtain whole specimens, which is particularly important in the case of small populations. The flagship taxon of significance for the protection of invertebrates in Europe is the genus *Osmoderma* (hermit beetles), comprising a complex of four species, including *Osmoderma barnabita* Motsch. – strictly associated with old, hollow trees, which was intensively studied by Landvik et al. (2017). In the study cited above, the authors focused on explaining the phylogeographic structure of the east European population of *O. barnabita*, based on specimens from Latvia and Finland, as well as on previously published sequences and museum specimens. A sequence analysis of the mitochondrial COI gene has identified 26 closely related haplotypes whose diversity decreases from south to north. The observed distribution of *O. barnabita* also pointed to the recent expansion of this species in eastern Europe. This knowledge has a huge impact on the protection and control of the species, which in Poland and in all other countries is legally protected. The problem

of identifying rare and endangered species also applies to the stag beetle family (Lucanidae). More than 90 species of the genus *Lucanus* have been described, but in many cases, the validity of isolating taxa is questionable. Sexual dimorphism and variability in body size as well as the lack of diagnostic phenotypic features in the larvae further complicate the systematics of *Lucanidae*. Their classification is changing and is under discussion. Recent studies (Cox et al. 2013) describe the seven species of *Lucanus* in the western Palearctic: *Lucanus cervus* L., *Lucanus ibericus* Mötsch., *Lucanus orientalis* Kraatz, *Lucanus tetraodon* Thunberg, *Lucanus (Pseudolucanus) barbarossa* Fab., *Lucanus (P.) busignyi* Planet and *Lucanus (P.) macrophyllus* Kraatz; some of them are considered endangered. It is difficult to set specific conservation priorities without proper identification; therefore, *Lucanus* was used to analyse the 3'-end of the COI gene for identifying species and subspecies (Cox et al. 2013). The sequenced COI fragment distinguished several studied *Lucanus* species and alleged *L. cervus* subspecies.

#### 4. Control of forest tree pests

In an era of increased trade in wood and wood products, the risk of accidentally introducing alien insect species is increasing. Quick and correct identification is crucial to detecting invasive alien species that may exhibit greater pathogenicity in areas beyond their range. Sequencing the mtDNA region of the COI gene region enabled a DNA barcode library of European beetles to be established, which includes *Ips typographus* L., *Plagionotus detritus* L., *Rhagium inquisitor* L., *Rhagium mordax* De Geer, *Saperda scalaris* L., *Xylotrechus rusticus* L., *Peltis grossa* L. and *Protaetia* sp. Similar projects were implemented in Finland (Pentinsaari et al. 2014) and Germany (Hendrich et al. 2015), presenting DNA barcodes for 4,330 species from northern and central Europe. Similarly, the first DNA reference library was developed for about 100 *Agrius* species from the Northern Hemisphere based on three mitochondrial markers: *cox1-5'* (DNA barcode fragment), *cox1-3'* and *rrnL*. All data, including sample images and geographic data (dx.doi.org/10.5883/DS-AGRILUS1), are available in barcode database format, which is thus far the largest collection of data for the identification of species from this genus. All of the more than 3,000 species of the genus *Agrius* feed on parts of vegetation, causing serious damage to trees. Their quick identification is the first step in undertaking further protective measures. Molecular research can, therefore, be an effective tool for controlling pests on a global scale. About 151 species of beetles, pests found in Europe and North America, have been identified using DNA barcodes, including *Ips acuminatus* Gyll. and *I. typographus* L. (Jordal, Kamberstad 2014). Therefore, DNA barcode analysis can serve not

only as a new taxonomic tool but also as a standard system for quick identification and monitoring.

The genus *Xylotrechus* (Coleoptera: Cerambycidae), represented in Greece by four species, damaged olive tree plantations in 2014. The pests *Xylotrechus stebbingi* Gahan and *X. rusticus* L. were identified based on morphological features in conjunction with the analysis of the DNA barcode (Levidara et al. 2018).

