



Entomología molecular:

Diversidad y filogenia de dípteros de interés médico-legal y veterinario, y su aplicación en situaciones reales.



Maite Gil Arriortua

Memoria para optar al grado de Doctora por la UPV/EHU

JUNIO 2016



Universidad de País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea
Departamento de Zoología y
Biología Celular Animal



Entomología molecular:

Diversidad y filogenia de dípteros de interés médico-legal y
veterinario, y su aplicación en situaciones reales

Molecular entomology:

Diversity and phylogeny of Diptera of medico-legal and
veterinary interest, and their application in real situations

Memoria presentada por

Maite Gil Arriortua

Para optar al grado de Doctora por la UPV/EHU

Leioa, junio 2016

A los que ya no están con nosotros

A mi familia

A Jose

“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”

“Quien nunca ha cometido un error, nunca ha probado algo nuevo”

“Una velada en la que todos los presentes estén absolutamente de acuerdo, es una velada perdida”

Albert Einstein

En este espacio me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la materialización de este trabajo, y también a aquellas que ajenas a este tema han hecho que el paso por esta experiencia haya sido más llevadero.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directoras, la Dra. Marian Martínez de Pancorbo, Catedrática de Biología Celular, y la Dra. Marta Saloña, Profesora Titular de Biología Animal, por la confianza depositada y por su apoyo tanto en mis inicios, como a lo largo de toda mi formación investigadora. Mi más sincero agradecimiento, por aportar cada una su particular sabiduría y experiencia que han hecho posible el desarrollo de esta investigación.

Quisiera agradecer, de manera muy especial, al Dr. Jose Ignacio Saiz Salinas, Catedrático de Biología, que desde un principio me brindó su confianza y apoyo al ofrecerse como soporte para lograr la financiación personal que, durante estos años, me ha permitido realizar esta tesis doctoral.

Mi agradecimiento a la Prof. Dra. Heidi Pfeiffer y al Dr. Stephan Köhnemann al acogirme en el Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Münster en Alemania y proporcionarme su apoyo y confianza durante los meses de mi estancia.

Asimismo, a la Prof. Dra. María Fátima Pinheiro y a la Dra. Laura M. Cainé del Instituto Nacional de Medicina Legal de Oporto, por su colaboración en buena parte de la investigación realizada.

Agradezco especialmente a los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco UPV/EHU, su apoyo profesional y humano. En particular, me gustaría expresar mi gratitud tanto por la formación proporcionada, como por poner a mi disposición los equipos siempre que los he requerido. Especialmente, debo mencionar a la Dra. Maite Álvarez, Técnico del Banco de ADN, y a los Dres. Irati de Miguel y Fernando Rendo, Técnicos del Servicio de Genómica, por su trato cercano y sus acertadas sugerencias.

Quiero agradecer la colaboración de todas las personas que durante el desarrollo de este trabajo han participado desinteresadamente en los muestreos y/o en las identificaciones

morfológicas. En especial, a la Sociedad Cooperativa de Servicios Veterinarios Abeltzain (Álava), al Personal del Instituto de Medicina Legal de Münster, y a aquellos que han colaborado con el laboratorio de Entomología Forense del Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal de la UPV/EHU.

Expreso mi gratitud a los miembros del Tribunal por haber aceptado juzgar este trabajo.

Esta investigación no hubiera llegado a término sin el inestimable apoyo de mis compañeros de laboratorio. La verdad es que han sido muchas las experiencias compartidas: charlas, consejos, comentarios, tanto científicos como personales, que me han proporcionado ideas, apoyo y ánimo. A los que ya estaban cuando me incorporé Sergio, Xabier, Laura, Adrian, Naiara, etc., y a los nuevos fichajes que fueron llegando más tarde, Alejandra, Leire, Jose, David, Andrés, Beatriz, Estibaliz, Miriam, Carolina, etc. Os agradezco el interés mostrado y la ayuda que me habéis ofrecido durante toda esta investigación. Especialmente, a los más veteranos, gracias por vuestra colaboración, amplia experiencia y apoyo en el trabajo diario, que han sido indispensables durante todo este tiempo.

Así mismo, quiero agradecer a mis amigas/os que han estado a mi lado desde mucho antes que esto comenzara, Rebeca, Ana, María, Iratxe, etc.; gracias por vuestro cariño, apoyo y consejos.

Y a mi familia, en ningún caso ajena a este trabajo, siempre cuidando de mí y ayudándome en todo lo posible. A mis aitas, a mi hermano y a Irati, a mis tías y tíos, a mi prima y, en especial, a ti, Jose, por enseñarme a ser como soy y estar presente, de diferentes maneras, y apoyarme en este difícil y, en ocasiones, solitario viaje.

Finalmente, mi manifiesta gratitud a la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) por la concesión de la Ayuda para la Formación de Personal Investigador y de las Ayudas para la Movilidad de Investigadores en Estancias en el extranjero, de las que he disfrutado, y me han permitido llevar a cabo esta investigación.

Nota explicativa

La presente memoria de Tesis Doctoral ha sido elaborada como compendio de contribuciones. Se incluye, además, un resumen general, la introducción que comprende el estado del área de investigación en la que se enmarca el trabajo realizado, el interés (hipótesis) y los objetivos del trabajo, la visión global de los hallazgos, una descripción detallada de la metodología empleada, una discusión global y, por último, las conclusiones generales del trabajo de investigación.

La memoria se ha dividido en dos bloques que abordan el estudio de la entomología molecular forense como ciencia básica para la generación de conocimiento, y como ciencia aplicada en situaciones reales, respectivamente. En general, en cada bloque los apartados en que se recogen las diferentes aportaciones mantienen el contenido del trabajo original en inglés, mientras que el resto de los apartados se han escrito en castellano y/o en inglés de acuerdo con la normativa de presentación vigente para el formato de Tesis Doctoral Internacional.

También se adjunta la versión electrónica de esta memoria con el material suplementario, además de los artículos originales publicados, mencionados a lo largo de la misma.

Explanatory Note

The present Doctoral Thesis memory has been elaborated as a compendium of contributions. It also includes an overall abstract, an introduction comprising the state of the research area in which the work is framed, the interest (hypothesis) and objectives of the work, the overview of the findings, a detailed description about the employed methodology, an overall discussion and, finally, the general conclusions of the research work.

The report has been divided in two blocks that approach the study of forensic molecular entomology as basic science for knowledge generation, and as applied science in real situations, respectively. Generally, in each block the sections that gather the different contributions keep the content of the original work in English, while the rest of the sections have been written in Spanish and/or English according to the current presentation rules for International Doctoral Thesis format.

It also enclosed the electronic version of this report with the supplementary material, in addition to published original papers, mentioned throughout this memory.

Resumen

El prerrequisito crítico en entomología médico-legal y veterinaria es la rápida y precisa identificación de la entomofauna recolectada para estimar el periodo de actividad de los insectos (PAI), que generalmente se aproxima al intervalo *post-mortem* (IPM). El diagnóstico tradicional basado en caracteres externos está dificultado por la similitud morfológica entre especies, especialmente en los estadios inmaduros y especies estrechamente relacionadas. Además, los especímenes dañados o en malas condiciones pueden haber perdido algunos caracteres taxonómicos, haciendo que su identificación sea extremadamente compleja o imposible.

El enfoque basado en el estudio del ADN tiene por objeto asegurar la precisa e inequívoca identificación y delimitación de los insectos, en cualquier etapa de su desarrollo, e independientemente de sus condiciones de preservación. No obstante, la taxonomía molecular de algunas especies sigue sin estar resuelta, por lo que esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de las regiones del genoma que pueden contribuir a una mejor identificación de las especies entomológicas de interés. De forma habitual, el análisis molecular combina la amplificación y secuenciación de ADN. Además, uno de los retos de la biología molecular moderna es el desarrollo e incorporación de nuevas tecnologías, que mejoren el rendimiento de las convencionales. Por ello, el análisis de las curvas de disociación de alta resolución (HRM) está demostrando ser un método de *screening* viable y potente, que nos ofrece un considerable ahorro de tiempo y costes.

La aplicación principal del análisis molecular en el campo forense es el diagnóstico inequívoco de insectos a nivel de especie, si bien, en determinadas situaciones, los insectos presentan también un gran interés como reservorio de ADN de vertebrados. Así, su contenido digestivo, con ADN del hospedador (fuente de alimento), puede emplearse para la identificación del cadáver a nivel específico, o, incluso, individual (en el caso de restos humanos), siendo de gran utilidad cuando ha sido reubicado o concurren más de uno.

En este contexto, nuestro estudio explora la ciencia entomológica desde un punto de vista molecular, tratando aspectos clave en las pesquisas médico-legales y veterinarias.

Inicialmente, el presente trabajo de Tesis se centró en evaluar la idoneidad, eficacia y precisión de los análisis basados en marcadores de ADN mitocondrial y nuclear (ADNmt y ADNnu) para la identificación de dípteros del centro y sur de Europa con interés médico-legal y veterinario. Con este fin, examinamos los siguientes marcadores de ADNmt: la región *barcode* del citocromo c oxidasa subunidad I (COI *barcode*, 658 pb), un fragmento de 616 pb del mismo gen (COI, 616 pb), el citocromo c oxidasa subunidad II (COII, 725-731 pb), el citocromo b (Cyt-b, 307 pb) y una región (Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1, 495-496 pb) que incluye un fragmento no codificante situado entre el ARN transferente para la serina (ARNt^{ser}) y la subunidad I de la nicotinamida deshidrogenasa (ND1). Asimismo, estudiamos la región del segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 310-352 pb), además de la que contiene el primer y segundo espaciador transcrito interno (ITS12, 1081-1083 pb) del ADN ribosómico nuclear (ADNr). Hemos investigado las familias Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Phormia regina*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar*, *L. illustris* y *L. bufonivora*), Muscidae (*Musca autumnalis*) y Oestridae (*Hypoderma bovis*). Globalmente, los Calliphoridae estudiados son los indicadores IPM más comunes del centro y sur de Europa, excluyendo *L. bufonivora* que es parásito obligado de los anfibios. En general, los resultados revelaron la robustez tanto de COI (616 pb) como de Cyt-b (307 pb) como herramientas diagnósticas. Estos *loci* acumularon mayor variabilidad nucleotídica que el resto de marcadores mitocondriales analizados, posibilitando la diferenciación más precisa entre especies. Sin embargo, únicamente la región ITS2 (310-352 pb) permitió delinear satisfactoriamente los límites de las especies estudiadas, incluso dentro de los géneros más complejos (ej. *Lucilia*). De esta manera, demostramos la conveniencia del análisis multi-región para el diagnóstico inequívoco a nivel específico, en particular para resoluciones forenses, recomendando la selección de *loci* mitocondriales como primera aproximación taxonómica en las muestras desconocidas, así como de los nucleares para lograr el diagnóstico a nivel específico de las especies estrechamente relacionadas. Cabe destacar que el *locus* COI dispone de gran cantidad de secuencias en las bases de datos moleculares, lo que supone una ventaja cuando se trabaja con especies poco estudiadas, como son los dípteros

miásicos. Con nuestra contribución incrementamos el número de secuencias nucleotídicas de especies de dípteros necrófagos y miásicos disponibles en GenBank. Esta aportación resulta de incuestionable valor considerando la escasez de datos sobre estas especies en el sur de Europa y, más concretamente, en la Península Ibérica.

Posteriormente, nuestro propósito fue desarrollar y validar un ensayo basado en el análisis HRM de la región nuclear ITS2 (310-343 pb) (HRM-ITS2), como herramienta diagnóstica alternativa para la diferenciación inequívoca de dípteros. El ensayo se centró en siete especies de califóridos (*Ch. albiceps*, *L. ampullacea*, *L. sericata*, *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. caesar* y *L. illustris*) con gran importancia médico-legal y veterinaria en el sur de Europa. Los perfiles de disociación obtenidos permitieron la diferenciación de las siete especies, en concordancia con los datos de secuenciación y las muestras de referencia. Los resultados demostraron la robustez del novedoso análisis HRM-ITS2 para la diferenciación rápida y fiable de las especies necrófagas, utilizando un único par de *primers*, con un sistema en un paso en tubo cerrado y sin procesamiento post-amplificación. De esta forma, se reduce el riesgo de contaminación, aspecto esencial cuando se trabaja con evidencias forenses.

A continuación, el objetivo fue utilizar el análisis molecular convencional como herramienta alternativa, viable y efectiva, para el diagnóstico de insectos en diferentes situaciones. Con este propósito utilizamos el *locus* COI *barcode* (658 pb), marcador estándar para la identificación de insectos, del que existe gran cantidad de información nucleotídica disponible. La primera actuación consistió en realizar una identificación molecular de un espécimen inmaduro en malas condiciones y con diagnóstico morfológico no concluyente. Gracias al análisis basado en ADN, se pudo clasificar de forma inequívoca como *M. autumnalis*, registrándose por primera vez esta especie como parásito accidental asociado a una miasis traumática en un individuo de la especie *Bos taurus* de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV, Álava). En la segunda actuación se planteó el análisis molecular como control de calidad en estudios a gran escala. Se detectaron incongruencias entre el diagnóstico morfológico y el molecular de un espécimen que, finalmente, se

identificó, según su genética, como *L. bufonivora*. Esto permitió corroborar la presencia de dicha especie en la CAPV. Todo lo anteriormente expuesto puso en evidencia la necesidad de complementar la taxonomía tradicional con la molecular para evitar incertidumbres que pudieran conducir a errores judiciales, particularmente en especies próximas como ocurre con las del género *Lucilia*.

Más adelante, nuestra meta fue recuperar y analizar, de manera efectiva, el ADN de la fuente de alimento contenido en el tracto digestivo de larvas procedentes de casos reales. Para ello, se recogieron larvas de cadáveres humanos en diferentes estados de descomposición. La identificación individual humana se hizo con sistemas comerciales de amplificación de STRs (Mentype® Nonaplex^{OS}, AmpFℓSTR® NGM™ y AmpFℓSTR® MiniFiler™), y el diagnóstico a nivel específico con el *locus* Cyt-b (307 pb). Los resultados demostraron que el aspecto y tamaño de los buches influye en la calidad y cantidad de ADN que se obtiene. Los *loci* STRs amplificados coincidieron con los perfiles de referencia. El marcador Cyt-b (307 pb) mostró resultados satisfactorios, incluso en los casos en los que falló el genotipado de *loci* STRs.

Finalmente, considerando la valiosa información que los artrópodos pueden proporcionar y la importancia decisiva de los pasos iniciales de recolección y preservación, hemos revisado las directrices sobre los procedimientos a seguir durante una investigación criminal para garantizar la validez de las evidencias entomológicas ante un Tribunal de Justicia. Adicionalmente, se adjunta un formulario para la recogida, de forma sencilla, de la información más relevante sobre las evidencias objeto de estudio. Estos documentos han sido facilitados en versión bilingüe (Castellano/Euskera), y siguen los estándares internacionales.

Abstract

The critical prerequisite in medico-legal and veterinary entomology is the rapid and accurate identification of collected entomofauna to estimate the period of insect activity (PIA), which usually approximates the *post-mortem* interval (PMI). Traditional diagnosis based on external characters is hampered by the morphological similarities between species, especially in immature stages and closely related species. Furthermore, specimens damaged or in poor conditions may have lost several taxonomic characters, making their identification extremely difficult or impossible.

The approach based on the study of DNA aims to ensure precise and unequivocal identification and delimitation of insects, in any stage of development, and regardless the preserved conditions. Nevertheless, the molecular taxonomy of some species remains unresolved; therefore, this Doctoral Thesis has focused on the study of genome regions that can contribute to a better identification of entomological species of interest. Habitually, molecular analysis combined DNA amplification and sequencing. Moreover, one of the challenges of modern molecular biology is the development and introduction of new technologies, which improve the performance of the conventional ones. Therefore, high-resolution melting analysis (HRM) is exhibiting to be a feasible and powerful screening method, which offers us a considerable time and cost saving.

The main application of molecular analysis in the forensic field is the unequivocal insect diagnosis at species level. Moreover, in certain situations, insects have also a great interest as a reservoir of vertebrates DNA. Thus, their gut-content, with host DNA (food resource), may be used to identify the cadaver at specific, or even at individual level (in case of human remains), being of great usefulness when it has been relocated or concur more than one.

In this context, our study explores the entomological science from a molecular point of view, addressing key aspects in medico-legal and veterinary inquiries.

Initially, the present Thesis work focused on evaluating the suitability, efficacy and accuracy of analysis based on mitochondrial and nuclear DNA (mtDNA and nuDNA) for identification of Central and Southern European Diptera of medico-legal and veterinary interest. To this aim, we examined the following markers of mtDNA: the barcode region of cytochrome c oxidase subunit I (COI barcode, 658 bp), a 616 bp fragment of the same gene (COI, 616 bp), the cytochrome c oxidase subunit II (COII, 725-731 bp), the cytochrome b (Cyt-b, 307 bp) and a region (Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1, 495-496 bp) that includes a non-coding fragment located between serine transfer RNA (tRNA^{ser}) and nicotinamide dehydrogenase subunit 1(ND1). Moreover, we also studied the second internal transcribed spacer (ITS2, 310-352 bp), in addition to that included the first and second internal transcribed spacer (ITS1, 1081-1083 bp) of nuclear ribosomal DNA (rDNA). We worked with Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Phormia regina*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar*, *L. illustris* and *L. bufonivora*), Muscidae (*Musca autumnalis*) and Oestridae (*Hypoderma bovis*) families. Overall, the studied Calliphoridae are the most common PMI indicators in Central and Southern Europe, excluding *L. bufonivora* which is an obligate parasite of amphibians. In general, the results revealed the robustness both COI (616 bp) and Cyt-b (307 bp) as diagnostic tools. These *loci* accumulated higher nucleotide variability than the remaining analyzed mitochondrial markers, enabling more precise and reliable differentiation between species. However, only the ITS2 (310-352 bp) region allowed successfully delineating the limits of studied species, even within more complex genera (i.e. *Lucilia*). Thus, we demonstrated the convenience of multi-region analysis for unambiguous diagnosis at species level, in particular for forensic resolutions, recommending the selection of mitochondrial *loci* as first taxonomic approach in the unknown samples, as well as of nuclear to achieve diagnostics at specific level of closely related species. Notice that the COI *locus* has a lot of sequences in molecular databases, which is an advantage when working with poorly studied species, such as myiasic Diptera. With our

contribution we increase the number of nucleotide sequences of necrophagous and myiasic Diptera species available in GenBank. This is an invaluable point considering the scarcity of data about these species in Southern Europe and, particularly, in the Iberian Peninsula.

Afterwards, we aimed on develop and validate an assay based on the HRM analysis of the ITS2 (310-343 bp) nuclear region (HRM-ITS2), as an alternative diagnostic tool for unequivocal differentiation of Diptera. The assay purposed in seven blowfly species (*Ch. albiceps*, *L. ampullacea*, *L. sericata*, *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. caesar* and *L. illustris*) with great medico-legal and veterinary importance in Southern Europe. The obtained melting profiles allowed the differentiation of the seven species, matching the sequencing data and the reference samples. Results demonstrated the robustness of the novel HRM-ITS2 analysis to differentiate fast and reliably carrion-breeding species, using a single primer pair, in one-step close-tube system and without post-amplification processing. In this way, the risk of contamination is reduced, essential issue when working with forensic evidence.

Subsequently, the objective was to utilize the conventional molecular analysis as a, feasible and effective, alternative tool for insect diagnosis in different situations. To this end we used the COI barcode (658 bp) *locus*, the standard marker for insect identification, from which has available a large amount of nucleotide information. First action consisted in perform a molecular identification of an immature specimen in poor conditions and with inconclusive morphological diagnosis. DNA-based analysis enables the unambiguous classification as *M. autumnalis*, being this species recorded for the first time as an accidental parasite associated with a traumatic myiasis in an individual of *Bos taurus* species from the Basque Country (Álava). A second action was arisen to molecular analysis as quality control in large-scale studies. Inconsistencies were detected between the morphological and molecular diagnosis of one specimen that was finally identified as *L. bufonivora* based on its genetics. This

corroborates the presence of this species in the Basque Country. All the foregoing, highlighted the need to complement traditional taxonomy with molecular techniques to avoid uncertainties that may lead to justice miscarriages, particularly in close species as it happens within the *Lucilia* genus.

Later, our goal was to recover and analysis, in an effective way, the DNA of food resource contained in the digestive tract of larvae from real caseworks. To do this, larvae were collected from human cadavers at different stages of decomposition. Human individual identification was performed using STRs amplification commercial systems (Mentype® Nonaplex^{OS}, AmpFℓSTR® NGM™ and AmpFℓSTR® MiniFiler™), and the diagnostic at species level with the Cyt-b (307 bp) *locus*. The results demonstrated that appearance and size of the crops influence the quality and quantity of DNA obtained. The amplified STRs *loci* matched the reference profiles. The Cyt-b (307 bp) marker exhibited satisfactory results, even in cases in which failed the *loci* STRs genotyping.

Finally, considering the valuable information that arthropods can provide and the critical importance of the collection and preservation initial steps, we have reviewed guidelines on the procedures to be followed during a criminal investigation to guarantee the entomological evidence validity in a Court of Justice. Additionally, a registration form is attached in order to easily record further essential information about evidence to be taken under consideration. These documents have been made available in bilingual version (Spanish/Basque), and follow the international standards.

Índice / Index

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Contextualización	3
1.2 Entomología molecular	9
1.2.1 Antecedentes	9
1.2.2 Estado actual	13
1.3 Aplicaciones de la entomología molecular	19
1.3.1 Identificación específica	19
1.3.2 Genética de poblaciones y análisis filogenético	26
1.3.3 Análisis del contenido digestivo de insectos	29
1.3.4 Estudios de expresión génica	32
1.4 Perspectivas en entomología molecular	36
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS / HYPOTHESIS AND OBJECTIVES	39
III.VISIÓN GLOBAL DEL TRABAJO / GLOBAL VIEW OF THE WORK	55

IV. METODOLOGÍA	65
4.1 Muestreo, cría y procesamiento de dípteros	67
4.2 Identificación morfológica de insectos	69
4.3 Identificación molecular de insectos	70
4.3.1 Extracción, limpieza y cuantificación de ADN	70
4.3.2 Diseño de <i>primers</i> y optimización de la amplificación PCR	71
4.3.3 Secuenciación	72
4.3.3.1 <i>Amplificación PCR, electroforesis en gel y limpieza de amplificados</i>	72
4.3.3.2 <i>PCR de secuenciación, limpieza y electroforesis capilar</i>	75
4.3.3.3 <i>Análisis de datos</i>	75
4.3.4 HRM (<i>high-resolution melting</i>)	77
4.3.4.1 <i>Extracción de ADN</i>	77
4.3.4.2 <i>Amplificación de ADN, secuenciación de productos amplificados y análisis de datos</i>	77
4.3.4.3 <i>PCR a tiempo real y análisis HRM</i>	77
4.3.4.4 <i>Validación del ensayo del análisis HRM</i>	78
4.4 Identificación molecular de la fuente de alimento	80
4.4.1 Sacrificio, examen morfológico y selección de muestras	80
4.4.2 Extracción y cuantificación de ADN de la fuente de alimento	81
4.4.3 Amplificación de ADN y genotipado de STRs	81
4.4.4 Amplificación de ADN y análisis de secuencias	82

V. BLOQUE / BLOCK I. Ciencia básica: Caracterización, variabilidad y filogenia de dípteros de interés médico-legal y veterinario / Basic science: Characterization, variability and phylogeny of Diptera of medico-legal and veterinary interest.	85
5.1 Aportación / Contribution I.I	89
El gen mitocondrial Cyt-b: Herramienta diagnóstica para los Calliphoridae de interés forense / The mitochondrial Cyt-b gene: Diagnostic tool for Calliphoridae of forensic interest <i>Forensic Science International</i> , 2013, 228: 132-136	
5.1.1 Resumen / Abstract	95
5.1.2 Introduction	97
5.1.3 Materials and methods	98
5.1.3.1 <i>Samples</i>	98
5.1.3.2 <i>DNA extraction</i>	99
5.1.3.3 <i>PCR amplification</i>	99
5.1.3.4 <i>Sequencing analysis</i>	99
5.1.3.5 <i>Statistical analysis</i>	100
5.1.4 Results and discussion	100
5.1.4.1 <i>Analysis of intra-specific variability</i>	101
5.1.4.2 <i>Analysis of inter-specific variability</i>	103
5.1.4.3 <i>Homology of the Cyt-b gene in species of Diptera</i>	104
5.1.5 Summary	106

5.2 Aportación / Contribution I.II	107
Eficacia diagnóstica de los marcadores moleculares COI <i>barcode</i> , COI (616 pb), Cyt-b, Cyt-b-ARNt ^{ser} -ND1 e ITS2 en los Calliphoridae del centro de Europa (Alemania) / Diagnostic efficacy of the COI barcode, COI (616 bp), Cyt-b, Cyt-b-tRNA ^{ser} -ND1 and ITS2 molecular markers in Calliphoridae from Central Europe (Germany)	
<i>Forensic Science International</i> , 2014 , 242: 274-282	
5.2.1 Resumen / Abstract	113
5.2.2 Introduction	115
5.2.3 Materials and methods	117
5.2.3.1 <i>Specimen collection and morphological identification</i>	117
5.2.3.2 <i>DNA extraction, PCR amplification and sequencing</i>	117
5.2.3.3 <i>DNA sequences processing and phylogenetic analysis</i>	119
5.2.4 Results and discussion	120
5.2.4.1 <i>Analysis of inter-specific variability of the five studied species</i>	120
5.2.4.2 <i>Analysis of homology and phylogeny in Calliphoridae species</i>	123
5.2.5 Summary	131

5.3 Aportación / Contribution I.III	133
Efectividad de los marcadores moleculares COI <i>barcode</i> , Cyt-b e ITS2 en la identificación de las especies del género <i>Lucilia</i> del sur de Europa (Portugal) / Effectiveness of the COI barcode, Cyt-b and ITS2 molecular markers in <i>Lucilia</i> genus species identification from Southern Europe (Portugal)	
<i>Forensic Science International</i> , 2015 , 257: 393-397	
5.3.1 Resumen / Abstract	139
5.3.2 Introduction	141
5.3.3 Materials and methods	142
5.3.3.1 <i>Specimen collection, morphological identification and DNA extraction</i>	142
5.3.3.2 <i>DNA polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing</i>	143
5.3.3.3 <i>Data processing and phylogenetic analysis</i>	143
5.3.4 Results and discussion	144
5.3.4.1 <i>Intra-specific analysis of the seven studied species</i>	144
5.3.4.2 <i>Inter-specific analysis of the seven studied species</i>	146
5.3.4.3 <i>Pairwise divergence analysis within the Calliphoridae family</i>	147
5.3.5 Summary	150

5.4 Aportación / Contribution I.IV	151
Los marcadores moleculares COI <i>barcode</i> , COI (616 pb), COII, ITS2 e ITS12, y sus ventajas para el diagnóstico de dípteros miásicos (Oestridae, Calliphoridae y Muscidae) del sur de Europa (CAPV) / The COI barcode, COI (616 bp), COII, ITS2 and ITS12 molecular markers, and their advantages for myiasis-causing dipterans diagnosis (Oestridae, Calliphoridae and Muscidae) from Southern Europe (Basque Country)	
<i>Journal of Medical Entomology</i> (enviada / submitted)	
5.4.1 Resumen / Abstract	157
5.4.2 Introduction	159
5.4.3 Materials and methods	161
5.4.3.1 <i>Study area, specimen collection and morphological identification</i>	161
5.4.3.2 <i>DNA extraction, PCR amplification and sequencing</i>	162
5.4.3.3 <i>DNA sequences processing and data analysis</i>	163
5.4.4 Results and discussion	164
5.4.4.1 <i>Brief argument about cases</i>	164
5.4.4.2 <i>Phylogenetic and similarity analyses</i>	165
5.4.5 Summary	170

5.5 Aportación / Contribution I.V	171
Caracterización de los marcadores moleculares COI <i>barcode</i> , COI (616 pb), Cyt-b e ITS2 en Calliphoridae del sur de Europa (CAPV) / Characterization of the COI barcode, COI (616 bp), Cyt-b and ITS2 molecular markers in Calliphoridae from Southern Europe (Basque Country)	
<i>International Journal of Legal Medicine</i> (enviada / submitted)	
5.5.1 Resumen / Abstract	177
5.5.2 Introduction	179
5.5.3 Materials and methods	181
5.5.3.1 <i>Specimen collection and morphological identification</i>	181
5.5.3.2 <i>DNA extraction, PCR amplification and sequencing</i>	182
5.5.3.3 <i>Data processing and analysis</i>	183
5.5.4 Results and discussion	183
5.5.4.1 <i>Intra-specific analysis of the studied specimens</i>	184
5.5.4.2 <i>Inter-specific analysis of the studied specimens</i>	186
5.5.4.3 <i>Pairwise divergence analysis for the studied Calliphoridae species</i>	187
5.5.5 Summary	192

5.6 Aportación / Contribution I.VI	193
Nuevas técnicas analíticas: <i>High-resolution melting analysis</i> (HRM) / New analytical techniques: High-resolution melting analysis (HRM)	
<i>Forensic Science International</i> (enviada / submitted)	
5.6.1 Resumen / Abstract	199
5.6.2 Introduction	201
5.6.3 Materials and methods	203
5.6.3.1 <i>DNA extraction</i>	203
5.6.3.2 <i>DNA amplification, sequencing and data processing</i>	204
5.6.3.3 <i>Real-time PCR, high-resolution melting (HRM) analysis and data processing</i>	204
5.6.3.4 <i>Validation of HRM-ITS2 analysis assay</i>	205
5.6.3.4.1 <i>Randomized blind study</i>	205
5.6.3.4.2 <i>Specificity assay</i>	206
5.6.3.4.3 <i>Sensitivity assay</i>	206
5.6.3.4.4 <i>Variability assay</i>	206
5.6.4 Results and discussion	206
5.6.5 Summary	210

VI. BLOQUE / BLOCK II. Entomología molecular aplicada / Applied molecular entomology	213
6.1 Aportación / Contribution II.I	217
Identificación molecular como alternativa resolutive para muestras en malas condiciones / Molecular identification as a resolute alternative for samples in bad conditions	
<i>Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa, 2014, 55: 312-316</i>	
6.1.1 Resumen / Abstract	223
6.1.2 Introduction	225
6.1.3 Materials and methods	227
6.1.3.1 Case details	227
6.1.3.2 Morphological identification	228
6.1.3.3 Molecular identification: DNA extraction, amplification and sequencing	228
6.1.4 Results and discussion	229
6.1.5 Summary	231

6.2 Aportación / Contribution II.II	233
Diagnóstico molecular como control de calidad / Molecular diagnosis as quality control	
<i>Boletín de la Asociación española de Entomología, 2014, 38: 25-31</i>	
6.2.1 Resumen / Abstract	239
6.2.2 Introducción	241
6.2.3 Materiales y métodos	242
6.2.3.1 <i>Identificación morfológica</i>	242
6.2.3.2 <i>Identificación molecular</i>	243
6.2.3.2.1 <i>Extracción de ADN, amplificación y secuenciación</i>	243
6.2.4 Resultados y discusión	244
6.2.5 Sumario	245

6.3 Aportación / Contribution II.III	247
Identificación a nivel específico e individual de cadáveres mediante el contenido digestivo de larvas necrófagas en casos reales / Identification at specific and individual level of cadavers by means of the digestive content of necrophagous larvae in real cases	
<i>International Journal of Legal Medicine</i> (enviada / submitted)	
6.3.1 Resumen / Abstract	253
6.3.2 Introduction	255
6.3.3 Materials and methods	256
6.3.3.1 <i>Sampling, selection and dissection</i>	256
6.3.3.2 <i>Human DNA extraction and quantification</i>	257
6.3.3.3 <i>DNA amplification and STR genotyping</i>	257
6.3.3.4 <i>DNA amplification and nucleotide sequencing</i>	258
6.3.4 Results and discussion	258
6.3.5 Summary	260

6.4 Aportación / Contribution II.IV	263
Protocolo de actuación en entomología forense (bilingüe: Castellano / Euskera) / Action protocol in forensic entomology (bilingual: Spanish / Basque)	
<i>Eguzkilore</i> , 2014, 28: 275-286	
6.4.1 Resumen / Abstract	267
6.4.2 Introducción /	269
Sarrera	278
6.4.3 Protocolo de actuación /	271
Jarduera protokoloa	279
6.4.3.1 <i>Equipamiento, herramientas y conservantes /</i>	271
<i>Ekipamendu, tresna eta kontserbagarriak</i>	280
6.4.3.2 <i>Toma de muestras entomológicas /</i>	272
<i>Lagin entomologikoak bilketa</i>	281
6.4.3.3 <i>Método de preservación de evidencias entomológicas /</i>	275
<i>Ebidentzia entomologikoak preserbatzeko metodoa</i>	284
6.4.4 Formulario para la toma de muestras en cadáveres humanos /	
Giza gorpuetan lagin bilketarako formularioa	286

VII. DISCUSIÓN GENERAL / GENERAL DISCUSSION	291
7.1 Identificación molecular de dípteros /	293
Molecular identification of Diptera	339
7.1.1 Biología y etología de dípteros de interés médico-legal y veterinario /	294
Biology and ethology of Diptera of medico-legal and veterinary interest	340
7.1.2 Identificación molecular convencional /	300
Conventional molecular identification	345
7.1.2.1 <i>Marcadores mitocondriales y nucleares en la identificación de especies de dípteros /</i>	300
<i>Mitochondrial and nuclear markers in Diptera species identification</i>	346
7.1.2.2 <i>Análisis de la variabilidad intra-específica /</i>	304
<i>Analysis of intra-specific variability</i>	349
7.1.2.3 <i>Análisis de la variabilidad inter-específica /</i>	307
<i>Analysis of inter-specific variability</i>	352
7.1.2.4 <i>Filogenia de dípteros de interés médico-legal y veterinario /</i>	309
<i>Phylogeny of Diptera of medico-legal and veterinary interest</i>	354
7.1.2.4.1 <i>Especies hermanas del género Lucilia /</i>	312
<i>Sister species of Lucilia genus</i>	357
7.1.2.4.2 <i>Filogenia en especies miásicas /</i>	316
<i>Myiasic species phylogeny</i>	361
7.1.2.5 <i>Divergencia entre pares en dípteros de interés médico-legal y veterinario /</i>	318
<i>Pairwise divergence in Diptera of medico-legal and veterinary interest</i>	362
7.1.2.6 <i>Problemática del ADN barcode y las bases de datos /</i>	323
<i>DNA barcode and databases problematic</i>	368
7.1.2.7 <i>Síntesis /</i>	326
<i>Synthesis</i>	370

7.1.3 Nuevas técnicas de identificación molecular /	327
New techniques on molecular identification	371
7.2 Identificación a nivel específico e individual de cadáveres utilizando el contenido digestivo de dípteros inmaduros en casos reales /	330
Identification at specific and individual level of cadavers using digestive content of immature Diptera in real cases	374
7.3 Protocolo de actuación en entomología forense /	335
Action protocol in forensic entomology	378
VIII. CONCLUSIONES GENERALES / GENERAL CONCLUSIONS	383
IX. BIBLOGRAFÍA / REFERENCES	389
ANEXO / ANEXE A: Difusión de resultados / Results dissemination	417
ANEXO / ANEXE B: Perspectivas futuras / Future perspectives	437

I. Introducción

1.1. Contextualización

Los insectos son el grupo de individuos más numeroso y diverso de la Tierra, suponiendo más de la mitad de las especies conocidas del Reino Animal [Melic 1997; Benecke 2001]. Adaptados a todo tipo de ambientes y estrategias de alimentación, constituyen una pieza clave en el mantenimiento de la estabilidad de los ecosistemas [Peralta *et al.* 2013].

La Humanidad ha sido consciente de su existencia desde tiempos inmemoriales, por encontrarse algunas especies asociadas a problemas, tanto de índole económica como sanitaria o ambiental, comúnmente reconocidos como plagas [Magaña 2001], que se han ido sucediendo a lo largo de la Historia. Sin embargo, otras muchas especies nos aportan grandes beneficios, no solo directos, como la producción de miel o de jalea real, sino también indirectos, como la polinización de cultivos y el reciclado de materia orgánica, entre otros [Ssymank *et al.* 2008; Peralta *et al.* 2013]. Además, la ausencia de insectos necrófagos puede provocar un desequilibrio medioambiental, y desencadenar graves problemas de salud pública, como ocurrió en Australia con la introducción de la ganadería, al no estar adaptados los insectos coprófagos autóctonos al consumo de los excrementos de grandes herbívoros [Mittal 2005]. De hecho, los insectos necrófagos y en especial los dípteros, son de gran interés al ser los principales responsables de la reducción de materia orgánica en descomposición, incluidos los restos cadavéricos, por lo que, indirectamente, se encargan de contener las enfermedades infecciosas asociadas a la descomposición bacteriana que suelen estar ligadas a dichos ambientes [Fleischmann *et al.* 2004; Peralta *et al.* 2013]. Por su asociación directa con la materia orgánica en putrefacción, el estudio de la entomofauna necrófaga es fundamental para la aplicación de la entomología a la biología forense.

En la actualidad, la entomología forense es la ciencia que estudia la interacción de los insectos y de otros artrópodos, con el ser humano, como apoyo a problemas legales, ya

I. Introducción

sean civiles, principalmente económicos (infestaciones y plagas) [Catts & Goff 1992; Byrd & Tomberlin 2001; Arnaldos *et al.* 2006], o tipificados como delitos en el Código Penal (muertes violentas, abusos, malos tratos o abandonos, etc.) (**Tabla 1**) [Hall 1990; Benecke & Lessig 2001]. Esta disciplina forense es la encargada de examinar la fauna entomológica, con el objetivo de extraer información, que contribuya a precisar el tiempo, lugar y modo en el que ha tenido lugar un suceso [Anderson 1997; Campobasso & Introna 2001; Greenberg & Kunich 2002], pudiendo incluso detectar la existencia de desplazamientos, abusos y negligencias, o el uso de drogas [Benecke & Lessig 2001; Introna *et al.* 2001; Amendt *et al.* 2007, 2011; Gosselin *et al.* 2011]. Así, al igual que las huellas dactilares, pelos, fibras o muchos otros vestigios biológicos, las muestras entomológicas son evidencias físicas que forman parte del conjunto de evidencias en los procesos legales [Hall 1990; Amendt *et al.* 2007, 2011].

