

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS CITOCROMO OXIDASA I Y ESPACIADORES RIBOSOMALES TRANSCRITOS INTERNOS (ITS I Y II Y 5.8S) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE INTERÉS FORENSE

Ángela Aristizábal-Botero¹✉, Helena Groot², Ginna Paola Camacho³, Emilio Realpe¹ y Manuel Paredes³

¹Laboratorio de Ecología y Zoología Acuática, LAZOE. ²Grupo de Genética Forense, Laboratorio de Genética Humana. Universidad de los Andes. Carrera Primera #18A-12. Bogotá, Colombia.

³Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Calle 7A No. 12A-51. Bogotá, Colombia.

✉ Autor de correspondencia: a.aristizabal331@uniande.edu.co

RESUMEN. El presente estudio provee una herramienta a la entomología forense que permite la identificación eficiente de especies involucradas como testigos pasivos en escenas de crímenes. Las especies seleccionadas: *Lucilia sericata*, *L. cuprina*, *L. peruviana*, *L. eximia*, *Calliphora vicina*, *Chrysomya albiceps*, *Comptosomyiops verena* y *Sarconesia magellanica* están ampliamente distribuidas en Colombia y su identificación facilita su aplicación en el cálculo del IPM (Intervalo Post-Mortem) y la caracterización del lugar del crimen, ya que son pioneras en las escenas del crimen de ambientes urbanos y periurbanos. El análisis independiente de E-COI y el complejo ITS permitió discriminar en un tiempo mínimo de 72 h individuos preservados de todas las especies mencionadas, con excepción de: *L. sericata* y *C. vicina*, que solo pudieron identificarse mediante el complejo ITS o la concatenación de ambos marcadores. Finalmente, las especies *L. cuprina* y *L. peruviana* fueron separadas mediante la utilización de análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana sobre las secuencias de COI-E, formando un clado con *L. eximia*, separado de *L. sericata*; especie que se encontró más relacionada con *C. vicina*. Esta situación concuerda con lo reportado por otros autores y suscita revisar su clasificación taxonómica y evaluar posibles procesos de hibridación.

Palabras clave Entomología forense, ADN mitocondrial, Máxima verosimilitud, Inferencia bayesiana.

Cytochrome Oxidase I and Ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS I and II and 5.8S) Sequence Analysis for Identification of Species of Forensic Interest

ABSTRACT. This study provides a tool for forensic entomology, integrated with molecular biology and bioinformatics, whose purpose is the identification of species involved as passive witnesses at crime scenes. The species *Lucilia sericata*, *L. cuprina*, *L. peruviana*, *L. eximia*, *Calliphora vicina*, *Chrysomya albiceps*, *Comptosomyiops verena* and *Sarconesia magellanica* were selected because they are widely distributed in Colombia. The molecular identification of these species allows the characterization of the crime scene and the PMI calculation, since they are the first to reach a crime scene in urban and suburban environments. Independent analysis of polymorphisms of COI-E and ITS complex were used for the identification of all of the above species, using collecting individuals that were preserved in 70% alcohol, reaching a minimum of 72 hours in the process; with the exception of: *L. sericata* and *C. vicina*, which could only be identified by the ITS complex or the concatenation of both molecular markers. This fact highlighted the importance of implementing nuclear genes for species identification. Finally, species *L. peruviana* and *L. cuprina* were separated using maximum likelihood analysis and Bayesian inference sequences COI-E forming a clade with *L. eximia* but separately from *L. sericata*. According our results, the latter species is closely related to *C. vicina*, which is consistent with reports from other studies and raises the need to revise their taxonomic classification and make evaluation of possible local hybridization processes.

Keywords: Forensic entomology, mitochondrial DNA, maximum likelihood, bayesian inference.

INTRODUCCIÓN

La entomología forense se ocupa de la correcta utilización de los insectos y otros artrópodos como testigos pasivos de una escena de un crimen (Benecke, 2004) y elementos materia de prueba en asuntos legales (Catts y Goff, 1992; García-Rojo *et al.*, 2009). Por tal razón, la correcta

identificación de las especies constituye una parte crucial en la investigación judicial, ya que contribuye a la determinación del tiempo, causa, manera y lugar de la muerte (Usaquén y Camacho, 2003; Chen *et al.*, 2004).

La familia Calliphoridae consta de aproximadamente 1500 especies de dípteros, de cuales 228 habitan en el trópico, siendo de gran importancia para las ciencias forenses en Colombia (Amat *et al.*, 2004 y 2005; Camacho, 2008); principalmente debido a que su desarrollo larval se asocia a materia orgánica en descomposición. Varias de las especies se alimentan de cadáveres, mostrando cierta preferencia por determinadas fases de descomposición del cuerpo (Smith *et al.*, 1996; Usaquén y Camacho, 2004; Camacho, 2005; Restrepo y Fagua, 2014), aspecto utilizado como herramienta fundamental en la determinación del tiempo aproximado de muerte o *intervalo post mortem* (IPM) (Catts y Goff 1992; Calderón-Arguedas *et al.*, 2004; Camacho y Segura, 2009; Segura *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, la identificación taxonómica de estas especies se realiza usando características morfológicas (Oliva, 2003; Amat *et al.*, 2008). Sin embargo, su identificación solo resulta totalmente exitosa cuando el individuo estudiado se encuentra en tercer estado larval o como imago y además, debe estar en buen estado de conservación, ya que muchos de los caracteres morfológicos importantes para la identificación mediante claves taxonómicas resultan ser susceptibles a daños. Adicionalmente, su análisis puede involucrar la pérdida total o parcial del individuo adulto, como es el caso de la disección de la genitalia (Catts y Haskell, 1997; Stevens y Wall, 2001; Centeno *et al.*, 2002; Day y Wallman, 2008), lo que implica que ya no es posible mantenerlos en colecciones.