Preventing the introduction of invasive alien species into forest ecosystems is a high priority goal for countries with extensive forest resources. Studying DNA barcodes within the family Erebidae (Lepidoptera) revealed intraspecies differences between *Lymantria dispar* L., *Lymantria mathura* Moore and *Lymantria sinica* Moore (Stewart et al. 2016). To help identify these insects, a TaqMan® test kit was developed, which can identify all three *L. dispar* subspecies and five additional *Lymantria* species that threaten North American forests. The test suite is a 'molecular key' (analogous to a taxonomic key) and includes several parallel single and multiplex qPCR reactions. Each reaction uses a combination of primers and probes designed to distinguish taxa, enabling their rapid and accurate identification. Analysing molecular data can quickly identify an unknown sample, including the juvenile stages of insects. Successive studies confirm the high potential of COI barcodes to identify the larvae of the flat bark and longhorn beetle families: *Cucujus cinnaberinus* Scop., *R. mordax* De Geer and *R. inquisitor* L. (Ziganshina et al. 2018). Using DNA barcodes in research also provides the possibility to identify rare species and forest pests at various stages of development. Wu et al. (2017) applied an integrated approach not previously used, but which allows the results to be cross-verified by simultaneous rearing larvae to the adult stage. The DNA barcodes generated in these studies supplement the data in the event of inadvertently transported pests such as *Saperda* sp. and *Xylotrechus* sp.

#### 5. Controversy about the usefulness of DNA barcodes

The DNA barcode has many advantages that allow a large number of samples to be quickly identified even by non-experts. However, there is some controversy regarding the use of DNA barcodes in the classification system of organisms, both at the stage of specimen identification and in the discovery of new species (Meier 2008). The assignment of taxonomic names to unknown specimens is performed using DNA reference libraries and depends on the number of representatives of each species contained in the database. This process may be affected by errors when the samples contained in the library are incorrectly described or do not reflect the overall genetic diversity of the species. Therefore, the most

important factor determining the accuracy of species identification is the wealth of available barcode libraries (Ekrem et al. 2007). In fact, most identification errors are due to a lack of reference data (Virgilio et al. 2010). The identification of new species using DNA barcodes requires high accuracy and ceases to be effective when there is high genetic diversity within a given species (Davis, Nixon 1992; DeSalle et al. 2005). The identification results may be adversely affected by heteroplasmy (Song et al. 2008), that is, the coexistence of several mitochondrial haplotypes in one individual, reported for many insects (Gellissen, Michaelis 1987; Bensasson et al. 2000; Brower 2006; Rubinoff et al. 2006; Magnacca, Brown 2010a, b). It is estimated that a quarter of the taxa of the described animals are not monophyletic (Funk, Omland 2003), which may also be the source of errors in the analyses. Different species may also appear polyphyletic or paraphyletic because of incomplete sorting of mitochondrial DNA lines or introgression. Such situations are quite common (e.g. Kaila, Ståhls 2006; Burns et al. 2010; Žurovcová et al. 2010). The selection of appropriate statistical methods and interpretation of the results of genetic variation between specimens are also problematic. The development of algorithms for identification based on the DNA barcode is still a challenge in the field of bioinformatics.

Despite these issues, Collins and Cruickshank (2013) were optimistic about the future of DNA barcoding because the advantages of the method outweigh its disadvantages. And identification itself based on DNA barcodes can be performed in two stages: initial identification using the COI barcode and detailed identification using additional molecular and morphological data for a specific group of insects.

## 6. Summary

The importance of biodiversity research in forests is increasing, as exemplified by the implementation of large-scale inventories of extensive forest complexes in selected forest districts and the Białowieża Forest. This is due to the need to know the number of species associated with forest ecosystems, which is crucial, amongst others, for the designation of valuable natural areas, sustainable forest management, determining its impact on biodiversity and understanding the causes of range changes, including the expansion or disappearance of certain species. Thus far, an overwhelming number of inventory studies have been conducted using traditional methods, that is, based on the taxonomic identification of morphological features, less often anatomical. Such research often encountered difficulties with identification, the lack of specialists, the ability to include larger forest areas in the studies and the high costs of implementation. Molecular analysis techniques can help

here. Sometimes it is the only method that can provide a clear result, for example, to distinguish between cryptic (twin) species or forms difficult to identify, such as larvae. Molecular techniques are also indispensable in the case of “difficult samples,” such as fragments of insect bodies remaining in humus, based on which the parent species may not be able to be determined in the traditional manner. The DNA barcoding technique is now a common practice in supporting the identification and classification of living organisms (Hebert et al. 2003), because this code is the same at every life cycle stage of a specific organism for both sexes. Barcode sequences sent to databases are easily available and subsequent analyses can be repeated by anyone. However, there are many taxonomical gaps in the databases. Many sequences or even entire genomes are available for intensively studied groups and model organisms, but the vast majority of species have no sequence data and are waiting to be described (Sanderson et al. 2003).