Tabla 1. La entomología forense en apoyo a problemas legales.

Económicos				Delitos		
Infestaciones, Plagas o Contaminaciones				Muertes violentas	Abusos o Negligencias	Tráfico ilícito
Inmuebles	Mercancías	Cultivos	Animales	Homicidios Asesinatos	Miasis en Individuos dependientes	Vehículos Mercancías Animales
Control de calidad						

En este sentido, los estudios entomológicos de los artrópodos en general, y de las especies necrófagas en particular, son aplicables en áreas de investigación estratégicas y con elevada implicación social como:

- La medicina y veterinaria forenses, en las que se estudian la diversidad específica y los tiempos de desarrollo de los insectos necrófagos para determinar el lugar, las circunstancias del suceso y el periodo de actividad de los insectos (PAI), próximo al intervalo *post-mortem* (IPM) [Lord 1990; Amendt *et al.* 2007]. En esta línea, en los casos en los que el PAI supera el IPM pueden detectarse negligencias o abusos, asociados a infestaciones miásicas *ante-mortem* [Benecke *et al.* 2004; Amendt *et al.* 2007, 2011; GilArriortua *et al.* 2014c]. Estas miasis, o infestaciones de vertebrados vivos por larvas de dípteros, son frecuentes tanto en individuos

dependientes (niños, enfermos o ancianos), como en animales (ganado, mascotas, etc.) [Zumpt 1965; Stevens & Wall 1997b; Soler-Cruz 2000; Benecke & Lessig 2001; Benecke *et al.* 2004; Amendt *et al.* 2011]. Asimismo, los estudios entomotoxicológicos pueden revelar muertes por envenenamiento o por sobredosis [Introna *et al.* 2001; Gosselin *et al.* 2011]. Por otra parte, el análisis del contenido digestivo de las larvas de estos insectos hace posible, incluso, la identificación de la víctima y la detección de desplazamientos en los casos en los que, deliberadamente, el cadáver ha sido retirado del lugar del suceso [Di Luise *et al.* 2008; Kondakci *et al.* 2009; Amendt *et al.* 2011].

- La medicina terapéutica, con la terapia larvaria que utiliza especies necrófagas, como *Lucilia sericata*, para el tratamiento de heridas gangrenadas, de lesiones crónicas de difícil cicatrización o del tejido necrosado de los tumores [Fleischmann *et al.* 2004; Parnés & Lagan 2007].
- El medioambiente y la salud pública, en los que las especies necrófagas juegan un papel fundamental en el reciclado de materia orgánica en descomposición, en la contención de agentes patógenos y en la polinización de algunos vegetales, entre otros procesos [Ssymank *et al.* 2008; Peralta *et al.* 2013]. Por otra parte, la estimación del tiempo y tipo de contaminación, permite fundamentar reclamaciones a empresas o particulares, responsables del producto en el momento de la contaminación (alimentos, materias primas, muebles, inmuebles, etc.).

En los últimos años, la entomología forense se ha constituido como una herramienta fundamental para los equipos de investigación criminal, por su decisiva aportación a los procesos judiciales.

En el ámbito médico-legal, el papel más relevante de esta ciencia forense es la estimación del período de actividad de los insectos (PAI), que suele aproximarse al intervalo *post-mortem* (IPM) [Greenberg 1991; Dadour *et al.* 2001; Amendt *et al.*

1. Introducción

2007], en casos de homicidio, suicidio o muerte violenta. Habitualmente, para realizar estimaciones a corto plazo, los forenses utilizan métodos de patología clásicos, basados en cambios fisiológicos, como la disminución de la temperatura, el *livor mortis* o el *rigor mortis* [Kaatsch *et al.* 1993; Amendt *et al.* 2011; Kaliszan 2013]. Sin embargo, una vez transcurridas 48-72 horas, cuando la descomposición activa ha comenzado y los métodos de la patología forense ya no son aplicables [Grassberger & Reiter 2002], la interpretación de la fauna necrófaga se establece como el procedimiento más fiable. La estimación del PAI (o IPM) se hace, a corto-medio plazo, según el grado de desarrollo de los elementos faunísticos más relevantes, como son los colonizadores primarios (principalmente califóridos inmaduros) y, a largo plazo, según los patrones de sucesión de la fauna artropodiana que se encuentra en el cadáver o en relación con éste (**Fig. 1**) [Catts & Goff 1992; Turchetto *et al.* 2001; Amendt *et al.* 2011].

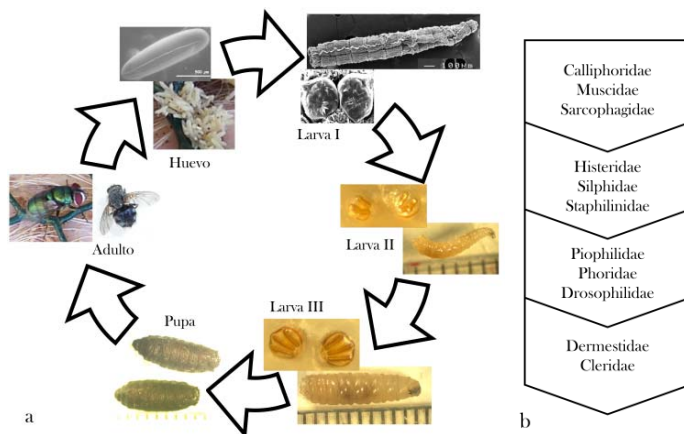


Fig. 1. Estimación del IPM: A corto-medio plazo (**a**): Biología del desarrollo, con las diferentes fases o estadios; A largo plazo (**b**): Modelo de sucesión faunística, con las diferentes oleadas.

En este punto, es importante considerar que tras la muerte se producen una serie de cambios metabólicos y transformaciones fisicoquímicas que convierten al cadáver en un biotopo único y dinámico, al que se asocian diferentes grupos ecológicos que se suceden según el estado de descomposición del mismo (**Tabla 2**) [Magaña 2001; Wolff *et al.* 2001] y que constituyen una biocenosis propia, diferente de la existente en el ecosistema circundante.

Tabla 2. Etapas básicas de la descomposición cadavérica adoptadas por convenio para animales, y asimilables a las descritas en cadáveres humanos (cromática, enfisematosa, coligulativa y esquelética) por Gisbert-Calabuig (1991). La duración en días es aproximada y dependiente de factores ambientales.

Estado	Duración (días)	Descripción
Fresco	0-2	Desde la muerte hasta la hinchazón evidente
Enfisematoso o hinchado	2-12	Hinchazón evidente, aspecto abombado
Descomposición activa	12-20	Salida de gases y fluidos por la rotura de la piel
Descomposición avanzada	20-40	Dsecación evidente solo piel, cartílago y hueso
Esqueletización	40-50	Restos de pelo y huesos

Atendiendo a sus características biológicas y relaciones tróficas, la clasificación de la entomofauna sarcosaprófaga incluye los siguientes grupos: necrófagos (llegan en primer lugar y se alimentan directamente de tejidos cadavéricos), necrófilos (muestran afinidad por entornos cadavéricos y suelen alimentarse de los necrófagos), omnívoros (se alimentan tanto del cadáver como de la fauna asociada), oportunistas o accidentales (utilizan el cadáver como refugio o están de paso) (**Fig. 2**) [Leclercq 1978; Smith 1986; Braack 1987; Amendt *et al.* 2011].

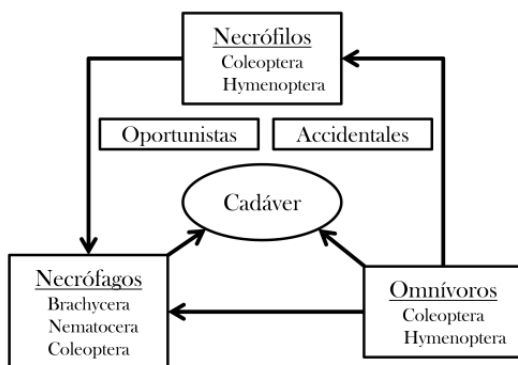


Fig. 2. Clasificación de la entomofauna sarcosaprófaga según sus hábitos de alimentación. Adaptado de Arnaldos *et al.* (2005).

En este contexto, los estudios faunísticos realizados por Mégnin en 1894 dieron a conocer cómo los insectos que aparecen en un cadáver siguen un patrón de sucesión característico [Mégnin 1894], produciéndose secuencialmente una adición o sustitución de especies, que varía según el lugar y la época del año [Carvalho *et al.* 2000]. Así, merece la pena destacar que la fauna invertebrada terrestre asociada a la materia

I. Introducción

orgánica en descomposición, está constituida fundamentalmente por insectos [Catts & Goff 1992], principalmente larvas de dípteros [Di Luise *et al.* 2008], cuya diversidad es característica de cada región geográfica, y está influenciada por las condiciones climáticas, orográficas y medioambientales propias del lugar [Eberhardt & Elliot 2008; Vanin *et al.* 2008]. Además, hay que considerar que el desarrollo larvario varía según la especie y es significativamente dependiente de la temperatura [Boehme *et al.* 2010]. De ahí la importancia de conocer la distribución estacional, ecología, biología y taxonomía de los insectos de interés de nuestra fauna, para evitar generalizaciones y evaluar las evidencias entomológicas desde una escala regional, que aporte precisión y fiabilidad a esta disciplina forense [Grassberger & Frank 2004].

La aplicación de la entomología en las investigaciones forenses demanda precisión en la estimación del tiempo de infestación utilizado en la determinación del PAI, para lo cual el prerequisite crítico es la correcta identificación de los especímenes recolectados [Harvey *et al.* 2003a; Reibe *et al.* 2009].

La identificación entomológica tradicional emplea técnicas comparativas basadas en el reconocimiento de caracteres morfológicos diagnósticos [Smith 1986; González-Mora & Peris 1988; Peris & González-Mora 1991], que requieren disponer de colecciones de referencia, y dominar técnicas de disección y claves taxonómicas, frecuentemente muy complejas [GilArriortua *et al.* 2013]. Además, la pérdida de caracteres taxonómicos diagnósticos en especímenes dañados o degradados (larvas muertas o necrosadas, puparios incompletos, etc.), la presencia de características semejantes en especies diferentes (principalmente en individuos inmaduros), o la introducción de especies necrófagas alóctonas, pueden dificultar la determinación taxonómica [Mazzanti *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2012]. Asimismo, la necesidad de esperar hasta la emergencia del adulto para poder realizar identificaciones fiables, supone una demora y constituye un riesgo, salvo que los especímenes lleguen vivos al especialista [Harvey *et al.* 2003a; Mazzanti *et al.* 2010; Amendt *et al.* 2011]. Por último, en muchos

sistemas legales, el mantenimiento de la integridad de las evidencias en procesos judiciales es de gran importancia y queda comprometido cuando se ha llevado a cabo la cría, que implica un cambio de forma [Harvey *et al.* 2003a]. Todas estas razones hacen que los métodos de identificación morfológica resulten complejos o incluso inviábiles, pudiendo inducir a errores judiciales [GilArriortua *et al.* 2013]. Así, considerando que en el ámbito forense los errores pueden repercutir en terceras personas, la identificación específica requiere procedimientos complementarios, o alternativos, en los que las técnicas moleculares juegan un papel fundamental por su rapidez, fiabilidad, sensibilidad, precisión e irrefutabilidad [Saigusa *et al.* 2005; Wells & Stevens 2010].

1.2. Entomología molecular

1.2.1. Antecedentes

Los primeros estudios moleculares orientados al conocimiento de la variabilidad genética se realizaron alrededor de 1960, con el desarrollo de la técnica de electroforesis de proteínas [Hunter & Markert 1957], en la que se estudiaban principalmente isoenzimas, aunque no se aplicó al estudio filogenético de insectos hasta 1968 [Johnson & Bealle 1968]. En esta línea, años más tarde, se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography*, HPLC) para discriminar hemoglobina y ácidos grasos especie-específicos [Taylor *et al.* 1993; Bellis *et al.* 2003]. Sin embargo, estos métodos no resultaron suficientemente eficientes para solventar los problemas de taxonomía surgidos entre especies estrechamente relacionadas.

No fue hasta finales de 1970 cuando se desarrollaron nuevas técnicas que permitieron el análisis directo del ácido desoxirribonucleico (ADN). Los primeros trabajos que estudian el ADN mitocondrial (ADNmt) datan de 1979, mediante el análisis de RFLPs

I. Introducción

(polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) [Avisé *et al.* 1979; Brown & Wright 1979], ampliamente utilizados en los estudios filogenéticos de insectos a pesar de sus desventajas, por requerir tiempo, grandes cantidades de ADN y sustancias radioactivas [Osakabe & Sakagami 1994; Kumar *et al.* 1998; Wells & Sperling 1999; Schroeder *et al.* 2003a].

Posteriormente, una nueva técnica descrita por Mullis *et al.* 1986, denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), revolucionó multitud de campos científicos, entre ellos la taxonomía y la sistemática, proporcionando un conocimiento exhaustivo de la secuencia de ADN a partir de cantidades mínimas. En sistemática, por ejemplo, esta técnica se ha utilizado para el estudio de familias completas (Scatophagidae) [Bernasconi *et al.* 2000], de géneros [Cognato & Sperling 2000] e incluso de grupos de especies (grupo *repleta* del género *Drosophila*) [Durando *et al.* 2000]. Asimismo, su aplicación para el diagnóstico de insectos de importancia forense se propuso por primera vez en 1994 [Sperling *et al.* 1994].

Considerando que el ADN es la molécula de estudio principal en esta ciencia forense, mencionaremos algunas de sus características más relevantes. Es bien sabido que en las células somáticas animales podemos encontrar el material genético en las mitocondrias (ADNmt), y en el núcleo (ADN nuclear, ADNnu). En general, en las células eucariotas, el ADNnu es lineal, de gran tamaño (180 Mb *Drosophila melanogaster*) y presenta una estructura compleja en doble hélice unida a proteínas cromosómicas (histonas) [Adams *et al.* 2000]. Por su parte, el genoma mitocondrial es un dúplex circular de pequeño tamaño, de entre 16-18 Kb en insectos [Oliveira *et al.* 2008]. Asimismo, en el genoma nuclear el número de cromosomas es diploide, mientras que en el mitocondrial, el número de copias en una célula, por lo general, supera el millar [Alberts *et al.* 1996]. Otra diferencia a destacar es el patrón de herencia biparental con reordenación de la información genética característica en el ADNnu y que en el ADNmt es uniparental (matrilínea) sin recombinación [Wells &

Stevens 2008]. Además, la tasa de evolución del ADNmt en insectos es más elevada que la de los genes nucleares [Powell *et al.* 1986; Solignac *et al.* 1986; Sharp & Li 1989; Wells *et al.* 2007], aunque la diferencia no es tan notable como en vertebrados [Brown *et al.* 1982]. Asimismo, en contraste con el genoma nuclear constituido principalmente por ADN no codificante (incluidos los intrones génicos) y en el que solo el 1,5 % es codificante (exones) [IHGSC 2001], el genoma mitocondrial posee un número muy reducido de nucleótidos no codificantes y carece de intrones [Cantatore & Saccone 1987; Pereira 2000]. Durante años, el género *Drosophila*, principalmente la mosca de la fruta *D. melanogaster*, ha sido objeto de estudio, lo que ha permitido el conocimiento de algunas de las características del ADN de los insectos. Por ello, sabemos que el ADNmt de los insectos es muy rico en las bases adenina y timina (A+T: 70-90 %), en la región control no codificante, y en genes que codifican para el citocromo c oxidasa I y II (COI y COII), entre otros [Satta *et al.* 1987; Oliveira *et al.* 2008]. Las características expuestas de ambos genomas, nuclear y mitocondrial, se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resumen de las características del ADNnu vs ADNmt.

Características	ADNnu	ADNmt
Localización	Núcleo	Mitocondrias
Forma	Lineal	Circular
Tamaño	Grande (100-300 Mb)	Pequeño (16-18 Kb)
Organización	Compleja (histonas)	Simple
Herencia	Biparental	Uniparental (matrilineal)
Número	Diploide (dos copias)	Haploide (miles de copias)
Recombinación	Sí	No
Tasa de mutación	Baja	Alta
% codificante	1,5 %	97 %
Otros	-*	70-90 % A+T

*Datos no disponibles

El genoma mitocondrial en insectos tiene prácticamente el mismo número de genes que en vertebrados, aunque presenta algunas reorganizaciones [Boore *et al.* 1995] y, en general, las diferencias estructurales que se pueden encontrar están relacionadas con el tamaño de la región control [Oliveira *et al.* 2008]. Dentro del orden Diptera (Insecta), la organización del genoma mitocondrial de los Brachycera se diferencia de la de los

I. Introducción

Nematocera en una única inversión [Oliveira *et al.* 2008]. El genoma mitocondrial está formado por dos regiones bien definidas, la región control y la región codificante, que representa casi la totalidad del genoma y consiste en 37 genes que carecen de intrones (**Fig. 3**) [Pereira 2000; Oliveira *et al.* 2008].

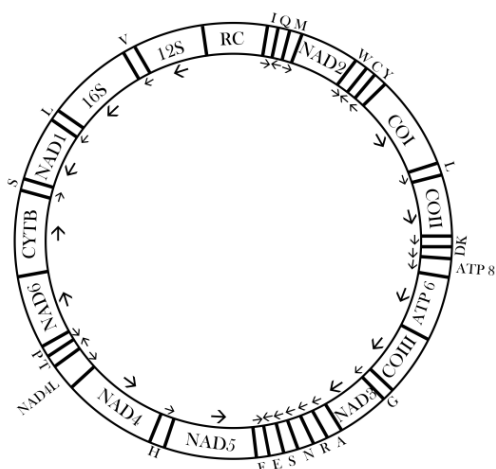


Fig. 3. Organización esquemática del genoma mitocondrial de la mosca de los cuernos, *Haematobia irritans*. Las flechas indican la dirección de transcripción de cada gen. Los genes ARNt se identifican con el símbolo del aminoácido que codifican. Los genes ARNr para las dos subunidades y la región control aparecen como 12S, 16S y RC, respectivamente. Adaptado de Oliveira *et al.* (2008).

Sin embargo, en el genoma nuclear podemos encontrar considerables variaciones de tamaño incluso dentro de un mismo género, *Drosophila virilis* 313 Mb [Hartl & Lozovskaya 1995], *D. arizonae* 220 Mb [Laird 1973] o *D. simulans* 119 Mb [Powell 1997]. No obstante, en la familia Calliphoridae el número de cromosomas es muy estable ($2n=12$), con 5 pares de autosomas de tamaño medio/grande (meta/sub-metacéntricos) y el par heteromórfico sexual (XX hembras y XY machos) más pequeño (meta/sub-meta/telocéntrico) [Stevens 1908; Keneuke 1924; Boyes & Wilkes 1953; Parise-Maltempo & Avancini 2001]. Además, se ha encontrado una considerable variabilidad morfológica entre los cariotipos de las diferentes especies [Boyes & Shewell 1975; Bedo 1991]. Así, mientras los autosomas presentan una cierta estabilidad (**Tabla 4**), los cromosomas sexuales muestran variaciones de forma y tamaño según la especie [Boyes & Shewell 1975].

Tabla 4. Clasificación morfológica de los pares cromosómicos de las especies *Chrysomya pinguis*, *Lucilia cuprina*, *L. porphyrina*, *L. sericata*, *Protocalliphora falcozi* y, según la nomenclatura de Levan *et al.* (1964).

Especie	I						Referencias	
	X	Y	II	III	IV	V		VI
<i>Ch. pinguis</i>	T	T	M	M	M	M	M	Agrawal <i>et al.</i> (2010)
<i>L. cuprina</i>	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	Childress (1969)
<i>L. porphyrina</i>	T	T	M	M	M	M	M	Agrawal <i>et al.</i> (2010)
<i>L. sericata</i>	M	SM	M	M	SM	M	M	Acuña-Morera <i>et al.</i> (2011)
<i>Pr. falcozi</i>	SM	SM	M	M	M	M	SM	Holecova <i>et al.</i> (2012)

*M: Metacéntrico; SM: Sub-metacéntrico; T: Telocéntrico.

Finalmente, conviene destacar que los genes ribosómicos nucleares presentan un segmento intergénico no codificante conocido como espaciador transcrito interno (ITS) [Wells & Stevens 2010]. Convencionalmente, el ITS del ADN ribosómico nuclear (ADNr) incluye la región ITS1, el gen 5.8S y la región ITS2 (Fig. 4) [Coleman 2003]. Así, en contraste con muchos otros genes nucleares, en un genoma eucariota típico podemos encontrar cientos de copias en tándem de los genes ARNr nucleares [Coleman 2003]. Únicamente puede aparecer una variabilidad significativa entre las secuencias de ITS de un mismo organismo en los híbridos [Buckler *et al.* 1997; Coleman 2003]. Excepto en estos casos, esta familia multigénica presenta una evolución concertada, que generalmente homogeniza las diferencias entre copias, lo que hace posible su tratamiento como un único gen [Hershkovitz *et al.* 1999].

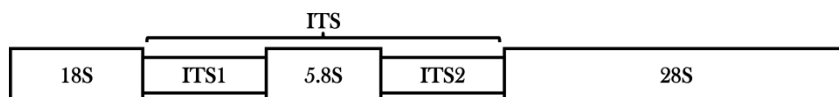


Fig. 4. Organización típica de las regiones codificantes y espaciadoras del ARN ribosómico nuclear de una célula eucariota. Adaptado de Coleman (2003).

1.2.2. Estado actual

Dado que el prerequisite crítico para el uso diligente de la entomología forense es la correcta identificación taxonómica, las técnicas de biología molecular se utilizan principalmente como alternativa rápida y fiable a la identificación morfológica. Además, existen otras aplicaciones de los métodos moleculares que incluyen la

I. Introducción

caracterización de la estructura genética poblacional, el establecimiento del origen evolutivo de las especies de insectos de interés forense, la identificación del contenido digestivo de los insectos [Di Luise *et al.* 2008; Wells & Stevens 2008; Kondakci *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014], y el reconocimiento de las diferencias en la expresión génica a lo largo del ciclo de desarrollo [Charles 2010; Amendt *et al.* 2011].

En los últimos años, la ciencia forense ha abordado las técnicas basadas en ADN como alternativa objetiva y fiable en la identificación de especies, utilizando marcadores moleculares especie-específicos para desarrollar métodos diagnósticos apropiados [Amendt *et al.* 2011]. En general, el ADNmt tiene una tasa alta de mutación respecto al ADN nuclear (ADNnu), por lo que aumenta la posibilidad de hallar en él marcadores especie-específicos que proporcionen información taxonómica y filogenética [Awise *et al.* 1987]. Asimismo, el ADNmt tiene un número de copias mayor que el nuclear [Robin & Wong 1988], hecho que resulta claramente ventajoso en estudios forenses con especímenes en malas condiciones o con el ADN degradado. Así, prácticamente la totalidad de los estudios para la identificación de invertebrados utilizan la caracterización molecular de marcadores mitocondriales, principalmente los genes que codifican para las subunidades I y II del citocromo c oxidasa (COI y COII), o para la subunidad menor del ribosoma (16S ARNr) [Malgorn & Coquoz 1999; Caterino *et al.* 2000; Wells *et al.* 2001b; Wells & Stevens 2008; Nelson *et al.* 2012]. En esta línea, recientemente se ha sugerido utilizar una región de cerca de 650 pb del COI, como marcador universal para el diagnóstico de especies animales (COI *barcode*) [Hebert *et al.* 2003]. Otros *loci* mitocondriales menos frecuentes son las subunidades 4 y 4L de la nicotinamida deshidrogenasa (ND4 y ND4L) [Nelson *et al.* 2012], la región no codificante situada entre el ARN transferente para la serina (ARNt^{ser}) y ND1 [Weigl *et al.* 2010b], y el citocromo b (Cyt-b) [M de Pancorbo *et al.* 2004; GilArriortua *et al.* 2013]. Este último gen se utiliza de forma rutinaria en los laboratorios forenses para la identificación de animales vertebrados [Zehner *et al.*

1998; Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003]. Además, las regiones ITS del ADNr nuclear son herramientas habituales en los estudios sistemáticos, en los filogenéticos y en la identificación de especies hermanas [Álvarez & Wendel 2003; Coleman 2003; Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008b; LaRue *et al.* 2009].

La identificación de especies entomológicas en el contexto forense requiere análisis que proporcionen una información detallada de la secuencia y permitan una determinación específica inequívoca. Por ello, en la actualidad, los métodos que combinan amplificación mediante PCR y secuenciación de productos amplificados son los más utilizados, por proporcionar altos niveles de especificidad y sensibilidad (**Fig. 5**), al permitir una efectiva y fiable clasificación taxonómica sin necesidad de esperar hasta la emergencia del adulto, ni requerir conocimientos específicos sobre taxonomía tradicional. Así, se superan también las dificultades asociadas a la identificación morfológica de especímenes dañados, fragmentados, o carentes de suficientes caracteres diagnósticos [Mazzanti *et al.* 2010]. Además, estos métodos permiten la identificación de especies, independientemente del estadio de desarrollo que presenten y del método de preservación utilizado [Harvey *et al.* 2003a].

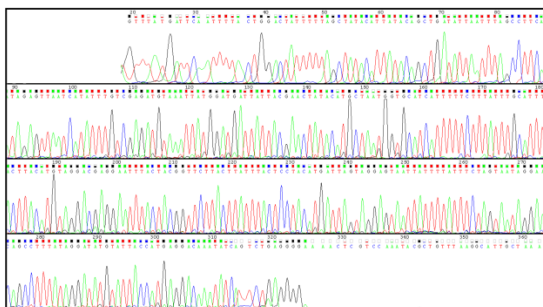


Fig. 5. Electroferograma: cada posición nucleotídica está definida por un pico, o máximo, y los diferentes nucleótidos están representados por colores diferentes.

En general, cuando se trata de realizar identificaciones específicas, la calidad del ADN extraído es un parámetro crítico que está influenciado, en gran medida, por el modo de sacrificio y por las condiciones de preservación, variando su ejecución según el tipo de vestigio (**Tabla 5**) [Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2007, 2011]. Habitualmente, se

I. Introducción

suelen obtener buenos resultados cuando los especímenes se almacenan en etanol diluido (70-95 %) o en seco (solo para adultos) [Amendt *et al.* 2011]. Además, se recomienda evitar el uso de otros preservantes, como el etilacetato o el formaldehído, que influyen negativamente en la calidad del ADN [Amendt *et al.* 2011].

Tabla 5. Modo óptimo de preservación según las características del vestigio.

Tipo de muestra	Modo de sacrificio		Modo de preservación
	Mantenidos en	Tiempo	Mantenidos en
Huevos	Etanol 70-95 %	∞	Etanol 80-95 %*
Inmaduros	Agua a 80-100 °C -20 °C (en seco)	30-60 s 30 min	Etanol 80-95 %* -20 °C o -80 °C
Pupas	Etanol 70 %	∞	Etanol 70 %*
Puparios	-	-	Etanol 70 %*
Adultos	Etanol 70 % -20 °C (en seco)	∞ 30-60 min	Etanol 70 %* T° ambiente

*A su vez se pueden mantener a -20 °C para mejorar la conservación.

Convencionalmente, la metodología de trabajo consiste en 3 pasos fundamentales: extracción de ADN, amplificación y secuenciación de la región de interés y, por último, tratamiento de datos y búsqueda de homología. Esta búsqueda consiste, básicamente, en cotejar la secuencia de nucleótidos del espécimen desconocido, con los genotipos de referencia recogidos en las principales bases de datos, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y/o BOLD (<http://www.boldsystems.org>). Es importante tener presente que, en la mayoría de los casos, la variabilidad intra-específica hará que el porcentaje de coincidencia (homología) entre el genotipo del individuo de referencia y el de estudio sea inferior al 100 %.

Uno de los retos de la biología molecular moderna es el desarrollo de métodos robustos para la rápida determinación específica de forma precisa e inequívoca [Malewski *et al.* 2010; Wells & Stevens 2010]. Al principio, la identificación de las especies de insectos se realizó mediante el análisis de marcadores de polimorfismos RFLPs [Sperling *et al.* 1994], que proporcionaban información únicamente de la secuencia de la diana de restricción, pudiendo provocar la mutación en un único nucleótido de dicha diana la alteración de los patrones de restricción [Amendt *et al.* 2011], comprometiendo así la

identificación. Actualmente, la identificación molecular de insectos a nivel específico combina la amplificación con la secuenciación convencional de ADN, que suministra una información nucleotídica completa de la secuencia de interés. Más recientemente, se han desarrollado tecnologías novedosas para el rápido genotipado y la búsqueda de mutaciones, mejorándose las prestaciones de las convencionales. En este sentido, la pirosecuenciación y las curvas de disociación de alta resolución de productos de PCR, o HRM (*high-resolution melting*), son alternativas rentables y efectivas, al procesar un número de muestras elevado en un tiempo breve y tener protocolos más sencillos [Wells & Stevens 2010; Radvansky *et al.* 2011]. El HRM permite trabajar sin manipulación post-PCR, ya que el análisis tiene lugar en un único tubo cerrado, reduciéndose así el riesgo de contaminación (**Fig. 6**). Asimismo, ofrece un aumento de la sensibilidad y precisión en el genotipado de polimorfismos que involucran a más de un SNP (*single nucleotide polymorphism*) y permite la detección de la variabilidad nucleotídica desconocida. Recientemente se ha utilizado para la identificación específica de dípteros y trematodos, mediante el análisis de SNPs discriminantes [Baudry *et al.* 2003; Malewski *et al.* 2010; Radvansky *et al.* 2011].

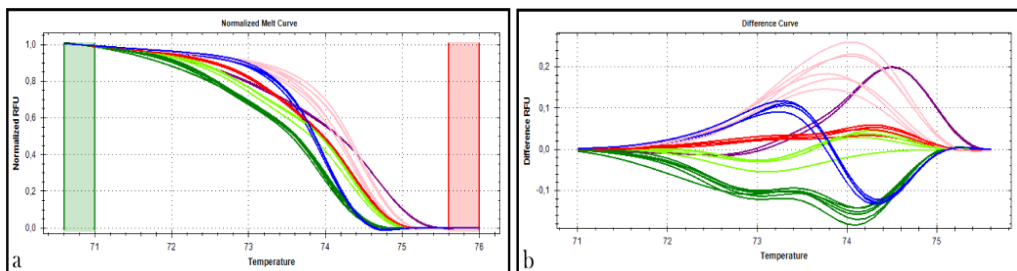
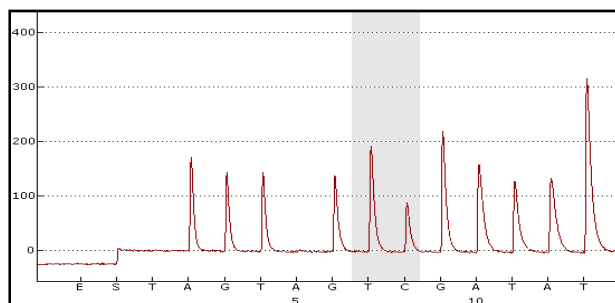


Fig. 6. Análisis de HRM. Curva de disociación normalizada característica para cada especie (**a**); Gráfico de diferencias entre las curvas de disociación de cada especie (**b**). Cada color corresponde a una especie de Calliphoridae.

Por otra parte, la pirosecuenciación proporciona una elevada fiabilidad y precisión, al identificarse cada nucleótido de forma independiente y registrarse en tiempo real (**Fig. 7**) [Ahmadian *et al.* 2006; Wells & Stevens 2010]. Asimismo, permite analizar

1. Introducción

secuencias de corta longitud (alrededor de 100 bases) [Ahmadian *et al.* 2006; Wells & Stevens 2010] e identificar falsas amplificaciones. Esta técnica se utiliza, principalmente, para la detección de mutaciones y el genotipado de SNPs [García *et al.* 2000; Andreasson *et al.* 2002].



Sin embargo, la utilización eficaz de estas tecnologías más avanzadas requiere el manejo previo de las técnicas moleculares convencionales que nos proporcionan una imprescindible información de base. Como ejemplo, la secuenciación tradicional o de Sanger, permite la caracterización molecular de los taxones de interés. Por ello, se hace necesaria la complementación de unas técnicas con otras a fin de conseguir el diseño de protocolos que satisfagan los requerimientos de las investigaciones (Fig. 8).

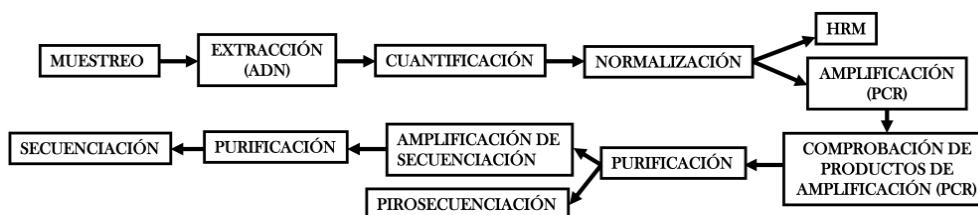


Fig. 8. Diseño experimental para las siguientes técnicas analíticas: secuenciación convencional (Sanger), HRM y pirosecuenciación.

La tendencia más reciente en los trabajos de taxonomía y filogenia de insectos es el estudio conjunto de varios marcadores. En este sentido, se están comenzando a

introducir técnicas de secuenciación masiva, o NGS (*next generation sequencing*), que permiten analizar cientos de *loci* de forma relativamente más rápida y económica [Nelson *et al.* 2012]. Esta novedosa metodología está diseñada para el estudio de regiones de gran tamaño, como genomas mitocondriales completos, a partir de los que se crean librerías de fragmentos más cortos que se secuencian directamente [Nelson *et al.* 2012].

Además, en los últimos años, se ha demostrado que la elevada sensibilidad que presentan las herramientas biomoleculares actuales permite identificar la fuente de alimento de los insectos, contribuyendo a detectar ADN humano y de otras especies en el tracto digestivo de larvas necrófagas (**Fig. 9**) o de hematófagos adultos [Di Luise *et al.* 2008; Wells & Stevens 2008; Kondakci *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014]. Esta posibilidad de realizar identificaciones individuales humanas resulta de gran interés, tanto para establecer una relación entre la víctima y el sospechoso como para relacionar con un cadáver concreto los especímenes inmaduros encontrados en un determinado lugar [Amendt *et al.* 2011].



Fig. 9. Díptero necrófago inmaduro con el buche repleto de vestigios biológicos humanos.

1.3. Aplicaciones de la entomología molecular

1.3.1. Identificación específica

Como ya hemos mencionado anteriormente, la correcta identificación taxonómica de las evidencias entomológicas, tanto de adultos como de larvas encontradas en un cuerpo o en el lugar de un suceso, es un paso crucial para que el curso de la investigación sea legítimo y aceptado en los procedimientos legales, máxime cuando el uso principal del diagnóstico es la estimación del tiempo de infestación, o periodo de

I. Introducción

actividad de los insectos (PAI), que habitualmente se aproxima al intervalo *post-mortem* (IPM). Sin embargo, la identificación morfológica de individuos inmaduros en algunos géneros puede ser problemática e incluso imposible de realizar [Wells & Stevens 2010] y, únicamente la cría hasta la emergencia del adulto permite la diagnosis. En la familia Sarcophagidae, por ejemplo, solo los machos tienen morfotipos claramente establecidos [Smith 1986], mientras que son las hembras las más frecuentes en los entornos cadavéricos. Para superar esta problemática, durante la última década, se han utilizado los métodos de identificación molecular basados en la variabilidad especie-específica de determinados genes [Wells & Stevens 2010] como recurso alternativo a la identificación tradicional, basada en caracteres anatómicos externos.

En general, los marcadores de ADNmt juegan un papel principal en el diagnóstico molecular de artrópodos, además de por su haploidía, por su elevado número de copias en comparación con el ADNnu, lo que mejora la eficiencia de extracción cuando se trabaja con muestras degradadas o con escaso ADN [Benecke & Wells 2001; Wells & Stevens 2010]. En este sentido, los marcadores comúnmente utilizados para la identificación animal son los genes mitocondriales que codifican para: las subunidades I y II del citocromo c oxidasa (COI y COII) [Caterino *et al.* 2000; Wells & Stevens 2008, 2010; Nelson *et al.* 2012]; la subunidad 4, 4L y 5 del complejo ND deshidrogenasa (ND4, ND4L y ND5) [Caterino *et al.* 2000; Zehner *et al.* 2004a; Wells & Stevens 2008; Nelson *et al.* 2012]; el ARN ribosómico (ARNr) 16S y 12S [Hornok *et al.* 2008; Nelson *et al.* 2012]; y el citocromo b (Cyt-b) [Parson *et al.* 2000; M de Pancorbo *et al.* 2004, 2006; GilArriortua *et al.* 2013].

En insectos, la mayoría del ADNmt estudiado comprende alguna región de los genes que codifican para COI o COII [Sperling *et al.* 1994; Malgorn & Coquoz 1999; Wells *et al.* 2001a; Wells & Stevens 2010]. Inicialmente, los investigadores eligieron el *locus* COI para la obtención de perfiles genéticos de insectos, por ser el gen que

codifica para la subunidad de mayor tamaño del citocromo c oxidasa y combina regiones variables y altamente conservadas [Clary & Wolstenholme 1985; Morlais & Severson 2002]. En este sentido, en los últimos años, el “DNA Barcode of Life Project” ha propuesto utilizar un fragmento de unas 650 pb del extremo 5’ del gen COI, como marcador universal, o “código de barras de ADN” (COI *barcode*), para la discriminación de especies animales (**Fig. 10**) [Hebert *et al.* 2003; Will & Rubinoff 2004; Erpenbeck *et al.* 2005; Nelson *et al.* 2007; Meiklejohn *et al.* 2011]. Además, en dicho proyecto se creó la base de datos “The Barcode of Life Database” (BOLD, www.barcodinglife.org) donde se recogen miles de secuencias de la región “barcode” de una gran variedad de organismos [Ratnasingham & Hebert 2007], que puede ser de gran interés como primera aproximación cuando se trata de realizar la identificación taxonómica de especímenes desconocidos. En este contexto, se ha definido un nuevo concepto para la delimitación de especies, el “*barcoding gap*”, que es el hueco o espacio que queda entre la distancia máxima intra-específica y la mínima inter-específica [Hebert *et al.* 2004]. Así, la existencia de valores de divergencia intra-específica muy altos e inter-específica muy bajos puede provocar la ausencia de este “*gap*”, que suele relacionarse con especiaciones incompletas o recientes, o con hibridaciones entre especies que inicialmente se encontraban aisladas [Johnsen *et al.* 2010; Bastos-Silveira *et al.* 2012].