Debido a ello, cuando se trata de estadios inmaduros como: huevos, larvas de primer y segundo estadio, pupas y puparios, los caracteres definatorios no son lo suficientemente discriminatorios (Florez y Wolff, 2009) por lo que es necesario el cultivo de los individuos, lo cual no siempre es posible, pues en muchas ocasiones solo se cuenta con individuos muertos y en ocasiones degradados por efectos ambientales o de manejo (Catts y Haskell, 1997; Centeno *et al.*, 2002; Day y Wallman, 2008).

En respuesta a dichas limitantes, se ha fortalecido el uso del ADN como herramienta molecular para la identificación de especies (Wallman y Donnellman, 2001; Wells y Sperling, 2001; Wolff *et al.*, 2001; Butler, 2005; Reibe *et al.*, 2009; Gil-Arriortua *et al.*, 2013). Entre las secuencias más usadas se encuentran las subunidades I y II de los genes mitocondriales de la Citocromo Oxidasa C (COI y COII) (Stevens *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2010), siendo la subunidad larga (COI) la más utilizada por los estudios en entomología forense (Nelson *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). También es la región más usada en propuestas de *Barcoding* (Hebert *et al.*, 2002; Boehme *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010) debido a la buena resolución encontrada para diversas especies de insectos, dada su baja variabilidad intra-específica, respecto a una significativamente mayor variabilidad inter-específica (Lunt *et al.*, 1996; Ames *et al.*, 2006; Roe *et al.*, 2007; Wells *et al.*, 2007).

Por otra parte, estudios paralelos han encontrado de gran utilidad implementar el uso marcadores nucleares (Stevens y Wall, 2001; Coleman y Vacquier, 2002) con el fin de resolver problemas de identificación de especies cercanamente emparentadas o que presentan características morfológicas no concluyentes debido a su origen híbrido (Cornel *et al.*, 1996; Douglas y Haymera, 2001). Ya que el ADN mitocondrial no tiene la información de ambos parentales, puede identificar un individuo como perteneciente a una especie, sin tomar en cuenta la carga de la otra especie contribuyente; en estos casos, los ITSs se han reportado como marcadores que permiten una identificación molecular exitosa (Nelson *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008) debido a su alta variabilidad entre especies (Gallego y Galián, 2001).

En consecuencia y ya que en Colombia no existe un protocolo estándar para el análisis de muestras de entomología forense, el objetivo del presente trabajo es la estandarización e implementación de técnicas de extracción y amplificación que permiten determinar el potencial del análisis filogenético de las secuencias del gen de la citocromo oxidasa I y del complejo nuclear ITS, para la identificación de adultos y estadios inmaduros (Huevos, Larvas I, II y III, prepupas, pupas y puparios) de individuos pertenecientes a la familia Calliphoridae (Harvey *et al.*, 2003 (a); Harvey, *et al.*, 2008). Se espera que el aval de los resultados aquí presentados por parte del Instituto Nacional de Medicina Legal permita que se empiece a aprovechar información aportada por la entomología forense que usualmente no es tenida en cuenta en las investigaciones forenses Colombianas (Camacho, 2005).

MATERIALES Y MÉTODO

Muestras. Las muestras (Cuadro. 1) de: *L. sericata* (Meigen, 1826), *L. cuprina* (Wiedemann, 1830), *L. peruviana* (Robineau-Desvoid, 1830), *L. eximia* (Wiedemann, 1819), *C. vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *C. albiceps* (Wiedemann, 1819), *C. verena* (Walter, 1849) y *S. magellanica* (Le Guillou, 1842) previamente preservadas en etanol al 70 % de la colección entomológica del museo de historia natural de la Universidad de los Andes. La distribución de los estadios de las especies usadas en el proyecto no fue homogénea, pues se seleccionó más del doble de individuos en estados inmaduros (Cuadro. 1) ya que estos son los más abundantes en la mayoría de las escenas de crímenes y cadáveres hallados en investigaciones judiciales (Camacho, 2005). Adicionalmente, se seleccionaron 3 individuos de diferentes estadios de cada especie para los cuales la especie se mantuvo oculta a los investigadores, con el fin de simular las condiciones de identificación en casos reales, hasta que se llevó a cabo la identificación molecular. Además, dos individuos adultos se tomaron de preservación en seco de la colección del Museo de historia Natural de la Universidad de los Andes. El estadio inmaduro más abundante (larva III), se seleccionó por disponibilidad de la muestra para las especies seleccionadas. Además, los adultos fueron fraccionados para evaluar la posibilidad de reducir la cantidad de material macerado para el correcto análisis molecular, con el fin de poder preservar los individuos para la formación de colecciones de biodiversidad.