## Conflict of interest

The authors declare no potential conflicts.

## Acknowledgements and source of funding

The research was financed from the forest fund of the State Forests National Forest Holding – DGLP 500-449.

## References

- Anderson A.M., Stur E., Ekrem T. 2013. Molecular and morphological methods reveal cryptic diversity and three new species of Nearctic *Micropsectra* (Diptera: Chironomidae). *Freshwater Science* 32: 892–921. DOI 10.1899/12-026.1.
- Balakrishnan R. 2005. Species concepts, species boundaries and species identification: a view from the Tropics. *Systematic Biology* 54: 689–693. DOI 10.1093/nar/gki023.
- Bensasson D., Zhang D.X., Hewitt G.M. 2000. Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17: 406–415. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026320.
- Bristow C.R. 1991. A revision of the brassoline genus *Opsiphanes* (Lepidoptera: Rhopalocera). *Zoological Journal of the Linnean Society* 101: 203–293. DOI 10.1111/j.1096-3642.1991.tb00282.
- Brower A.V.Z. 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: “ten species” of *Astraptus fulgerator* reassessed (Lepidoptera: HesperIIDae). *Systematics and Biodiversity* 4: 127–132. DOI 10.1017/S147720000500191X.
- Burns J.M., Janzen D.H., Hajibabaei M., Hallwachs W., Hebert P.D.N. 2008. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* 105: 6350–6355. DOI 10.1073/pnas.0712181105.
- Burns J.M., Janzen D.H., Hajibabaei M., Hallwachs W., Hebert P.D.N. 2007. DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides. *Journal of the Lepidopterists Society* 61: 138–153.
- Carew M.E., Pettigrove V., Hoffmann A.A. 2005. The utility of DNA markers in classical taxonomy: using cytochrome oxidase I markers to differentiate Australian *Cladopelma* (Diptera: Chironomidae) midges. *Annals of the Entomological Society of America* 98: 587–594. DOI 10.1603/0013-8746(2005)098[0587:TUODMI]2.0.CO;2.
- Chacon I.A., Montero-Ramirez J., Janzen D.H., Hallwachs W., Blandin P., Bristow C.R., Hajibabaei M. 2012. A new species of *Opsiphanes* Doubleday, (1849) from Costa Rica (Nymphalidae: Morphinae: Brassolini), as revealed by its DNA barcodes and habitus. *Bulletin of the Allyn Museum* 166: 1–15. DOI 10.1139/gen-2016-0005.
- Clark K., Karsh J., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. 2016. GeneBank. *Nucleic Acids Resources* 4(44): 234–241. DOI 10.1093/nar/gkv1276.
- Collins R.A., Cruickshank R.H. 2013 The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 13: 969–975. DOI 10.1111/1755-0998.12046.
- Cox K., Thomaes A., Antonini G., Zilioli M., De Gelas K., Harvey D., Solano E., Audisio P., McKeown N., Shaw P., Minetti R., Bartolozzi L., Mergeay J. 2013. Testing the performance of a fragment of the COI gene to identify western Palearctic stag beetle species (Coleoptera, Lucanidae). *ZooKeys* 365(365): 105–126. DOI 10.3897/zookeys.365.5526.
- Davis J.I., Nixon K.C. 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology* 41: 421–435. DOI 10.2307/2992584.
- De Salle R., Egan M.G., Siddall M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 360: 1905–1916. DOI 10.1098/rstb.2005.1722.
- DeVries P.J. 1987. Butterflies of Costa Rica and Their Natural History: Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae. Princeton University Press, 327 s. ISBN 0691024030.