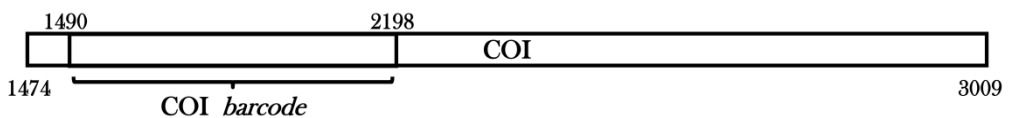


Fig. 10. COI está definido entre la posición 1474 y 3009 del genoma mitocondrial (*Drosophila yakuba*, NC001322) y contiene la región *barcode*, que abarca desde la posición 1490 a la 2198. Adaptado de Nelson *et al.* (2007).

En los últimos años, se ha demostrado que este *locus* carece de capacidad discriminatoria suficiente para la realización de diagnósticos inequívocos cuando se trata de diferenciar especies estrechamente relacionadas de algunos géneros de

I. Introducción

califóridos (*Lucilia*: *L. caesar*-*L. illustris*, *L. sericata*-*L. cuprina*; *Chrysomya*: *Ch. putoria*-*Ch. chloropyga*) y de coleópteros (*Catops*: *C. nigricans*-*C. fuscus*), entre otros [Wells & Stevens 2010; Schilthuizen *et al.* 2011; Boehme *et al.* 2012; Nelson *et al.* 2012]. La tecnología de secuenciación actual permite obtener, de forma rutinaria y en un único análisis, más de 900 pb con un 98,5 % de precisión [Gunning *et al.* 2006], por lo que, en el caso de especies hermanas, algunos autores han propuesto la utilización de regiones de mayor tamaño junto con otros marcadores mitocondriales para que las identificaciones sean fiables [Sperling *et al.* 1994; Benecke & Wells 2001; Preativatanyou *et al.* 2010]. Sin embargo, algunas especies de la familia Calliphoridae, bien por su origen parafilético, polifilético o por su reciente divergencia evolutiva, no se pueden diferenciar con los marcadores mitocondriales habituales, al poseer genotipos comunes entre especies (**Fig. 11**) [Wells *et al.* 2007; Wells & Stevens 2010]. La cuestión fundamental es si el marcador y/o la longitud seleccionada proporcionan suficiente información o no.

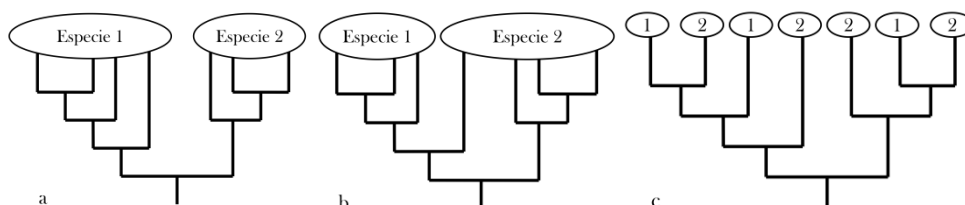


Fig. 11. Capacidad discriminativa de un gen para dos especies: especie 1 y 2 muestran un origen monofilético (a), el gen permite una identificación específica óptima; La especie 1 es monofilética, pero la especie 2 es parafilética (b), las dos especies pueden presentar secuencias homólogas, la identificación no es inequívoca; y las dos especies comparten la información genética, mostrando un origen polifilético (c), el gen no es apropiado para realizar una identificación específica. Adaptado de Wells *et al.* (2007).

Principalmente, hay que tener en cuenta que la utilización del ADNmt para la identificación de especies requiere asumir que una especie definida mediante su morfología forma parte de un mismo linaje de ADNmt, pues de lo contrario no sería posible establecer un genotipo de referencia para ninguna especie [Wells & Williams 2007]. Además, en las ocasiones en las que la similitud morfológica, que dificulta la

identificación tradicional, coincide con la molecular, es fundamental evaluar otros factores como la historia, la distribución geográfica o los patrones de actividad estacional para realizar identificaciones de forma fiable [Wells *et al.* 2007; Wells & Williams 2007]. En un principio, habría que considerar únicamente las especies conocidas para un determinado lugar, descartando cualquier otra especie. Por ejemplo, en el Nuevo Mundo no hay constancia de la presencia de *L. caesar*, ni tampoco en Latinoamérica de *Ch. chloropyga* [Wells *et al.* 2007; Wells & Stevens 2010]. No obstante, en aquellas regiones geográficas en las que especies estrechamente relacionadas (*Calliphora augur*-*C. dubia*, *C. stygia*-*C. albifrontalis* y *C. hilli*-*C. varifrons*, *L. caesar*-*L. illustris* y *L. sericata*-*L. cuprina*) presentan distribuciones solapadas, podemos tener dificultades para diferenciarlas mediante el ADNmt [Harvey *et al.* 2008]. Esta problemática requiere la caracterización no solo de regiones mitocondriales, sino también nucleares, como los genes que codifican las dos subunidades del ARNr (18S y 28S), o el primer o segundo espaciador transcrito interno (ITS1 o ITS2), para aclarar la identificación en estos casos [Stevens *et al.* 2002; Nelson *et al.* 2012].

Uno de los ejemplos más llamativos y estudiados corresponde al de las especies *L. sericata*-*L. cuprina*, para las que el marcador COI mostraba tres linajes diferenciados, dos con las formas independientes de *L. sericata* y *L. cuprina*, y un tercero que agrupaba a especímenes de *L. cuprina* (Hawaii, Australia, etc.), por su morfología, con el mitotipo de *L. sericata* [Wells *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2012]. Por el contrario, los análisis con marcadores nucleares (28S ADNr, ITS1 o ITS2), han revelado la existencia de dos linajes bien diferenciados (*L. sericata* y *L. cuprina*) [Wells *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2012]. Aunque, en general, una vez iniciado el proceso de especiación el ADNmt evoluciona más rápido que el ADNnu, y éste suele ser más apropiado para la diferenciación de especies estrechamente relacionadas; en este caso, esto parece no cumplirse [Wells *et al.* 2007].

I. Introducción

En principio, los resultados obtenidos con COI para las dos variantes haplotípicas presentadas por *L. cuprina* no invalidaban el marcador, ya que formaban dos grupos monofiléticos diferenciados y la variante híbrida estaba geográficamente bien delimitada (Islas Hawaii) [Stevens *et al.* 2002; Wells *et al.* 2007], aunque posteriormente apareciera en otros lugares. Algunos autores interpretan esta variabilidad diferenciando morfológicamente *L. cuprina* en dos subespecies, *L. cuprina cuprina* (cercana a *L. sericata*), presente en Asia, Oceanía, el Nuevo Mundo y Australia tropical, y *L. cuprina dorsalis* (independiente), distribuida desde África hasta el oeste de la India, Australia templada y Nueva Zelanda [Wells *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2012]. No obstante, la mayoría de los taxónomos no reconocen estas dos formas por no ajustarse a la realidad [Wells *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2012]. Así, de acuerdo con los resultados filogenéticos, la explicación más sencilla podría ser la existencia de una forma pura y otra híbrida de *L. cuprina* [Amendt *et al.* 2011]. Sin embargo, aunque se ha comprobado que estas dos especies pueden hibridar y producir descendencia fértil en condiciones de laboratorio (bajo presión), no se ha demostrado que esto ocurra en el medio natural [Ulyett 1945]. Además, los resultados obtenidos considerando genomas mitocondriales completos muestran un “barcode gap” distintivo para los haplotipos híbridos [Nelson *et al.* 2012], lo que anula la hipótesis de hibridación. A la vista de los patrones filogenéticos mitocondriales, algunos autores proponen como hipótesis más razonable un evento de hibridación anterior al último ancestro común de las poblaciones de *L. sericata* [Nelson *et al.* 2012]. Con esta última teoría se descartan, también, los linajes incompletos que demandan una mayor tasa de sustitución en el ADNnu que en el ADNmt [Nelson *et al.* 2012].

Por todo lo anterior, hay que destacar la conveniencia de combinar marcadores mitocondriales y nucleares en los diagnósticos taxonómicos moleculares, no solo para mejorar la fiabilidad de los resultados, sino también, para detectar hibridaciones y fenómenos de especiación recientes o incompletos.

En general, se dice que dos especímenes pertenecen a especies distintas cuando su variabilidad es superior al 3 % [Amendt *et al.* 2011], mientras que, la existente entre individuos de la misma especie puede superar, en algunos casos, el 1 % [Amendt *et al.* 2011]. Esto último dependerá de la variabilidad geográfica intra-específica que exista [Alessandrini *et al.* 2008]. Así, incluso variaciones comprendidas entre el 1-3 % no necesariamente son indicativas de la presencia de especies diferentes [Amendt *et al.* 2011]. Por ello, al igual que las estimaciones sobre el tiempo de desarrollo se deben realizar desde una perspectiva local, para evitar imprecisiones, los estudios moleculares deben centrarse en la entomofauna regional característica [Harvey *et al.* 2003a, 2008], evitando realizar extrapolaciones que podrían conducir a identificaciones erróneas [Harvey *et al.* 2008]. A pesar del importante papel que desempeña la entomología molecular como apoyo en la resolución de casos forenses (Tabla 6), el esfuerzo destinado a su estudio aún es muy escaso, por lo que para algunas de las especies necrófagas conocidas pueden no encontrarse secuencias de referencia para un determinado gen o, incluso, no estar presentes en las bases de datos, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y/o BOLD (<http://www.boldsystems.org>). Así, el éxito del diagnóstico molecular dependerá tanto de la representatividad, como de la fiabilidad de las secuencias recogidas en la base de datos de referencia [Wells & Stevens 2010]. Por ello, la información que contienen debe analizarse con cautela y suficiente visión crítica, considerando si las secuencias están incluidas en publicaciones referenciadas o si entre los autores hay expertos taxónomos que avalen la identificación indubitada de la especie referida, entre otros aspectos.

Tabla 6. Utilidades de la identificación de insectos.

Identificación Específica de Insectos					
Muertes violentas	Abusos o Negligencias	Tráfico ilícito		Transporte de mercancías	
Interpretación de evidencias entomológicas					
Estimación IPM o PAI*		Procedencia/Origen		Circunstancias	
Tiempos de desarrollo	Patrones de sucesión	Distribución	Climatología	Estacionalidad	Desplazamiento
Búsqueda de responsables					

*IPM: Intervalo *post-mortem*; PAI: Periodo de actividad de los insectos.

1.3.2. Genética de poblaciones y análisis filogenético

En general, la entomología forense centra la mayor parte de la investigación genética en la taxonomía y en la identificación de especies, siendo limitado el esfuerzo empleado para el estudio de las relaciones filogenéticas y la genética de poblaciones. La razón de esta limitación radica en que estos análisis requieren el tratamiento de una elevada cantidad de información genética que, en principio, no es necesaria para la realización de los diagnósticos específicos. Sin embargo, estos estudios resultan fundamentales por revelar información de gran importancia entomológica. Así, la variabilidad genética entre poblaciones de una misma especie según su distribución geográfica podría introducir cambios, por ejemplo en la biología del desarrollo, que modificasen variables cruciales para la entomología forense, como pueden ser la tasa de desarrollo [Wells & Stevens 2008, 2010] o la temperatura basal. Además, la aparición de diferencias genéticas características de poblaciones ubicadas en regiones geográficas diferentes permitiría la detección de desplazamientos *post-mortem* de un cadáver [Wells & Stevens 2008, 2010], o el tráfico ilegal de vehículos, otras mercancías, personas, etc.

Comúnmente, el ADNmt se considera un buen candidato en los estudios filogenéticos por varias características de las que carecen los genes nucleares [Pereira 2000], entre otras, la herencia vía materna [Kondo *et al.* 1990; Gyllestein *et al.* 1991], la ausencia de recombinación genética [Clayton 1992], el elevado número de copias en la célula [Robin & Wong 1988] o la alta tasa de mutación que implica una rápida evolución de la secuencia nucleotídica [Brown *et al.* 1979]. Así, los genes mitocondriales son muy útiles y altamente efectivos en la identificación de especímenes desconocidos, ya que ésta se realiza con un pequeño número de diferencias genéticas [Sperling & Hickey 1994; Wells *et al.* 2001a; Hebert *et al.* 2003]. Además, las características genéticas de estos marcadores también se pueden utilizar para definir los diferentes linajes mitocondriales que caracterizan la estructura poblacional. Es sabido que la

información que aportan los análisis moleculares es fundamental para la comprensión, en profundidad, de las relaciones filogenéticas [Blair & Hedges 2005; Regier *et al.* 2005] y que, éstas se basan fundamentalmente en la separación de clados monofiléticos [Harvey *et al.* 2008]. Sin embargo, en ocasiones, los marcadores mitocondriales no proporcionan la suficiente resolución para establecer patrones evolutivos y de genética de poblaciones, ya que la delimitación de una especie o de una población requiere información procedente de muchas fuentes diferentes, como morfología, etiología, patrones de desarrollo y múltiples marcadores moleculares, tanto mitocondriales como nucleares [Funk & Omland 2003; Dayrat 2005]. En estos casos, son los genes nucleares los que ofrecen una mayor resolución, permitiendo incluso la detección de especies crípticas. Además, generalmente en taxones animales, el ADNn es el de mayor utilidad para la diferenciación poblacional [Wells & Stevens 2010].

En este contexto, la genética de poblaciones en insectos con interés económico, como las abejas polinizadoras y productoras de miel, o sanitario, como los chinches y mosquitos vectores de patógenos, se encuentra muy desarrollada. En concreto, la historia evolutiva y la estructura poblacional de la abeja, *Apis mellifera*, se conoce en profundidad, estando sus marcadores poblacionales bien definidos. Asimismo, tanto en apicultura como en pesquería se llevan a cabo, de forma rutinaria, planes de conservación y selección para la gestión de los recursos existentes y el mantenimiento de las especies autóctonas [De La Rúa *et al.* 2001; Manel *et al.* 2005; Wells & Stevens 2008]. Sin embargo, este campo está aún sin desarrollar en el ámbito de la entomología forense. En general, se asume que existe una población homogénea en la que los individuos se entrecruzan aleatoriamente [Wells & Stevens 2008]. La razón fundamental que puede dificultar la existencia de una estructura genética poblacional definida es el considerable flujo génico y la falta de aislamiento geográfico que presentan [Picard & Wells 2010]. Así, un individuo adulto (díptero necrófago) puede

I. Introducción

recorrer grandes distancias en un mismo día [Wall 1993; Nelson *et al.* 2007; Wells & Stevens 2008; Picard & Wells 2010]. Sin embargo, también pueden observarse adaptaciones a ambientes locales, como la clina latitudinal en la respuesta a la diapausa de la familia Sarcophagidae [Kurahashi & Ohtaki 1989]. En general, la mayoría de los estudios poblacionales realizados en insectos están basados en regiones codificantes de ADNmt que, probablemente se encuentren demasiado conservadas como para acumular este tipo de variabilidad genética [Wells & Stevens 2008]. Aunque algunos autores dicen haber detectado una relación entre distancia geográfica y divergencia genética en algunas poblaciones, para COI *barcode* y otros genes mitocondriales, lo cierto es que, habitualmente ésta no es significativa.

Comúnmente, los genotipos hipervariables, es decir los que tienden a variar intra-específicamente, son los utilizados para inferir eventos evolutivos pasados y conocer el comportamiento poblacional actual [Weir 1996]. Así, los marcadores de linaje mitocondrial, como la región control (hipervariable), son los habitualmente empleados en genética de poblaciones para determinar el origen filogeográfico, teniendo en cuenta los linajes característicos definidos para cada región [Pereira 2000]. Por su parte, los *loci* microsatélites (STRs), marcadores de ADNnu, se han utilizado ampliamente para estimar el flujo génico en animales vertebrados [Wells & Stevens 2008, 2010]. Sin embargo, el desarrollo de paneles de estos marcadores para grupos de insectos, como los dípteros necrófagos, es muy lento, al ser mucho menor su frecuencia en el genoma de artrópodos que en el de vertebrados [Ji *et al.* 2003; Wells & Stevens 2008, 2010]; su localización es, también, mucho más costosa. A pesar de ello, se han desarrollado paneles de STRs para algunas especies de dípteros califóridos de Europa y Brasil (*L. illustris*, *L. sericata* y *Cochliomyia hominivorax*) [Hartl & Lozovskaya 1994; Florin & Gyllenstrand 2002; Torres *et al.* 2004; Torres & Azeredo-Espin 2005]. No obstante, requieren una adaptación regional y, de momento, no son aplicables a escala global [Wells & Stevens 2010].

Finalmente, se debe comentar que, desde un punto de vista evolutivo, el análisis de pequeñas regiones cromosómicas en diferentes especies proporciona información sobre las fuerzas evolutivas que influyen en la localización, el orden y la distancia de los genes en los cromosomas [Hartl & Lozovskaya 1994]. Asimismo, la comparación de mapas físicos de cromosomas completos de diferentes especies permite estimar las tasas y patrones de evolución cromosómica y reconstruir la organización de genomas ancestrales [Devos & Gale 2000]. Según algunos autores, las tasas de evolución cromosómica pueden variar, incluso, entre cromosomas de una misma especie [Rice 1984; Charlesworth *et al.* 1987].

1.3.3. Análisis del contenido digestivo de insectos

Desde una perspectiva forense, algunas de las estrategias de alimentación que han desarrollado los insectos a lo largo de su evolución, como la necrofagia, la miasis o la hematofagia, pueden ser cruciales para la resolución de las investigaciones criminales. Mientras que los insectos necrófagos, que se encuentran asociados a procesos de reducción cadavérica, ocupan un lugar principal en las estimaciones forenses [Di Luise *et al.* 2008], los insectos miásicos que se desarrollan en individuos vivos juegan en desventaja y, normalmente, no se les confiere la importancia que merecen. Asimismo, los insectos hematófagos, cuya dieta es básicamente la sangre de vertebrados vivos, suelen obviarse, bien por desconocimiento o bien por la dificultad de su detección.

Según la estrategia de alimentación, el análisis del contenido digestivo de los insectos presenta, entre otros, los siguientes usos potenciales (**Tabla 7**): en insectos necrófagos inmaduros, permite relacionar el cadáver con un lugar concreto y detectar desplazamientos *post-mortem* [Di Luise *et al.* 2008; Kondakci *et al.* 2009; Wells & Stevens 2010]; en insectos miásicos inmaduros, posibilita la identificación de la víctima y revela negligencias médicas o abandonos, normalmente asociados a individuos dependientes (niños, ancianos, enfermos, etc.) [Amendt *et al.* 2011]; en insectos hematófagos adultos (mosquitos, piojos, ladillas, chinches, pulgas, etc.), puede

I. Introducción

ubicar a un sujeto (víctima o sospechoso) en un entorno, si se localizan en un lugar concreto, o relacionarlo con la víctima, si se ha producido una transferencia durante episodios de abusos o malos tratos [Lord *et al.* 1998; Mumcuoglu *et al.* 2004; Curic *et al.* 2014].

Tabla 7. Utilidades de la identificación humana a partir del contenido digestivo de insectos.

Identificación Individual Humana			
Muertes Violentas, Abusos o Negligencias asociadas a casos de miasis			
Necrófagos inmaduros		Hematófagos adultos	
En un lugar (Coche, casa, etc.)	En la víctima (<i>Post-mortem/Ante-mortem</i>)	En un lugar (Habitación, etc.)	En la víctima (<i>Post-mortem/Ante-mortem</i>)
Conexión con Víctima/Cadáver	Identificación Víctima/Cadáver	Conexión con Sospechoso/Víctima	Identificación Sospechoso
Calliphoridae, Sarcophagidae, etc.		Chinches, mosquitos, etc.	Piojos, ladillas, pulgas, etc.

Una de las etapas decisivas para lograr extraer ADN de calidad del contenido digestivo del insecto es la detención del proceso de digestión que está teniendo lugar mediante el inmediato sacrificio y una adecuada preservación [Di Luise *et al.* 2008; Kondakci *et al.* 2009; Garipey *et al.* 2012]. En general, la tasa de digestión varía entre grupos de insectos, y depende de factores ambientales, fisiológicos y etológicos [Garipey *et al.* 2012]. Hay que considerar que las larvas de díptero metabolizan rápidamente (en horas) el alimento almacenado en situaciones de ayuno [Linville *et al.* 2004]. Por el contrario, en mosquitos se ha demostrado que las identificaciones individuales mediante STRs son viables incluso tres días después de haberse producido la última ingestión de sangre [Curic *et al.* 2014]. En general, lo recomendable es sacrificar el espécimen mediante congelación a -20 °C, lo antes posible (**Tabla 8**) [Linville *et al.* 2004; Di Luise *et al.* 2008; Kondakci *et al.* 2009].

Tabla 8. Modo óptimo de preservación según las características del vestigio.

Tipo de muestra	Modo de sacrificio	Modo de preservación
Inmaduros	-20 °C (en seco)	-20 ó -80 °C (en seco)
Adultos		

En el caso de individuos inmaduros necrófagos tendremos en cuenta, además, la existencia de una digestión pre-oral parcial que se lleva a cabo mediante la secreción de enzimas al medio. Estas enzimas fluidifican los tejidos facilitando su ingestión y su posterior almacenamiento en el buche (en inglés *crop*), hasta que tenga lugar la digestión [Wells *et al.* 2001b; Linville *et al.* 2004; Zehner *et al.* 2004a]. En estos casos, algunos autores recomiendan realizar la disección de la larva, el aislamiento del buche y la extracción del ADN del contenido digestivo en las 24 horas inmediatas a su recogida para prevenir la degradación (**Fig. 12**) [Coulson *et al.* 1990; Linville *et al.* 2004]. Conviene mencionar que las propiedades desnaturizantes del alcohol diluido y otros fijadores habitualmente utilizados en la preservación de larvas, influyen negativamente en la calidad del ADN y reducen el éxito en la obtención de los perfiles genéticos [Di Luise *et al.* 2008].

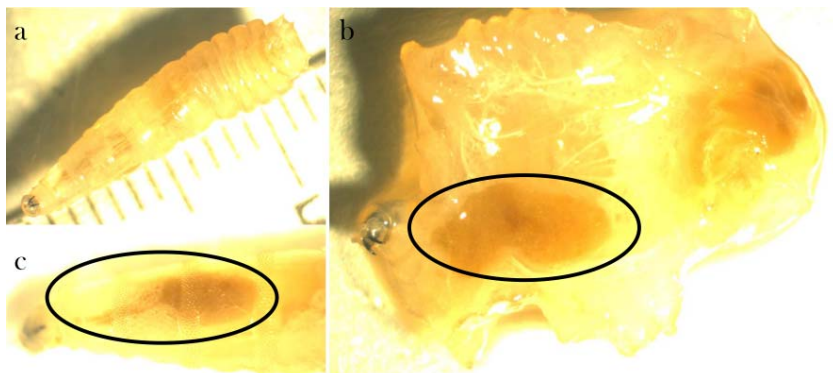


Fig. 12. Disección de inmaduros necrófagos para el aislamiento del buche. Inmaduro completo (a), buche (b) y disección para extracción del buche (c).

Por otro lado, cuando el interés se centra exclusivamente en la identificación a nivel específico de los animales vertebrados, fuente de alimento más frecuente de las larvas de dípteros, es el gen mitocondrial Cyt-b el que se analiza habitualmente en los laboratorios forenses [Parson *et al.* 2000; Wells & Stevens 2010]. Sin embargo, hay que mencionar que la creciente avalancha de información generada para el marcador

I. Introducción

COI *barcode* con el desarrollo del “DNA Barcode of Life Project”, seguramente favorecerá la utilización de este *locus* como herramienta diagnóstica molecular en las investigaciones forenses.

Actualmente, la identificación individual humana se realiza de forma rutinaria mediante el análisis de una batería de *loci* STRs establecidos. Los *loci* STRs son secuencias cortas repetidas en tándem que se sitúan en regiones altamente polimórficas del ADNnu. Dado que dichas repeticiones no se encuentran conservadas intra-específicamente, cada individuo presenta un número característico de unidades de repetición que permite la identificación individual. Para el análisis de los STRs se utilizan convencionalmente sistemas multiplex comerciales, como pueden ser el AmpFLSTR® Identifiler® (con amplificadores de STRs de mayor tamaño), para el análisis de ADN en buen estado, o el AmpFℓSTR® MiniFiler™ (con amplificadores de STRs de menor tamaño), para ADN degradado [Sánchez *et al.* 2006; Di Luise *et al.* 2008; Kondakci *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014]. Sin embargo, en muestras altamente degradadas, cuyo ADN puede estar muy fragmentado o ser escaso, la integridad de las secuencias requeridas para amplificar los STRs puede verse comprometida. En los últimos años, para acometer la identificación individual humana con estas muestras problemáticas se están desarrollando paneles de SNPs nucleares altamente polimórficos [Sánchez *et al.* 2006; Kondakci *et al.* 2009], cuya exitosa aplicación puede propiciar que, en un corto período de tiempo, se utilicen de forma complementaria o como alternativa a los STRs tradicionales.

1.3.4. Estudios de expresión génica

Casi la totalidad de la información expuesta hasta el momento, se ha referido al análisis de ADN (ADNnu y ADNmt) desde un enfoque principalmente de diagnóstico o de caracterización. Sin embargo, en la actualidad, el ácido ribonucleico (ARN) se utiliza frecuentemente en estudios sobre expresión génica para revelar los genes activos en el momento del procesado de una muestra de tejido [Arbeitman *et al.* 2002]. Hay que

considerar que según el tipo celular y el momento de desarrollo, el contenido de ARN mensajero (ARNm) es diferente y único [Amendt *et al.* 2011; Butler 2012]. Además, cada perfil de ARNm ofrece la oportunidad de desarrollar ensayos tejido-específicos enfocados a la detección de genes concretos [Butler 2012]. En el ámbito de la entomología forense, la aplicación más directa de los estudios de expresión génica es el establecimiento de modelos más precisos de los estadios de desarrollo de los califóridos de interés forense, que incrementen la precisión de las estimaciones del PAI, o IPM [Wells & Stevens 2010].

En este sentido, se sabe que durante el desarrollo post-embrionario, desde larva hasta la emergencia del adulto, el insecto está sometido a grandes cambios [Charles 2010], tanto en forma como en tamaño. Estos cambios externos son los que, tradicionalmente, se utilizan en la estimación de la edad del espécimen [Wells & Stevens 2010]. Desafortunadamente, la detección de cambios morfológicos útiles es bastante compleja, y todavía no están definidos para la mayor parte del ciclo de vida, lo que puede introducir incertidumbre en las estimaciones [Wells & Stevens 2010]. El mayor dilema se plantea cuando el inmaduro alcanza su tamaño máximo durante el tercer estadio larvario (LIII) y entra en fase migratoria [Greenberg & Kunich 2002]. Durante este período, que puede ser tan prolongado como la mitad de la vida de la larva, ésta disminuye de tamaño mientras se prepara para pupar (prepupa) [Greenberg & Kunich 2002]. Así, en el inicio y final de la fase LIII podemos encontrar coincidencias de tamaño que dificulten la diferenciación entre la larva en fase de crecimiento activo o en fase migratoria [Wells & Stevens 2010; Amendt *et al.* 2011]. Además, una vez inicia la fase pupa, hay un estancamiento en el que no se producen cambios morfológicos evidentes [Amendt *et al.* 2011]. Otros criterios, como los cambios en sus órganos internos, podrían ser de utilidad pero todavía no están claramente establecidos [Greenberg & Kunich 2002; Wells & Stevens 2010].

I. Introducción

En insectos holometábolos, con metamorfosis completa como los califóridos, las células epidérmicas se encuentran en continua actividad, sintetizando cutículas diferentes según el estadio de desarrollo (larva, pupa y adulto) [Charles 2010]. Esta capa externa, compuesta por fibras de quitina y proteínas cuticulares, modifica sus propiedades físicas al variar su composición durante la vida del insecto, siendo flexible en la fase larvaria y rígida en la fase pupa o adulta, así como según la región anatómica considerada [Charles 2010]. Por ejemplo, los inmaduros presentan cutícula dura en las piezas bucales y cutícula flexible en la superficie del cuerpo, debido a su modo de locomoción [Charles 2010] y a su extremada voracidad. Por todo ello, los genes que codifican para las proteínas cuticulares son de gran interés para el establecimiento de patrones de desarrollo de insectos que relacionen la diferenciación celular tejido-específica con un determinado período de tiempo transcurrido [Charles 2010]. Estudios en la especie *L. sericata* han demostrado que se pueden establecer patrones de expresión génica en función de la edad [Tarone *et al.* 2007]. Asimismo, estudios realizados en otros insectos sobre la regulación hormonal de los genes de las proteínas cuticulares revelaron notables diferencias en la expresión génica según la etapa de desarrollo (**Fig. 13**) [Charles 2010].

En un futuro próximo, la aplicación de estos estudios permitirá incrementar, considerablemente, la fiabilidad que una evidencia entomológica ofrece para la estimación del tiempo de desarrollo en los períodos críticos preimaginales, como la fase migratoria o la fase pupa, utilizados habitualmente en el cálculo del IPM [Wells & Stevens 2010].

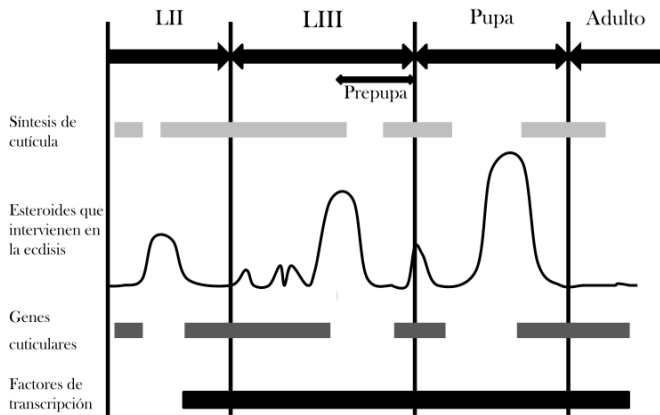


Fig. 13. Representación simplificada de los períodos de síntesis de cutícula y de los esteroides que intervienen en la ecdisis, durante el desarrollo larvario y la metamorfosis de *Drosophila*, y que se solapan con los períodos de expresión de los genes cuticulares y la activación de los factores de transcripción. Adaptado de Charles (2010).

Por último, hay que mencionar que la metodología de trabajo con ARN difiere notablemente de la aplicada tradicionalmente para el ADN (**Fig. 14**). Ésta requiere la adaptación de los protocolos de extracción convencionales para la coextracción de ARN y ADN [Álvarez *et al.* 2004]. Además, al ser el ARN una estructura de cadena simple, es químicamente más inestable y más fácilmente degradable por las enzimas digestivas que el ADN [Juusola & Ballantyne 2003]. Por ello, uno de los aspectos críticos es la preservación del mismo en los especímenes. Sin embargo, algunos marcadores de ARNm utilizados en sangre y saliva humana, parecen presentar una elevada resistencia a la degradación, proporcionando resultados satisfactorios en vestigios de, incluso, 16 años de antigüedad [Zubakov *et al.* 2009]. El objetivo principal es determinar la cantidad de un ARNm concreto por lo que, tras la extracción, se lleva a cabo la transcripción inversa a ADN complementario (ADNc) y se cuantifica mediante *Northern blot* [Juusola & Ballantyne 2007; Fleming & Harbison 2010] o PCR a tiempo real [Noreault-Conti & Buel 2007; Haas *et al.* 2009; Amendt *et al.* 2011].

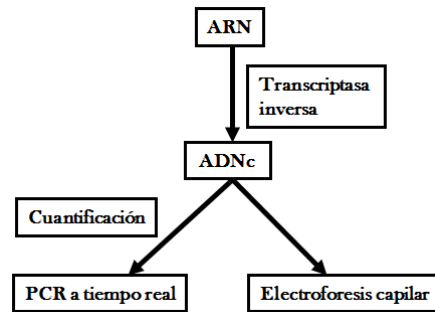


Fig. 14. Metodología de análisis de ARN. Adaptado de Butler (2012).

1.4. Perspectivas en entomología molecular

En resumen, la entomología forense está adquiriendo cada vez mayor relevancia a nivel mundial como apoyo en la resolución de investigaciones forenses. En Norteamérica y otros países anglosajones, los estudios entomológicos están más asentados por la tradicional colaboración existente entre entomólogos y cuerpos judiciales. Sin embargo, en Sudamérica y en países como España, todavía queda mucho trabajo por realizar. Aunque, los progresos efectuados indican un importante desarrollo en este campo, la aplicación generalizada de esta disciplina a nivel regional (continente, país, etc.) sigue siendo complicada, debido especialmente a la escasa colaboración entre instituciones y a la escasez de investigación básica necesaria para el adecuado conocimiento de la fauna necrófaga característica de cada territorio. Por ello, la paulatina incorporación de esta disciplina forense a las investigaciones legales requiere la realización paralela de estudios de ecología, biología, taxonomía y sistemática, que permitan conocer, entre otros aspectos, la distribución geográfica y estacional de la fauna cadavérica en los diferentes bioclimas y sus tiempos de desarrollo característicos. Para ello, es necesaria la elaboración de mapas de distribución, matrices y curvas de crecimiento de las principales especies utilizadas como indicadores forenses, así como, la aplicación de modelos matemáticos que agilicen y garanticen la calidad del peritaje. Complementariamente, la correcta

identificación taxonómica de individuos encontrados en un cuerpo y/o en el lugar de un suceso, tanto adultos como larvas, es un paso crucial para que el curso de la investigación sea legítimo [Malgorn & Coquoz 1999]. Así, resulta fundamental disponer de herramientas adecuadas para la correcta identificación de las especies de insectos necrófagos más representativas, que hagan posible la estimación precisa del tiempo y lugar de un suceso.

En general, es necesario el diseño y desarrollo de procedimientos actualizados, incorporando tecnologías y conocimientos de última generación, tanto para mejorar la fiabilidad, rapidez y objetividad de los análisis, como para reducir sus costes. El imparable progreso tecnológico está propiciando la evolución, incluso, de la entomología más tradicional, la morfológica, en la que están surgiendo nuevos campos, como la entomología forense virtual. Este último, aún en proceso de desarrollo, incorpora la micro-tomografía computarizada, por ejemplo, para describir los cambios anatómicos internos que se suceden durante la metamorfosis [Richards *et al.* 2012], aplicable en la estimación precisa del IPM. Por su parte, la entomología molecular no se limita a la introducción de las técnicas de genotipado emergentes, como el HRM, la pirosecuenciación o la secuenciación a gran escala (NGS). Por ello, se han comenzado a explorar nuevos horizontes utilizando tecnologías ampliamente establecidas en otras disciplinas forenses, como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas, y cuyo objetivo no es el análisis del material genético sino el de los hidrocarburos cuticulares y los compuestos orgánicos volátiles asociados [Frederickx *et al.* 2012; Braga *et al.* 2013]. Algunos estudios han revelado que éstos pueden variar en función de factores genéticos (edad, sexo, etc.), medioambientales (alimentación, temperatura, etc.), o geoclimáticos [Liang & Silverman 2000; Rouault *et al.* 2000; Drijfhout 2010; Frederickx *et al.* 2012]. Así, en *C. vicina* los perfiles de los compuestos orgánicos volátiles han mostrado variabilidad en composición y cantidad en función de la edad (larvas/pupas) [Frederickx *et al.* 2012]. Además, los

1. Introducción

hidrocarburos cuticulares han demostrado ser de interés para la discriminación de especies estrechamente relacionadas o poblaciones complejas en algunos insectos como cucarachas [Carlson & Brenner 1988; Everaerts *et al.* 1997], y mosquitos [Phillips *et al.* 1990; Horne & Priestman 2002]. Más recientemente, estos hidrocarburos se han utilizado para la diferenciación taxonómica de dípteros necrófagos de géneros o familias distintos [Ye *et al.* 2007; Braga *et al.* 2013]. Sin embargo, aunque estas tendencias abren nuevos horizontes por su gran potencial y aplicabilidad, bien en la estimación del IPM bien en el diagnóstico específico, aún les queda mucho camino por recorrer hasta estar formalmente establecidas en el ámbito de la entomología forense. Por ello, actualmente, los análisis basados en ADN siguen siendo los más utilizados al proporcionar información más completa y fiable.

II. Hipótesis y objetivos /

Hypothesis and objectives

A día de hoy, la metodología de referencia para la identificación específica es el análisis de marcadores moleculares combinando amplificación mediante PCR y secuenciación, que proporciona una información detallada de la secuencia nucleotídica.

Las ventajas que presenta el ADN mitocondrial (ADNmt) respecto al nuclear (ADNnu), mayor número de copias y tasa de mutación, han hecho que la práctica totalidad de las investigaciones se centren en él. Actualmente, existe un variado abanico de marcadores mitocondriales con los que abordar eficazmente los diagnósticos.

Los genes mitocondriales tradicionalmente utilizados en la caracterización de invertebrados son los que codifican para las subunidades I y II del citocromo c oxidasa (COI y COII) [Sperling *et al.* 1994; Malgorn & Coquoz 1999; Caterino *et al.* 2000; Wallman & Donnellan 2001; Wallman *et al.* 2005; Wells & Stevens 2008; Zaidi *et al.* 2011; Nelson *et al.* 2012]. Entre ellos, el gen COI es el *locus* de referencia, considerándose su región *barcode* (COI *barcode*) como marcador universal para el diagnóstico animal [Hebert *et al.* 2003]. Asimismo, un amplio rango de tamaños de este *locus* se ha utilizado en la identificación de dípteros necrófagos [Wallman *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007; Harvey *et al.* 2008; Desmyter & Gosselin 2009; Park *et al.* 2009a; Singh & Wells 2011], siendo los marcadores de mayor longitud, o más completos, los más robustos. Sin embargo, en determinados casos la eficacia de dichos marcadores resulta insuficiente, por presentar un reducido poder de discriminación entre especies. No obstante, su estudio habitual hace que la información recogida en las bases de datos, para una amplia variedad de especies y orígenes geográficos, sea atractiva para una primera aproximación taxonómica.