Procesamiento de las muestras. Se llevaron a cabo dos procesos: el primero de digestión y el segundo, una purificación basada en cromatografía de afinidad para tejido blando utilizando perlas magnéticas (modificación del protocolo 3C de Promega® *DNA IQ System*). Para la fase inicial de digestión química y mecánica de los tejidos se maceran los tejidos mediante el uso de pistones plásticos estériles en tubos eppendorf de 1.5 o 2 ml, una vez obtenida una mezcla parcialmente homogénea con los tejidos, estos se incubaron en una plancha de calentamiento a 56 °C durante 24 a 48 h dependiendo del contenido de quitina de las muestras, cuidando de no aumentar la temperatura o superar este tiempo límite, con el fin de no comprometer la integridad del ADN extraído. Concluido el tiempo de digestión, se añadieron a la mezcla: Buffer de lisis Promega® *DNA IQ System* (El doble del volumen final de la digestión anterior), 10 µl de Proteinasa K 20mg/ml, 10 µl de Chitinase 0.4U y 10 µl de DTT 1M y se incubó durante 5 min antes de iniciar el protocolo modificado para el kit 3C Promega® *DNA IQ System*.

El ADN obtenido fue almacenado a 4 °C para uso inmediato y a -20 °C para almacenamientos prolongados, con el fin de preservar su integridad. La concentración de ADN obtenido fue medida mediante espectrofotometría de masas usando el NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer de Thermo Scientific® y su integridad fue verificada en geles de agarosa al 2% para todas las muestras.

Cuadro 1. Distribución de los 48 individuos en los diferentes estadios de desarrollo. Arriba: Número de individuos inmaduros usados para cada especie. Los huevos se maceraron en masas aproximadamente 20 por cada ensayo. Abajo: Distribución de los adultos según la cantidad de grupos de segmentos usados para cada una de las especies.

34 Inmaduros									
5 Huevos	3 Larvas Instar I	2 Larvas Instar II	12 Larvas Instar III			6 Prepupas	5 Pupas	1 Pupario	
14 Adultos*									
3 Abdomenes con huevos	3 Tórax	1 Tóra x con Alas	1 Tórax con Cabeza	2 Tórax con Cabeza y Alas	1 Tórax con Abdomen	12 Patas**	7 Abdomenes	5 Cabezas	2 Adultos Completo

*No se usaron todos los segmentos de todos los adultos. **Dos ensayos de patas se realizaron con solo 3 y 4 patas respectivamente, mientras que los 10 ensayos restantes se realizaron con las 6 patas de los individuos.

Reacción en cadena de la Polimerasa: Implementación de Protocolos de Amplificación.

Se utilizaron las parejas de iniciadores: C1N2195 (*forward*) y TL2N3014 (*reverse*) desarrollados por Simon *et al.*, 1994 e implementados en Harvey *et al.*, 2003 (a) y (b) para la amplificación del fragmento COI-E. Para el complejo ITS1, 5.8S e ITS2, se utilizaron los iniciadores 1975F (*forward*) y 52R (*reverse*) desarrollados por Ratcliffe *et al.*, 2003, en la casa comercial Sigma Genosys (Sydney, Australia).

A partir de protocolos de termociclaje reportados en Simon *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 2003 (a) y Ratcliffe *et al.*, 2003, se realizaron modificaciones de las temperaturas y tiempos de digestión, ajuntándolos según la composición de las diferentes muestras, siguiendo los principios físicos de esta reacción y un gradiente de temperaturas de anillaje para obtener los valores óptimos con mayor grado de astringencia para cada fragmento. La concentración final de ADN utilizado utilizada para las diferentes reacciones varió en un rango entre 10 y 400 ng dependiendo de la pureza reportada para cada muestra.

Con el fin de verificar la calidad de las secuencias obtenidas, se realizaron dos análisis cuantitativos que permiten determinar qué tan eficiente resulta la reacción de secuencia. El primero de ellos denominado *Quality test*, llevado a cabo por el programa de secuenciación BigDye Ready Sequencing v3.1[®], proporcionado por la empresa MacroGen[®] y corroborado por los programas utilizados para la edición de secuencias utilizados: Geneious[®] (Drummond *et al.*, 2011) y CLC DNA Workbench[®] v5. Dicho test muestra el porcentaje de confiabilidad para la identidad de los picos obtenidos en el electroferograma para cada base secuenciada. Adicionalmente, se compararon las longitudes obtenidas con las esperadas: 820 pb del fragmento COI-E y 1150 pb para el complejo ITS1, 5.8S e ITS2.

Secuenciación y Purificación. La reacción de secuencia la llevó a cabo la empresa MacroGen, basada en los protocolos para los equipos BigDye Ready Sequencing v3.1[®] con electroforesis capilar con ABI3730XL.