- Ekrem T., Stur E., Hebert P.D.N. 2010. Females do count: documenting *Chironomidae* (Diptera) species diversity using DNA barcoding. *Organisms Diversity & Evolution* 10: 397–408. DOI 10.1016/j.ympev.2010.06.006.
- Ekrem T., Willassen E., Stur E. 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 530–542. DOI 10.1016/j.ympev.2006.11.021.
- Funk D.J., Omland K.E. 2003. Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 397–423. DOI 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421.
- Gellissen G., Michaelis G. 1987. Gene-transfer – mitochondria to nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 503: 391–401. DOI 10.1111/j.1749-6632.1987.tb40625.x.
- Grimaldi D., Engel M.S. 2005. Evolution of the Insects. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN 0521821495.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313–321. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812–14817. DOI 10.1073/pnas.0406166101.
- Hendrich L., Moriniere J., Haszprunar G., Hebert P.D.N., Hausmann A., Kohler F. 2015. A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: adding more than 3500 identified species to BOLD. *Molecular Ecology Resources* 15(4): 795–818. DOI 10.1111/1755-0998.12354.
- Huemer P., Mutanen M., Sefc K.M., Hebert P.D.N. 2014. Testing DNA Barcode Performance in 1000 Species of European *Lepidoptera*: Large Geographic Distances Have Small Genetic Impacts. *PLoS One* 9(12): e115774. DOI 10.1371/journal.pone.0115774.
- Jackson J.K., Battle J.M., White B.P., Pilgrim E.M., Stein E.D., Miller P.E., Sweeney B.W. 2014. Cryptic biodiversity in streams: a comparison of macroinvertebrate communities based on morphological and DNA barcode identifications. *Freshwater Science* 33: 312–324. DOI 10.1086/675225.
- Janzen D.H., Hajibabaei M., Burns J.M., Hallwachs W., Remigio E., Hebert P.D.N. 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex *Lepidoptera* fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462): 1835–1846. DOI 10.1139/gen-2016-0005.
- Jordal B.H., Kambestad M. 2014. DNA barcoding of bark and ambrosia beetles reveals excessive NUMTs and consistent east-west divergence across Palearctic forests. *Molecular Ecology Resources* 14(1): 7–17. DOI 10.1111/1755-0998.12150.
- Kaila L., Ståhls G. 2006. DNA barcodes: evaluating the potential of COI to differentiate closely related species of Elachista (Lepidoptera: Gelechioidea: Elachistidae) from Australia. *Zootaxa* 1170: 1–26.
- Landvik M., Miraldo P., Niemelä U., Valainis R., Cibulskis T. 2017. Evidence for geographic substructuring of mtDNA variation in the East European Hermit beetle (*Osmoderma barnabita*). *Nature Conservation* 19: 171–189. DOI 10.3897/natureconservation.19.12877.
- Levidara E., Levidaras I., Vontas I., Artizis D.N. 2018. First record of *Xylotrechus chinensis* in Greece and in the EPPO region. *Biuletyn OEPP/EPPO*. DOI 10.1111/epp.12468.
- Magnacca K.N., Brown M.J.F. 2010a. Tissue segregation of mitochondrial haplotypes in heteroplasmic Hawaiian bees: implications for DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 10: 60–68. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02724.
- Magnacca K.N., Brown M.J.F. 2010b. Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian Hylaeus (Nesoprosopis) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evolutionary Biology* 10: 174. DOI 10.1186/1471-2148-10-174.