Un ejemplo claro donde la aplicación del *locus* COI *barcode* presenta limitaciones es en la diferenciación de especies estrechamente relacionadas de los géneros *Calliphora*, *Lucilia* o *Chrysomya*, entre otros [Wallman & Donnellan 2001; Wells *et al.* 2007; Harvey *et al.* 2008; Reibe *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2012]. En estos

II. Hipótesis y objetivos

casos, suele existir un alto grado de similitud genética y morfológica entre especies, que dificulta los diagnósticos e incluso los hace infructuosos. Esta problemática tiene su origen en la escasa divergencia nucleotídica mostrada por el marcador y que normalmente suele relacionarse con procesos de especiación inacabados. Así, las especies de reciente emergencia requerirán tiempo hasta poder diferenciar la variación inherente a la especie (intra-específica) de la inter-específica, parámetro conocido como *barcoding gap* [Rubinoff *et al.* 2006; Coleman 2009; Alquezar *et al.* 2010]. No obstante, esta falta de divergencia genética puede estar también condicionada por las diferencias en la tasa de mutación que pueden presentar unos *loci* respecto a otros en función de la especie y el marcador mitocondrial.

Esto hace que sea necesario desarrollar nuevas estrategias de análisis en las que intervengan marcadores con capacidad diagnóstica concluyente. Según algunos autores, el abordaje más adecuado en este tipo de muestras complejas podría ser el análisis multi-región. Sin embargo, la escasez de datos referidos a otros marcadores, tanto mitocondriales como nucleares, hace que su eficacia parezca insuficiente o no esté demostrada, permaneciendo así los marcadores tradicionales como fundamentales para el diagnóstico molecular.

En este sentido, estudios previos han demostrado la idoneidad de algunos *loci* mitocondriales mucho menos frecuentes en taxonomía de insectos. Así, la región no codificante situada entre el ARN transferente para la serina (ARNt^{ser}) y la subunidad 1 de la nicotinamida deshidrogenasa (ND1) (ARNt^{ser}-ND1) se ha utilizado con éxito en la diferenciación de varios dípteros miásicos de la familia Oestridae [Weigl *et al.* 2010b]; mientras que, el citocromo b (Cyt-b) establecido en los laboratorios forenses para el diagnóstico de especies vertebradas (especialmente mamíferos) [Bataille *et al.* 1999; Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003; Tobe *et al.* 2010], se ha aplicado en la identificación de algunos dípteros de interés forense (Calliphoridae y Piophilidae) [M de Pancorbo *et al.* 2004; Zaidi *et al.* 2011]. En general, los datos genéticos disponibles

son todavía muy escasos y aislados, requiriéndose por ello un análisis más detallado en las especies de interés médico-legal y veterinario.

Por otra parte, el marcador nuclear más relevante en taxonomía y sistemática molecular es el espaciador transcrito interno (ITS), que incluye el primer espaciador (ITS1), la región 5.8S y el segundo espaciador (ITS2) [Coleman 2003]. Este marcador presenta una correlación entre los cambios nucleotídicos compensatorios en las estructuras secundarias de las hélices II o III de ITS2 y la incompatibilidad sexual [Müller *et al.* 2007; Ahvenniemi *et al.* 2009; Coleman 2009; Alquezar *et al.* 2010]. Así, la región ITS2 acumula mutaciones de forma relativamente rápida (incluso superior al ADNmt) en las poblaciones reproductivamente aisladas, siendo de los primeros indicadores en registrar la discontinuidad genética [Müller *et al.* 2007; Coleman 2009; Alquezar *et al.* 2010]. Por ello, dicha región es un referente en el diagnóstico de dípteros hematófagos [Walton *et al.* 2007a-b; Alquezar *et al.* 2010; Loaiza *et al.* 2013]. Sin embargo, en la identificación de califóridos el marcador ITS2 es objeto de controversia, ya que en algunos trabajos posibilita la diferenciación inequívoca de especies [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008b; Zaidi *et al.* 2011], mientras que en otros no [Sonet *et al.* 2012]. Esta cuestión se encuentra aún sin resolver por la falta de estudios al respecto, siendo los datos genéticos muy escasos o inexistentes para muchas especies de interés.

Lo anteriormente referido subraya la necesidad de profundizar en el conocimiento de la variabilidad genética característica de cada especie y marcador (mitocondrial o nuclear) para el diagnóstico eficaz de los dípteros de interés médico-legal y veterinario. Asimismo, hay que considerar que la entomología es una ciencia específica de cada lugar, por lo que es esencial evitar generalizaciones y realizar las identificaciones desde una perspectiva local. No obstante, en lo que respecta a la Península Ibérica (sur de Europa), únicamente algunos estudios realizados en Portugal por Cainé *et al.* (2006, 2009), Oliveira *et al.* (2011) y Rolo *et al.* (2013) han abordado de forma sucinta la

II. Hipótesis y objetivos

entomología forense desde el punto de vista molecular, siendo la información genética disponible aún muy limitada.

Por otra parte, la reciente introducción del análisis de las curvas de disociación de alta resolución (HRM), potente herramienta para el genotipado de polimorfismos, la detección de mutaciones y la asignación de homología, de forma rápida y precisa [Reed *et al.* 2007; Radvansky *et al.* 2011; Wong *et al.* 2013] responde al objetivo que se plantea la biología molecular moderna de desarrollar nuevas tecnologías que mejoren las prestaciones de las convencionales. A pesar de que esta técnica novedosa es ampliamente utilizada para el diagnóstico de microorganismos patógenos (virus, bacterias o protozoos y sus variantes) [Monis *et al.* 2005; Lin *et al.* 2008; Pietzka *et al.* 2009], su aplicación al contexto entomológico se encuentra aún sin desarrollar. Hasta la fecha, sólo unos pocos trabajos están enfocados al estudio de marcadores con limitaciones en la diferenciación de algunas especies de califóridos [Malewski *et al.* 2010], o de insectos que actúan como vectores de enfermedades y que afectan a la ganadería o a la agricultura [Kang & Sim 2013; Wetten *et al.* 2016]. Por ello, resulta imprescindible abordar esta temática desde una orientación entomológica.

Hasta el momento, la información expuesta se ha referido exclusivamente al estudio del material genético del insecto. No obstante, en situaciones concretas el contenido digestivo del mismo puede emplearse como reservorio de ADN del hospedador (fuente de alimento), con interés para la identificación a nivel específico e, incluso, individual. En este sentido, la mayoría de estudios se enmarcan en el contexto médico o veterinario orientado a la investigación de insectos hematófagos para el control epidemiológico [Coulson *et al.* 1990; Boakye *et al.* 1999; Kreike & Kampfer 1999; Mukabana *et al.* 2002; Curic *et al.* 2014]. En el ámbito forense, su aplicación más relevante es determinar la identidad de la víctima o del sospechoso mediante el análisis de microsatélites (*short tandem repeats*, STRs). Asimismo, la identificación a nivel específico se realiza con el citocromo b (Cyt-b), y es de utilidad cuando concurren

varios cadáveres de diferentes especies, y/o si el origen de la larva es dudoso. Considerando las escasas publicaciones al respecto, su aplicación en casos reales es limitada [Zehner *et al.* 2004a; Di Luise *et al.* 2008; Li *et al.* 2011; Marchetti *et al.* 2013], basándose los estudios más consistentes en situaciones simuladas de las que se obtienen generalmente resultados experimentales ideales y no extrapolables [Clery 2001; Mumcuoglu *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2005; Kondakci *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014].

Lo anteriormente mencionado pone de relieve la necesidad de realizar más estudios entomológicos desde el punto de vista molecular, que permitan la adecuada praxis de esta ciencia como soporte en las investigaciones criminales.

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el conocimiento de la diversidad genética de la fauna entomológica de interés médico-legal y veterinario, mediante el examen e incorporación de marcadores y metodologías que aseguren la correcta identificación de las especies en el campo de la entomología molecular, tanto en el ámbito geográfico de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) como a nivel Peninsular y Europeo.

Además, como meta complementaria se aborda el estudio de las evidencias entomológicas como fuente de ADN del hospedador, en casos reales, para la determinación de la fuente de alimento a nivel de especie o de individuo. Este trabajo considera los beneficios y la aplicabilidad de la investigación, sin descuidar el estudio de aspectos básicos de la entomología, que nos ayudan a comprender e interpretar mejor la información contenida en las evidencias entomológicas. Por último, se espera contribuir al desarrollo de la investigación forense en la CAPV, con la revisión del protocolo de actuación para la recogida, procesamiento y registro de evidencias entomológicas.

II. Hipótesis y objetivos

El trabajo que se presenta en esta memoria se ha centrado en los siguientes objetivos específicos:

1. Examinar las ventajas y limitaciones de los marcadores moleculares convencionales para la identificación de dípteros necrófagos y miásicos.
2. Contribuir con nuevos marcadores moleculares, más resolutivos y eficaces, a la inequívoca clasificación taxonómica de dípteros de importancia médico-legal y veterinaria.
3. Caracterizar molecularmente los dípteros de interés médico-legal y veterinario, tanto del sur como del centro de Europa, y estudiar su variabilidad nucleotídica.
4. Elaborar un panel de marcadores para la identificación molecular de los dípteros Calliphoridae de importancia forense del sur de Europa (Península Ibérica).
5. Incorporar y validar tecnologías novedosas, como el análisis de los perfiles de disociación de alta resolución (*high-resolution melting*, HRM), para simplificar y mejorar la rapidez de los diagnósticos moleculares, reduciendo sus costes.
6. Aplicar la entomología molecular para superar las dificultades taxonómicas habituales en situaciones reales: identificación específica de insectos en malas condiciones y control de calidad de los diagnósticos convencionales.
7. Mejorar la efectividad y utilidad del análisis del ADN del hospedador contenido en la evidencia entomológica, para determinar, a nivel específico e individual, la fuente de alimento.
8. Elaborar unas directrices básicas que permitan la integración de la entomología forense como un proceso más en las investigaciones criminales que se lleven a cabo en la CAPV.

El desarrollo de estos objetivos supondrá la generación de nuevos conocimientos y metodologías aplicables, tanto a la sistemática entomológica como a la ciencia médica, veterinaria y forense, con buenas perspectivas de productividad y competitividad, en el ámbito de la CAPV y a nivel de la Península Ibérica o de Europa.

Por último, se debe mencionar que este trabajo persigue un bien social y se adecúa a las prioridades de especialización, enmarcadas en materia de investigación en el “PCTI Euskadi 2020”, en el “Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016”, y en el Programa Europeo “Horizonte 2020”. Así, por su carácter multidisciplinar, podríamos adscribirlo a las acciones estratégicas de biociencias y salud, en relación con la biotecnología, la biodiversidad y la salud pública y ambiental.

Nowadays, the reference methodology for specific identification is the analysis of molecular markers combining PCR amplification and sequencing, which provides detailed information of the nucleotide sequence.

The advantages that the mitochondrial DNA (mtDNA) offers in regard to the nuclear (nuDNA), greater copy number and mutation rate, have made that almost all investigations were focused on it. Currently, there is a wide variety of mitochondrial markers to be addressed effectively diagnoses.

Mitochondrial genes traditionally used in the characterization of invertebrates are those encoding for subunits I and II of cytochrome c oxidase (COI and COII) [Sperling *et al.* 1994; Malgorn & Coquoz 1999; Caterino *et al.* 2000; Wallman & Donnellan 2001; Wallman *et al.* 2005; Wells & Stevens 2008; Zaidi *et al.* 2011; Nelson *et al.* 2012]. Among them, the COI gen is the reference *locus*, considering its barcode region (COI barcode) as an universal marker for the diagnosis of animals [Hebert *et al.* 2003]. Moreover, a wide range of lengths of this *locus* has been used in the identification of necrophagous dipterans [Wallman *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007; Harvey *et al.* 2008; Desmyter & Gosselin 2009; Park *et al.* 2009a; Singh & Wells 2011], being the markers of greater length, or more complete, the most robust. However, in certain cases the effectiveness of such markers is not enough, as they have a reduced inter-species discrimination power. Nevertheless, its common study makes the information recorded in the databases, for a wide variety of species and geographic origins, attractive as a first taxonomic approach.

A clear example where the use of COI barcode exhibits limitations is in distinguishing closely related species of *Calliphora*, *Lucilia* or *Chrysomya* genera, among others [Wallman & Donnellan 2001; Wells *et al.* 2007; Harvey *et al.* 2008; Reibe *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2012]. In those cases, there is usually a high degree of genetic and morphological similarity between species, which difficult the diagnoses and even makes them unsuccessful. This problematic has its origin on the low

II. Hypothesis and objectives

nucleotide divergence shown by the marker and is normally related to unfinished speciation processes. Thus, species of recent emergence require time to distinguish the variation inherent to the species (intra-specific) from the inter-specific, parameter known as barcoding gap [Rubinoff *et al.* 2006; Coleman 2009; Alquezar *et al.* 2010]. However, this lack of genetic divergence can be also conditioned by differences in the rate of mutation that may have some *loci* in contrast to others, depending on the species and mitochondrial marker.

This makes necessary to develop new analysis strategies involving markers with conclusive diagnostic capability. According to some authors, the most appropriate approach for this type of complex samples may be the multi-region analysis. However, the lack of data on other markers, both mitochondrial and nuclear, makes their effectiveness apparently insufficient or unsubstantiated, remaining the traditional marker as essential to the molecular diagnosis.

In this regard, previous studies have demonstrated the suitability of few mitochondrial *loci* far less common in insect taxonomy. Thus, the non-coding region located between the serine transfer RNA (tRNA^{ser}) and the subunit 1 of nicotinamide dehydrogenase (ND1) (tRNA^{ser}-ND1) has been successfully used in differentiating several myiasic Diptera of Oestridae family [Weigl *et al.* 2010b]; while, the cytochrome b (Cyt-b), established in forensic laboratories for the diagnosis of vertebrate species (especially mammals) [Bataille *et al.* 1999; Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003; Tobe *et al.* 2010], has been applied in the identification of few Diptera of forensic interest (Calliphoridae and Piophilidae) [M de Pancorbo *et al.* 2004; Zaidi *et al.* 2011]. Overall, the genetic data available are still very scarce and isolated, needing therefore a more detailed analysis about the species of medico-legal and veterinary.

Otherwise, the most important nuclear marker in molecular taxonomy and systematics is the internal transcribed spacer (ITS), that includes the first spacer (ITS1), the 5.8S region, and the second spacer (ITS2) [Coleman 2003]. This marker exhibited a

correlation between compensatory nucleotide changes on helix II or III of the ITS2 secondary structures and sexual incompatibility [Muller *et al.* 2007; Ahvenniemi *et al.* 2009; Coleman 2009; Alquezar *et al.* 2010]. Thus, the ITS2 accumulates mutations relatively quick (even higher than mtDNA) within reproductively isolated populations, being of the first indicators in collecting the genetic discontinuity [Muller *et al.* 2007; Coleman 2009; Alquezar *et al.* 2010]. Therefore, such region is a reference in the diagnosis of haematophagous Diptera [Walton *et al.* 2007a-b; Alquezar *et al.* 2010; Loaiza *et al.* 2013]. However, in identifying blowflies the ITS2 marker is controversial, because in some works enables clear species differentiation [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008b; Zaidi *et al.* 2011] but in others not [Sonet *et al.* 2012]. This issue is still unresolved, because of the lack of studies in this regard, being the genetic data very scarce or nonexistent for many species of interest.

The above mentioned emphasizes the need to deepen the knowledge of the characteristic genetic variability of each species and marker (mitochondrial or nuclear) for the effective diagnosis for Diptera of medico-legal and veterinary interest. Moreover, it has to be considered that entomology is a locality-specific science, so it is essential to avoid generalizations and make identifications from a local perspective. However, with regard to the Iberian Peninsula (Southern Europe), only few studies performed in Portugal by Cainé *et al.* (2006, 2009), Oliveira *et al.* (2011) and Rolo *et al.* (2013) have addressed in a succinct way the forensic entomology from a molecular point of view, being the genetic information available very limited.

Otherwise, the recent introduction of high-resolution melting analysis (HRM), a powerful tool for genotyping polymorphism, mutation detection and the assignment of homology, rapidly and accurately [Reed *et al.* 2007; Radvansky *et al.* 2011; Wong *et al.* 2013], meets the objective that modern molecular biology arises of developing new technologies to improve the output offered by conventional ones. Despite this novel technique is widely used for the diagnosis of pathogenic microorganisms (viruses,

II. Hypothesis and objectives

bacteria or protozoa and their variants) [Monis *et al.* 2005; Lin *et al.* 2008; Pietzka *et al.* 2009], its application to the entomological context is still undeveloped. Up to date, there are only a few studies focused on markers with limitations in the differentiation of some blowfly species [Malewski *et al.* 2010], or on insects that act as vectors of diseases affecting livestock or agriculture [Kang & Sim 2013; Wetten *et al.* 2016]. Thus, it is essential to address this issue from an entomological orientation.

So far, the information exposed has been exclusively referred to the study of the genetic material of the insect. However, in certain situations its digestive contents can be employed as a reservoir of host DNA (food source), with interest in the identification at specific and, even, at individual level. In this regard, most of the studies are framed in a medical or veterinary context aimed to the research of haematophagous insects for epidemiological control [Coulson *et al.* 1990; Boakye *et al.* 1999; Kreike & Kampfer 1999; Mukabana *et al.* 2002; Curic *et al.* 2014]. In the forensic field, its most important application is to determine the identity of the victim or suspect, by analyzing microsatellites (short tandem repeats, STRs). Moreover, the identification at a specific level is performed with the cytochrome b (Cyt-b), and is useful when concur several cadavers from different species, and/or if the origin of the larva is doubtful. Considering the scarcity of publications in this regard, its application in real cases is limited [Zehner *et al.* 2004a; Di Luise *et al.* 2008; Li *et al.* 2011; Marchetti *et al.* 2013], being the most consistent studies based on simulated situations from which results are ideal experimentally obtained and not translatable [Clery 2001; Mumcuoglu *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2005; Kondakci *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014].

The aforementioned highlighted the need of performing further entomological studies, from the molecular point of view, that allow proper practice of this science to support criminal investigations.

The main objective of this work is to deepen the knowledge of the genetic diversity of entomological fauna of medico-legal and veterinary interest, by examining and

incorporating markers and methodologies that ensure the correct identification of the species in the molecular entomology field, both in the geographical scope of the Basque Country or at Peninsular and European level.

Moreover, as an additional target the entomological evidence study is addressed as a source of host DNA in real cases, for determining the food source at species or individual level. This work considers the benefits and applicability of this research, without disregarding the study of basic aspects of entomology, which help us to better understand and interpret the information contained in the entomological evidence. Finally, it is expected to contribute to the development of forensic investigation in the Basque Country, with the review of procedure guidelines for the collection, processing and recording of entomological evidence.

The work that is presented in this report is focused on the following specific objectives:

1. To examine the advantages and limitations of conventional molecular markers for carrion-breeding and myiasic Diptera identification.
2. To contribute with new molecular markers, more reliable and effective, for unambiguous taxonomic classification of Diptera of medico-legal and veterinary importance.
3. To characterize molecularly the Diptera of medico-legal and veterinary interest both from Southern and Central Europe, and to study their nucleotide variability.
4. To elaborate a panel of markers for identifying molecularly the Diptera Calliphoridae of forensic importance in Southern Europe (Iberian Peninsula).
5. To incorporate and validate novel technologies, such as high-resolution melting (HRM) analysis, to simplify and improve the speed of diagnosis, reducing costs.

II. Hypothesis and objectives

6. To apply the molecular entomology to overcome the usual taxonomic difficulties in real situations: specific identification of insect in poor conditions and quality control of conventional diagnosis.
7. To improve the effectiveness and usefulness of the host DNA analysis contained in the entomological evidence, to determine at a specific and individual level the food source.
8. To elaborate basic guidelines that enable the integration of forensic entomology as a further process in criminal investigations carried out in the Basque Country.

The development of these goals will generate new applicable knowledge and methodologies, both to entomological systematics and to medical, veterinary and forensic science, with good productivity prospects and competitiveness, in the area of the Basque Country and at the Iberian Peninsula or European level.

Finally, it is worth mentioning that this work pursues a social benefit and fits the priorities of specialization, framed in terms of research in the “PCTI Euskadi 2020”, in the “Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016”, and in the European program “Horizon 2020”. Thus, by its multidisciplinary nature, we could ascribe to the strategic actions of biosciences and health in relation to biotechnology, biodiversity, and environmental and public health.

III. Visión global del trabajo /

Global view of the work

La presente Tesis Doctoral afronta la consecución de los objetivos descritos anteriormente mediante el desarrollo de un total de diez aportaciones que están organizadas en dos **Bloques (I y II)** según su temática. El **Bloque I** aborda la entomología molecular como una ciencia básica para la generación de conocimiento sobre los dípteros de interés médico-legal y veterinario, incluyendo la caracterización molecular, el estudio de la variabilidad genética y la estructura filogenética de las especies más representativas del centro y sur de Europa. Esta primera parte se encuentra orientada hacia la rápida y precisa identificación taxonómica de las evidencias entomológicas y responde a los **objetivos específicos 1-5**. Por su parte, el **Bloque II** se centra en la aplicación de la entomología molecular en la resolución de situaciones reales en un contexto médico-legal y veterinario, a fin de alcanzar los **objetivos específicos 6-8**. En dichos bloques, constituidos por diferentes aportaciones, se presentan los resultados de la investigación realizada y su discusión mediante los artículos científicos ya publicados, o en vías de estarlo.

El **Bloque I** consta de seis aportaciones que incluyen trabajos publicados en la revista *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) o enviados a publicar a ésta y a otras revistas especializadas. En las **aportaciones I.I-I.V** se plantea la consecución de los cuatro primeros objetivos específicos, mientras que la **I.VI** aborda el **quinto**.

La **aportación I.I** se centra en el estudio del gen mitocondrial citocromo b (Cyt-b, 307 pb) como herramienta para la identificación de las especies necrófagas de interés forense del sur de Europa (Península Ibérica: Portugal), en colaboración con investigadores del Instituto Nacional de Medicina Legal en Oporto (INML Oporto).

En la **aportación I.II** se examina la eficacia diagnóstica de la región *barcode* del citocromo c oxidasa subunidad I (COI *barcode*, 658 pb), una región adyacente al extremo 3'- COI *barcode* (COI, 616 pb), el marcador Cyt-b (307 pb), la región Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1 (495-496 pb) que incluye un fragmento no codificante situado entre el ARN transferente para la serina (ARNt^{ser}) y la subunidad 1 de la nicotinamida

III. Visión global del trabajo

deshidrogenasa (ND1), y el segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 310-337 pb), en especies necrófagas de interés forense del centro de Europa (Alemania: *Westphalia*), en colaboración con investigadores del Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Münster (IML Münster).

La **aportación I.III** contempla la mejora de la efectividad y precisión de los análisis basados en el marcador molecular utilizado convencionalmente (COI *barcode*, 658 pb), complementándola con la de otros marcadores mitocondriales, Cyt-b (307 pb), y nucleares, ITS2 (310-331 pb), para la identificación de especies de califóridos del sur de Europa (Península Ibérica: Portugal, INML Oporto).

En la **aportación I.IV** se evalúa la capacidad diagnóstica de los marcadores mitocondriales, COI *barcode* (658 pb), COI (616 pb), citocromo c oxidasa subunidad II (COII, 725-731 pb), y nucleares, ITS2 (322-352 pb) y ITS12 (1081-1083 pb) para la diferenciación inequívoca de las especies de dípteros asociados a casos de miasis en animales del sur de Europa (Península Ibérica: Comunidad Autónoma del País Vasco, CAPV), en colaboración con la Sociedad Cooperativa de Servicios Veterinarios Abeltzain (Álava).

En la **aportación I.V** se caracterizan los marcadores moleculares de mayor utilidad diagnóstica, COI *barcode* (658 pb), COI (616 pb), Cyt-b (307 pb) e ITS2 (310-343 pb), en las especies de califóridos de interés forense del sur de Europa (Península Ibérica: CAPV).

En la **aportación I.VI** se desarrolla y valida el ensayo basado en el análisis de los perfiles de disociación de alta resolución (*high-resolution melting*, HRM) de la región nuclear ITS2 (310-343 pb), como herramienta diagnóstica alternativa, rápida y económica, para la identificación de las especies de dípteros de interés forense del sur de Europa (Península Ibérica: CAPV).

El **Bloque II** consta de cuatro aportaciones (**II.I-II.IV**) entre las que se incluyen trabajos publicados en el *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* (ISSN: 1134-6094), en el *Boletín de la Asociación española de Entomología* (ISSN: 0210-8984) y en *Eguzkilore (Cuaderno del Instituto Vasco de Criminología)* (ISSN: 0210-9700), además de un trabajo enviado a publicar a la revista *International Journal of Legal Medicine*” (ISSN: 0937-9827). Las **aportaciones II.I** y **II.II** responden al **sexto objetivo específico**, la **II.III** al **séptimo** y la **II.IV** al **octavo**.

En la **aportación II.I** se aplica la entomología molecular a la identificación de insectos, como alternativa viable al diagnóstico morfológico tradicional, en muestras en malas condiciones que carecen de caracteres taxonómicos diagnósticos (Península Ibérica: CAPV, Abeltzain).

En la **aportación II.II** se utilizan las herramientas moleculares como control de calidad de las identificaciones morfológicas realizadas en un estudio a gran escala, lo que permite la detección de errores diagnósticos (Península Ibérica: CAPV).

En la **aportación II.III** se hace uso de la entomología molecular para la identificación de la última comida del insecto (fuente de alimento), tanto a nivel de especie, utilizando el *locus* mitocondrial Cyt-b, como de individuo, mediante el análisis de *loci* STRs, a partir del ADN extraído del contenido digestivo de dípteros inmaduros recogidos de cadáveres humanos en casos reales (Alemania: *Westphalia*, IML Münster).

La **aportación II.IV** se corresponde con la actualización del protocolo de actuación consensuado para Europa para la recogida, procesamiento y registro de muestras entomológicas, elaborado en versión bilingüe (Castellano/Euskera), que facilite la integración de esta ciencia como una rutina más en las investigaciones criminales futuras que se realicen en la CAPV.

The present Doctoral Thesis faces the achievement of the previously described objectives through the development of a total of ten contributions that are organized in two **Blocks (I and II)** according to the topic. **Block I** addresses the molecular entomology as a basic science for generation of knowledge about Diptera of medico-legal and veterinary interest, including the molecular characterization, the study of genetic variability, and the phylogenetic structure of the most representative species from Central and Southern Europe. This first part is pointed towards the rapid and accurate taxonomic identification of entomological evidence, and responds to the **specific objectives 1-5**. For its part, **Block II** is focused on the application of molecular entomology in the resolution of real situations in a medico-legal and veterinary context, in order to achieve the **specific objectives 6-8**. In these blocks, compounded for different contributions, are presented the results of the performed research and its discussion through already published scientific articles, or under the process of being it.

Block I consists of six contributions, including works published in the journal *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) or sent to be published to this and other specialized journals. In the **contributions I.I-I.V** the first four specific objectives are achieved, while the **I.VI** addresses **the fifth**.

The **contribution I.I** is focused on the study of mitochondrial cytochrome b gene (Cyt-b, 307 bp) as a tool for identifying necrophagous species of forensic interest in Southern Europe (Iberian Peninsula: Portugal), in collaboration with researchers of the National Institute of Legal Medicine in Porto (NILM Porto).

In the **contribution I.II** is examined the diagnostic efficacy of the cytochrome c oxidase subunit I barcode region (COI barcode, 658 bp), an adjacent region of the 3'-COI barcode end (COI, 616 bp), the Cyt-b (307 bp) marker, the Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) region that includes a non-coding fragment located between serine transfer RNA (tRNA^{ser}) and nicotinamide dehydrogenase subunit 1 (ND1), and the

III. Global view of the work

second internal transcribed spacer (ITS2, 310-337 bp), in necrophagous species of forensic interest from Central Europe (Germany: Westphalia), in collaboration with researchers of the Institute of Legal Medicine at the University of Münster (ILM Münster).

The **contribution I.III** contemplates the improvement of the effectiveness and accuracy of the analyses based on the conventionally used molecular marker (COI barcode, 658 bp) complemented with other mitochondrial, Cyt-b (307 bp), and nuclear, ITS2 (310-331 bp), markers for the identification of blowfly species from Southern Europe (Iberian Peninsula: Portugal, NILM Porto).

In the **contribution I.IV** is evaluated the diagnostic ability of the mitochondrial markers, COI barcode (658 bp), COI (616 bp), cytochrome c oxidase subunit II (COII, 725-731 bp), and nuclear ITS2 (322-352 bp) and ITS12 (1081-1083 bp) for unambiguous differentiation of Diptera species associated with myiasis cases in animals from Southern Europe (Iberian Peninsula: Basque Country), in collaboration with the Cooperative Society of Veterinary Services Abeltzain (Álava).

In the **contribution I.V** are characterized molecular markers of greater diagnostic utility, the COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp), for blowfly species of forensic interest in Southern Europe (Iberian Peninsula: Basque Country).

In the **contribution I.VI** is developed and validated the assay based on high-resolution melting (HRM) analysis of nuclear ITS2 region (310-343 bp), as an alternative diagnostic tool, fast and cost-effective, for identifying Diptera species of forensic interest in Southern Europe (Iberian Peninsula: Basque Country).

Block II contains four contributions (**II.I-II.IV**) among which are included works published in the *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* (ISSN: 1134-6094), in the *Boletín de la Asociación española de Entomología* (ISSN: 0210-8984) and in

Eguzkilo (*Cuaderno del Instituto Vasco de Criminología*) (ISSN: 0210-9700), as well as a paper submitted for publication to *International Journal of Legal Medicine* (ISSN: 0937-9827). The **contributions II.I** and **II.II** respond to the **sixth specific objective**, the **II.II** to the **seventh** and **II.IV** to the **eighth**.

In the **contribution II.I**, it is applied the molecular entomology to insect identification, as a feasible alternative to the traditional morphological diagnosis, in samples in poor conditions which lack diagnostic taxonomic characters (Iberian Peninsula: Basque Country, Abeltzain).

In the **contribution II.II** are utilized molecular tools as quality control of morphological identifications performed in a large-scale study, allowing the detection of misidentifications (Iberian Peninsula: Basque Country).

In the **contribution II.III** the molecular entomology is employed for identifying the insect last meal (food source), both at species level, using the mitochondrial *locus* Cyt-b, and individual, by analyzing STRs *loci*, based on the DNA extracted from the digestive content of immature Diptera collected from human cadavers in real cases (Germany: Westphalia, ILM Münster).

The **contribution II.IV** corresponds to a review for European procedural guide for the collection, processing and recording of entomological samples, drafted in bilingual version (Spanish/Basque), which facilitates the integration of this science as another routine in criminal future investigations that will take place in the Basque Country.

IV. Metodología

En el presente estudio se aplican metodologías para la captura, conservación, cría, identificación morfológica (disección y manejo de claves taxonómicas) e identificación molecular (análisis de secuencias nucleotídicas y de perfiles HRM) de dípteros, además de para la identificación de la fuente de alimento de los mismos (análisis de marcadores STRs y ADNmt).

4.1. Muestreo, cría y procesamiento de dípteros

La recogida de las evidencias entomológicas se realizó mediante dos procedimientos:

- Con trampas de doble embudo, adaptadas del modelo de Hwang & Turner 2005, y cebadas con víscera animal (**Fig. 15**). Este método de muestreo selectivo aprovecha el desarrollado olfato de los dípteros necrófagos adultos que les permite detectar materia orgánica en descomposición, incluso a kilómetros de distancia. Además, permite mantener a los especímenes en buenas condiciones. Considerando las diferencias en atracción y descomposición que presentan las vísceras animales [Kaneshrajah & Turner 2004], utilizamos hígado o riñón de cerdo como cebo, por su textura y lenta descomposición.

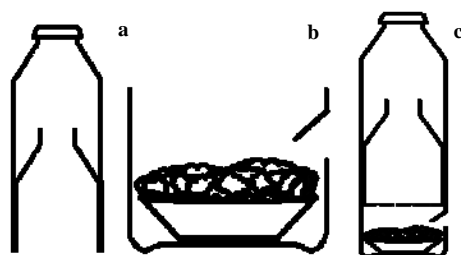


Fig. 15. Cámara de recogida (a), cámara de cebo (b) y trampa de doble embudo (c). Adaptado de Hwang & Turner (2005).

- Con pinzas, cucharas y otros utensilios para la recolección manual. Este sistema se utilizó para el muestreo en casos reales (miasis en ganado y cadáveres humanos)

IV. Metodología

de individuos inmaduros. Cuando fue posible, se procedió a la cría de los especímenes, en condiciones controladas, hasta la emergencia del adulto.

Los individuos seleccionados para la cría se transfirieron a recipientes de cría adecuados, que permitían el intercambio de aire, y se mantuvieron en condiciones controladas [Arnaldos *et al.* 2006, Amendt *et al.* 2007]. Las larvas fueron alimentadas con hígado o riñón de cerdo *ad libitum*.

El sacrificio de los especímenes adultos se realizó por congelación a -20 °C (durante 30-60 min) (**Tabla 9**). Posteriormente, se conservaron en alcohol al 70 % (**Tabla 9**), para evitar el endurecimiento de las membranas que aumenta la fragilidad de las articulaciones [Amendt *et al.* 2007].

Los estadios inmaduros requirieron unos minutos en agua hirviendo (80-100 °C) para su sacrificio y limpieza (**Tabla 9**) [Tantawi & Greenberg 1993; Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2007]. Este tratamiento permite el acondicionamiento de los tejidos y la eliminación de la protección cuticular, facilitándose así la penetración del conservante [Tantawi & Greenberg 1993]. A continuación, se preservaron en alcohol al 80 % (**Tabla 9**) [Adams & Hall 2003]. Todas las muestras fueron dispuestas en tubos individuales y se mantuvieron a -20 °C ó -80 °C hasta el momento de su utilización (**Tabla 9**).

En aquellos casos en los que el objetivo principal era la preservación y posterior análisis del contenido digestivo de las larvas, su sacrificio se hizo directamente por congelación a -20 °C (**Tabla 9**), sin la utilización de fluidos de preservación [Di Luise *et al.* 2008].

Tabla 9. Datos sobre el modo de procesamiento según el interés y el tipo de muestra. Interés, tipo de muestra, modo de sacrificio, limpieza, preservación y mantenimiento a largo plazo.

Interés	Tipo de muestra	Modo de sacrificio	Limpieza	Preservación	Mantenimiento
Insecto	Adulto	Congelación -20 °C	Ultrasonidos	Alcohol 70 %	-20 ó -80 °C
	Inmaduro	Cocción 80-100 °C	No precisa	Alcohol 80-90 %	-20 ó -80 °C
Contenido digestivo	Inmaduro	Congelación -20 °C	No precisa	En seco	-20 ó -80 °C

4.2. Identificación morfológica de insectos

La identificación morfológica de los ejemplares adultos se realizó bajo lupa (Motic microscopes SMZ 168, Motic, Barcelona, España), con ayuda de pinzas, alfileres y soportes entomológicos. En los adultos del género *Lucilia* fue necesaria la extracción de las genitalias para su correcta identificación.

Los especímenes inmaduros requirieron técnicas de disección (**Fig. 16**) y preparación en portaobjetos para la visualización, al microscopio óptico (Nikon E100-LED, Nikon instruments, Tokio, Japón), de los caracteres taxonómicos diagnósticos.

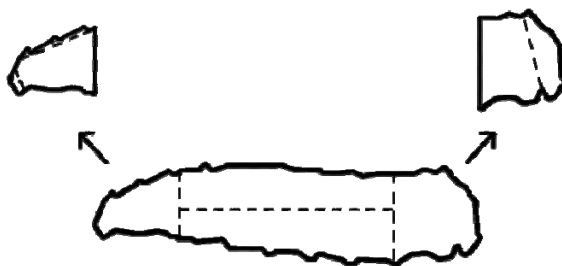


Fig. 16. Procedimiento para la disección de las larvas. Adaptado de Szpila (2010).

Las identificaciones morfológicas se realizaron siguiendo claves taxonómicas específicas (**Tabla 10**) y por comparación con la colección de referencia del Servicio de Entomología Forense de los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

Tabla 10. Claves taxonómicas utilizadas para la identificación.

Familia	Estadio de desarrollo	Clave
Calliphoridae/Muscidae	Adultos/Inmaduros	Smith 1986
	Adultos/Inmaduros	González-Mora & Peris 1988
	Adultos/Inmaduros	Peris & González-Mora 1991
Calliphoridae	Adultos/Inmaduros	Rognes 1991
	Inmaduros	Szpila 2010
	Inmaduros	Fremdt <i>et al.</i> 2012
	Adultos	Szpila 2012
Muscidae	Inmaduros	Skidmore 1985
Oestridae	Inmaduros	Zumpt 1965

IV. Metodología

4.3. Identificación molecular de insectos

4.3.1. Extracción, limpieza y cuantificación de ADN

Previa extracción, los especímenes adultos fueron inicialmente sometidos a una limpieza en baño de ultrasonidos (Symphony™ Ultrasonic Cleaner, VWR International, Radnor, PA, USA) durante varios minutos (2-6 min). Posteriormente, tanto los adultos como las larvas, fueron lavados individualmente con una solución de hipoclorito sódico (NaClO, 20 %) para eliminar la contaminación externa [Linville & Wells 2002; Campobasso *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2005].

El ADN de los dípteros adultos, de tegumentos más consistentes (exoesqueleto), se extrajo a partir de la cabeza, tras una disgregación mecánica inicial de los tejidos con *pestle* Sigma-Z3559947 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguida de una lisis proteolítica con Proteinasa K (10 µl a 20 mg/ml; Promega, Madison, WI, USA). Sin embargo, las larvas, de tegumentos menos consistentes, no precisaron de estos pasos preparatorios.

Los protocolos utilizados para la extracción de ADN de insectos (adultos y larvas) fueron: Qiagen DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), Genra Puregene Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), el EZ1 ADN Forensic Card (Qiagen, Valencia, CA, USA), DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (**Tabla 11**). El material sobrante de cada individuo se almacenó para verificaciones posteriores.

Tabla 11. Datos sobre los métodos de extracción utilizados: tipos de extracción, kits comerciales, y equipos utilizados.

Tipo de extracción	Kit	Equipo
Manual	DNeasy Tissue Kit	No requiere
	Genra Puregene Tissue Kit	
Automática	EZ1 ADN Forensic Card	BioRobot EZ1 workstation (Qiagen, Valencia, CA, USA)
	DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16	Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA)

Los extractos de ADN se valoraron mediante cuantificación espectrofotométrica y/o fluorimétrica (**Tabla 12**). La valoración espectrofotométrica permitió estimar tanto la concentración como la pureza del ADN, proporcionando las relaciones de sales y proteínas frente al ADN, en función de su capacidad de absorción a diferentes longitudes de onda. Por su parte, la valoración fluorimétrica consiguió una mayor precisión en la estimación de la concentración de ADN de doble hebra según la fluorescencia emitida por el fluorocromo PicoGreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que se une específicamente al ADN.