Análisis de las secuencias: Determinación de los sitios polimórficos e Identificación molecular de las especies. Se realizaron alineamientos múltiples utilizando la herramienta del programa CLC DNA Workbench[®] v5 para calcular la cantidad de sitios polimórficos en las secuencias. Posteriormente se utilizó la herramienta *Pairwise comparison Alingment* del programa CLC DNA Workbench[®] v5, con el fin de cuantificar las diferencias nucleotídicas de las secuencias de los fragmentos obtenidos. Las secuencias obtenidas para las especies previamente identificadas mediante métodos de taxonomía tradicional se verificaron utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponible en el portal de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), realizando la comparación de

las secuencias obtenidas respecto a las almacenadas en dicha base de datos. Para aquellos individuos cuya identidad permanecía oculta, se realizaron comparaciones de diversidad nucleotídica, búsquedas de alineamientos locales con las secuencias establecidas para las especies conocidas y búsquedas en la base de datos de NCBI. Los análisis estadísticos para la comparación de medias entre los porcentajes de divergencia intra e inter-específica se realizaron con el paquete SPSS Inc. (1999).

Análisis de distancias génicas. Finalmente, se realizaron análisis de distancias génicas utilizando análisis filogenéticos de máxima verosimilitud en RaxML 7.2.0 (Stamatakis, 2006; Stamatakis *et al.*, 2008) y PhyML (Guindon y Gascuel, 2003), así como análisis de inferencia Bayesiana en MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003); con el fin de verificar la distancia génica a la cual se encuentran las especies identificadas previamente y evaluar la coherencia de la señal filogenética obtenida para los marcadores y especies seleccionadas (Escobar, 2008). La estimación de los modelos evolutivos y los diferentes análisis fueron realizados en TOPALi v 2.5 (Milne *et al.*, 2004) y MRMODELTEST v2.2 (Nylander, 2004) para la matriz concatenada. Las ramas fueron soportadas por bootstrap de 10.000 réplicas para PhyML, de 100 réplicas para los análisis de RaxML y de 1'000.000 generaciones para los análisis bayesianos. Las secuencias fueron alineadas utilizando la herramienta MUSCLE (Edgar, 2004) en Geneios® Pro 5.5.7 (Drummond *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo ADN a partir de todos los adultos fragmentados y en mal estado de preservación, gracias a lo cual fue posible determinar que el método de preservación y manejo que afecta en menor grado la obtención de ADN de buena calidad es la fijación mediante el uso de Etanol al 70 % respecto al secado y preservación en alfiler. Adicionalmente, la extracción de ADN fue exitosa para el 100 % de los individuos fragmentados de todas las especies y del 70 % de aquellos en mal estado de preservación, en los cuales el grado de contaminación aumenta al aumentar el grado de descomposición o desecación.

Reacción en cadena de la Polimerasa: Implementación de Protocolos de amplificación. Se seleccionaron únicamente aquellas secuencias cuyo porcentaje de identidad fuera superior al 80 % en al menos el 76 % de la secuencia, para al menos una de las hebras complementarias, centrando la atención en la calidad de la parte central del fragmento amplificado que adicionalmente tuvieran un tamaño similar al esperado. Este análisis, tuvo como resultados una eficiencia promedio de elongación del 95.56% para el Fragmento E del COI y del 86.93 % para las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 (Fig. 1).

Análisis de las Secuencias: Determinación de sitios polimórficos e Identificación molecular de las especies. Al realizar las comparaciones pareadas entre las diferentes secuencias, se obtuvieron valores muy discriminantes para la divergencia nucleotídica inter-específica de las especies: *L. eximia*, *C. verena* y *C. albiceps* respecto a la familia Sarcophagidae para el fragmento COI-E, lo que concuerda con lo reportado por Roe *et al.* (2007). Al realizar la comparación de las divergencias nucleotídicas del fragmento COI-E, estas permitieron separar e identificar exitosamente todas las especies incluyendo a aquellas cuya identidad permanecía oculta, acorde con lo reportado por Priya y Sebastian (2015); con excepción de *L. sericata* respecto a *C. vicina* y de *L. cuprina* respecto a *L. peruviana* cuyos valores de divergencia nucleotídica intra-específica no resultaron estadísticamente diferentes respecto a los valores obtenidos para la divergencia inter-específica (Fig. 1).

Cuadro 2. Concentraciones promedio de ADN obtenidas en cada tipo de muestra.

Origen de la muestra	Promedio de la concentración del ADN (ng/μl)
Huevos	53.6
Larvas I	11.3
Larvas II	13.7
Larvas III	23.6
Prepupas	43.2
Pupas	55.3
Pupario	11.8*
Tórax, Cabeza y Alas	22.5
Tórax, Abdomen y huevos	47.3*
Tórax y Abdomen	27.4*
Cabeza	21.9
Patas	12.7
Abdomen	22.2
Abdomen y Huevos	51.2
Tórax	28.4
Tórax y Alas	14.5*
Tórax y Cabeza	35.4*
Adultos Completos	16.7

*Este estadio inmaduro y/o combinaciones de fragmentos solo cuentan con una muestra.