- Monaghan M., Balke M., Gregory T., Vogler A. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1925–9. DOI 10.1076/aqin.24.4.247.8238.
- Pentinsaari M., Hebert P.D.N., Mutanen M. 2014. Barcoding beetles: a regional survey of 1872 species reveals high identification success and unusually deep interspecific divergences. *PLoS One* 9: e108651. DOI 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- Ratnasingham S., Hebert P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7(3): 355–364. DOI 10.1111/j.1755-0998.2011.03067.
- Rubinoff D. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology* 20: 1026–1033.
- Sanderson M.J., Driskell A.C. 2003. The challenge of constructing large phylogenetic trees. *Trends in Plant Science* 8: 374–379. DOI 10.1007/978-3-540-27810-823.
- Sinclair C.S., Gresens S.E. 2008. Discrimination of *Cricotopus* species (*Diptera: Chironomidae*) by DNA barcoding. *Bulletin of Entomological Research* 98: 555–563. DOI 10.1017/S0007485308005865.
- Smith J., Reijnen B., Stokvis F. 2008. Half of the European fruit fly species barcoded (*Diptera, Tephritidae*); a feasibility test for molecular identification. *ZooKeys* 365: 279–305. DOI 10.3897/zookeys.365.5819.
- Song H., Buhay J.E., Whiting M.F., Crandall K.A. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(13): 486–491. DOI 10.1073/pnas.0803076105.
- Stewart D., Zahiri R., Djoumad A., Freschi L., Lamarche J., Holden D., Cervantes S., Ojeda D., Potvin A., Nisole A., Béliveau C., Capron A., Kimoto T., Day B., Yueh H., Duff C., Levesque R.C., Hamelin R., Cusson M. 2016. A Multi-Species TaqMan PCR Assay for the Identification of Asian Gypsy Moths (*Lymantria* spp.) and Other Invasive Lymantriines of Biosecurity Concern to North America. *PLoS One* 11(8): e0160878. DOI 10.1371/journal.pone.0160878.
- Stur E., Ekrem T. 2011. Exploring unknown life stages of Arctic *Tanytarsini* (*Diptera: Chironomidae*) with DNA barcoding. *Zootaxa* 2743: 27–39. DOI 10.11646/zootaxa.2743.1.2.
- Svensson G.P., Oleksa A., Gawroński R., Lassance J.-M., Larsson M.C. 2009. Enantiomeric conservation of the male-produced sex pheromone facilitates monitoring of threatened European hermit beetles (*Osmoderma* sp.). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 133(3): 276–282. DOI 10.1007/s10841-012-9499-7.
- Sweeney B.W., Battle J.M., Jackson J.K., Dapkey T. 2011. Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? *Journal of the North American Benthological Society* 30: 195–216.
- Virgilio M., Bäckeljau T., Nevado B., Meyer M.D. 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics* 11: 206. DOI 10.1186/1471-2105-11-206.
- Webb J.M., Jacobus L.M., Funk D.H., Zhou X., Kondratieff B., Geraci C.J., Dewalt R.E., Baird D.J., Richard B., Phillips I. 2012. A DNA barcode library for North American *Ephemeroptera*: progress and prospects. *PLoS One* 7: e38063. DOI 10.1371/journal.pone.0038063.
- Wu Y., Trepanowski N.F., Molongoski J.J., Reigel P.F., Lingafelter S.V., Nadel H., Myers S.W., Ray A.M. 2017. Identification of woodboring beetles (*Cerambycidae* and *Buprestidae*) intercepted in trade associated solid wood packaging material using DNA barcoding and morphology. *Scientific Reports* 7: 40316–40321.
- Zhou X., Adamowicz S.J., Jacobus L.M., Dewalt R.E., Hebert P.D. 2009. Towards a comprehensive barcode library for arctic life – *Ephemeroptera*, *Plecoptera*, and *Trichoptera* of Churchill, Manitoba, Canada. *Frontiers in Zoology* 6: 1–9. DOI 10.1186/1742-9994-6-30.
- Zhou X., Kjer K.M., Morse J.C. 2007. Associating larvae and adults of Chinese *Hydropsychidae* caddisflies (*Insecta: Trichoptera*) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society* 26: 719–742. DOI 10.11646/zoosymposia.14.1.21.
- Ziganshina E.E., Mohammed W.S., Shagimardanova E.I., Vankov P.Y., Gogoleva N.E., Ziganshin A.M. 2018. Fungal, Bacterial, and Archaeal Diversity in the Digestive Tract of Several Beetle Larvae (Coleoptera). *BioMed Research International*: 15 s. DOI 10.1155/2018/6765438.
- Meier R., Zhang G.Y., Ali F. 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. *Systematic Biology* 57: 809–813. DOI 10.1080/10635150802406343.
- Žurovcová M.A., Havelka J., Starý P., Vcchtová P.A., Chundelová D.A. 2010. “DNA barcoding” is of limited value for identifying adelgids (Hemiptera: Adelgidae) but supports traditional morphological taxonomy. *European Journal of Entomology* 107: 147–156.

## Authors' contribution

I. Sz-B. – concept, literature review, manuscript preparation; K.S. – literature review, manuscript preparation, proofreading.