Tabla 12. Datos sobre los métodos de cuantificación. Tipos de valoración, fluorocromo y equipos utilizados.

Tipo de valoración	Fluorocromo	Equipo
Espectrofotométrica	No requiere	NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)
Fluorimétrica	PicoGreen®	Beckman Coulter DTX880 Multimode Detector (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)

4.3.2. Diseño de *primers* y optimización de la amplificación PCR

El diseño de *primers* se realizó mediante el examen de las secuencias de los genes de interés en las especies de dípteros estudiadas, obtenidas de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas con los programas ClustalX 1.83 [Thompson *et al.* 1997] y MUSCLE [Edgar 2004], y visualizadas en MEGA [Tamura *et al.* 2013]. Se seleccionaron las regiones flanqueantes más conservadas entre especies, para minimizar las posiciones variables en el diseño de los *primers*. Posteriormente, se procedió al diseño y estimación de las temperaturas de hibridación de las parejas de *primers* con Perlprimer v1.1.16 (<http://perlprimer.sourceforge.net/>). Finalmente, se efectuó una búsqueda con la herramienta informática BLAST [Zhang *et al.* 2000] del *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para comprobar la especificidad de las secuencias de los *primers* con las especies y regiones de ADN objeto de estudio.

IV. Metodología

La optimización de los parámetros de amplificación PCR para cada pareja de *primers* se evaluó ajustando la temperatura de hibridación, el número de ciclos, el tiempo de extensión final y la concentración de MgCl₂. Las reacciones se llevaron a cabo en diferentes termocicladores: C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.3.3. Secuenciación

4.3.3.1. Amplificación PCR, electroforesis en gel y limpieza de amplificadas

Para la amplificación PCR (*polymerase chain reaction*) de la regiones de ADN mitocondrial (Cyt-b, Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1, COI *barcode*, COI 616 pb y COII) y nuclear (ITS2 e ITS12) diana se utilizaron las parejas de *primers* indicadas en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Datos sobre los marcadores utilizados. Marcador molecular (MM), longitud del amplificado en pares de bases (L, pb), *primers* y secuencias nucleotídicas de los mismos. La notación nucleotídica sigue el código IUPAC.

MM	L (pb)	Primer	Secuencia nucleotídica
Cyt-b	307	L14816 H15173	5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3' 5'-CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3'
Cyt-b-ARNt ^{ser} -ND1	495-496	Cyt-b_F11509 ND1_R12063	5'-CTG TAA TTT TAT TAA CTT GAA TTG GAG C-3' 5'-AGG AGA GTC AGA ATT AGT TTC AGG-3'
COI <i>barcode</i>	658	LCO1490 HCO2198	5'- TTT CAA CTA ATC ATA AAG ATA TTG G -3' 5'- TAA ACT TCA GGA TGA CCA AAG AAT CA -3'
COI 616 pb	384	COI-1_F2115 COI-1_R2538	5'-TACT TCA TTC TTT GAC CCA G-3' 5'-AAC AAC TCC AGT TAA TCC TC-3'
	330	COI-2_F2439 COI-2_R2808	5'-AGC AAC TCT TTA TGG AAC TC-3' 5'-GTA AGC ATC TGG GTA ATC TG-3'
	616	COI-3_F1978 COI-3_R2810	5'- ATA CGA TCT ACA GGA ATC AC -3' 5'- GTG TAA GCA TCT GGG TAA TCT G -3'
	616	COI-1_DEG_F2115* COI-2_DEG_R2808*	5'- TAC WTC ATT YTT TGA YCC WG -3' 5'- RTA AGC RTC WGG RTA RTC TG -3'
COII	725-731	COII-F3016 COII-R3786	5'- ATA TGG CAG ATT AGT GCA ATG G -3' 5'- GGC TTT CAG TCA TCT AAT GAA GAG -3'
ITS2	310-352	ITS2-F2814-2835 ITS2-R3295-3317	5'- TGC TTG GAC TAC ATA TGG TTG A -3' 5'- GTA GTC CCA TAT GAG TTG AGG TT -3'
ITS12	1081-1083	ITS12- F ITS12-R	5'- TAA CAA GGT TTC CGT AGG TG -3' 5'- GTT ACT TTC TTT TCC TCC CCT -3'

**Primers* degenerados.

La amplificación de la mayoría de los marcadores (Cyt-b, Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1, COI *barcode*, COII, ITS2 o ITS12) se hizo utilizando un único par de *primers*. Sin

embargo, el marcador COI (616 pb) requirió de varias parejas, según su amplificación fuera en uno (COI-3_F1978/COI-3_R2810, *primers* específicos, o COI-1_DEG_F2115/COI-2_DEG_R2808, *primers* degenerados) o dos pasos (COI-1_F2115/COI-1_R2538, 384 pb, y COI-2_F2439/COI-2_R2808, 330 pb).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bajo las condiciones establecidas en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Datos sobre las condiciones de termociclado. Marcador molecular (MM), *primers*, temperatura (°C), duración (minutos o segundos) y número de ciclos de repetición de las diferentes etapas de la amplificación.

MM	<i>Primers</i>	Iniciación	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final
Cyt-b	L14816 H15173	95 °C 11 min	94 °C 30 s	35 ciclos 50 °C 45 s	72 °C 45 s	-
Cyt-b-ARNt ^{ser} -ND1	Cyt-b_F11509 ND1_R12063	95 °C 11 min	94 °C 30 s	35 ciclos 58 °C 45 s	72 °C 1 min	-
COI <i>barcode</i>	LCO1490 HCO2198	95 °C 10 min	94 °C 30 s	40 ciclos 55 °C 30 s	72 °C 1 min	72 °C 5 min
COI 616 pb	COI-1_F2115 COI-1_R2538	95 °C 11 min	94 °C 30 s	35 ciclos 58 °C 45 s	72 °C 45 s	-
COI 616 pb	COI-2_F2439 COI-2_R2808	95 °C 11 min	94 °C 30 s	35 ciclos 58 °C 45 s	72 °C 45 s	-
COI 616 pb	COI-3_F1978 COI-3_R2810	95 °C 11 min	94 °C 45 s	35 ciclos 58 °C 40 s	72 °C 1 min	72 °C 5 min
COI 616 pb	COI-1_DEG_F2115 COI-2_DEG_R2808	95 °C 11 min	94 °C 45 s	35 ciclos 58 °C 40 s	72 °C 1 min	72 °C 5 min
COII	COII-F3016 COII-R3786	95 °C 11 min	94 °C 45 s	35 ciclos 60 °C 40 s	72 °C 1 min	72 °C 5 min
ITS2	ITS2-F2814-2835 ITS2-R3295-3317	95 °C 11 min	94 °C 45 s	35 ciclos 65 °C 40 s	72 °C 1 min	72 °C 5 min
ITS12	ITS12-F ITS12-R	95 °C 11 min	94 °C 45 s	35 ciclos 60 °C 40 s	72 °C 1 min	72 °C 10 min

En cada reacción se utilizó un volumen final de 25 µl que incluía 10 ng de ADN, 0,2 mM dNTP (Bioline, Berlín, Alemania), 0,2 µM de cada *primer*, 1,6 x 10⁻⁴ mg/µl BSA (Bioline, Berlín, Alemania), 1 ó 2 unidades de Taq polimerasa (Biotaq, Bioline, Berlín, Alemania), 1 x Buffer (pH: 8,8, Bioline, Berlín, Alemania) y una cantidad variable de MgCl₂ (Bioline, Berlín, Alemania) (**Tabla 15**). En todas las reacciones se incluyeron controles positivos y blancos para comprobar el adecuado funcionamiento de la amplificación y detectar la posible contaminación de los reactivos.

IV. Metodología

Tabla 15. Datos sobre las concentraciones de MgCl₂ utilizadas. Marcador molecular (MM), *primers* y concentraciones de MgCl₂ utilizadas.

MM	<i>Primers</i>	Concentración de MgCl ₂		
		1,5 mM	2 mM	2,5 mM
Cyt-b	L14816/H15173		X	X
Cyt-b-ARNt ^{ser} -ND1	Cyt-b_F11509/ND1_R12063		X	
COI <i>barcode</i>	LCO1490/HCO2198	X		
COI 616 pb	COI-1_F2115/COI-1_R2538		X	
COI 616 pb	COI-2_F2439/COI-2_R2808		X	
COI 616 pb	COI-3_F1978/COI-3_R2810			X
COI 616 pb	COI-1_DEG_F2115/COI-2_DEG_R2808			X
COII	COII-F3016/COII-R3786	X		
ITS2	ITS2-F2814-2835/ITS2-R3295-3317		X	
ITS12	ITS12-F/ITS12-R		X	

La correcta obtención de los productos de amplificación PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa, Madrid, España) al 1,5 % en solución TBE 1X (Tris bórico EDTA, pH: 8,3). La detección de ADN se realizó con bromuro de etidio (C₂₁H₂₀BrN₃) o Red Gel, agentes intercalantes que se unen a los ácidos nucleicos y emiten fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta (254 nm). El marcador de peso molecular de referencia fue 1 Kb ADN *ladder* (Biotools, Madrid, España). La carga de los geles se hizo añadiendo 1 µl de tampón de carga (azul de bromofenol-xilencianol, C₁₉H₁₀Br₄O₅S-C₂₅H₂₇N₂NaO₆S₂; Sigma-Aldrich, Madrid, España) a 2 µl de producto amplificado. La visualización final se realizó en el Uvidoc Gel Documentation (Uvitec, Cambridge, UK). En ocasiones, también, se realizó la detección de amplificados utilizando geles de poliacrilamida al 10 % teñidos con nitrato de plata (AgNO₃).

La purificación de los productos de amplificación PCR se llevó a cabo mediante ultrafiltración por vacío con MultiScreen[®] PCR 96 Filter Plate (Millipore, Madrid, España), Millipore Montage[™] SEQ 96 Sequencing Reaction Clean-up Kit (Millipore, Madrid, España), o mediante digestión enzimática con Exo-SAP (Exonucleasa I/fosfatasa alcalina; TaKaRa Bio, Otsu, Japón), utilizando 1,25 µl de Exo-SAP (1 u/1 u) por cada 5 µl de producto amplificado.

4.3.3.2. PCR de secuenciación, limpieza y electroforesis capilar

Los productos de amplificación fueron secuenciados utilizando BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), con los *primers* de amplificación convencional como *primers* de secuenciación. Los reactivos no incorporados se eliminaron con BigDye® X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La separación electroforética y la detección de los productos de la reacción de secuenciación se hizo en un analizador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando el programa Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.3.3.3. Análisis de datos

Las secuencias fueron visualizadas con el programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd., Brisbane, Australia) y manualmente editadas en BioEdit [Hall 1999], para eliminar *primers* y errores de lectura. Además, fueron automáticamente alineadas con los programas ClustalX 1.83 [Thompson *et al.* 1997] y MUSCLE [Edgar 2004]. La traducción a proteínas de las regiones codificantes se realizó con MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013], obteniéndose pautas de lectura abierta sin codones *stop*. Las secuencias consenso para cada especie se obtuvieron en el SeaView 4.0 [Galtier *et al.* 1996]. El programa Arlequin V. 2000 [Schneider *et al.* 2000] se utilizó para calcular diferentes parámetros: número de bases (*nr. bases*, pb), número de posiciones variables (*nr. variable sites/positions*), número de sustituciones (*nr. substitutions*), número de inserciones/delecciones (*nr. INDELS*), número de transiciones (*nr. transitions*), número de transversiones (*nr. transversions*), número de haplotipos/variantes (*nr. haplotypes/variants*), composición nucleotídica (*nucleotide composition*, %), número medio de pares de diferencias (*mean nr. pairwise differences*, MNPD: mean \pm SD), diversidad nucleotídica (*nucleotide diversity*, ND: mean \pm SD) y diversidad de haplotipos/variantes (*haplotype/variant diversity*, H/VD: mean \pm SD), que para marcadores mitocondriales se denomina diversidad génica (*gene diversity*). La

IV. Metodología

búsqueda de homología en las bases de datos se hizo con las herramientas informáticas: BLAST [Zhang *et al.* 2000] del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y BOLD-IDS (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine) del “Barcode of Life Database” (BOLD).

La identificación molecular a nivel específico se realizó atendiendo a la similitud (o semejanza, *similarity*) y a la filogenia. Este análisis filogenético se centra en la habilidad del marcador molecular para resolver cada especie como monofilética, mientras que el de similitud está enfocado principalmente a la delimitación de las especies por comparación de los niveles máximos de variabilidad intra-específica con los niveles mínimos de variabilidad inter-específica. Para este último análisis las matrices de distancias por pares (*pairwise distance matrix*) se obtuvieron con el programa MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013]. Los árboles filogenéticos se infirieron utilizando los métodos *maximum likelihood* (ML), *maximum parsimony* (MP) y *neighbor joining* (NJ) en MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013]. El análisis bayesiano se llevó a cabo con el programa MrBayes 3.2 [Ronquist & Huelsenbeck 2003], utilizando árboles de inicio al azar, 10⁶ generaciones, y muestreos cada 1000 generaciones. Para la selección del modelo de sustitución nucleotídica más apropiado se siguió el criterio AIC (*akaike information criterion*), independientemente para cada marcador, en el programa jModelTest 2 [Darriba *et al.* 2012]. Los parámetros de sustitución nucleotídica generados para el modelo seleccionado se exportaron a MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013], donde se construyeron los diferentes árboles. La fiabilidad de los clados fue testada en los árboles NJ y MP con 1000 réplicas *bootstrap*. En todos los análisis se seleccionaron *out-groups* próximos a los taxones de estudio.

Además, se incluyeron, con un propósito comparativo, las secuencias recogidas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para las especies y marcadores de interés.

4.3.4. HRM (*high-resolution melting*)

4.3.4.1. Extracción de ADN

El procesamiento y la extracción de ADN se llevaron a cabo como se especifica en el apartado 3.1 para especímenes adultos. El ADN se extrajo con Genra Puregene Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante para tejidos animales. El ADN total se cuantificó espectrofotométricamente y fluorimétricamente (apartado 3.1) y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

4.3.4.2. Amplificación de ADN, secuenciación de productos amplificados y análisis de datos

Para la amplificación y secuenciación de la región ITS2 (310-343 pb) se utilizaron los *primers* ITS2_F2814-2835 5'-TGC TTG GAC TAC ATA TGG TTG A-3' y ITS2_R3295-3317 5'-GTA GTC CCA TAT GAG TTG AGG TT-3', siguiendo las especificaciones descritas anteriormente en el apartado 3.3.1. Las secuencias *forward* y *reverse* fueron visualizadas y manualmente editadas en BioEdit [Hall 1999] para eliminar los *primers* y los errores de lectura, y se alinearon de forma automática utilizando MUSCLE [Edgar 2004]. Las secuencias nucleotídicas consenso para cada especie se obtuvieron con el programa SeaView 4.0 [Galtier *et al.* 1996]. La búsqueda de homología se realizó utilizando la herramienta BLAST [Zhang *et al.* 2000] del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.3.4.3. PCR a tiempo real y análisis HRM

Los *primers* utilizados en la amplificación convencional se usaron como HRM *primers*. Cada mix de reacción HRM-PCR se preparó en un volumen final de 5 µl, utilizando 2,5 µl de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 0,75 µl de cada *primer* (1 µM) y 1 µl de ADN (2,5 ng/µl). En cada set de reacciones se incluyeron controles positivos y blancos para comprobar el adecuado funcionamiento

IV. Metodología

de la amplificación y detectar la posible contaminación de los reactivos. Las amplificaciones se llevaron a cabo en C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 98 °C, seguido de 45 ciclos de 98 °C → 5 s y 65 °C → 40 s. A continuación, los productos amplificados se sometieron a un período de desnaturalización, a 95 °C durante 30 s, y otro de hibridación, a 60 °C durante 2 min, antes del análisis HRM. El análisis de las curvas de disociación se llevó a cabo por aumento gradual de temperatura desde 65 °C a 95 °C con incrementos de 0,2 °C durante 10 s. El análisis HRM se realizó en un módulo Bio-Rad Real-time Thermal Cycler CFX96™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se monitorizó con el programa CFX Manager v2.0 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Los datos de las curvas de disociación se analizaron con el programa Bio-Rad Precision Melt™ Analysis v1.0 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), estableciendo las regiones de normalización entre 70,6-71,0 °C y 75,4-75,8 °C. En general, los genotipos se determinaron mediante comparación con una selección de muestras representativas para cada especie, que se utilizó como referencia. El programa asignó de forma automática las curvas de disociación de cada amplificado y proporcionó un porcentaje de confianza, o probabilidad relativa que tiene la muestra de pertenecer al conjunto asignado (o *cluster*), según la similitud de la muestra con la curva de disociación media de cada elemento del *cluster*. Se aplicó un umbral de confianza mínimo del 90 % [Kirkpatrick *et al.* 2009; Ganopoulos *et al.* 2012].

4.3.4.4. Validación del ensayo del análisis HRM

La validación del ensayo del análisis HRM-ITS2 incluyó la identificación de los perfiles HRM-ITS2 de referencia en muestras secuenciadas, un estudio ciego aleatorio (precisión), ensayos de especificidad, de sensibilidad y de variabilidad (repetitividad y reproducibilidad).

Identificación de los perfiles HRM-ITS2 en muestras secuenciadas

Para la validación del ensayo HRM-ITS2 se seleccionaron 295 califóridos adultos. Los especímenes fueron morfológicamente identificados siguiendo las claves taxonómicas

para la familia Calliphoridae [Smith 1986; González-Mora & Peris 1988; Peris & González-Mora 1991; Rognes 1991; Szpila 2012], y molecularmente mediante secuenciación nucleotídica y búsqueda de homología en GenBank. Posteriormente, se procedió al análisis HRM-ITS2 de las muestras. La fiabilidad de los perfiles HRM-ITS2, obtenidos para cada especie, se verificó mediante el examen de los datos de secuenciación.

Estudio ciego aleatorio

Para evaluar la precisión de este método de identificación se realizó un estudio ciego aleatorio. Se seleccionaron al azar 60 especímenes del total estudiado, que fueron numerados y desvinculados de la información inicial. Después, se llevó a cabo el análisis HRM-ITS2 y el procesamiento de los resultados de estas muestras anonimizadas. La identificación a nivel específico se realizó mediante comparación con las muestras de referencia previamente establecidas para cada especie, y que se incluyeron en cada reacción. Finalmente, se procedió a la comprobación de los resultados por comparación de la secuencia nucleotídica inicial.

Ensayos de especificidad

La evaluación de la especificidad de las regiones amplificadas se llevó a cabo mediante la búsqueda de homología de las secuencias nucleotídicas obtenidas utilizando la herramienta BLAST [Zhang *et al.* 2000] del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ensayos de sensibilidad

La sensibilidad del análisis HRM-ITS2 se evaluó utilizando dos volúmenes finales para los reactivos (5 y 10 μ l), diferentes concentraciones de ADN (5, 2,5, 1,5 y 0,5 ng por tubo de reacción) y modificando parámetros de termociclado, como el número de ciclos (40, 45 y 50 ciclos) o la temperatura de hibridación (60 °C, 63 °C y 65 °C).

IV. Metodología

Ensayos de variabilidad

Como parte del estudio de variabilidad, se realizaron duplicaciones en cada carrera (*intra-run*) y diferentes carreras (*inter-run*), en diferentes días. Después, se calculó la desviación estándar (SD) de las temperaturas de disociación (T_m), *intra* e *inter-run*, para evaluar la repetitividad y reproducibilidad respectivamente. Además, la consistencia intra-específica de los perfiles HRM-ITS2 se testó mediante el análisis de un número considerable de especímenes para cada especie.

4.4. Identificación molecular de la fuente de alimento

Un punto crítico en la extracción de ADN a partir del contenido digestivo de insectos es la detención del proceso de digestión [Di Luise *et al.* 2008; Kondakci *et al.* 2009; Garipey *et al.* 2012]. Se debe a que en condiciones de ayuno, las larvas de díptero metabolizan el alimento rápidamente (en horas) [Linville *et al.* 2004]. Además, la digestión pre-oral parcial, que tiene lugar antes de la ingestión, obliga a que la disección de la larva, el aislamiento del buche (o *crop*) y la extracción de ADN deban realizarse lo antes posible para prevenir su degradación [Coulson *et al.* 1990; Linville *et al.* 2004].

4.4.1. Sacrificio, examen morfológico y selección de muestras

Las larvas fueron manualmente recogidas durante las autopsias de cadáveres humanos. Los inmaduros seleccionados, en fase III (LIII) y crecimiento activo, fueron inmediatamente sacrificados a -20 °C en seco [Di Luise *et al.* 2008]. Se descartaron los especímenes muy pequeños para su disección, en fase III tardía, con buches prácticamente vacíos, o en fase prepupa (fase estacionaria) [Campobasso *et al.* 2005]. Las larvas se lavaron minuciosamente con una solución de hipoclorito sódico (NaClO 20 %) [Linville & Wells 2002; Campobasso *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2005] y se colocaron en tubos estériles. La disección y el aislamiento del buche se realizó individualmente bajo la lupa mediante el corte, con micro-tijeras, de los dos segmentos

posteriores de la larva, y realizándose una incisión ventral desde el extremo posterior al anterior [Linville & Wells 2002; Campobasso *et al.* 2005]. Así, el buche puede ser fácilmente retirado, con ayuda de unas pinzas, y depositado en un tubo estéril. Los restos de insecto que quedaron después de la disección se preservaron a -20 °C para su identificación morfológica. Además de las muestras entomológicas, se recogieron muestras de tejido para ser utilizadas como referencia.

4.4.2. Extracción y cuantificación de ADN de la fuente de alimento

La extracción de ADN del contenido digestivo de las larvas se llevó a cabo con el DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de referencia se extrajeron del mismo modo.

La cuantificación específica de ADN humano se hizo mediante Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en el equipo ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), siguiendo las especificaciones correspondientes.

4.4.3. Amplificación de ADN y genotipado de STRs

Los *loci* microsatélites o STRs se amplificaron mediante los sistemas multiplex comerciales Mentype® Nonaplex^{QS} (Biotype, Dresden, Alemania), AmpFℓSTR® NGM™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y AmpFℓSTR® MiniFiler™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). En general, se utilizaron valores superiores a 100 pg de ADN (entre 100-500 pg) para todos los sistemas. Los análisis se llevaron a cabo siguiendo las condiciones óptimas sugeridas por el fabricante, pero aumentando el número de ciclos de amplificación (30-32 ciclos). En todas las reacciones se incluyeron controles positivos y blancos para la comprobación del funcionamiento de la amplificación y la detección de posibles contaminantes en los reactivos.

IV. Metodología

Se analizaron 3 µl de cada producto de amplificación mezclados con 9 µl de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y 0,5 µl de GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Tras la desnaturalización de los amplificadores por calentamiento (6 min a 96 °C) y su posterior enfriamiento (4 min a 4 °C), se procedió a su separación y detección en un ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con un voltaje de 1.2 kV y un tiempo de inyección de 16 s. Los resultados de la electroforesis se analizaron con el programa Genemapper v4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.4.4. Amplificación de ADN y análisis de secuencias

Para el análisis del marcador mitocondrial citocromo b (Cyt-b, 307 pb; *Homo sapiens* NC012920: 14842-15148 positions) se utilizó el par de *primers* L14816 (5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3') y H15173 (5'-CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3') de Parson *et al.* (2000). La amplificación se llevó a cabo en un C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), con las siguientes condiciones: 11 min a 95 °C, 35-40 ciclos de 94 °C → 30 s, 50 °C → 45 s y 72 °C → 45 s, seguido de un mantenimiento a 4 °C. En cada reacción se utilizó un volumen final de 25 µl que incluía, aproximadamente, 0,1-0,5 ng de ADN, 0,2 mM dNTP (Bioline, Berlín, Alemania), 2,5 de MgCl₂ (Bioline, Berlín, Alemania), 0,2 µM de cada *primer*, 1,6 x 10⁻⁴ mg/µl BSA (Bioline, Berlín, Alemania), 2 unidades de Taq polymerase (Biotaq, Bioline, Berlín, Alemania) y 1 x Buffer (pH: 8,8, Bioline, Berlín, Alemania). Además, se incluyeron controles de comprobación de funcionamiento y detección de posible contaminación. Los productos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (Pronadisa, Madrid, España). La purificación de los productos amplificados se llevó a cabo mediante digestión enzimática con Exo-SAP (Exonucleasa I/fosfatasa alcalina; TaKaRa Bio, Otsu, Japón).

Para la PCR de secuenciación se utilizó Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), con los *primers* de amplificación

convencional como *primers* de secuenciación. Los reactivos no incorporados se eliminaron con el BigDye® X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La separación electroforética y la detección de los productos de la reacción de secuenciación se llevaron a cabo en un analizador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Los datos brutos de las secuencias fueron visualizados y manualmente editados en BioEdit [Hall 1999], para eliminar los *primers* y los errores de lectura. La traducción a proteínas de las secuencias codificantes se realizó con MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013], obteniéndose pautas de lectura abierta sin codones *stop*. La búsqueda de homología se realizó con BLAST [Zhang *et al.* 2000].

V. BLOQUE / BLOCK I

Ciencia básica: Caracterización, variabilidad y filogenia de dípteros de interés médico-legal y veterinario / Basic science: Characterization, variability and phylogeny of Diptera of medico-legal and veterinary interest.

Ciencia básica: Caracterización, variabilidad y filogenia de dípteros de interés médico-legal y veterinario

El **Bloque I** abarca los aspectos más básicos de la entomología molecular, profundizando en el conocimiento de la variabilidad genética de los dípteros de interés médico-legal y veterinario, con el único objetivo de conseguir la rápida y precisa identificación taxonómica del insecto. Para ello, se caracterizó un amplio abanico de marcadores moleculares, tanto mitocondriales como nucleares, utilizando la metodología tradicional que combina amplificación y secuenciación. Posteriormente, se diseñó un ensayo utilizando una nueva metodología, el análisis de las curvas de disociación de alta resolución (HRM), para el marcador molecular más resolutivo.

Basic science: Characterization, variability and phylogeny of Diptera of medico-legal and veterinary interest

The **Block I** includes the most basic aspects of molecular entomology, deepening the knowledge about the genetic variability of medico-legal and veterinary interest Diptera, with the solely purpose of getting fast and accurate taxonomic identification of the insect. To this aim, a wide range of molecular markers were characterized, both nuclear and mitochondrial, using the traditional methodology which combines amplification and sequencing. Afterward, it was designed an assay by means of a new methodology, the high-resolution melting (HRM) analysis, for the most resolute molecular marker.

5.1. Aportación / Contribution I.I

El gen mitocondrial Cyt-b: Herramienta diagnóstica para los Calliphoridae de interés forense / The mitochondrial Cyt-b gene: Diagnostic tool for Calliphoridae of forensic interest

“Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera: Calliphoridae)”

Forensic Science International, **2013**, 228: 132-136

El gen mitocondrial Cyt-b: Herramienta diagnóstica para los Calliphoridae de interés forense

La **aportación I.I** contribuye a la consecución de los objetivos específicos “*Examinar las ventajas y limitaciones de los marcadores moleculares convencionales para la identificación de dípteros necrófagos y miásicos*”, “*Contribuir con nuevos marcadores moleculares, más resolutivos y eficaces, a la inequívoca clasificación taxonómica de dípteros de importancia médico-legal y veterinaria*”, “*Caracterizar molecularmente los dípteros de interés médico-legal y veterinario, tanto del sur como del centro de Europa, y estudiar su variabilidad nucleotídica*” y “*Elaborar un panel de marcadores para la identificación molecular de los dípteros Calliphoridae de importancia forense del sur de Europa (Península Ibérica)*”.

En esta **aportación (I.I)** el análisis molecular se centró en un fragmento de 307 pb del ADN mitocondrial que codifica para el gen citocromo b (Cyt-b). Dicho marcador se utiliza ampliamente en el ámbito de la genética forense para la identificación de vertebrados. Sin embargo, su aplicación para el diagnóstico de insectos es limitada, siendo la información nucleotídica disponible prácticamente inexistente para la mayoría de las especies de interés forense.

Se estudiaron un total de 185 especímenes, recogidos en cadáveres humanos en el sur de Europa (Península Ibérica: Portugal, INML Oporto), pertenecientes a seis especies de la familia Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. ampullacea* y *L. caesar*). Dicha familia suele ser pionera en los procesos de descomposición cadavérica, siendo por ello de gran importancia forense.

El *locus* Cyt-b (307 pb) destacó por su robustez como herramienta diagnóstica y por su mayor variabilidad inter-específica, en comparación con el gen estándar en identificación de insectos, el citocromo c oxidasa subunidad I (COI).

5.1. Aportación I.I

Un valor añadido fue la caracterización por primera vez del *locus* Cyt-b (307 pb) para todas las especies estudiadas excepto para *L. sericata*. Considerando la escasez de datos genéticos recogidos para este marcador en las bases de datos, esta contribución resulta altamente significativa.

Este trabajo ha sido publicado en la revista científica *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) con el título “***Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera: Calliphoridae)***”. Dicho artículo se muestra a continuación.

The mitochondrial Cyt-b gene: Diagnostic tool for Calliphoridae of forensic interest

The **contribution I.I** collaborates to the achievement of the specific objectives “*To examine the advantages and limitations of conventional molecular markers for carrion-breeding and myiasic Diptera identification*”, “*To contribute with new molecular markers, more reliable and effective, for unambiguous taxonomic classification of Diptera of medico-legal and veterinary importance*”, “*To characterize molecularly the Diptera of medico-legal and veterinary interest both from Southern and Central Europe, and to study their nucleotide variability*” and “*To elaborate a panel of markers for identifying molecularly the Diptera Calliphoridae of forensic importance in Southern Europe (Iberian Peninsula)*”.

In this **contribution (I.I)** molecular analysis was focused on a fragment of 307 bp of mitochondrial DNA that encodes the cytochrome b gene (Cyt-b). This marker is widely employed in the forensic genetics field for identifying vertebrates. However, its application for the diagnosis of insects is limited, being the nucleotide available data almost nonexistent for most of the species of forensic interest.

A total of 185 specimens, collected from human cadavers in Southern Europe (Iberian Peninsula: Portugal, NILM Porto), belonging to six species of the Calliphoridae family (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. ampullacea* and *L. caesar*) were studied. This family is often a pioneer in the processes of cadaveric decomposition, thereby being of great forensic importance.

The Cyt-b (307 bp) *locus* stands out for its robustness as a diagnostic tool and for its greater inter-specific variability, compared to the standard gene for insect identification, the cytochrome c oxidase subunit I (COI).

5.1. Contribution 1.1

An added value was the first time characterization of the Cyt-b (307 bp) *locus* for all the studied species excluding for *L. sericata*. Considering the lack of genetic data gathered for this marker in the databases, this contribution is highly significant.

This work has been published in the scientific journal *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) with the title “***Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera: Calliphoridae)***”. This paper is reported below.

5.1.1. Resumen

En entomología forense la rápida y precisa identificación de los insectos recolectados en el lugar de los hechos es fundamental para evitar errores en la estimación del tiempo de infestación de los insectos y en la determinación del intervalo *post-mortem* (IPM). La identificación tradicional basada en características morfológicas puede ser complicada por la similitud física entre diferentes especies, principalmente en los estadios inmaduros. El análisis genético es un método de identificación rápido y fiable. En este artículo, el análisis molecular se centró en un fragmento de 307 pb de la región de ADN mitocondrial que codifica para el citocromo b (Cyt-b). Se recogieron e identificaron un total de seis especies pertenecientes a tres géneros de interés forense de la familia Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. ampullacea* y *L. caesar*). Éstas son las especies de la entomofauna cadavérica más comunes en la costa atlántica de la Península Ibérica. Los resultados muestran la robustez del *locus* Cyt-b (307 pb) como herramienta diagnóstica, ya que su variabilidad nucleotídica permite realizar diferenciaciones fiables entre especies. Este estudio ha contribuido con nuevas secuencias consenso de interés para la correcta identificación de especies.

Abstract

In forensic entomology the fast and accurate identification of insects collected at the scene of events is essential to avoid errors in estimating infestation times of insects and in determining the *post-mortem* interval (PMI). Traditional identification based on morphological characteristics can be complicated due to physical similarities between different species, especially at immature stages. Genetic analysis is a fast and reliable identification method. In this paper, molecular analysis is focused on a fragment of 307 bp of the mitochondrial DNA region that codes for cytochrome b (Cyt-b). Six species belonging to three genera of Calliphoridae of forensic interest (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. ampullacea* and *L. caesar*) were collected and identified. These are the most common species of cadaveric entomofauna on the Atlantic Coast of the Iberian Peninsula. The results show the robustness of the Cyt-b (307 bp) *locus* as a diagnostic tool, since its nucleotide variability enables reliable distinctions to be drawn between species. This study also contributes new consensus sequences of interest for correct species identification.

5.1.2. Introduction

Forensic entomology studies the structure and dynamics of the populations of insects and other communities of arthropods to assist in legal problems of a judicial nature (abuse, mistreatment in dependent persons, murders, etc.) and in financial matters, associated with infestations and plagues affecting stored by-products, furniture and buildings [Benecke & Lessig 2001; M de Pancorbo *et al.* 2006]. The most significant application of this area of forensic science is in criminal investigations, where it is used to estimate the *post-mortem* interval (PMI) [Amendt *et al.* 2004; Di Luise *et al.* 2008]. In that sense, the critical prerequisite for the accurate practice of forensic entomology is the proper identification of the collected specimens. Moreover, we have to consider that blowflies can provide information not only about the circumstances of events but also on the seasonal and environmental conditions [Lord 1990; Wells & LaMotte 2001], since specific composition vary according to the biogeographical characteristics of each habitat [Eberhardt & Elliot 2008; Manlove & Disney 2008].

Conventional entomological identification is based on external morphological features, based on a comparative technique that requires the selection and preservation of reference specimens and complex taxonomic keys. This task can sometimes be highly difficult, time-consuming and may even prove impossible due to the loss of morphological features in damaged specimens or to physical similarities that make difficult to identify taxonomic features. In particular, immature specimens may need to be raised until the emergence of the adult before they can be correctly identified which takes time and entails no guarantees unless the specimens are alive when they reach the specialist [Turchetto & Vanin 2004; Mazzanti *et al.* 2010].

When morphological methods are uncertain and judicial errors may result, species have to be identified by alternative procedures, among which molecular techniques play a significant role [Saigusa *et al.* 2005]. Mitochondrial DNA (mtDNA) is most widely used, since it provides the largest number of copies [Butler 2001] and has a higher

mutation rate than nuclear DNA. These features facilitate the analysis of specimens in poor conditions, increase the possibility of generating species-specific markers, provide information for taxonomic and phylogenetic investigations [Avisé *et al.* 1987] and even permit the rapid generation of different sequences between subspecies [Malgorn & Coquoz 1999]. Most of the studies that deal with species identification have used mtDNA markers such as cytochrome c oxidase subunits I & II (COI & COII) or 16S ribosomal (rRNA) [Wells & Stevens 2008]. Currently, the COI gene is the standard *locus* for invertebrate identification; however, recently, this genetic marker has shown limitations in its ability to identify closely related species [Harvey *et al.* 2008]. Forensic laboratories perform usually species identification based on the analysis of cytochrome b (Cyt-b), although to date it has been used almost exclusively to discriminate vertebrate species [Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003].

This work proposes the analysis of a specific region of Cyt-b (307 bp) gene, widely used and established in the forensic genetic field to identify vertebrates [Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003], as an alternative or complement when the traditional genes show difficulties to discriminate closely related species. This paper seeks to show the capabilities and robustness of the mitochondrial Cyt-b (307 bp) gene for fast, accurate species-specific identification for Diptera of forensic importance. An added value is the characterization for the first time of this specific region (307 bp) of Cyt-b genetic marker for five of the six blowfly species reported.

5.1.3. Materials and methods

5.1.3.1. Samples

One hundred and eighty five maggots were collected from 38 autopsies on human cadavers at the National Institute of Legal Medicine North-Branch (Portugal). They were identified morphologically using taxonomic keys [González-Mora & Peris 1988;

Peris & González-Mora 1991; Smith 1986], preserved in ethanol and kept at -80 °C up to the time of DNA extraction [Cainé *et al.* 2009].

5.1.3.2. DNA extraction

The specimens were washed with a 20 % bleach solution to eliminate external contaminants [Linville & Wells 2002]. DNA was extracted using either the Qiagen DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) or the EZ1 ADN Forensic Card with the BioRobot EZ1 workstation (Qiagen, Valencia, CA, USA) [Cainé *et al.* 2009].

5.1.3.3. PCR amplification

A 307 bp region of the mitochondrial Cyt-b gene was amplified via PCR in an C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the L14816 and H15173 primer pair for PCR [Parson *et al.* 2000], using approximately 10 ng of DNA in a final volume of 25 µl: 0.2 mM dNTP (Bioline, Berlin, Germany), 2.5 mM MgCl₂ (Bioline, Berlin, Germany), 0.2 µM of each primer, 1.6 x 10⁻⁴ mg/µl BSA (Bioline, Berlin, Germany), 2 units of Taq polymerase (Biotaq, Bioline, Berlin, Germany) and 1 x Buffer (pH: 8.8, Bioline, Berlin, Germany), under the following PCR conditions: 95 °C for 11 min, 35 cycles 94 °C → 30 s, 50 °C → 45 s and 72 °C → 45 s, followed by holding at 4 °C.