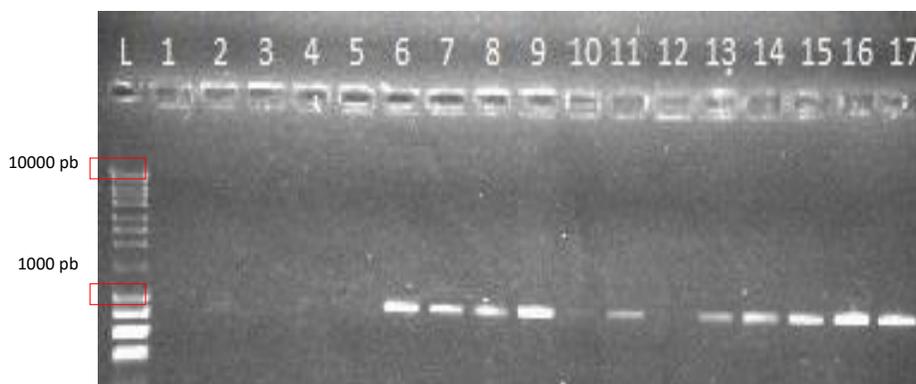


Figura 1. Gradiente de concentración de ADN utilizado para la amplificación. Chequeo en gel de agarosa al 2% Fragmento E del gen COI (~820 pb). L: Marcador de peso molecular *Ladder* 1000 BioLine®. Pozos 1 y 2: Muestras con una concentración de 10 ng de ADN por cada reacción, pozos 3 y 4: Muestras con una concentración de 20 ng de ADN por cada reacción, pozos 5 y 6: Muestras con una concentración de 30 ng de ADN por cada reacción, pozos del 7 al 9: Muestras con una concentración de 40 ng de ADN por cada reacción, pozos 10 y 11: Muestras con una concentración de 200 ng de ADN por cada reacción, pozo 12: Negativo, pozos 13 y 14: Muestras con una concentración de 150 ng de ADN por cada reacción, pozos 15 y 16: Muestras con una concentración de 100 ng de ADN por cada reacción y pozo 17: Muestra con una concentración de 50 ng de ADN.

Así mismo, se reporta un individuo (el número 15 larva instar II) cuya asociación con la especie identificada (*S. magellanica*), no resulta tan robusta y presenta un soporte estadístico débil ($p = 0.054$). Esto se debe a que sus valores de divergencia intra-específica presentan valores cercanos a la divergencia inter-específica, caso similar a lo encontrado para *L. peruviana*, por lo que no se recomienda identificar dichas especies utilizando solo este marcador. Dicha hiper-variabilidad, podría explicarse por la escogencia de sitios de alta divergencia nucleotídica no afectados por la selección natural, cuyo potencial debe ser explorado en estudios de identificación de poblaciones pertenecientes a estas especies.

Para el complejo ITS, los valores de la divergencia nucleotídica inter-específica resultaron discriminantes para las especies: *C. vicina*, *C. verena*, *L. sericata* y *L. eximia* y fue posible separar e identificar exitosamente todas las especies incluyendo a aquellas cuya identidad permanecía oculta, siendo la comparación de la especie de la familia Sarcophagidae, escogida como grupo externo, (Buenaventura *et al.*, 2009; Meiklejohn *et al.*, 2011) respecto a la especie *S. magellanica*, las especies con valores de divergencia inter-específica más bajos, los cuales no obstante no son estadísticamente diferentes ($p = 0.16711$) respecto a los valores mínimos de las otras especies.

Los análisis comparativos de la variabilidad intra-específica respecto a la variabilidad inter-específica total de las secuencias revelaron además un alto potencial para la identificación de especies: concordancia perfecta con la identificación morfológica, así como un alto nivel de variabilidad inter-específica. Para el Fragmento COI – E: promedio = 8.84 % (rango entre 2.58 y 14.08 %) y para el complejo ITS: promedio = 21.78 % (rango entre 1.56 y 43.53 %); respecto a la variabilidad intra-específica: para Fragmento COI – E: promedio = 0.54 % rango de 0 a 1.55 %, (exceptuando el valor para *S. magellanica* de 4.39 %) y para el complejo ITS: promedio = 0.16 % (rango entre de 0 a 0.36 %). Por tanto y en concordancia con lo reportado en el estudio sobre Callifóridos en China y Pakistan (Zaidi *et al.*, 2011), dichos marcadores resultan adecuados para separar claramente individuos de especies pertenecientes a una misma familia e incluso a un mismo género (*Lucilia*).

Análisis de distancias génicas. El uso conjunto de ambos genes permitió separar e identificar satisfactoriamente todas las especies, formando clados monofiléticos coherentes con la taxonomía de las especies haciendo evidente la utilidad del acercamiento filogenético multi-loci (Zaidi *et al.*, 2011); con la excepción del clado formado por *L. sericata* y *C. vicina* (Fig. 2).

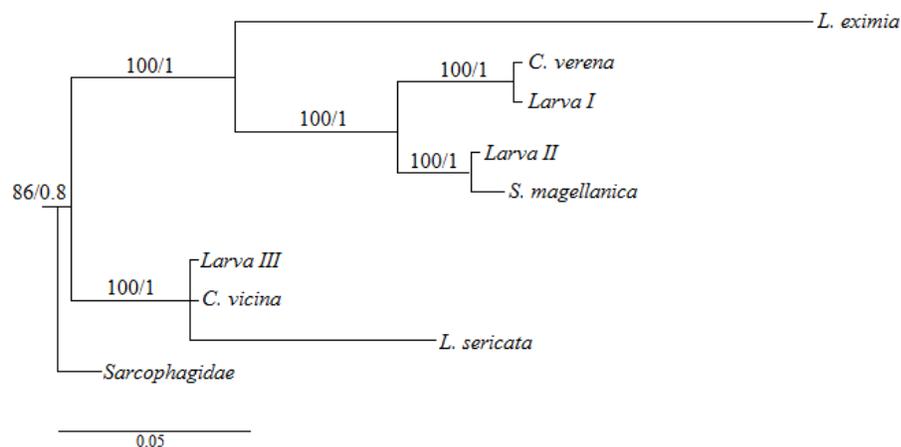


Figura 2. Filogenia obtenida para las especies analizadas por ambos marcadores, con la concatenación de las matrices para el COI-E y el complejo ITS usando los modelos GTR + G para inferencia bayesiana y el modelo TIM+G para verosimilitud por PhyML (00.5 sustituciones esperadas por sitio). Elaborado con FigTree.