5.1.3.4. Sequencing analysis

PCR products were purified using a Millipore Montage™ SEQ 96 Sequencing Reaction Clean-up Kit (Millipore, Madrid, Spain) and sequenced with a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Unincorporated terminators were cleaned with a BigDye® X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Electrophoretic separation and sequencing reaction product detection were handled by an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5.1.3.5. Statistical analysis

The forward and reverse sequences obtained for each specimen were edited with the aid of the software ChromasPro V. 1.41 (Technelysium Pty Ltd.) and ClustalX 1.83 [Thompson *et al.* 1997], the latter being used for alignment together with BLAST [Zhang *et al.* 2000]. Consensus sequences were obtained with Sea View 4.0 [Galtier *et al.* 1996], which was also used for inter-specific analysis. Intra-specific variation was analyzed with Arlequin Ver. 2000 [Schneider *et al.* 2000]. Phylogenetic tree was inferred with neighbor joining algorithm in Sea View 4.0 [Galtier *et al.* 1996]. The nematode *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900 was used as the taxonomic out-group. Additionally, a 310 bp region within COI, which is a standard *locus* employed for insects identification, was used to compare the discrimination capability of both regions. We used 187 sequences recorded in the GenBank database. Some of the analyzed individuals belonged to the six species of Calliphoridae referred in this paper [*Chrysomya albiceps* (15), *Calliphora vicina* (35), *C. vomitoria* (15), *Lucilia sericata* (58), *L. ampullacea* (14) and *L. caesar* (46)].

5.1.4. Results and discussion

This study characterized a 307 bp region of the Cyt-b gene satisfactorily in 185 individuals, collected from human cadavers. In total, 6 different species of forensic interest, belonging to the subfamilies Calliphorinae, Luciliinae and Chrysomyinae, were collected and identified morphologically: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (65 specimens), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 (61), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758) (41), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (12), *Lucilia ampullacea* Villeneuve, 1922 (5), *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) (1). All the species belong to the family Calliphoridae, which are pioneers in cadaver colonisation and decomposition processes since they are primary colonisers of great forensic interest [Boehme *et al.* 2010; Malewski *et al.* 2010].

The species of Calliphoridae collected reflect the diversity of this family, as described in previous studies conducted in the Iberian Peninsula [Martínez-Sánchez *et al.* 2000; Arnaldos *et al.* 2001; Saloña-Bordas *et al.* 2009]. The only exception is the presence of *L. ampullacea*, which was not reported in previous studies developed in the Upper Aragon [Castillo-Miralbés 2002] or Madrid regions [García-Rojo 2004]. Given its geographical distribution, *L. ampullacea* seems to prefer temperate weather with a maritime influence, where temperatures are kept milder through the heat-regulating effect of the sea, being its southern limit associated to the Atlantic range [Moneo & Saloña-Bordas 2007; Vanin *et al.* 2008].

All sequences were deposited in the GenBank under the following accession numbers: JF705985–JF706169 (**Table S1**, Supplementary material).

5.1.4.1. Analysis of intra-specific variability

Intra-specific analysis was conducted on the basis of the information obtained from the Cyt-b sequences of the specimens analyzed. After removed both primers, forward and reverse, the remaining DNA sequences of 307 bp length were used in all further studies. As expected, the analysis of this region of mtDNA was observed to have a strong AT bias (about 73 %) (**Table 16**), which is characteristic of insect mitochondrial DNA, including Diptera [Harvey *et al.* 2003a; Ames *et al.* 2006].

Table 16. Intra-specific analysis of the studied Calliphoridae species [*Ch. albiceps* (1), *C. vicina* (2), *C. vomitoria* (3), *L. sericata* (4), *L. ampullacea* (5), *L. caesar* (6)] for the Cyt-b (307 bp) molecular marker. The table shows species, number of specimens (N), number of haplotypes (NH), gene diversity (GD), nucleotide diversity (ND), mean number of pairwise differences (MNPD), number of variable sites (NVS) and nucleotide composition (%).

Species	N	NH	GD	ND	MNPD	NVS	Nucleotide composition (%)			
							C	T	A	G
1	65	2	0.06 ± 0.04	0.0002 ± 0.0005	0.0606 ± 0.1328	1	12.70	42.68	29.96	14.66
2	61	11	0.54 ± 0.08	0.0029 ± 0.0023	0.8781 ± 0.6245	7	11.41	42.66	30.60	15.33
3	41	4	0.47 ± 0.07	0.0014 ± 0.0015	0.4378 ± 0.4006	2	11.97	42.10	30.95	14.98
4	12	2	0.17 ± 0.13	0.0005 ± 0.0009	0.1667 ± 0.2401	1	10.42	44.63	30.59	14.36
5	5	2	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	11.40	44.63	29.38	14.59
6	1	1	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	11.07	43.97	30.29	14.66

^a NCE no statistical estimates are drawn up.

The Cyt-b (307 bp) sequences of *C. vicina* (N = 61) contained the largest number of polymorphic bases (7) which determine eleven different haplotypes with an average *locus* diversity of 0.54 ± 0.08 (Table 16). In contrast, the lowest level of variability was observed in *Ch. albiceps*, although being the most abundant species (N = 65). It has only one polymorphism determining two haplotypes (with 63 and 2 individuals respectively) and a very low level of sequence diversity (0.06 ± 0.04) between haplotypes (Table 16). This low diversity of the species *Ch. albiceps* (N = 15) sequences has also been observed in COI (310 bp) gene for GenBank sequences (0.00 ± 0.00) with only one haplotype (Table 17), and in a previous study done with a similar number of individuals (N = 76) (0.078 ± 0.04) [Cainé *et al.* 2009]. In contrast, the congeneric species *Ch. megacephala* (Fabricius, 1794) shows higher intra-specific sequence divergence (0.24 for other region of Cyt-b and 0.16 % for COI) [Zaidi *et al.* 2011]. Similarly, *L. sericata* (N = 12) has a single polymorphic position that determines two different haplotypes; however, the average *locus* diversity between haplotypes is considerably higher at 0.17 ± 0.24 (Table 16). Very few specimens of *L. caesar* (N = 1) and *L. ampullacea* (N = 5) were found in this study, so no statistical estimations were performed based on the sequences obtained.

It should be noticed that 20 of the 22 Cyt-b (307 bp) haplotypes in the six species studied are new and were not recorded previously in the GenBank database.

Table 17. Intra-specific analysis of the GenBank Calliphoridae species [*Ch. albiceps* (1), *C. vicina* (2), *C. vomitoria* (3), *L. sericata* (4), *L. ampullacea* (5), *L. caesar* (6)] for COI (310 bp) molecular marker. The table shows species, number of specimens (N), number of haplotypes (NH), gene diversity (GD), nucleotide diversity (ND), mean number of pairwise differences (MNPd), number of variable sites (NVS) and nucleotide composition (%).

Species	N	NH	GD	ND	MNPd	NVS	Nucleotide composition (%)			
							C	T	A	G
1	15	1	0.00 ± 0.00	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0	16.45	40.00	28.39	15.16
2	35	3	0.11 ± 0.07	0.0004 ± 0.0007	0.1149 ± 0.1874	2	16.77	39.35	28.71	15.16
3	15	2	0.48 ± 0.09	0.0015 ± 0.0016	0.4762 ± 0.4367	1	16.34	39.78	28.71	15.16
4	58	4	0.17 ± 0.07	0.0005 ± 0.0008	0.1688 ± 0.2295	3	16.13	40.32	28.36	15.18
5	14	3	0.28 ± 0.15	0.0009 ± 0.0012	0.2857 ± 0.3226	2	17.42	38.71	28.34	15.53
6	46	5	0.70 ± 0.03	0.0032 ± 0.0024	0.9778 ± 0.6757	4	16.57	39.24	28.79	15.41

5.1.4.2. Analysis of inter-specific variability

The sequences from the individuals of each species were aligned with the clustal option in the SeaView program, and consensus sequences were then obtained (**Tables S2-S3**, Supplementary material).

The comparison between the consensus sequences of the six species in this study showed variations at 49 positions (50.9 % transitions and 49.1 % transversions) (**Table S2**, Supplementary material), with a transition/transversion (ts:tv) ratio (R) of 1.04. This contrasts to the ratios commonly found for Calliphoridae in the COI gene, where the average is higher (R = 1.37) [Cainé *et al.* 2009], and in other groups of insects such as Hemiptera (R = 1.81) [Damgaard *et al.* 2000] and Tephritidae (1.78) (gene RNA18S) [Han & McPheron 1994], in which the number of transitions is approximately the double of transversions found here. The high number of transversions that Cyt-b (3017 bp) has in contrast to other molecular markers may be indicative of a greater diversity, giving therefore better discrimination power between species.

When we analyzed the 187 COI (310 bp) sequences from the GenBank database, they showed a similar number of variable positions (49, 39 % transitions and 61 % transversions) (**Table S3**, Supplementary material), but a bias on the tr:tv ratio (R = 0.64) caused by the *Ch. albiceps* consensus sequence which originates 16 transversions. The exclusion of these transversions generated a common average rate of approximately 1.17 (ts: 54 % and tv: 46 %).

The analysis of the Cyt-b (307 bp) region showed 19 variable positions among the genera *Chrysomya* (10), *Calliphora* (6) and *Lucilia* (3), which allow the molecular differentiation (**Table S2**, Supplementary material). Furthermore, within the same genus the individuals of each species revealed a high inter-specific nucleotide variation sufficient for unambiguous differentiation between the six species. Eleven positions were found to distinguish *C. vicina* from *C. vomitoria* and 26 to distinguish *L. sericata*

from *L. caesar* and from *L. ampullacea* (**Table S2**, Supplementary material). These results agree with previous studies, where other region of Cyt-b gene was more discriminative than certain mitochondrial markers (ND5 and COI) [Zaidi *et al.* 2011].

In contrast, the comparison of the GenBank COI (310 bp) consensus sequences among genera showed more variable positions (28) [*Chrysomya* (19), *Calliphora* (3) and *Lucilia* (6)]. However, inside each genus the variability appears to be smaller [*C. vicina*-*C. vomitoria* (10), *L. sericata*-*L. illustris*-*L. ampullacea* (15)] (**Table S3**, Supplementary material).

The visible groupings of Calliphoridae species according to genus (*Chrysomya*, *Calliphora* or *Lucilia*) evidence the potential application of these genetic tools in forensic entomology. The study of longer fragments may get even greater potential. However, shorter fragments of approximately 300 bp, similar to the Cyt-b here studied, may be preferable in highly degraded samples where long targets usually have amplification problems.

5.1.4.3. Homology of the Cyt-b gene in species of Diptera

The high species identification capability of Cyt-b (307 bp) was confirmed through the study of the homology of this gene in various species of Diptera recorded in the GenBank (**Table S4**, Supplementary material). Thus, the genetic differences between species may be expected to increase as the evolutionary distance between them becomes greater.

The phylogenetic analysis of the Cyt-b (307 bp) region shows a visible separation between the families Drosophilidae and Calliphoridae, linked to their membership of different superfamilies (Ephydroidea and Oestroidea) (**Fig. 17**). There is also a clear separation between the different genera of Calliphoridae studied (**Fig. 17**). The species belonging to the genus *Calliphora* are grouped showing a short evolutionary distance (bootstrap 97 %) and, as expected, the specimens of *L. sericata* show a total homology

(100 %) (**Fig. 17**). Within the Calliphoridae family and *Chrysomya* genus, *Ch. albiceps* shows an unexpected location in the Cyt-b phylogenetic tree (**Fig. 17**). This species is closer to *Lucilia* genus (*L. sericata*) than to other species of its own genus (**Fig. 17**). This genetic incongruent topology may be related to the geographical separation between the different *Chrysomya* specimens here studied, because *Ch. putoria* (Wiedemann, 1830) is originally from Africa, *Ch. megacephala* from Asia and *Ch. albiceps* is European [Desmyter & Gosselin 2009; Stevens *et al.* 2002]. Nevertheless, the consistence of this relationship is really weak (bootstrap 12 %) (**Fig. 17**), so further studies should perform to clarify this issue.

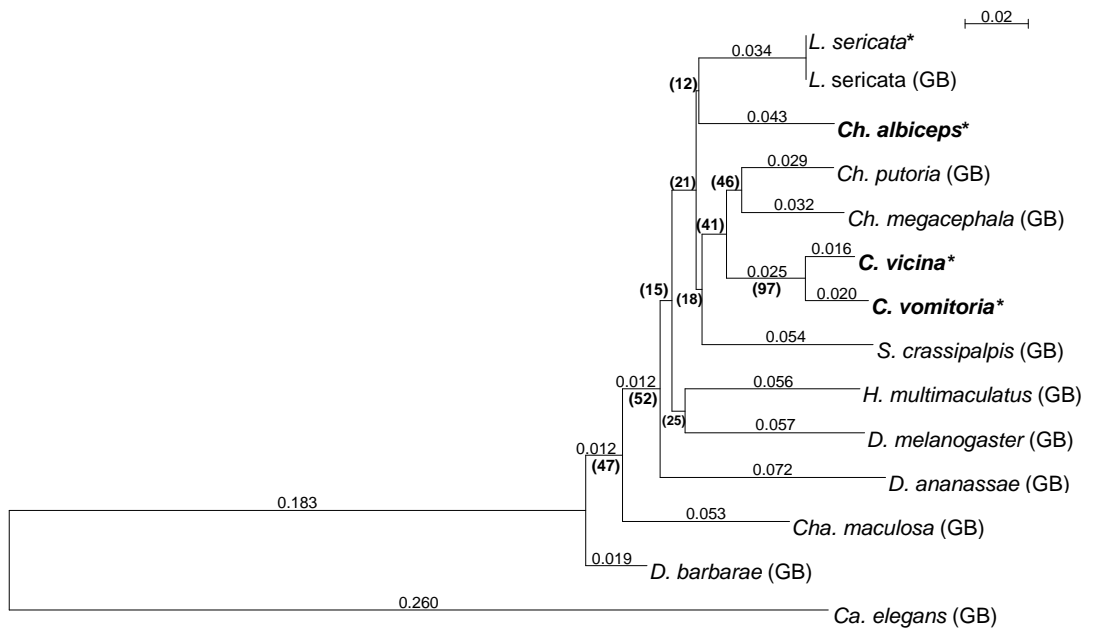


Fig. 17. Neighbor joining (NJ) phylogenetic reconstruction for the Cyt-b locus. NJ tree constructed on the basis of Cyt-b (287 bp) consensus sequences for the studied species (*Ch. albiceps**, *C. vicina**, *C. vomitoria** and *L. sericata**; excluding *L. caesar* and *L. ampullacea*) and GenBank (GB) Diptera species (*Chrysomya putoria*, *Ch. megacephala*, *L. sericata*, *Sarcophaga crassipalpis* Macquart, 1839, *Drosophila ananassae* Doleschall, 1858, *D. barbara* Bock & Wheeler, 1972, *D. melanogaster* Meigen, 1830, *Helictopleurus multimaculatus* Lebis, 1964, *Chaetellipsis maculosa* Hancock & Drew, 1999). The nematode *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900 (NC001328) was used as the taxonomic out-group. The numbers shown in brackets refer to the bootstrap support (1000 iterations), while the length of branches is proportional to the amount of DNA that changes in the sequence, with the bar indicating 0.02 substitutions per position.

5.1.5. Summary

The Cyt-b (307 bp) seems to exhibit more variability inside genera than the most common *locus* for insects identification, COI. This characteristic gives it a great advantage for accurate diagnosis of blowflies. Therefore, our study provides a point of reference for the future use of the mitochondrial gene Cyt-b as a useful tool for the molecular identification of cadaveric entomofauna, in all developmental stages and under all preserved conditions; even, in specimens in poor conditions, which have lose external diagnostic taxonomic characters. Thus, the use of the mtDNA Cyt-b (307 bp) region in forensic laboratories should not be limited to the molecular identification of vertebrates, and can also be extended to the specific differentiation of Diptera of forensic interest. This work also contributes new genetic sequences that may be of great interest in performing proper species diagnosis of the entomological evidence from forensic casework.

5.2. Aportación / Contribution I.II

Eficacia diagnóstica de los marcadores moleculares COI *barcode*, COI (616 pb), Cyt-b, Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1 e ITS2 en los Calliphoridae del centro de Europa (Alemania) /
Diagnostic efficacy of the COI barcode, COI (616 bp), Cyt-b, Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 and ITS2 molecular markers in Calliphoridae from Central Europe (Germany)

“Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera: Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers”

Forensic Science International, **2014**, 242: 274-282

Eficacia diagnóstica de los marcadores moleculares COI *barcode*, COI (616 pb), Cyt-b, Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1 e ITS2 en los Calliphoridae del centro de Europa (Alemania)

La **aportación I.II** contribuye al logro de los objetivos específicos “*Examinar las ventajas y limitaciones de los marcadores moleculares convencionales para la identificación de dípteros necrófagos y miásicos*”, “*Contribuir con nuevos marcadores moleculares, más resolutivos y eficaces, a la inequívoca clasificación taxonómica de dípteros de importancia médico-legal y veterinaria*”, “*Caracterizar molecularmente los dípteros de interés médico-legal y veterinario, tanto del sur como del centro de Europa, y estudiar su variabilidad nucleotídica*” y “*Elaborar un panel de marcadores para la identificación molecular de los dípteros Calliphoridae de importancia forense del sur de Europa (Península Ibérica)*”.

Tradicionalmente, el gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI) es el *locus* de referencia para la caracterización de invertebrados, siendo actualmente la región *barcode* (COI *barcode*, 658 pb) considerada el marcador universal para el diagnóstico de especies animales. Sin embargo, este *locus* presenta limitaciones en la identificación de especies estrechamente relacionadas. Recientemente, otros marcadores mitocondriales, como la región comprendida entre el ARN transferente para la serina (ARNt^{ser}) y la subunidad 1 de la nicotinamida deshidrogenasa (ND1), o el gen citocromo b (Cyt-b), se han estudiado con éxito para el diagnóstico de las familias Oestridae y Calliphoridae, respectivamente. Por su parte, el segundo espaciador transcrito interno (ITS2) del ADN ribosómico nuclear (ADNr), reconocido como el marcador estándar en dípteros hematófagos, se ha utilizado también para la identificación molecular de algunas especies de califóridos.

En esta **aportación (I.II)** se examinó la eficacia del análisis basado en la región *barcode* del citocromo c oxidasa subunidad I (COI *barcode*, 658 pb), y se complementó con el estudio de otros marcadores mitocondriales: una región adyacente

5.2. Aportación I.II

al extremo 3'- COI *barcode* (COI, 616 pb), el *locus* Cyt-b (307 pb) y la región Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1 (495-496 pb), que contiene un fragmento no codificante. Además, se incluyó el segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 310-337 pb) del ADN ribosómico nuclear (ADNr).

Se analizaron un total de 54 especímenes, pertenecientes a cinco especies de la familia Calliphoridae (*Phormia regina*, *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *L. ampullacea* y *L. caesar*). Dichos ejemplares fueron recogidos en cadáveres humanos y en muestreos selectivos utilizando trampas de doble embudo (cebadas con víscera animal) en Europa Central (Alemania: *Westphalia*, IML Münster).

Los marcadores COI (616 pb) e ITS2 (310-337 pb) destacaron al permitir la identificación inequívoca de las especies estudiadas y al acumular una elevada variabilidad en comparación con COI *barcode* (658 pb), o Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1 (495-496 pb).

Un valor añadido fue la caracterización por primera vez de los marcadores: Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1 (495-496 pb) para las especies *P. regina*, *L. ampullacea* y *L. caesar*; Cyt-b (307 pb) para *P. regina*; y de la región que incluye COI (658 pb) y COI (616 pb) para especímenes europeos de *P. regina*. De esta manera, se ha aportado nueva información genética sobre los califóridos centroeuropeos de utilidad en la realización de identificaciones inequívocas.

Este trabajo ha sido publicado en la revista científica *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) con el título “***Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera: Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers***”. Dicho artículo se expone a continuación.

Diagnostic efficacy of the COI barcode, COI (616 bp), Cyt-b, Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 and ITS2 molecular markers in Calliphoridae from Central Europe (Germany)

The **contribution I.II** collaborates to the achievement of the specific objectives “*To examine the advantages and limitations of conventional molecular markers for carrion-breeding and myiasic Diptera identification*”, “*To contribute with new molecular markers, more reliable and effective, for unambiguous taxonomic classification of Diptera of medico-legal and veterinary importance*”, “*To characterize molecularly the Diptera of medico-legal and veterinary interest both from Southern and Central Europe, and to study their nucleotide variability*” and “*To elaborate a panel of markers for identifying molecularly the Diptera Calliphoridae of forensic importance in Southern Europe (Iberian Peninsula)*”.

Traditionally, the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene is the reference *locus* for invertebrates characterization, being the barcode region (COI barcode, 658 bp) currently considered the universal marker for animal species diagnosis. However, this *locus* shows limitations in identifying closely related species. Recently, other mitochondrial markers, such as the region between serine transfer RNA (tRNA^{ser}) and the nicotinamide dehydrogenase subunit 1 (ND1), or the cytochrome b gene (Cyt-b), have been successfully studied for the diagnostic of Oestridae and Calliphoridae families, respectively. For its part, the second internal transcribed spacer (ITS2) of nuclear ribosomal DNA (rDNA), recognized as the standard marker in haematophagous Diptera, has been also employed for the molecular identification of some blowfly species.

In this **contribution (I.II)** the efficacy of the analysis based on the barcode region of cytochrome c oxidase subunit I (COI barcode, 658 bp) was examined and complemented with the study of other mitochondrial markers: an adjacent region to the 3'- COI barcode end (COI, 616 bp), the *locus* Cyt-b (307 bp) and the Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) region, which comprises a non-coding fragment. Furthermore, the

5.2. Contribution I.II

second internal transcribed spacer (ITS2, 310-337 bp) region of nuclear ribosomal DNA (rDNA) was included.

A total of 54 specimens, belonging to five species of the Calliphoridae family (*Phormia regina*, *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *L. ampullacea* and *L. caesar*) were analyzed. These specimens were collected from human corpses and from selective sampling using double funnel traps (baited with animal viscera) in Central Europe (Germany: Westphalia, ILM Münster).

The COI (616 bp) and ITS2 (310-337 bp) markers highlighted to enable unambiguous identification of the studied species and to accumulate a high variability compared to COI barcode (658 bp), or Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp).

An added value was the first time characterization of markers: Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) for *P. regina*, *L. ampullacea* and *L. caesar* species; Cyt-b (307 bp) for *P. regina*; and of the region that includes COI (658 bp) and COI (616 bp) for European specimens of *P. regina*. Thus, it is provided novel genetic information about Central European Calliphoridae useful in performing unequivocal identifications.

This work has been published in the scientific journal *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) with the title “***Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera: Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers***”. This paper is shown below.

5.2.1. Resumen

Uno de los principales retos de la entomología médica, veterinaria y forense aplicada es la rápida y precisa identificación de los especímenes para la estimación del período de actividad de los insectos (PAI), que generalmente se aproxima al intervalo *post-mortem* (IPM). La identificación morfológica de las evidencias de insectos está dificultada por la similitud entre especies, especialmente en los estadios larvarios tempranos. Sin embargo, la identificación específica basada en ADN es más precisa y fiable. En este estudio, mejoramos la idoneidad y eficacia del diagnóstico estándar basado en la región *barcode* del citocromo c oxidasa subunidad I (COI) de 658 pb, combinándola con una región adicional de 616 pb de este mismo gen. Además, probamos la utilidad de otros *loci* mitocondriales y nucleares, como la región no codificante integrada en el fragmento mitocondrial Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1 (495-496 pb) y la región del segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 310-337 pb) del ADN ribosómico nuclear (ADNr). Se identificaron un total de 54 especímenes pertenecientes a tres géneros y cinco especies de Calliphoridae habitualmente encontradas en Europa Central: *Phormia* (*P. regina*), *Calliphora* (*C. vicina*) y *Lucilia* (*L. sericata*, *L. ampullacea* y *L. caesar*). Adicionalmente, se incluyeron las secuencias del *locus* Cyt-b (307 pb) para la especie *P. regina* y la información recogida en el GenBank sobre los marcadores estudiados para las especies elegidas. Los resultados revelaron la robustez de los marcadores COI (616 pb) e ITS2 (310-337 pb) como herramientas diagnósticas complementarias al ampliamente establecido COI *barcode* (658 pb). El mayor poder de discriminación de dichas regiones permite realizar identificaciones más precisas y fiables, incluso en los géneros más complejos (ej. *Lucilia*). Este trabajo proporciona, además, nuevas secuencias nucleotídicas que son de utilidad para el adecuado diagnóstico específico y nuevos datos sobre la variabilidad inter-específica de los califóridos de la región Europea de *Westphalia* (Alemania).

Abstract

A challenging step in medical, veterinary and forensic entomology casework is the rapid and accurate identification of specimens to estimate the period of insect activity (PIA), which usually approximates the *post-mortem* interval (PMI). The morphological identification of insect evidence is hampered by species similarities, especially at the early larval stages. However, DNA-based species identification is more accurate and reliable. In this study, we improved the suitability and efficacy of the standard analysis based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) barcode region of 658 bp combined with an additional region of 616 bp of the same gene. We also tested the usefulness of other mitochondrial and nuclear *loci*, such as the non-coding region included in mitochondrial Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) and the second internal transcribed spacer (ITS2, 310-337 bp) region of nuclear ribosomal DNA (rDNA). We classified a total of 54 specimens from five blowfly species belonging to three Calliphoridae genera commonly found in Central Europe: *Phormia* (*P. regina*), *Calliphora* (*C. vicina*) and *Lucilia* (*L. sericata*, *L. ampullacea* and *L. caesar*). Additionally included were the *locus* Cyt-b (307 bp) sequences for *P. regina* species and GenBank recorded information about the studied markers for select species. The results revealed the robustness of COI (616 bp) and ITS2 (310-337 bp) markers as diagnostic tools to be added to the widely established COI barcode (658 bp). Their higher discriminatory power allows for more precise and reliable identifications, even within more complex genera (i.e. *Lucilia*). This work also contributes new nucleotide sequences that are useful for accurate species diagnosis and new sequence data of Calliphoridae inter-specific variability in the European Westphalia region (Germany).

5.2.2. Introduction

The Calliphoridae family is considered an important source of information involved in medical, veterinary and forensic investigations [Méglin 1894; Gennard 2012]. It may be used to detect abuses, abandonment or neglect in addition to its usefulness in murder caseworks [Benecke & Lessig 2001; Benecke *et al.* 2004; Stevens & Wallman 2006]. Blowfly species are commonly associated with carcass decomposition, necrotic tissues in wounds (superficial myiasis) and the presence of faeces or urine in skin (rectal or urogenital myiasis) [Stevens & Wall 1997b]. The current aging population and the global economic crisis may result in a change in the scope of forensic entomology, with an increasing number of deaths in which the period of insect activity (PIA) exceeds the *post-mortem* interval (PMI) [Benecke & Lessig 2001; Amendt *et al.* 2007], which may indicate the involvement of neglect or abandonment previous to the death [Benecke *et al.* 2004; Franza *et al.* 2006]. Critical to properly estimating larval age is the identification of the collected specimens because each species has a unique habitat, growth rate and geographical distribution [Reibe *et al.* 2009; Richards *et al.* 2009]. However, morphological differences are subtle, especially in the immature stages and between closely related species [Wallman & Donnellan 2001; Sonet *et al.* 2012]. These characteristics may be absent in damaged specimens [GilArriortua *et al.* 2013; Rolo *et al.* 2013], though DNA-based identification provides rapid and unambiguous identification in all cases.

Initially, the cytochrome c oxidase subunits I and II (COI and COII) were by far the most studied mitochondrial genes for invertebrate analysis [Nelson *et al.* 2012], followed by nicotinamide dehydrogenase subunits 4 and 4 L (ND4 and ND4L) and a large ribosomal subunit (18S rRNA) [Nelson *et al.* 2012]. In the last few years, molecular diagnosis has been dominated by the “DNA Barcode of Life Project” that proposes the approximately 650 bp 5’ end of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) as a means to accurately identify metazoan species [Hebert *et al.* 2003; Nelson *et al.* 2012]. This

genetic marker is currently considered the standard *locus* for insect identification [Wells & Stevens 2008]. However, it has shown limitations in the identification of some closely related species [Harvey *et al.* 2008; Sonet *et al.* 2012]. Recently, other mitochondrial genomic regions have been studied, such as cytochrome b (Cyt-b) and the non-coding region occurring between serine transfer RNA (tRNA^{ser}) and nicotinamide dehydrogenase subunit 1 (ND1), which allow for clear genetic discrimination of Calliphoridae and Oestridae specimens, respectively [Weigl *et al.* 2010b; GilArriortua *et al.* 2013]. Furthermore, nuclear genetic markers such as the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA (rDNA) have been used to identify closely related blowfly species [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008b].

The aim of this work is to improve the efficacy, accuracy and reliability of the traditionally established analysis based on COI barcode (658 bp) *locus* by analyzing other regions of mitochondrial and nuclear DNA. To this end, this paper demonstrates the usefulness and robustness of COI (616 bp), an adjacent region of 3'-COI barcode, the Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) region, which includes a non-coding fragment, and the ITS2 (310-337 bp) nuclear marker for reliable and unambiguous molecular diagnosis in forensically important blowflies of the Westphalia region (Germany). Additionally, to provide more information about the most widely used markers for species identification in forensic laboratories, we analyzed the Cyt-b (307 bp) *locus* of *Phormia* species. This is the first characterization of the Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) region for *Phormia regina*, *Lucilia ampullacea* and *L. caesar*, the 1274 bp fragment of COI gene for *P. regina* European specimens and the Cyt-b (307 bp) gene for *P. regina*.

5.2.3. Materials and methods

5.2.3.1. Specimen collection and morphological identification

Fifty-four adults and maggots were collected on double bottle traps baited with animal viscera, adapting the model proposed by Hwang & Turner 2005, in three localities of the Westphalia region (Germany) and manually from two human cadavers at the Institute of Legal Medicine of the University Hospital of Münster (Germany). Immature captured specimens were raised until imago emergence and were identified morphologically using specific taxonomic keys [Smith 1986; González-Mora & Peris 1988; Peris & González-Mora 1991; Rognes 1991; Szpila 2012] (**Table S5**, Supplementary material), preserved in 70 % ethanol [Amendt *et al.* 2007] and stored at -20 °C until the time of DNA extraction [GilArriortua *et al.* 2013].

5.2.3.2. DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Before the extraction, all adults were cleaned with a 20 % bleach solution to eliminate external contamination [Cainé *et al.* 2009]. DNA was extracted with the DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions.

The mitochondrial COI barcode (658 bp) sequence was amplified with the primers LCO1490 and HCO2198, as modified from Folmer *et al.* 1994 (www.barcodinglife.org) (**Table S6**, Supplementary material), using a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The following PCR conditions were used: 95 °C for 10 min, 40 cycles 94 °C → 30 s, 55 °C → 30 s and 72 °C → 1 min, followed by a final extension at 72 °C for 5 min [GilArriortua *et al.* 2014a].

The amplification of mtDNA COI (616 bp) was carried out in two separate steps of 384 bp and 330 bp with the designed specific primers: COI-1_F2115, COI-1_R2538, COI-2_F2439 and COI-2_R2808 (**Table S6**, Supplementary material). PCR was

performed using a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) under the following cycling conditions: 95 °C for 11 min, 35 cycles 94 °C → 30 s, 58 °C → 45 s and 72 °C → 45 s.

The specific mtDNA region Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) was amplified with newly designed primers: CYTB_F11509 and ND1_R12063 (**Table S6**, Supplementary material). PCR was carried out using a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the following cycling parameters: 95 °C for 11 min, 35 cycles 94 °C → 30 s, 58 °C → 45 s and 72 °C → 1 min.

Amplification of the Cyt-b mtDNA region (307 bp) was performed by means of the primer pair L14816 and H15173 from Parson *et al.* 2000 (**Table S6**, Supplementary material), under the following thermocycling parameters: 95 °C for 11 min, 35 cycles 94 °C → 30 s, 50 °C → 45 s and 72 °C → 45 s [GilArriortua *et al.* 2013].

The nuclear ITS2 (310-337 bp) molecular marker analysis was carried out with primers ITS2_F2814-2835 and ITS2_R3295-3317, as adapted from Song *et al.* 2008b (**Table S6**, Supplementary material). PCR was performed using a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the following cycling conditions: 95 °C for 11 min, 35 cycles 94 °C → 45 s, 65 °C → 40 s and 72 °C → 1 min, followed by a final extension at 72 °C for 5 min.

Each PCR reaction was carried out in a final volume of 25 µl that included approximately 10 ng of DNA, 0.2 mM dNTP (Bioline, Berlin, Germany), 0.2 µM each primer, 1.6 x 10⁻⁴ mg/µl BSA (Bioline, Berlin, Germany), 1 unit of Taq polymerase (Biotaq, Bioline, Berlin, Germany), 1 x Buffer (pH: 8.8, Bioline, Berlin, Germany) and a variable amount of MgCl₂ (Bioline, Berlin, Germany), from 1.5 mM for COI barcode (658 bp), to 2 mM for COI (616 bp), Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-337 bp).

The PCR products were purified with Exo-SAP (Exonuclease I/Shrimp alkaline phosphatase; TaKaRa Bio, Otsu, Japan) and sequenced with a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the PCR primers as sequencing primers. Unincorporated terminators were removed using a BigDye® X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Electrophoretic separation and sequencing reaction product detection was performed by an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5.2.3.3. DNA sequences processing and phylogenetic analysis

Forward and reverse DNA sequences were visualized using the software Chromas 2.32 (Technelysium Pty Ltd., Brisbane, Australia) and manually edited in BioEdit [Hall 1999] to remove the primers and reading errors. The batches of sequences for each molecular marker were aligned automatically using MUSCLE [Edgar 2004]. The protein translation of the coding sequences in MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013] presented open reading frames without stop codons. Nucleotide consensus sequences for each studied species were obtained with SeaView 4.0 [Galtier *et al.* 1996] and inter and intra-specific variation was analyzed using Arlequin Ver. 2000 [Schneider *et al.* 2000].

Phylogenetic trees were inferred with Bayesian, maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), and neighbor joining (NJ) methods in MEGA 6 software [Tamura *et al.* 2013]. Bayesian phylogenetic analyses were conducted using MrBayes 3.2 [Ronquist & Huelsenbeck 2003], with random starting trees, 10^6 generations and trees being sampled every 1000 generations. The akaike information criterion (AIC) was used to choose the most appropriate nucleotide substitution model for COI barcode (658 bp), COI (616 bp), COI barcode-COI 616 bp (1274 bp) and ITS2 (310-337bp) separately using the software jModelTest 2.1.4 [Darriba *et al.* 2012]. In all cases the general time reversible model with gamma (GTR + G) distribution was chosen as the best DNA substitution model. The nucleotide substitution parameters generated were exported to MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013]. NJ and MP trees were tested by 1000

bootstrap replicates. In all analyses, the flesh fly *Sarcophaga peregrina* Robineau-Desvoidy, 1830 was used as the taxonomic out-group.

Additionally, we used the sequences of the Calliphoridae family species recorded in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), to compare the discriminatory capability of each DNA region (**Tables S7-S10**, Supplementary material).

5.2.4. Results and discussion

Fifty-four individuals were identified belonging to 3 genera (*Phormia*, *Calliphora* and *Lucilia*) and 5 species of Calliphoridae: *Phormia regina* (Meigen, 1826) (9 specimens), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 (35), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (2), *Lucilia ampullacea* Villeneuve, 1922 (5) and *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) (3).

Four molecular markers, the 658 bp COI barcode region, another fragment of 616 bp of the mitochondrial COI gene, the mtDNA Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495- 496 bp) region and the nuclear ribosomal DNA (rDNA) 310-337 bp ITS2 region, were characterized for all the studied species. Additionally, the Cyt-b (307 bp) gene was studied for *P. regina* species.

All sequences have been deposited in GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) under the following accession numbers: KF225250–KF225311 (**Table S5**, Supplementary material).

5.2.4.1. Analysis of inter-specific variability of the five studied species

The obtained sequences for the studied regions, COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) and ITS2 (310-337 bp), without the forward and reverse primers, were individually aligned with MUSCLE and consensus sequences were created for each of the five species in the SeaView program (**Tables S11-S13**, Supplementary material). The *P. regina* sequences of Cyt-b (307 bp) gene were processed in the same way (**Table S14**, Supplementary material).

For the COI barcode (658 bp), the comparison between the consensus sequences of the five studied species included 562 invariant positions and 96 informative sites with a transition/transversion (ts:tv) ratio (R) of 1.35 (ts: 57 % and tv: 43 %) (**Table 18**). This contrasts with a slightly higher ratio obtained for the COI (616 bp) *locus* (R = 1.45), which had 53 fewer invariant positions and a higher number of informative sites (107) (ts: 59 % and tv: 41 %) (**Table 18**). These results are similar to the proportion previously found for the COI gene in Calliphoridae (1.37) [Cainé *et al.* 2009] and contrast with the higher values obtained for other insects, such as Hemiptera (1.81) [Damgaard *et al.* 2000]. Moreover, the analysis of the COI barcode (658 bp) and COI (616 bp) region showed 52 and 59 variable positions, respectively, among the genera *Calliphora* (11 and 28), *Phormia* (29 and 23) and *Lucilia* (12 and 8) (**Table S11**, Supplementary material). Furthermore, within the genus *Lucilia*, we found 46 and 59 characteristic positions, respectively, that distinguished *L. sericata* (22 and 23) from *L. ampullacea* (15 and 21) and *L. caesar* (9 and 15) (**Table S11**, Supplementary material). These results revealed a significantly lower species-specific nucleotide variability of the COI barcode (658 bp) sequence compared to the COI (616 bp) sequence, among and, notably, within the *Lucilia* genus. Furthermore, the intra-specific variability also fits this condition, showing, in general, a fewer number of variable positions for the traditional molecular marker. All this is consistent with previous studies, where the widely used COI barcode region was far less discriminatory than other molecular markers, such as COII, ND6 and Cyt-b [Wallman *et al.* 2005; Cameron & Whiting 2007, 2008; Roe & Sperling 2007; Nelson *et al.* 2012; GilArriortua *et al.* 2013]. Additionally, the COI (616 bp) sequence seems to have a potentially discriminative advantage of performing reliable and unambiguous identification, not only between the species studied here but also between more genetically related species, such as those belonging to *Lucilia* genus.

Table 18. Inter-specific analysis of the studied Calliphoridae (*P. regina*, *C. vicina*, *L. sericata*, *L. ampullacea* and *L. caesar*) sequences for the COI barcode (658 bp) (1), COI (616 bp) (2), COI barcode-COI 616 bp (1274 bp) (3), Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) (4) and ITS2 (310-337 bp) (5) molecular markers. The table shows species, number of bases in base pair (NB, bp), number of variable sites (NVS), number of substitutions (NS), number of insertion-deletions (INDELs), transitions (% Ts) and transversions (% Tv) percentage and ratio, and nucleotide composition.