Estas especies fueron agrupadas consistentemente por ambos marcadores, por lo que se debe considerar la revisión de la clasificación de estas especies, teniendo en cuenta lo reportado por Solano y Wolff, 2013, donde individuos de estos dos géneros se agrupan en un solo clado. Así mismo, resulta pertinente la evaluación de posibles eventos de hibridación local (como el ocurrido en Hawaii entre *L. sericata* y *L. cuprina* reportado por Wells en 2002), que deben ser confirmados mediante el estudio de individuos pertenecientes a poblaciones diferentes con el fin

de cuantificar el efecto que la distribución geográfica y posibles eventos de hibridación local tiene sobre estas especies (Lin *et al.*, 2010).

CONCLUSIÓN

Fue posible estandarizar el método de extracción, amplificación y secuenciación de los fragmentos de ADN mitocondrial (COI, y tRNA^{LEU}) e ITS para las especies seleccionadas, tanto en estado adulto como en estados inmaduros.

Para los adultos en buen estado de preservación se recomienda utilizar solo fragmentos corporales, preferiblemente las patas, con el fin de preservar los individuos para colecciones biológicas, ya que la digestión completa de estos resulta innecesaria dado que la cantidad de ADN obtenida a partir de los fragmentos es equiparable y la cantidad de contaminantes es menor. Para el trabajo con inmaduros, se probó que la utilización de un solo individuo es suficiente, por lo tanto se requiere muy poco material biológico para obtener la identificación de las especies. El método aquí desarrollado representa por tanto una herramienta de gran valor para el trabajo con individuos adultos asociados a colecciones que deben preservar su integridad, así como para el trabajo con elementos materia de prueba que deben ser analizados en corto tiempo.

La concatenación de los genes permitió agrupar de manera precisa los individuos cuya identidad permanecía oculta con el uso de los marcadores separados; sin embargo, *L. sericata* permanece separada de las demás especies de *Lucilia* y estrechamente relacionada con *C. vicina* por lo cual, aún es necesario ampliar la muestra para obtener una mayor resolución de las relaciones entre estas especies.

Finalmente, fue posible establecer las secuencias obtenidas para Fragmento COI – E y el complejo ITS1, 5.8S e ITS2 como marcadores moleculares adecuados para la correcta identificación de todas las especies, teniendo en cuenta que para diferenciar a *C. vicina* y *L. sericata* debe usarse el complejo ITS o la concatenación de ambos marcadores. A partir de dichas secuencias, se ha elaborado una base de datos de referencia perteneciente a la Universidad de los Andes que podrá ser utilizada para la identificación de individuos de estas especies y su posterior implementación en el cálculo del IPM.

Agradecimientos

A la facultad de Ciencias Biológicas, el Museo de Historia Natural y el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes por brindar todo el apoyo a nuestra investigación.

Al profesor MSc. Eduardo Amat del Departamento de Ciencias Biológicas del Tecnológico de Antioquia, y a la PhD. Luz Adriana Pérez quienes donaron muestras cultivadas en experimentos de sucesión cadavérica para la realización del proyecto.

Literatura citada

- Amat, E. 2005. *Las moscas califóridas de Colombia*. Proyecto Diversidad de Insectos de Colombia, Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt.
- Amat, E., Pape, T. and Wolff, M. 2004. Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófágidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana*, 5(2): 201–208.
- Amat, E, Vélez, y M. Wolff, M. 2008. Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Caldasia*, 30(1): 231–244.
- Ames, C., Turner, B. and B. Daniel. 2006. The use of mitochondria cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowflies species - *Calliphora vicina* y *Calliphora vomitoria*. *Forensic science International*, 164: 179–182.

- Benecke, M. 2004. Forensic Entomology: Arthropods and Corpses. Pp. 207–240. In: Tsokos, M. (Ed.). *Forensic Pathology Reviews*, Vol II, Humana Press, Totowa (NJ, USA).
- Boehme, P., Amendt, J., Disney, H. and R. Zehner. 2010. Molecular identification of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. *International Journal of Legal Medicine*, 124: 577–581.
- Buenaventura, E., Camacho, G., García, A. y Wolff, M. 2009. Sarcophagidae (Diptera) de importancia forense en Colombia: claves taxonómicas, notas sobre su biología y distribución. *Revista de la Sociedad Colombiana de Entomología*. 35(2): 189–196.
- Butler, J. 2005. *Forensic DNA Typing. Biology, Technology and Genetic os STR Marker*. Second edition. Elsevier (USA). 688 p.
- Calderón-Arguedas, O., Troyo, A. y M. Solano. 2004. Poblaciones larvales de califóridos como estimadores del intervalo post-mortem en un modelo experimental. *Revista Latinoamericana de Derecho Médico y Medicina Legal*, 8(2): 43–51.
- Camacho, G. 2005. Sucesión de la entomofauna cadaverica y ciclo vital de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) como primera especie colonizadora, utilizando cerdo blanco (*Sus scrofa*) en Bogotá. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(2): 189–197.
- Camacho, G. 2008. Entomología Forense. Pp. 217–250. In: Sanabria, C. (Ed.). *Antropología Forense y la investigación médico legal de las muertes*. Segunda Edición. Asociación Colombiana de Antropología Forense. Bogotá D.C.
- Camacho, G. y A. Segura. 2009. Tiempo de desarrollo de cuatro especies de dípteros colonizadores (Diptera: Calliphoridae) de cadáveres humanos en Bogotá D.C. P. 137. In: *Resúmenes XXXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología*, Medellín-Colombia.
- Catts, P. and M. Goff. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*. 37: 253–272.
- Catts, P. and N. Haskell. 1997. *Entomology y Death a Procedural Guide*. Second Printing. Joyce's Print Shop, Inc. Clemson, South Carolina. 182 p.
- Centeno, N., Maldonado, M. and A. Oliva. 2002. Seasonal Patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires province (Argentina). *Forensic Science International*, 126: 63–70.
- Chen, W., Hung T. and S. Shiao. 2004. Molecular Identification of forensically important blow fly species (Diptera; Calliphoridae) in Taiwan. *Journal of Medical Entomology*, 41(1): 47–57.
- Coleman, A. W. and V. D. Vacquier. 2002. Exploring the Phylogenetic Utility of ITS Sequences for Animals: A test case for Abalone (Haliotis). *Journal of Molecular Evolution*, 54: 246–257.
- Cornel, A., Porter, C. and F. Collins. 1996. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *Journal of Medical Entomology*, 33(1): 109–16.
- Day, D. and J. Wallman. 2008. Effect of preservative solutions on preservation of *Calliphora augur* and *Lucilia cuprina* larvae (Diptera: Calliphoridae) with implications for post-mortem interval estimates. *Forensic Science International*, 179: 1–10.
- Douglas, L. and D. Haymera. 2001. Ribosomal ITS1 Polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(5): 726–731.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., and A. Wilson. 2011. *Geneious, software package v5.5.7*.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792–1797.
- Escobar, D. 2008. *Relaciones filogenéticas dentro del "Complejo de Cliona viridis" (Porifera, Demospongiae, Hidromerida) a partir de análisis moleculares (ITS 2 ARNr)*. Trabajo de grado para optar por el título de biólogo en la Universidad de los Andes.

- Florez, E. y M. Wolff. 2009. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. *Neotropical Entomology*, 38: 418–429.
- FigTree. Graphical viewer of phylogenetic trees. Desarrollado por: *Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology*. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>. (Fecha de consulta: 5-VIII-2012).
- Gallego, D. and J. Galián. 2001. The internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of the rDNA differentiates the bark beetle forest pests *Tomicus destruens* and *T. piniperda*. *Insect Molecular Biology*, 10(5): 415–520.
- García-Rojo, A., Honorato, L., González, M. y A. Téllez. 2009. Determinación del intervalo postmortem mediante el estudio de la sucesión de insectos en dos cadáveres hallados en el interior de una finca rústica en Madrid. *Cuadernos de Medicina Forense*, 15(56): 137–145.
- Gil-Arriortua, M., Bordas, M. I. S., Cainé, L. M., Pinheiro, F., and M. M. de Pancorbo. 2013. Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae). *Forensic science international*, 228(1): 132–136.
- Guindon, S. and O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5): 696–704.
- Harvey, M., Dadour, I., and S. Gaudieri. 2003a. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I: gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in Western Australia. *Forensic Science International*, 131: 134–139.
- Harvey, M., Mansell, M., Villet, M. and I. Dadour. 2003b. Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(4): 363–369.
- Harvey, M., Gaudieri, S., Villet M., and I. Dadour. 2008. A global study of forensically significant calliphorids: Implications for identification. *Forensic Science International*, 177: 66–76.
- Hebert, P., Cywinska, A., Shelley B. and R. Jeremy. 2002. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of Royal Society of London*, 653: 1–9.
- Hernández, M., Paredes, M., Groot, H. y S. Restrepo. 2008. Implementación del análisis del gen del citocromo oxidasa I para la identificación de insectos de interés forense: Estudio preliminar de una muestra de la familia Calliphoridae" en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3): 86.
- Lin, I., Yang, C., Pai, C. and S. Shiao. 2010. Population analysis of Forensically Important Calliphoridae. *Forensic Science Journal*, 9(1): 25–34.
- Liu, Q., Cai, J., Chang, Y., Guo, Y., Wang, X., Weng, J., Zhong, M., Wang, X., Yang, L., Wu, K., Lan, L., Wang, J. and Y. Chen. 2010. Identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in China by mitochondrial cytochrome oxidase I gene differentiation. *Insect Science*, 18: 554–564.
- Lunt, D., Zhang, D., Szymura, J. and G. Hewitt. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5(3): 153–165.
- Meiklejohn, K., Wallman, J. and M. Dowton. 2011. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *International Journal of Legal Medicine*, 125: 27–32.
- Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshal, D. F., Husmeier, D., and G. McGuire. 2004. TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments, *Bioinformatics* 20(11): 1806–1807.
- Nelson, L., Wallman, J. and M. Dowton. 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 21: 44–52.
- Nelson, L., Wallman, J. and M. Dowton. 2008. Identification of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). *Forensic Science International*, 177(2): 238–247.
- Nylander, J. A. A. 2004. *MrModeltest 2.2*. Program Distributed by the Author, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.