Species	NB (bp)	NVS	NS	INDELs	% Ts	% Tv	Ts:Tv	Nucleotide composition			
								A	T	C	G
1	658	96	101	0	57	43	1.35	30.1	38.0	16.3	15.6
2	616	107	115	0	59	41	1.45	29.8	39.7	14.5	16.1
3	1274	203	216	0	58	42	1.40	29.9	38.8	15.4	15.8
4	495-496	61	64	1	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	46.6	32.5	12.9	8.0
5	310-337	167	111	88	39	61	0.63	39.7	40.8	8.4	11.1

In contrast, the mitochondrial Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) sequence for the studied Calliphoridae species does not provide as much resolution as for *Hypoderma* species, for which it is feasible to perform a clear molecular discrimination [Weigl *et al.* 2010b]. The studied sequence of this region contained only 61 informative sites (including one INDEL) (**Table 18**), a low number of variable positions among genera [29; *Phormia* (15), *Calliphora* (9) and *Lucilia* (5)], and little inter-specific nucleotide variability within the *Lucilia* genus [33; *L. sericata* (13), *L. ampullacea* (12) and *L. caesar* (8)] (**Table S12**, Supplementary material). These results may be related to the presence of a highly conserved tRNA and non-coding region of approximately 84 bp in the analysed species of the Calliphoridae family. However, analysis of the ITS2 (310-337 bp) nuclear region revealed a significant number of informative sites (167), including base substitutions (111) and insertions/deletions (INDELs, 88), which seems to be an important advantage for the identification of closely related species (**Table 18**). This high inter-specific diversity combines preserved and highly variable regions (**Table S13**, Supplementary material), which is consistent with previous studies [Nelson *et al.* 2008]. Finally, we did not perform valuations about the mitochondrial Cyt-b (307 bp) because the sequences were obtained for *P. regina* specimens only (**Table S14**, Supplementary material).

To summarize, the COI (616 bp) and nuclear ITS2 (310-337 bp) regions contain more informative sites and variable positions among genera than the insect identification standard *locus*, COI barcode (658 bp), significantly improving the resolution within the usually problematic *Lucilia* genus. The mitochondrial Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) region had sufficient variability to perform unambiguous identifications. The Cyt-b haplotypes in *P. regina* species and the Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 haplotypes in *P. regina*, *L. ampullacea* and *L. caesar*, are newly discovered and were not previously recorded in the GenBank database.

5.2.4.2. Analysis of homology and phylogeny in Calliphoridae species

Phylogenetic and pairwise divergence analyses of the molecularly studied specimens were conducted using the consensus sequences obtained for the regions: COI barcode (658 bp), COI (616 bp), the combination of both sequences (COI barcode-COI 616 bp, 1274 bp), Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-337 bp). Additionally, the studied regions of the Calliphoridae family species recorded in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were included in the analysis as reference sequences (**Tables S7-S10**, Supplementary material).

Phylogenies were inferred separately from COI barcode (658 bp), COI (616 bp), COI barcode-COI 616 bp (1274 bp) and ITS2 (310-337 bp) sequences, with GTR + G as general best-fit model. ML, MP and NJ inference for each molecular marker recovered similar topologies, and these topologies were congruent with that derived from Bayesian analysis.

Phylogenetic analysis of the separate (COI barcode and COI 616 bp) and combined (COI barcode-COI 616 bp) regions had quite different topologies (**Figs. 18a-c**). The genera *Protophormia*, *Phormia* and some species of *Chrysomya* change their location in the phylogenetic tree depending on the basis of the combination COI barcode-COI 616 bp, the COI barcode or COI (616 bp). They are closer to other *Chrysomya* species

in the two first cases and to *Lucilia* and *Calliphora* genera in the last one. Nevertheless, the two first relationships are much more consistent (bootstrap 95-90 %; 98-97 %) (**Figs. 18a-c**). In general, COI barcode (658 bp) consensus sequence algorithms show stronger bootstrap support for exterior nodes (**Fig. 18a**: 94-89 % *Calliphora*) than for deeper nodes (**Fig. 18a**: 44-37 % *C. vomitoria* (Linnaeus, 1758)). In contrast, the COI (616 bp) tree showed an opposite behaviour, with weaker support in the more external nodes (**Fig. 18b**: 38 % *Lucilia* and 98-100 % *L. sericata*). However, the phylogeny based on combined analysis (COI barcode-COI 616 bp) revealed a higher resolution for more external and deeper nodes, such as *Chrysomya* and *Calliphora* genera (**Fig. 18c**). Nonetheless, the ITS2 (310-337 bp) marker achieved similar results with a considerably reduced size (**Fig. 19**). This is a highlighted issue considering that many phylogenetic analyses become counterproductive with sequence lengths of about 300 bp. It is worth mentioning that this nuclear region, as mitochondrial markers, exists in high copy number [Alquezar *et al.* 2010]. This feature added to the small sized of the target sequence may be a great advantage, especially in degraded samples where occurs a significant reduction of the fragments size.

The intra-specific pairwise sequences divergence analysis for all the COI *loci* (COI barcode, COI 616 bp and COI barcode-COI 616 bp) showed a strong similarity and even identity in most cases, such as *C. vicina* (0.0; 0.3; 0.2), *L. sericata* (0.0; 0.0; 0.0), *L. ampullacea* (0.0; 0.0; 0.0) or *L. caesar* (0.0; 0.3; 0.2) (**Table 19; Table S15**, Supplementary material). The high homology with the reference sequences registered in GenBank enables to confirm most of the specimen identification. Nevertheless, for *P. regina* (4.3; 3.2; 3.8) and *C. vomitoria* (3.5; 3.4; 3.5) species and some haplotypes of *L. caesar* species (**Table 19; Table S15**, Supplementary material), the intra-specific divergence values are significantly higher than the 1 % established as the maximum possible within the same species [Wallman & Donnellan 2001; Zehner *et al.* 2004b; Boehme *et al.* 2010]. This wide genetic variability may be related to the geographical

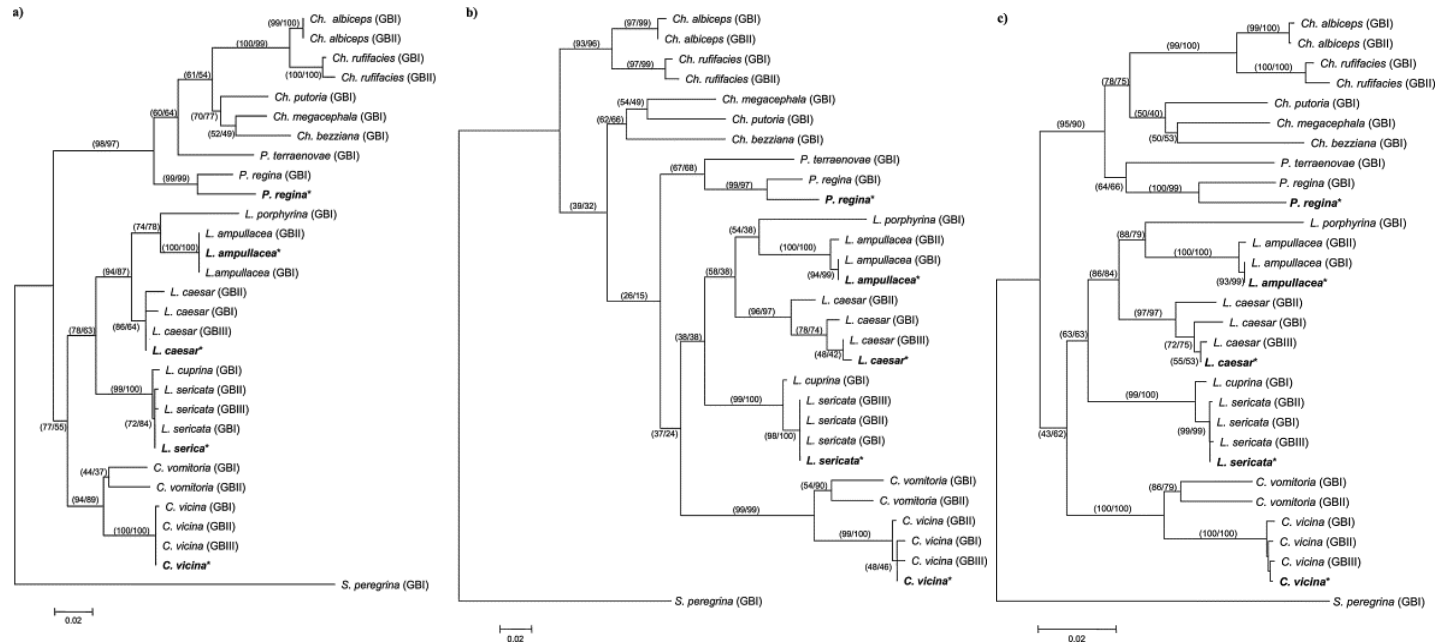


Fig. 18. Maximum likelihood (ML) phylogenetic reconstruction for the COI loci. ML tree constructed on the basis of mitochondrial COI barcode (658 bp) (a), mitochondrial COI (616 bp) (b) and the combined analysis COI barcode-COI 616 bp (1274 bp) (c), consensus sequences of the studied species (*P. regina**, *C. vicina**, *L. sericata**, *L. ampullacea** and *L. caesar**), and GenBank (GB) Calliphoridae species sequences. The GenBank sequences haplotypes were noted as GBI, GBII and GBIII. The flesh fly *Sarcophaga peregrina* Robineau-Desvoidy, 1830, was used as an out-group. The numbers shown in brackets refer to the bootstrap support (1000 iterations) for ML and maximum parsimony (MP) analysis (ML/MP). The length of branches is proportional to the amount of DNA that changes in the sequence, with the bar indicating 0.02 substitutions per position.

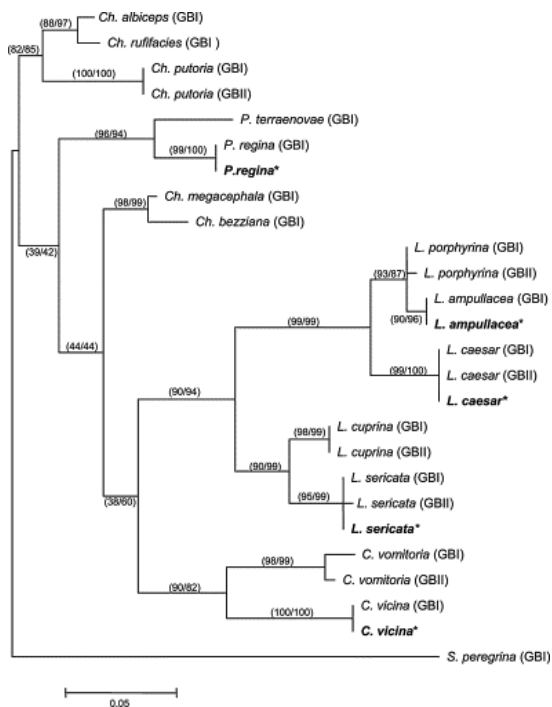


Fig. 19. Maximum likelihood (ML) phylogenetic reconstruction for the ITS2 marker. ML tree constructed on the basis of ITS2 (310-337 bp) consensus sequences for the studied species (*P. regina**, *C. vicina**, *L. sericata**, *L. ampullacea** and *L. caesar**) and GenBank (GB) Calliphoridae species. The GenBank sequences haplotypes were noted as GBI, GBII and GBIII. The flesh fly *Sarcophaga peregrina* Robineau-Desvoidy, 1830, was used as an out-group. The numbers shown in brackets refer to the bootstrap support (1000 iterations) for ML and maximum parsimony (MP) analysis (ML/MP). The length of branches is proportional to the amount of DNA that changes in the sequence, with the bar indicating 0.05 substitutions per position.

isolation of species-divergent haplotypes because *P. regina* are represented by specimens from Europe (Germany) and North America (California), *L. caesar* from Europe (UK) and Korea, and *C. vomitoria* originates from two regions of North America separated by more than 3000 km (California and Ohio) (**Table S7**, Supplementary material). The previous argument is also valid to explain the differences found in Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 and Cyt-b regions between the *L. cuprina* (Wiedemann, 1830) haplotypes (2.2; 4.2) from two Australian localities that are at a distance of about 1600 Km (I: Melbourne; II: Brisbane) (**Tables S8-S9** and **S16-S17**, Supplementary material) [Nelson *et al.* 2012]. However, the species *L. sericata* and *L. cuprina* for the COI barcode and COI barcode-COI 616 bp *loci* showed nucleotide divergence values under intra-specific of 1 % (0.5-0.6; 0.7-0.8), and for the other mitochondrial markers (COI 616 bp, Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 and Cyt-b) some haplotypes do not exceed the established inter-specific minimum of 3 % (1.0; 0.2-2.2; 1.0-1.3)

(Table 19; Tables S16-S17, Supplementary material) [Wells & Sperling 2001]. These results are reasonable considering their morphological and phylogenetic close relation, and the observed high sequence homology may be a consequence of recent or ongoing speciation [Sonet *et al.* 2012]. Additionally, it is noteworthy that the nuclear ITS2 (310-337 bp) of the studied blowfly species mostly lacks intra-specific genetic divergence. Only for *C. vomitoria* and *L. porphyrina* (Walker, 1856) species the divergence values (2.4 and 3.3) are far greater than the 1 % intra-specific limit (Table 20). As previously, in the case of *C. vomitoria* this variability within species may be explained with the different origin of specimens, United Kingdom and Belgium (Table S9, Supplementary material). However, *L. porphyrina* GenBank samples seem to be from the same place, Chiang Mai (Thailand) (Table S9, Supplementary material), so further studies should be performed to clarify the ITS2 and other mitochondrial genes variability in this species.

Finally, the inter-specific pairwise analysis of the mitochondrial and nuclear studied molecular markers showed great divergence values (COI barcode: 3.3-11.7; COI 616 bp: 4.9-11.2; COI barcode-COI 616 bp: 4.6-10.8; Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1: 3.6-9.1; Cyt-b: 3.6-11.7; and ITS2 4.9-30.6) for most of the species (Tables 19-20; Tables S15-S17, Supplementary material). However, within the *Lucilia* genus, excluding *L. cuprina* species, the COI barcode showed a very low nucleotide divergence with the minimum (3.3, *L. ampullacea*-*L. caesar*) extremely close to the species differentiation barrier of 3 % [Wells & Sperling 2001]. In contrast, the COI (616 bp) locus revealed the highest values for *Lucilia* species sequence variability (*L. sericata*-*L. ampullacea*: 7.0; *L. sericata*-*L. caesar*: 6.0-6.8; and *L. ampullacea*-*L. caesar*: 5.5-6.8) (Table 19), placing it in an advantageous position compared to the other mitochondrial regions. The Cyt-b (307 bp) locus showed the highest divergence for a mitochondrial marker between *L. sericata*-*L. ampullacea* sequences (7.2-7.8) (Table S17, Supplementary material). The analysis of the mitochondrial Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 region showed higher minimum for

L. ampullacea-*L. caesar* (4.0) than the COI barcode (658 bp) locus (3.6) (**Table S16**, Supplementary material). However, for the rest of the species, the Cyt-b (307 bp) and Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) regions seem to be at a disadvantage compared with the rest of the mitochondrial markers, with lower discrimination values. These results do not agree with previous studies [Weigl *et al.* 2010b; GilArriortua *et al.* 2013] and may be a result of the lower number of bases studied (approximately 162-351 bp length less) or for the scarce gene diversity in the species studied. It should be highlighted that, in general, the nuclear region ITS2 (310-337 bp) had much greater divergence values than any other mitochondrial marker, even between *L. sericata* and *L. cuprina* species (**Table 20**), making it a valuable point for reliable and unambiguous species differentiation.

In view of these findings, the combined region of the mitochondrial COI barcode-COI 616 bp (1274 bp) seems to be, in general, the most consistent marker for deep and more distant phylogenetic relationships. However, in degraded samples, only the shortest DNA fragments remain amplifiable by PCR. Under these circumstances, both the mitochondrial COI (616 bp) and nuclear ITS2 (310-337 bp) markers are more appropriate for the accurate identification of entomological evidence. When working with highly degraded DNA, the high copy number provided by mitochondrial DNA is a considerable advantage to overcoming potential technical problems. Additionally, we observed the necessity of being extremely careful to avoid misidentifications when the reference sequence origin is a far away or is an isolated site because they may accumulate geographically characteristic variability. Finally, it may be convenient to employ different combined molecular markers and criteria to allow for the increased resolution that enables reliable species differentiation.

5.2. Aportación / Contribution I.II

Table 19. Pairwise sequence divergence between the studied Calliphoridae (*P. regina**, *C. vicina**, *L. sericata**, *L. ampullacea** and *L. caesar**) consensus sequences for the COI barcode (658 bp) and COI (616 bp). GenBank database sequences for the same and other Calliphoridae species were included for comparison purposes. Pairwise divergence in percentage (%) is shown for the COI barcode (658 bp) above the diagonal and for COI (616 bp) below the diagonal.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
1 <i>Ch. albiceps</i> ^a	—	0.0	6.2	5.3	5.5	2.4	2.9	6.8	7.4	8.4	9.3	9.1	9.1	9.1	8.5	9.4	10.3	10.2	10.5	10.3	10.6	10.9	10.9	10.9	11.2	9.4	9.1	8.8	8.8		
2 <i>Ch. albiceps</i> ^b	0.3	—	6.2	5.3	5.5	2.4	2.9	6.8	7.4	8.4	9.3	9.1	9.1	9.1	8.5	9.4	10.3	10.2	10.5	10.3	10.6	10.9	10.9	10.9	11.2	9.4	9.1	8.8	8.8		
3 <i>Ch. bezziana</i> ^a	8.6	8.3	—	3.8	4.6	7.6	8.1	6.5	6.8	9.0	9.9	9.7	9.7	9.7	8.7	9.1	9.7	9.9	9.7	9.7	9.9	11.2	11.2	11.2	11.1	9.3	9.3	9.0	9.0		
4 <i>Ch. megacephala</i> ^a	7.0	6.7	6.2	—	3.8	6.7	7.1	5.5	7.0	7.9	8.8	8.7	8.7	8.7	7.9	9.0	8.8	8.7	9.0	8.8	9.0	9.9	9.9	9.9	10.2	9.0	8.4	8.4	8.4		
5 <i>Ch. putoria</i> ^a	7.8	7.8	6.7	5.4	—	6.2	6.7	6.8	7.3	7.8	9.0	8.8	8.8	8.8	8.1	8.4	9.6	9.7	9.7	9.6	9.7	10.3	10.3	10.3	10.6	9.4	9.1	9.1	9.1		
6 <i>Ch. ruffifacies</i> ^a	4.1	3.7	8.6	7.3	8.1	—	0.8	7.1	8.4	8.8	9.9	9.7	9.7	9.7	9.9	9.7	10.6	10.5	10.8	10.6	10.9	11.6	11.6	11.6	11.6	10.5	10.2	9.9	9.9		
7 <i>Ch. ruffifacies</i> ^b	4.2	3.9	9.1	7.8	8.6	0.8	—	7.6	8.8	8.7	10.3	10.2	10.2	10.2	10.3	10.2	11.1	10.9	11.2	11.1	11.4	11.4	11.4	11.4	11.4	11.4	11.7	10.6	10.6	10.3	10.3
8 <i>P. terraenovae</i> ^a	8.3	8.3	7.8	8.4	8.0	8.6	8.3	—	6.5	7.6	9.6	9.4	9.4	9.4	10.3	10.2	9.3	9.1	9.4	9.3	9.4	10.0	10.0	10.0	10.0	10.8	9.9	9.6	9.3	9.3	
9 <i>P. regina</i> ^a	8.3	8.3	8.6	7.8	7.3	9.1	9.1	6.3	—	4.3	8.8	8.7	8.7	8.7	9.4	9.3	9.3	9.4	9.4	9.3	9.4	10.3	10.3	10.3	11.2	9.7	9.4	9.4	9.4	9.4	
10 <i>P. regina</i> [*]	8.6	8.6	9.6	8.1	8.6	9.3	9.3	6.5	3.2	—	9.3	9.1	9.1	9.1	9.4	9.7	9.7	9.6	9.9	9.7	9.9	10.3	10.3	10.3	10.8	9.9	9.7	9.6	9.6	9.6	
11 <i>C. vicina</i> ^a	10.7	10.4	9.6	10.6	9.1	11.2	11.4	10.7	10.1	10.4	—	0.2	0.2	0.2	4.1	4.1	6.5	6.7	6.7	6.5	7.0	7.3	7.3	7.3	9.0	6.2	6.5	6.2	6.2		
12 <i>C. vicina</i> ^b	10.9	10.6	9.6	10.7	8.8	10.7	10.9	10.7	10.1	10.4	0.6	—	0.0	0.0	4.0	4.3	6.4	6.5	6.5	6.4	6.8	7.1	7.1	7.1	8.8	6.4	6.4	6.1	6.1		
13 <i>C. vicina</i> ^c	10.9	10.6	9.6	11.0	9.1	11.0	11.2	10.7	10.1	10.4	0.6	0.6	—	0.0	4.0	4.3	6.4	6.5	6.5	6.4	6.8	7.1	7.1	7.1	8.8	6.4	6.4	6.1	6.1		
14 <i>C. vicina</i> [*]	10.9	10.6	9.6	10.7	9.1	11.0	11.2	10.7	10.1	10.4	0.3	0.3	—	4.0	4.3	6.4	6.5	6.5	6.4	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	8.8	6.4	6.4	6.1	6.1		
15 <i>C. vomitoria</i> ^a	10.9	10.9	9.3	10.2	8.4	10.9	10.7	10.4	9.4	9.6	5.2	5.2	5.5	5.2	—	3.5	5.6	5.8	5.8	5.6	6.1	7.8	7.8	7.8	8.1	5.8	5.2	5.5	5.5		
16 <i>C. vomitoria</i> ^b	11.0	11.0	10.1	10.6	9.1	11.0	11.2	10.7	8.4	8.6	4.9	4.9	5.2	4.9	3.4	—	6.1	6.2	6.2	6.1	6.5	7.8	7.8	7.8	7.9	5.8	6.2	5.8	5.8		
17 <i>L. sericata</i> ^a	8.9	8.9	9.1	8.8	8.3	9.4	9.6	8.1	8.3	8.4	9.1	9.3	9.3	9.3	8.8	8.6	—	0.2	0.2	0.0	0.5	5.8	5.8	5.8	7.0	4.9	4.9	4.9	4.9		
18 <i>L. sericata</i> ^b	8.9	8.9	9.1	8.8	8.3	9.4	9.6	8.1	8.3	8.4	9.1	9.3	9.3	9.3	8.8	8.6	0.0	—	0.3	0.2	0.6	5.9	5.9	5.9	6.8	5.0	4.7	4.7	4.7		
19 <i>L. sericata</i> ^c	8.9	8.9	9.1	8.8	8.3	9.4	9.6	8.1	8.3	8.4	9.1	9.3	9.3	9.3	8.8	8.6	0.0	0.0	—	0.2	0.6	5.9	5.9	5.9	7.1	5.0	5.0	5.0	5.0		
20 <i>L. sericata</i> [*]	8.9	8.9	9.1	8.8	8.3	9.4	9.6	8.1	8.3	8.4	9.1	9.3	9.3	9.3	8.8	8.6	0.0	0.0	0.0	—	0.5	5.8	5.8	5.8	7.0	4.9	4.9	4.9	4.9		
21 <i>L. cuprina</i> ^a	8.6	8.6	8.6	8.6	7.8	9.3	9.4	7.8	7.8	8.0	8.8	8.9	8.9	8.9	8.4	8.3	1.0	1.0	1.0	—	5.9	5.9	5.9	6.8	5.0	5.0	5.0	5.0			
22 <i>L. ampullacea</i> ^a	9.3	9.3	10.4	9.9	9.1	9.1	9.3	9.4	9.3	8.6	9.9	10.1	9.9	9.9	8.6	8.4	7.0	7.0	7.0	7.0	—	0.0	0.0	5.2	3.3	4.6	3.6	3.6			
23 <i>L. ampullacea</i> ^b	9.4	9.4	10.4	9.9	8.8	9.3	9.4	9.3	9.4	8.8	9.9	10.1	9.9	9.9	8.9	8.4	7.0	7.0	7.0	7.0	0.6	—	0.0	5.2	3.3	4.6	3.6	3.6			
24 <i>L. ampullacea</i> [*]	9.3	9.3	10.4	9.9	9.1	9.1	9.3	9.6	9.3	8.6	9.9	10.1	9.9	9.9	8.6	8.4	7.0	7.0	7.0	7.0	0.0	0.6	—	5.2	3.3	4.6	3.6	3.6			
25 <i>L. porphyrina</i> ^a	8.3	8.0	10.2	9.1	9.6	8.4	8.6	8.8	9.4	8.6	9.9	10.2	9.9	9.9	9.9	9.3	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	6.3	6.5	6.3	—	5.3	5.5	4.7	4.7		
26 <i>L. caesar</i> ^a	9.7	9.4	9.1	8.3	7.6	8.6	9.1	7.6	9.7	9.1	9.6	9.6	9.9	9.9	9.4	9.3	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	7.3	—	1.5	0.6	0.6	
27 <i>L. caesar</i> ^b	9.4	9.1	8.9	8.6	7.3	9.3	9.7	7.6	8.9	8.3	8.9	9.3	8.9	8.9	8.8	8.6	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	5.5	5.5	5.5	7.1	2.4	—	0.9	0.9		
28 <i>L. caesar</i> ^c	9.4	9.4	9.3	8.6	7.6	8.9	9.1	8.3	9.3	8.6	9.7	9.4	9.7	9.7	8.9	8.8	6.3	6.3	6.3	6.3	6.0	6.0	6.0	6.0	6.8	1.1	2.9	—	0.0		
29 <i>L. caesar</i> [*]	9.1	9.1	9.3	8.6	7.3	8.6	8.8	8.0	8.9	8.3	9.4	9.1	9.4	9.4	8.6	8.4	6.0	6.0	6.0	6.0	5.7	5.7	5.7	5.7	6.8	1.5	2.6	0.3	—		

^a GenBank species haplotypes I; ^b GenBank species haplotypes II; ^c GenBank species haplotypes III.

Table 20. Pairwise sequence divergence between the studied Calliphoridae (*P. regina**, *C. vicina**, *L. sericata**, *L. ampullacea** and *L. caesar**) consensus sequences for the ITS2 (310-337 bp). GenBank database sequences for the same and other Calliphoridae species were included for comparison purposes. Pairwise divergence in percentage (%) is shown above the diagonal and the absolute differences below the diagonal.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 <i>Ch. albiceps</i> ^a	—	14.1	12.7	8.9	9.6	2.1	20.2	21.6	21.6	28.7	28.7	24.2	24.2	25.4	25.6	25.4	27.1	27.3	22.8	22.8	24.5	24.7	29.4	29.2	29.4
2 <i>Ch. bezziana</i> ^a	60	—	2.6	16.0	16.7	15.5	17.4	17.9	17.9	24.2	24.2	18.8	19.1	21.6	21.4	21.6	24.5	24.5	20.7	20.7	21.6	21.6	26.4	26.1	26.4
3 <i>Ch. megacephala</i> ^a	54	11	—	14.6	15.3	14.1	16.7	16.7	16.7	23.5	23.5	18.6	18.8	21.2	20.9	21.2	24.0	24.0	20.5	20.5	21.6	21.9	26.4	26.1	26.4
4 <i>Ch. putoria</i> ^a	38	68	62	—	0.7	9.9	21.9	20.0	19.8	27.3	27.3	24.7	24.7	27.3	27.1	27.3	29.6	29.6	22.6	22.6	24.0	24.0	27.8	27.5	27.8
5 <i>Ch. putoria</i> ^b	41	71	65	3	—	10.6	22.6	19.5	19.3	28.0	28.0	25.4	25.4	28.0	27.8	28.0	30.4	30.4	23.3	23.3	24.7	24.7	28.5	28.2	28.5
6 <i>Ch. rufifacies</i> ^a	9	66	60	42	45	—	20.9	22.6	22.6	29.2	29.2	25.2	25.2	26.4	26.6	26.4	28.0	28.2	24.0	24.0	25.6	25.9	30.1	29.9	30.1
7 <i>P. terraenovae</i> ^a	86	74	71	93	96	89	—	10.1	10.4	21.6	21.6	18.4	17.9	22.8	22.6	22.8	25.9	25.9	27.1	27.1	27.3	27.8	26.4	26.4	26.4
8 <i>P. regina</i> ^a	92	76	71	85	83	96	43	—	0.2	22.8	22.8	19.3	18.8	24.0	23.8	24.0	26.1	26.1	24.7	24.7	24.7	25.2	24.9	24.9	24.9
9 <i>P. regina</i> [*]	92	76	71	84	82	96	44	1	—	23.1	23.1	19.5	19.1	24.2	24.0	24.2	26.4	26.4	24.9	24.9	24.9	25.4	24.7	24.7	24.7
10 <i>C. vicina</i> ^a	122	103	100	116	119	124	92	97	98	—	0.0	13.4	13.4	24.7	24.5	24.7	28.0	28.0	30.6	30.6	29.2	29.6	26.6	26.6	26.6
11 <i>C. vicina</i> [*]	122	103	100	116	119	124	92	97	98	0	—	13.4	13.4	24.7	24.5	24.7	28.0	28.0	30.6	30.6	29.2	29.6	26.6	26.6	26.6
12 <i>C. vomitoria</i> ^a	103	80	79	105	108	107	78	82	83	57	57	—	2.4	22.1	21.9	22.1	24.9	24.9	26.6	26.6	24.2	25.2	22.6	22.8	22.6
13 <i>C. vomitoria</i> ^b	103	81	80	105	108	107	76	80	81	57	57	10	—	22.1	21.9	22.1	24.9	24.9	27.3	27.3	24.9	25.6	22.6	22.8	22.6
14 <i>L. sericata</i> ^a	108	92	90	116	119	112	97	102	103	105	105	94	94	—	0.2	0.0	8.9	8.7	23.8	23.8	23.1	22.4	21.6	21.4	21.4
15 <i>L. sericata</i> ^b	109	91	89	115	118	113	96	101	102	104	104	93	93	1	—	0.2	9.2	8.9	24.0	24.0	23.3	22.6	21.9	21.6	21.9
16 <i>L. sericata</i> [*]	108	92	90	116	119	112	97	102	103	105	105	94	94	0	1	—	8.9	8.7	23.8	23.8	23.1	22.4	21.6	21.4	21.6
17 <i>L. cuprina</i> ^a	115	104	102	126	129	119	110	111	112	119	119	106	106	38	39	38	—	0.2	25.6	25.6	24.5	24.5	22.8	22.6	22.8
18 <i>L. cuprina</i> ^b	116	104	102	126	129	120	110	111	112	119	119	106	106	37	38	37	1	—	25.9	25.9	24.7	24.5	22.8	22.6	22.8
19 <i>L. ampullacea</i> ^a	97	88	87	96	99	102	115	105	106	130	130	113	116	101	102	101	109	110	—	0.0	4.9	3.3	14.1	13.9	14.1
20 <i>L. ampullacea</i> [*]	97	88	87	96	99	102	115	105	106	130	130	113	116	101	102	101	109	110	0	—	4.9	3.3	14.1	13.9	14.1
21 <i>L. porphyrina</i> ^a	104	92	92	102	105	109	116	105	106	124	124	103	106	98	99	98	104	105	21	21	—	3.3	11.3	11.3	11.3
22 <i>L. porphyrina</i> ^b	105	92	93	102	105	110	118	107	108	126	126	107	109	95	96	95	104	104	14	14	14	—	12.2	12.0	12.2
23 <i>L. caesar</i> ^a	125	112	112	118	121	128	112	106	105	113	113	96	96	92	93	92	97	97	60	60	48	52	—	0.5	0.0
24 <i>L. caesar</i> ^b	124	111	111	117	120	127	112	106	105	113	113	97	97	91	92	91	96	96	59	59	48	51	2	—	0.0
25 <i>L. caesar</i> [*]	125	112	112	118	121	128	112	106	105	113	113	96	96	91	93	92	97	97	60	60	48	52	0	0	—

^aGenBank species variants I; ^bGenBank species variants II.

5.2.5. Summary

The present work has focused on improving the diagnostic capability of the analyses based on the most common genetic marker, COI barcode, in those cases where its unambiguous differentiation is limited by low discriminatory power. In these situations, it may be preferable to use more than one genomic region to improve the necrophagous species differentiation. In this sense, the mitochondrial 616 bp of cytochrome c oxidase subunit I (COI) *locus* and the second internal transcribed spacer (ITS2) region of ribosomal DNA (rDNA) (310-337 bp) hold promise for accurately identifying even closely related blowfly species. These markers accumulate high variability in comparison to the standard *locus* traditionally used for insect differentiation, the COI barcode (658 bp), or to the studied region Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp). These results provide new data about the genetic variability of European blowflies in Westphalia region (Germany) and indicate the usefulness of analyzing several markers in molecular identification.

5.3. Aportación / Contribution I.III

Efectividad de los marcadores moleculares COI *barcode*, Cyt-b e ITS2 en la identificación de las especies del género *Lucilia* del sur de Europa (Portugal) / Effectiveness of the COI barcode, Cyt-b and ITS2 molecular markers in *Lucilia* genus species identification from Southern Europe (Portugal)

“Mitochondrial and nuclear DNA approaches for reliable identification of *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae) species of forensic interest from Southern Europe”

Forensic Science International, **2015**, 257: 393-397

Efectividad de los marcadores moleculares COI *barcode*, Cyt-b e ITS2 en la identificación de las especies del género *Lucilia* del sur de Europa (Portugal)

La **aportación I.III** contribuye a la consecución de los objetivos específicos “Examinar las ventajas y limitaciones de los marcadores moleculares convencionales para la identificación de dípteros necrófagos y miásicos”, “Contribuir con nuevos marcadores moleculares, más resolutivos y eficaces, a la inequívoca clasificación taxonómica de dípteros de importancia médico-legal y veterinaria”, “Caracterizar molecularmente los dípteros de interés médico-legal y veterinario, tanto del sur como del centro de Europa, y estudiar su variabilidad nucleotídica” y “Elaborar un panel de marcadores para la identificación molecular de los dípteros Calliphoridae de importancia forense del sur de Europa (Península Ibérica)”.

Este trabajo amplía el estudio realizado (**aportación I.II**) para los califóridos de Centro Europa (Alemania), aumentando el número de especies y especímenes analizados (principalmente para el género *Lucilia*). Se puede considerar como la continuación de la **aportación I.I** sobre los dípteros del sur de Europa (Portugal), ya que proporciona información novedosa sobre los califóridos portugueses, además de nuevas secuencias para Cyt-b (307 pb).

En esta **aportación (I.III)** se realizó un estudio multi-región complementando COI *barcode* (658 pb) con los marcadores Cyt-b (307 pb) e ITS2 (310-331 pb), para mejorar la fiabilidad y precisión en el diagnóstico de los califóridos de interés forense del sur de Europa (Península Ibérica: Portugal, INML Oporto).

Se analizaron un total de 209 especímenes pertenecientes a siete especies de la familia Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. ampullacea*, *L. caesar* y *L. illustris*). Estas especies son las habitualmente utilizadas como indicadores forenses en Portugal.

5.3. Aportación I.III

Los *loci* mitocondriales presentaron dificultades en la separación de especies estrechamente relacionadas (*L. illustris*-*L. caesar*). Sin embargo, el marcador nuclear ITS2 (310-331 pb) mostró gran potencial diagnóstico al permitir la diferenciación inequívoca, incluso dentro de los géneros más complejos.

Un valor añadido fue la contribución con los primeros datos genéticos de los marcadores Cyt-b (307 pb) para *L. illustris* e ITS2 (310-331 pb) para las especies de *Lucilia* de la Península Ibérica. Esta aportación resulta de especial trascendencia considerando la escasez de información molecular disponible sobre los califóridos de importancia forense del sur de Europa.

Este trabajo ha sido publicado en la revista científica *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) con el título “***Mitochondrial and nuclear DNA approaches for reliable identification of Lucilia (Diptera: Calliphoridae) species of forensic interest from Southern Europe***”. Dicho artículo se muestra a continuación.

Effectiveness of the COI barcode, Cyt-b and ITS2 molecular markers in *Lucilia* genus species identification from Southern Europe (Portugal)

The **contribution I.III** collaborates to the achievement of the specific objectives “*To examine the advantages and limitations of conventional molecular markers for carrion-breeding and myiasic Diptera identification*”, “*To contribute with new molecular markers, more reliable and effective, for unambiguous taxonomic classification of Diptera of medico-legal and veterinary importance*”, “*To characterize molecularly the Diptera of medico-legal and veterinary interest both from Southern and Central Europe, and to study their nucleotide variability*” and “*To elaborate a panel of markers for identifying molecularly the Diptera Calliphoridae of forensic importance in Southern Europe (Iberian Peninsula)*”.

This work extends the study performed (**contribution I.II**) for blowflies of Central Europe (Germany), increasing the number of species and specimens analyzed (mainly for *Lucilia* genus). It can be considered as the continuation of the **contribution I.I** about Diptera of Southern Europe (Portugal), as it provides newly information on the Portuguese blowflies, as well as novel sequences for Cyt-b (307 bp).

In this **contribution (I.III)** a multi-region study was conducted complementing the COI barcode (658 bp) with Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-331 bp) markers, to improve the reliability and accuracy in the diagnosis of forensic interest blowflies from Southern Europe (Iberian Peninsula: Portugal, NILM Porto).

A total of 209 specimens belonging to seven species of the Calliphoridae family (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris*) were analyzed. These species are commonly employed as forensic indicators in Portugal.

Mitochondrial *loci* showed difficulties in the separation of closely related species (*L. caesar*-*L. illustris*). However, the ITS2 (310-331 bp) nuclear marker exhibited a great

5.3. Contribution I.III

diagnostic potential allowing unambiguous distinction, even within more complex genera.

An added value was the contribution with the first genetic data of markers Cyt-b (307 bp) for *L. illustris* and ITS2 (310-331 bp) for the Iberian Peninsula *Lucilia* species. This contribution is of special importance considering the scarcity of molecular information available about the Calliphoridae of forensic importance from Southern Europe.

This work has been published in the scientific journal *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) with the title “***Mitochondrial and nuclear DNA approaches for reliable identification of Lucilia (Diptera: Calliphoridae) species of forensic interest from Southern Europe***”. This paper is reported below.