- Oliva, A. 2002. Diptera (Insecta) de interés forense o causante de miasis. Claves artificiales para estadios preimaginales. Pp. 51–60. In: Salomón, O. S. (Ed.). *Actualización en artropodología sanitaria Argentina*. Fundación Mundo Sano, Buenos Aires,
- Priya, P. B., and C. D. Sebastian. 2015. Molecular barcoding of green bottle fly, *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) using COI gene sequences. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(1): 10–12.
- Ratcliffe, S., Webb, D., Weinzievr, R. and Robertson. 2003. H. PCR-RFLP Identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae) - A Generally Applicable Method. *Journal of Forensic Sciences*, 48(4): 19428–2959.
- Reibe, S., Schmitz, J. and B. Madea. 2009. Molecular identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) from Germany. *Parasitology Research*, 106(1): 257–261.
- Restrepo, A. F. S. y G. Fagua, G. 2014. Análisis sucesional de Calliphoridae (Diptera) en cerdo doméstico en pastizales (Cogua, Cundinamarca, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2): 190–197.
- Roe, A., Felix, A. and H. Sperling. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I y II DNA y implicaciones for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics y Evolution*, 44: 325–345.
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.
- Segura, N., Usaquén, W., Sánchez, M., Chuaire, L. y F. Bello. 2009. Succession pattern of cadaverous entomofauna in a semi-rural area of Bogotá, Colombia. *Forensic Science International*, 187: 66–72.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and P. Flook. 1994. Evolution, Weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Annals of the entomological society of America*, 86(6): 651–701.
- Smith, S., Fuerst, P. and K. Mecklenburg. 1996. Mitochondrial DNA sequence of Cytochrome oxidase II from *Calliphora erythrocephala*: Evolution of Blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Annals of the Entomological Society of America*, 89(1): 28–36.
- Solano, J. J., y M. Wolff. 2013. Identificación molecular de califóridos (Diptera : Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(2): 281–290.
- Song, Z., Wang, X. and G. Liang. 2008. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Forensic Science International*, 175: 17–22.
- SPSS Inc. (1999). *SPSS Base 10.0 for Windows*. User's Guide. SPSS Inc., Chicago IL.
- Stamatakis, A. 2006. “RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models”. In *Bioinformatics*, 22(21): 2688–2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P and J. Rougemont. 2008. A Fast Bootstrapping Algorithm for the RAxML Web-Servers, *Systematic Biology*, 57(5): 758–771.
- Stevens, J., and R. Wall. 2001. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Science International*, 120: 116–123.
- Stevens, J. R., West, H. and R. Wall. 2008. Mitochondrial genomes of the sheep blowfly, *Lucilia sericata*, and the secondary blowfly, *Chrysomya megacephala*. *Medical and veterinary Entomology*, 22: 89–91.
- Tan, S., Rizman-Idid, M., Mohd-Aris, E., Kurahashi, H. and Z. Mohamed. 2010. DNA-based characterisation and classification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) in Malaysia. *Forensic Science International*, 199: 43–49.
- Usaquén, W. y G. Camacho. 2003. Ciclo de Vida de *Lucilia sericata* como primera especie colonizadora de cerdo blanco *Sus scrofa* en condiciones medioambientales de la Sabana de Bogotá. *Revista del Instituto Nacional de Medicina Legal*, 17(2): 21–26.
- Usaquén, W. y G. Camacho. 2004. Ciclo de vida de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) como primera especie colonizadora presente en hígado humano realizado en el Instituto Nacional de

- Medicina Legal y Ciencias Forenses. Bogotá 2000. *Revista del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses*, 18(2): 31–36.
- Wallman, J. and S. Donnellman. 2001. The Utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Science International*, 120: 60–67.
- Wells, J. and F. Sperling. 2001. DNA-based identification of forensically important Crysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120: 110–115.
- Wells, J. 2002. FINAL REPORT: *Status and products of National Institute of Justice Research Grant, "Development of DNA-Based Identification Techniques for Forensic Entomology. Phase 2"*, 8/99-7/Olm 99-IJ-CX-0034. Department of Justice Sciences, University of Alabama at Birmingham.
- Wells, J., Wall, R., and J. Stevens. 2007. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *International Journal of Legal Medicine*, 121: 229–233.
- Wolff, M., Uribe, A., Ortiz, A. and P. Duque. 2001. A primary study of forensic entomology in Medellin, Colombia. *Forensic Science International*, 120: 53–59.
- Zaidi, F., Wei, S., Shi, M. and Chen, X. 2011. Utility of multi-gene loci for forensic species diagnosis of blowflies. *Journal of Insect Science*, 11(59): 1–12.
- Zhang, A., Heb, L., Crozier, R., Muster, C. and C. Zhu. 2010. Estimating sample sizes for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 1035–1039.