5.3.1. Resumen

En entomología forense, la rápida e inequívoca identificación de las especies de califóridos es prerequisite crítico para la estimación precisa del intervalo *post-mortem* (IPM). El diagnóstico convencional de la entomofauna cadavérica basado en caracteres externos, está limitado por la similitud morfológica entre especies, especialmente en etapas inmaduras. El análisis genético hace posible el diagnóstico y la delimitación de las especies de insectos de forma precisa y fiable. Sin embargo, la taxonomía de algunas especies permanece sin resolver. Este estudio se centró en mejorar la efectividad y la precisión de los análisis basados en la ampliamente utilizada región *barcode* del citocromo c oxidasa subunidad I (COI *barcode*, 658 pb), complementada con otras regiones mitocondriales y nucleares, como el citocromo b (Cyt-b, 307 pb) y el segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 310-331 pb), para la identificación de los califóridos del sur de Europa. Analizamos un total de 209 especímenes, recogidos de 38 cadáveres humanos, pertenecientes a tres géneros de Calliphoridae y siete especies: *Chrysomya* (*Ch. albiceps*), *Calliphora* (*C. vicina* y *C. vomitoria*), y *Lucilia* (*L. sericata*, *L. ampullacea*, *L. caesar* y *L. illustris*). Estas especies son los indicadores de IPM más comunes en Portugal. Los resultados revelaron que la separación inequívoca de las especies del género *Lucilia* requiere de *loci* diferentes de la región *barcode*. Además, concluimos que el marcador molecular ITS2 (310-331 pb) es una herramienta diagnóstica prometedora porque su poder de discriminación inter-específico permite realizar diferenciaciones inequívocas y consistentes, incluso entre especies estrechamente relacionadas (*L. caesar*-*L. illustris*). Este trabajo también aporta nuevos datos genéticos que pueden ser de interés en la realización del diagnóstico de las especies de califóridos del sur de Europa. Cabe destacar que, hasta donde nosotros conocemos, hemos proporcionado los primeros registros del *locus* Cyt-b (307 pb) para *L. illustris* y de la región ITS2 (310-331 pb) para las especies de *Lucilia* de la Península Ibérica.

Abstract

In forensic entomology, rapid and unambiguous identification of blowfly species is a critical prerequisite for accurately estimating the *post-mortem* interval (PMI). The conventional diagnosis of cadaveric entomofauna based on external characters is hampered by the morphological similarities between species, especially at immature stages. Genetic analysis has been shown to allow precise and reliable diagnosis and delimitation of insect species. Nevertheless, the taxonomy of some species remains unresolved. This study was focused on improving the effectiveness and accuracy of analysis based on the widely used cytochrome c oxidase subunit I barcode region (COI barcode, 658 bp), complemented by other mitochondrial and nuclear regions, such as cytochrome b (Cyt-b, 307 bp) and the second internal transcribed spacer (ITS2, 310-331 bp), for the identification of Southern European blowflies. We analyzed a total of 209 specimens, collected from 38 human corpses, belonging to three Calliphoridae genera and seven species: *Chrysomya* (*Ch. albiceps*), *Calliphora* (*C. vicina* and *C. vomitoria*), and *Lucilia* (*L. sericata*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris*). These species are the most common PMI indicators in Portugal. The results revealed that unambiguous separation of species of the *Lucilia* genus requires different *loci* from the barcode region. Furthermore, we conclude that the ITS2 (310-331 bp) molecular marker is a promising diagnostic tool because its inter-specific discriminatory power enables unequivocal and consistent distinctions to be made, even between closely related species (*L. caesar*-*L. illustris*). This work also contributes new genetic data that may be of interest in performing species diagnosis for Southern European blowflies. Notably, to the best of our knowledge, we provide the first records of the Cyt-b (307 bp) *locus* for *L. illustris* and the ITS2 (310-331 bp) region for Iberian Peninsula *Lucilia* species.

5.3.2. Introduction

The critical prerequisite for the accurate practice of forensic entomology is unequivocal identification of collected insects in criminal caseworks because the most significant application is estimation of the oviposition date, which is linked to the *post-mortem* interval (PMI) [Wells & LaMotte 2001; Amendt *et al.* 2007]. Moreover, each bio-geographical region exhibits a distinctive specific composition, adapted to the environmental conditions and seasonality, with a developmental rate that is characteristic of the species [Hwang & Turner 2005; Richards *et al.* 2009; Fremdt & Amendt 2014]. Morphological diagnosis based on external features may be very difficult due to physical similarities, particularly in immature stages, which must often be reared until the adult emerges to allow accurate diagnosis [Wallman & Donnellan 2001; Wells & Sperling 2001]. This task is time-consuming and entails no guarantees unless the specimens arrive alive to the specialist [Nelson *et al.* 2008]. Furthermore, specimens in poor conditions may lose several taxonomic characters, making their diagnosis extremely difficult or even impossible [Rolo *et al.* 2013; GilArriortua *et al.* 2014b]. However, DNA-based analysis provides fast and reliable species identification in all developmental stages (egg, maggot, pupa and adult) and under all preserved conditions [Malgorn & Coquoz 1999; Harvey *et al.* 2003a; GilArriortua *et al.* 2014b].

Mitochondrial DNA (mtDNA) has been widely used for molecular identification as it generally exhibits a higher copy number and mutation rate than nuclear DNA (nuDNA). Recently, the “DNA barcode of life” project proposed the approximately 650 bp 5’end of cytochrome c oxidase subunit I (COI barcode) as a region for the identification of metazoan species [Hebert *et al.* 2003]. Accordingly, most studies on invertebrates are based on the COI gene, which is currently considered the standard *locus* for insect identification [Wells & Stevens 2008]. However, this genetic marker has shown limitations in its ability to differentiate some closely related necrophagous species, including *Ch. saffrana*-*Ch. megacephala*, *L. sericata*-*L. cuprina* or *L.*

caesar-L. illustris, among others [Wells *et al.* 2007; Reibe *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010; Nelson *et al.* 2012; Sonet *et al.* 2012]. Other mitochondrial gene that is widely used in forensic laboratories for vertebrate species diagnosis, the cytochrome b (Cyt-b) [Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003], has been demonstrated to exhibit high variability at the species level [Tobe *et al.* 2010]. Moreover, one of the most important markers employed in molecular systematics, the nuclear ribosomal DNA (rDNA) second internal transcribed spacer (ITS2), has been used for species identification in Diptera [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008b; Alquezar *et al.* 2010].

This work extends a prior multi-region study conducted in Central Europe [GilArriortua *et al.* 2014c] to Southern European blowflies, increasing the number of species (new: *Ch. albiceps*, *C. vomitoria* and *L. illustris*) and specimens (from 54 to 209). This approach is aimed at improving the efficacy and accuracy of analysis based on the DNA barcoding marker for identification of Calliphoridae, especially when this *locus* lacks a sufficient resolution to allow discrimination within complex groups. To this end, the COI barcode (658 bp) and Cyt-b (307 bp) mtDNA *loci* and the ITS2 (310-331 bp) nuDNA region were examined in the same individuals. This study seeks to show the suitability of analyzing different markers to achieve rapid and unequivocal diagnosis, including among sister species. An additional contribution of this work is characterization of Cyt-b for *L. illustris* species and the ITS2 (310-331 bp) region for Southern European *Lucilia* species for the first time (both GenBank novelties).

5.3.3. Materials and methods

5.3.3.1. Specimen collection, morphological identification and DNA extraction

We collected 209 larvae from 38 corpses at the National Institute of Legal Medicine North-Branch (Portugal). When possible, some immature were raised to adults. After the specimens were appropriately processed [Amendt *et al.* 2007], they were morphologically identified using taxonomic keys [González-Mora & Peris 1988; Smith

1986; Peris & González-Mora 1991; Rognes 1991; Szpila 2010, 2012], preserved in ethanol and stored at -80 °C [GilArriortua *et al.* 2013]. DNA was extracted as specified [Cainé *et al.* 2009; GilArriortua *et al.* 2013].

For the Cyt-b (307 bp) *locus*, 40 of the 209 total sequences were new, whereas the remainder (169) were previously studied [GilArriortua *et al.* 2013] and logged in GenBank (**Table S18**, Supplementary material). In this work, we have increased the number of studied species and specimens, mainly for the *Lucilia* genus.

5.3.3.2. DNA polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing

The COI barcode (658 bp) *locus* was amplified with the primer pair LCO1490/HCO2198 [GilArriortua *et al.* 2014c], the Cyt-b (307 bp) *locus* with L14816/H15173 [Parson *et al.* 2000]; and the ITS2 (310-331 bp) region with ITS2-F2814-2835/ITS2-R3295-3317 [GilArriortua *et al.* 2014c]. Amplification was performed following the instructions established by GilArriortua *et al.* 2014c. The PCR products were treated with Exo-SAP (Exonuclease I/Shrimp alkaline phosphatase; Takara Bio, Otsu, Japan) or the Millipore Montage™ SEQ 96 Sequencing Reaction Clean-up Kit (Millipore, Madrid, Spain). Sequencing reactions were performed as specified in GilArriortua *et al.* 2014c using an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

5.3.3.3. Data processing and phylogenetic analysis

Forward and reverse DNA sequences were visualized and manually edited in BioEdit [Hall 1999] to remove reading errors and primers. The sequences were grouped according to the molecular markers and aligned automatically using MUSCLE [Edgar 2004]. The translations of coding sequences to proteins were checked in MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013]. Nucleotide consensus sequences were obtained using SeaView 4.0 [Galtier *et al.* 1996]. Intra and inter-specific analyses were performed with Arlequin V. 2000 [Schneider *et al.* 2000]. The probability that two randomly chosen

haplotypes/variants are different in the sample (H/VtD), is called gene diversity for mitochondrial markers. Pairwise distance matrices were obtained in MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013].

5.3.4. Results and discussion

The analyzed individuals belonged to 3 genera (*Chrysomya*, *Calliphora* and *Lucilia*) and 7 species of Calliphoridae: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), *Lucilia ampullacea* Villeneuve, 1922, *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) and *Lucilia illustris* (Meigen, 1826). These species are the most important taxa used for PMI estimation in Portugal [Prado e Castro *et al.* 2011, 2012].

The mtDNA COI barcode (658 bp) and Cyt-b (307 bp) *loci* were studied in all 209 specimens (**Table S18**, Supplementary material). The nuDNA ITS2 (310-331 bp) region was characterized for only the *Lucilia* genus specimens (**Table S19**, Supplementary material). All new sequences have been logged in GenBank (**Tables S18-S19**, Supplementary material).

5.3.4.1. Intra-specific analysis of the seven studied species

The intra-specific analysis was conducted for each species with the information obtained from the COI barcode (658 bp) and Cyt-b (307 bp) *loci*, both separately and in combination (COI barcode-Cyt-b, 965 bp). These mitochondrial *loci* were unable to differentiate *L. caesar*-*L. illustris*, and thus, no statistical estimations were performed.

For the COI barcode (658 bp) and Cyt-b (307 bp) *loci*, *C. vicina* exhibited the highest gene diversity ($0.68 \pm 0.06/0.54 \pm 0.07$) and number of variable sites (16/7) (**Table 21**). Similarly, *L. sericata* showed high sequence variability ($0.54 \pm 0.13/0.38 \pm 0.13$), but a lower number of variable positions (6/4) (**Table 21**). In contrast, one of the most abundant species, *Ch. albiceps*, displayed a low number of variable sites (4/1) and

haplotype diversity ($0.16 \pm 0.07/0.07 \pm 0.04$) (Table 21). This low intra-specific variation has also been observed in *Ch. albiceps* specimens from Africa and Australia (0.2) [Harvey *et al.* 2003b]. Notably, *L. ampullacea* showed more variability for Cyt-b (307 bp) than for the COI barcode (658 bp), despite exhibiting half the nucleotide length (Table 21). These findings are consistent with previous studies in which Cyt-b was found to be more variable than other molecular markers (COI and NAD5) in insects from China and Pakistan [Zaidi *et al.* 2011]. Overall, the joint COI barcode-Cyt-b (965 bp) analysis increased the observed gene diversity, except for *Ch. albiceps* and *L. ampullacea* (Table 21).

Table 21. Intra-specific analysis of the studied Calliphoridae sequences for the COI barcode (658 bp), Cyt-b (307 bp), COI barcode-Cyt-b (965 bp) and ITS2 (310-331 bp) molecular markers. The table shows species, number of specimens (N), molecular markers (MM), number of haplotypes/variants (NH/Vt), haplotypes/variants diversity (H/VtD), nucleotide diversity (ND), mean number of pairwise differences (MNPd) and number of variable sites (NVS).

Species	N	MM	NH/Vt	H/VtD	ND	MNPd	NVS
<i>Ch. albiceps</i>	59	COI barcode	5	0.16 ± 0.07	0.0003 ± 0.0004	0.2011 ± 0.2528	4
		Cyt-b	2	0.07 ± 0.04	0.0002 ± 0.0005	0.0666 ± 0.1397	1
		COI barcode-Cyt-b	5	0.16 ± 0.07	0.0003 ± 0.0003	0.2677 ± 0.2974	5
<i>C. vicina</i>	65	COI barcode	18	0.68 ± 0.06	0.0019 ± 0.0014	1.2712 ± 0.8105	16
		Cyt-b	9	0.54 ± 0.07	0.0028 ± 0.0022	0.8611 ± 0.6157	7
		COI barcode-Cyt-b	28	0.86 ± 0.04	0.0022 ± 0.0014	2.1308 ± 1.2012	23
<i>C. vomitoria</i>	51	COI barcode	4	0.46 ± 0.07	0.0019 ± 0.0014	1.2533 ± 0.8050	5
		Cyt-b	4	0.31 ± 0.08	0.0012 ± 0.0013	0.3577 ± 0.3532	3
		COI barcode-Cyt-b	7	0.60 ± 0.07	0.0018 ± 0.0012	1.7757 ± 1.0452	8
<i>L. sericata</i>	19	COI barcode	6	0.54 ± 0.13	0.0011 ± 0.0009	0.7252 ± 0.5655	6
		Cyt-b	4	0.38 ± 0.13	0.0020 ± 0.0018	0.6082 ± 0.5041	4
		COI barcode-Cyt-b	9	0.84 ± 0.07	0.0017 ± 0.0012	1.6491 ± 1.0153	10
		ITS2	3	0.49 ± 0.10	0.0016 ± 0.0015	0.5146 ± 0.4532	2
<i>L. ampullacea</i>	4	COI barcode	1	0.00 ± 0.00	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
		Cyt-b	2	0.50 ± 0.27	0.0016 ± 0.0020	0.5000 ± 0.5191	1
		COI barcode-Cyt-b	2	0.50 ± 0.27	0.0005 ± 0.0006	0.5000 ± 0.5191	1
		ITS2	1	0.00 ± 0.00	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
<i>L. caesar</i>	9	COI barcode	6	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	8
		Cyt-b	5	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	4
		COI barcode-Cyt-b	8	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	12
		ITS2	1	0.00 ± 0.00	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
<i>L. illustris</i>	2	COI barcode	2	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	9
		Cyt-b	2	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	2
		COI barcode-Cyt-b	2	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	11
		ITS2	1	0.00 ± 0.00	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0

^aNCE no statistical estimates are drawn up

The analysis of the ITS2 (310-331 bp) nuclear marker for the *Lucilia* genus revealed a nearly complete intra-species homology (**Table 21**). Only *L. sericata* harboured variable positions (**Table 21**). These results support previous assertions indicating that a lack of variability within species suggests homogenization processes generated through concerted evolution in Diptera (Brachycera and Nematocera) [Song *et al.* 2008a; Alquezar *et al.* 2010]. Intra-specific homogeneity of ITS2 (310-331 bp) is preferred, together with high inter-specific variability, when the aim is unequivocal species level differentiation [Malewski *et al.* 2010].

5.3.4.2. Inter-specific analysis of the seven studied species

The COI barcode (658 bp), Cyt-b (307 bp) and COI barcode-Cyt-b (965 bp) sequences for each species were aligned separately to obtain consensus sequences (**Tables S20-S21**, Supplementary material). The ITS2 (310-331 bp) sequences of the *Lucilia* species were processed in the same way (**Table S22**, Supplementary material). The mitochondrial *loci* failed to separate *L. illustris*-*L. caesar*, and thus, no valuations were performed.

The COI barcode (658 bp) and Cyt-b (307 bp) *loci* showed 48 and 19 variable positions, respectively, among the genera *Calliphora* (5/6), *Chrysomya* (33/10) and *Lucilia* (10/3). Within individual genera, 28 and 11 characteristic positions distinguished *C. vicina*-*C. vomitoria*, and 39 and 23 distinguished *L. sericata*-*L. ampullacea*. The combined analysis (COI barcode-Cyt-b, 965 bp) increased the observed variability both between genera (67; *Calliphora*: 11; *Chrysomya*: 43; and *Lucilia*: 13) and within individual genera (*C. vicina*-*C. vomitoria*: 39; and *L. sericata*-*L. ampullacea*: 62).

The nuDNA ITS2 (310-331 bp) region showed a distinctive base pair number for each species (*L. sericata*: 331 bp; *L. ampullacea*: 310 bp; *L. caesar*: 322 bp; and *L. illustris*: 324 bp) and a significant number of variable positions 102 (39 base substitutions and

73 INDELS) (**Table S22**, Supplementary material). The inter-specific variability in terms of both sequence length and nucleotide composition, which combine preserved and highly variable regions, appears to allow separation of *Lucilia* species. These findings are in line with previous works, where the analysis of ITS2 resolved complex species delimitations in Acari and Diptera (Brachycera and Nematocera) [Song *et al.* 2008a, 2011; Loaiza *et al.* 2013]. However, other study about the Central European entomofauna suggests unresolved mixtures of sister species belonging to the Calliphoridae family [Sonet *et al.* 2012]. In this regard, especially when addressing closely related species, it is strongly recommended that extreme care and thoroughness should be applied to avoid errors. Further studies should be performed to ensure that the positions assigned here remain characteristic.

Finally, to the best of our knowledge, the Cyt-b (307 bp) *locus* for *L. illustris* and the ITS2 (310-331 bp) region for Southern European *L. sericata*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris* have not been previously characterized. Furthermore, apart from the sequences we have studied, there are no other records of Cyt-b (307 bp) sequences for Iberian Peninsula blowflies in GenBank.

5.3.4.3. Pairwise divergence analysis within the Calliphoridae family

Pairwise divergence analyses were conducted for the Calliphoridae family using all the haplotypes/variants obtained for the examined *loci*: COI barcode (658 bp), Cyt-b (307 bp), COI barcode-Cyt-b (965 bp) and ITS2 (310-331 bp) (**Tables S18-S19**, Supplementary material). Additionally, we included the Calliphoridae family sequences from the studied regions recorded in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) for comparative purposes (**Tables S23-S24**, Supplementary material).

The intra-specific pairwise divergence analysis for the mtDNA *loci* (COI barcode, 658 bp; Cyt-b, 307 bp; and COI barcode-Cyt-b, 965 bp) revealed strong similarity, and

even identity (*Ch. albiceps*: 0.0-0.5, 0.0-0.7, 0.0-0.4; *C. vicina*: 0.0-0.8, 0.0-1.3, 0.0-0.7; *C. vomitoria*: 0.0-0.8, 0.0-1.0, 0.0-0.7; *L. sericata*: 0.0-0.5, 0.0-1.0, 0.0-0.4; *L. ampullacea*: 0.0, 0.0-0.3, 0.0-0.1; *L. caesar*: 0.0-0.8, 0.0-1.3, 0.0-0.8; and *L. illustris* 0.2-1.4, 0.0-0.7, 0.1-1.1) (**Tables S25-S27**, Supplementary material). The high observed homology with the GenBank sequences corroborated most of the specimen diagnoses (**Tables S25-S27**, Supplementary material), matching the data obtained based on morphology. In general, our data confirmed the maximum intra-specific threshold value of approximately 0.8-1 % previously observed for mitochondrial *loci* [Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008]. However, only a few haplotypes showed nucleotide variability over this limit, in *C. vicina* (Cyt-b, HVIII/IV, VII, IX: 1.3), *L. caesar* (Cyt-b, HI/V: 1.3) and *L. illustris* (COI barcode, HI/II: 1.4; HI/III: 1.2; COI barcode-Cyt-b, HI/II: 1.1) (**Tables S25-S27**, Supplementary material). These results fit with the intra-specific maximum of <1.5 found in mammals for the COI and Cyt-b *loci* [Tobe *et al.* 2010]. Notably, for *L. caesar*, the Cyt-b (307 bp) *locus* revealed substantial divergence between the haplotypes from Portuguese specimens (0.0-1.3) (**Table S26**, Supplementary material). Further studies with additional samples should be performed to confirm this assertion. In this regard, as developmental times should be estimated from a locality-specific perspective to avoid inaccuracies, DNA-based approaches should be focused on the regional characteristic entomofauna [Wallman & Donnellan 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008]. Thus, extrapolations may result in misidentifications and doubts about the levels of variability that ensure species differentiation [Harvey *et al.* 2008].

The inter-specific pairwise analysis of mitochondrial markers showed high divergence values for most species (COI barcode: 2.7-11.9; Cyt-b: 2.9-11.7; COI barcode-Cyt-b: 3.4-11.6; excluding closely related species) (**Tables S25-S27**, Supplementary material). Compared with the COI barcode (658 bp) and COI barcode-Cyt-b (965 bp) *loci*, the Cyt-b (307 bp) *locus* revealed the highest divergence within the *Lucilia* genus

(*L. sericata*-*L. ampullacea*: 7.2-7.8 and 5.8-6.1/6.2-6.5; *L. sericata*-*L. caesar*: 4.9-6.2 and 4.7-5.5/4.8-5.3; *L. ampullacea*-*L. caesar*: 3.6-4.9 and 3.2-3.8/3.4-4.0), excluding *L. illustris* (**Tables S25-S27**, Supplementary material). However, the members of the *L. caesar*-*L. illustris* species complex appear to share mitochondrial genomes, with the divergence values (0.0-1.5; **Tables S25-S27**, Supplementary material) below the minimum inter-specific threshold value of approximately 3 %, generally obtained for mitochondrial *loci* [Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008]. Therefore, mitochondrial *loci* should be considered unsuitable for the differentiation of these species [Wells *et al.* 2007; Sonet *et al.* 2012]. Notably, these two species exhibit highly similar external characters, making morphological diagnosis difficult, even for specialists. This close relationship in terms of morphology, phylogeny and sequence homology suggests very recent or ongoing divergence of these two sister species [Song *et al.* 2008b; Sonet *et al.* 2012].

For the rDNA ITS2 (310-331 bp) region, intra-specific genetic divergence was largely lacking in the studied species (*L. sericata*: 0.0-0.5; *L. ampullacea*: 0.0; *L. caesar*: 0.0; and *L. illustris*: 0.0) (**Table S28**, Supplementary material). Even with the large number of GenBank specimens, the number of variants was highly reduced. However, this nuclear region exhibited the highest inter-specific pairwise divergence and a far greater resolution than any mitochondrial *locus*, and it showed the highest divergence values for *L. caesar*-*L. illustris* (1.7) (**Table S28**, Supplementary material). As a rule, mtDNA evolves more rapidly than nuDNA after speciation events. Nonetheless, this assertion appears to not be applicable for these two sister species. Our findings support prior works, in which ITS2 was shown to be a useful tool for resolving evolutionary relationships and delimitations among closely related Diptera [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008b; LaRue *et al.* 2009], extending its suitability to the forensically important species of the *Lucilia* genus from Portugal.

For the Portuguese Calliphoridae, our results suggest a maximum intra-specific threshold of approximately 1.5 for mitochondrial *loci* and of 0.5 for nuclear region. In general, there is a gap between intra-specific maximum and inter-specific minimum values, ranging from about 1.5 to 3.0 for mitochondrial *loci* and from 0.5 to 12.8 (0.5-1.7 including sister species) for nuclear region. Further specimens should be analyzed to corroborate this assumption for blowflies from the Iberian Peninsula and Southern Europe.

5.3.5. Summary

We examined the Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-331 bp) regions to improve the efficacy of analysis based on the COI barcode (658 bp) for use in the delimitation and identification of Southern European blowfly species. The Cyt-b (307 bp) gene, despite exhibiting a short length, appears to be a promising diagnostic tool because of its high inter-specific divergence for most *Lucilia* species. However, only the nuclear ribosomal marker ITS2 (310-331 bp) has been successfully used to delineate the limits of closely related carrion-breeding species, even between *L. caesar* and *L. illustris*. The present study demonstrates the convenience of mitochondrial and nuclear DNA approaches for unequivocal diagnosis. Thus, we recommend the selection of mitochondrial *loci* (COI barcode and Cyt-b) for determining the taxonomy of unknown samples, and the ITS2 region for achieving species level diagnosis of complex genera. Notably, when working with degraded samples, targets with a high copy number and reduced lengths are great advantages because only short DNA fragments remain amplifiable. Our newly contributed nucleotide sequences increase the information on Southern European blowflies available in GenBank. This is an invaluable point considering the scarcity of data for the Calliphoridae species of the Iberian Peninsula and Southern Europe associated with forensic casework.

5.4. Aportación / Contribution I.IV

Los marcadores moleculares COI *barcode*, COI (616 pb), COII, ITS2 e ITS12, y sus ventajas para el diagnóstico de dípteros miásicos (Oestridae, Calliphoridae y Muscidae) del sur de Europa (CAPV) / The COI barcode, COI (616 bp), COII, ITS2 and ITS12 molecular markers, and their advantages for myiasis-causing dipterans diagnosis (Oestridae, Calliphoridae and Muscidae) from Southern Europe (Basque Country)

“DNA-based identification of myiasis-causing Diptera species (Oestridae, Calliphoridae and Muscidae) in the North of the Iberian Peninsula”

Journal of Medical Entomology (enviada / submitted)

Los marcadores moleculares COI *barcode*, COI (616 pb), COII, ITS2 e ITS12, y sus ventajas para el diagnóstico de dípteros miásicos (Oestridae, Calliphoridae y Muscidae) del sur de Europa (CAPV)

La **aportación I.IV** contribuye al logro de los objetivos específicos “*Examinar las ventajas y limitaciones de los marcadores moleculares convencionales para la identificación de dípteros necrófagos y miásicos*”, “*Contribuir con nuevos marcadores moleculares, más resolutivos y eficaces, a la inequívoca clasificación taxonómica de dípteros de importancia médico-legal y veterinaria*”, “*Caracterizar molecularmente los dípteros de interés médico-legal y veterinario, tanto del sur como del centro de Europa, y estudiar su variabilidad nucleotídica*” y “*Elaborar un panel de marcadores para la identificación molecular de los dípteros Calliphoridae de importancia forense del sur de Europa (Península Ibérica)*”.

El envejecimiento de la población y la crisis económica global están modificando la orientación de la entomología forense. Así, el aumento en el número de casos en los que el periodo de actividad de los insectos (PAI) supera el intervalo *post-mortem* (IPM) implica la existencia de negligencias o abandonos *ante-mortem*, reveladas por las infestaciones miásicas. Considerando la complejidad y el compromiso que plantea la recogida de dípteros miásicos en humanos afectados, además de posibles conflictos legales, este trabajo ha abordado el estudio de la miasis desde un punto de vista veterinario, relativamente menos sensible y complejo.

En línea con las aportaciones anteriores, esta investigación incluye *loci* mitocondriales tradicionalmente empleados en el estudio de insectos, como las subunidades I y II del citocromo c oxidasa (COI y COII), y marcadores nucleares menos utilizados con relevancia en sistemática molecular, como el primer y segundo espaciador transcrito interno (ITS1 e ITS2). Cabe destacar que esta contribución incluye los marcadores COII e ITS12 como novedad.

5.4. Aportación I.IV

En esta **aportación (I.IV)** se analizó la capacidad diagnóstica de algunos de los marcadores mitocondriales y nucleares más utilizados, como la región *barcode* del citocromo c oxidasa subunidad I (COI *barcode*, 658 pb) y el citocromo c oxidasa subunidad II (COII, 725-731 pb), o más resolutivos, como la región adyacente al extremo 3'- COI *barcode* (COI, 616 pb), el segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 322-352 pb) y la región que comprende el primer y segundo espaciador transcrito interno (ITS12, 1081-1083 pb), en especies miásicas del sur de Europa (Península Ibérica).

Se seleccionaron 60, de un total de 155, especímenes asociados a casos de miasis pertenecientes a seis especies de tres familias (Oestridae: *Hypoderma bovis*; Muscidae: *Musca autumnalis*; Calliphoridae: *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *Lucilia caesar* y *L. illustris*) (Península Ibérica: CAPV, Abeltzain).

En general, los *loci* mitocondriales permitieron la clara separación de la mayoría de las especies miásicas, mostrando COI (616 bp) la mayor variabilidad nucleotídica. Sin embargo, los *loci* mitocondriales fallaron en la diferenciación de especies en los géneros más complejos, como *Lucilia*. Únicamente, el marcador nuclear ITS2 (322-352 pb) exhibió la resolución necesaria para realizar diagnósticos inequívocos y consistentes de las especies miásicas, incluso entre las estrechamente relacionadas.

Un valor añadido fue la caracterización por primera vez de los marcadores: COI *barcode* (658 pb) para *H. bovis*; ITS2 (322-352 pb) para *M. autumnalis*; ITS12 (1081-1083 pb) para *L. caesar*; y de la región que incluye COI *barcode* (658 pb) y COI (616 pb) para *M. autumnalis*. Además, se registraron los primeros datos del *locus* COII (725-731 pb) para especies de califóridos miásicos del sur de Europa.

Este trabajo se encuentra en proceso de publicación en la revista científica *Journal of Medical Entomology* (ISSN: 0022-2585) con el título “***DNA-based identification of myiasis-causing Diptera species (Oestridae, Calliphoridae and Muscidae) in the North of the Iberian Peninsula***”. Dicho artículo se muestra a continuación.

The COI barcode, COI (616 bp), COII, ITS2 and ITS12 molecular markers, and their advantages for myiasis-causing dipterans diagnosis (Oestridae, Calliphoridae and Muscidae) from Southern Europe (Basque Country)

The **contribution I.IV** collaborates to the achievement of the specific objectives “*To examine the advantages and limitations of conventional molecular markers for carrion-breeding and myiasic Diptera identification*”, “*To contribute with new molecular markers, more reliable and effective, for unambiguous taxonomic classification of Diptera of medico-legal and veterinary importance*”, “*To characterize molecularly the Diptera of medico-legal and veterinary interest both from Southern and Central Europe, and to study their nucleotide variability*” and “*To elaborate a panel of markers for identifying molecularly the Diptera Calliphoridae of forensic importance in Southern Europe (Iberian Peninsula)*”.

The aging population and the global economic crisis are altering the scope of forensic entomology. Thus, the increase in the number of cases where the period of insect activity (PIA) exceeds the *post-mortem* interval (PMI) involves the existence of neglect or abandonment *ante-mortem*, revealed by the myiasic infestations. Considering the complexity and engagement posed by the collection of myiasis-causing Diptera from affected humans, as well as possible legal conflict, this work has approached the study of myiasis from a veterinary point of view, relatively less sensitive and complex.

In line with the previous contributions, this study includes mitochondrial *loci* traditionally employed in insect research, such as subunit I and II of cytochrome c oxidase (COI and COII), and less analyzed nuclear markers with relevance in molecular systematics, such as first and second internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2). It is noteworthy that this contribution includes the COII and ITS12 markers as a novelty.

5.4. Contribution I.IV

In this **contribution (I.IV)** the diagnostic ability of some of the most employed mitochondrial and nuclear markers were analyzed, such as the barcode region of cytochrome c oxidase subunit I (COI barcode, 658 bp) and cytochrome c oxidase subunit II (COII, 725-731 bp), or the most consistent ones, such as the adjacent region of the 3'-COI barcode end (COI, 616 bp), the second internal transcribed spacer ITS2 (322-352 bp) and the region comprising the first and second internal transcribed spacer (ITS12, 1081-1083 bp), in myiasic species from Southern Europe (Iberian Peninsula).

Sixty, from a total of 155, specimens related to myiasis cases belonging to six species of three families (Oestridae: *Hypoderma bovis*; Muscidae: *Musca autumnalis*; Calliphoridae: *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *Lucilia caesar* and *L. illustris*) were selected (Iberian Peninsula: Basque Country, Abeltzain).

Overall, mitochondrial *loci* allowed the clear separation of most myiasic species, showing the COI (616 bp) greater nucleotide variability. However, mitochondrial *loci* failed to species differentiation in the most complex genera, such as *Lucilia*. Only the ITS2 (322-352 bp) nuclear marker exhibited the necessary resolution to perform unequivocal and consistent diagnostics of myiasis-causing species, even between closely related ones.

An added value was the first time characterization of markers: COI barcode (658 bp) for *H. bovis*; ITS2 (322-352 bp) for *M. autumnalis*; ITS12 (1081-1083 bp) for *L. caesar*; and of the region that includes COI barcode (658 bp) and COI (616 bp) for *M. autumnalis*. Furthermore, the first data of the COII (725-731 bp) *locus* for the myiasic blowfly species from Southern Europe were recorded.

This work is under process of publication in the scientific *Journal of Medical Entomology* (ISSN: 0022-2585) with the title “***DNA-based identification of myiasis-causing Diptera species (Oestridae, Calliphoridae and Muscidae) in the North of the Iberian Peninsula***”. This paper is shown below.

5.4.1. Resumen

La miasis está principalmente relacionada con áreas tropicales y subtropicales, y suele asociarse a comunidades marginales con escasos hábitos higiénicos. Esta patología puede ser desagradable y estresante para los organismos infestados, provocando serios daños económicos y de salud. Algunas veces, puede estar relacionada con negligencias. Por eso, un paso fundamental en la entomología médico-legal y veterinaria es el rápido y preciso diagnóstico taxonómico de las evidencias recogidas. La identificación tradicional basada en caracteres externos está condicionada por la similitud morfológica entre especies, particularmente en etapas inmaduras que, por lo general, supone un retraso por la necesidad de esperar hasta la emergencia del adulto. Ésta tarea es especialmente complicada en especies cuyo desarrollo depende de un hospedador. La aproximación genética proporciona una identificación específica más directa y fiable. Sin embargo, la taxonomía y filogenia de algunas especies permanecen aún sin aclarar. En este trabajo se caracterizó y evaluó la eficacia de marcadores de ADN mitocondrial y nuclear (ADNmt y ADNnu) para la identificación inequívoca de especies miásicas. Para ello, examinamos la región *barcode* del citocromo c oxidasa subunidad I (COI *barcode*, 658 pb), un fragmento adicional de 616 pb del mismo gen (COI, 616 pb) y el *locus* citocromo c oxidasa subunidad II (COII, 725-731 pb) del ADNmt. También estudiamos una región del segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 322-352 bp) y un fragmento que incluía el primer y segundo espaciador transcrito interno (ITS12, 1081-1083 bp) del ADNnu. Un total de 155 especímenes, recogidos en casos de miasis en el norte de España, pertenecientes a tres familias y seis especies: Oestridae (*Hypoderma bovis*), Muscidae (*Musca autumnalis*) y Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *Lucilia caesar* y *L. illustris*), fueron morfológicamente clasificados. Entre ellos, se seleccionó una muestra representativa de 60 especímenes para su análisis molecular que corroboró las identificaciones. Los resultados demostraron la robustez de los marcadores COI (616 pb) e ITS2 (322-352 pb) como herramientas diagnósticas para la diferenciación inequívoca de las especies miásicas. Sin embargo, solo la región de ADNnu permite realizar distinciones consistentes, incluso para resolver las especies estrechamente relacionadas como monofiléticas. Esta investigación también aporta nuevos datos genéticos de interés para la identificación de especies y la inferencia filogenética de los dípteros miásicos del sur de Europa (norte de España).

Abstract

Myiasis infestation is mainly connected to tropical and subtropical areas, and is usually associated with marginal communities with poor hygienic habits. This insect disease can be unpleasant and stressful for infested organisms, causing serious economic and healthy damages. Sometimes, it can be related to neglect. Thus, a challenging step in medico-legal and veterinary entomology is the rapid and accurate taxonomic diagnostic of collected evidence. Traditional identification based on external characters is hampered by similarities between species, especially at immature stages that it is usually delayed by the need to wait for adult emergence. This task is particularly difficult in species whose development is host-dependent. Genetic approach provides a more straight and reliable species diagnosis. However, the taxonomy and phylogeny of some species is still unclear. In this work was characterized and evaluated the efficacy of mitochondrial and nuclear DNA (mtDNA and nuDNA) markers for unambiguous identification of myiasis-causing species. To this end, we examined the cytochrome c oxidase subunit I barcode (COI barcode, 658 bp) region, an additional fragment of 616 bp of the same gene (COI, 616 bp) and the cytochrome c oxidase subunit II (COII, 725-731 bp) *locus* of mtDNA. We also studied the second internal transcribed spacer (ITS2, 322-352 bp) region and a fragment which includes first and second internal transcribed spacer (ITS12, 1081-1083 bp) of nuDNA. A total of 155 specimens, collected from myiasis cases in the North of Spain, belonging to three families and six species: Oestridae (*Hypoderma bovis*), Muscidae (*Musca autumnalis*) and Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *Lucilia caesar* and *L. illustris*), were morphologically classified. Among them, a representative sample of 60 specimens was selected for molecular analysis, which corroborated the identifications. The results demonstrated the robustness of COI (616 bp) and ITS2 (322-352 bp) markers as a diagnostic tool to unequivocal differentiation of myiasic species. However, only nuDNA region enables to draw consistent distinctions, even to resolve closely related species as monophyletics. This research also contributes new genetic data that are of interest for species identification and phylogenetic inference of myiasic Diptera from Southern Europe (North of Spain).

5.4.2. Introduction

Myiasis is the infestation of live vertebrates by Diptera larvae, which feed on the host for a period of time [Zumpt 1965; Catts & Mullen 2002]. According to the host-dependence degree, it is possible to distinguish between obligatory myiasis caused by parasitic fly larvae that need to feed on the healthy tissues or fluids of a living host to complete the developmental cycle (obligate parasites) [Hall & Wall 1995; Stevens 2003], and facultative myiasis generally caused by free-living saprophagous fly larvae, which circumstantially adopt a predate dependence on a host (primary or secondary ectoparasites) [Stevens & Wall 1997b; Dogra & Mahajan 2010]. Primary myiasis-causing agents can initiate an infestation after being attracted to necrotic tissues associated with wounds or the presence of faeces/urine on the skin, while secondary agents may only invade existing infestations [Stevens & Wall 1997b].

In the Palaearctic region, obligated parasites belong to three genera of the Oestridae family [Otranto & Stevens 2002]: the genus *Oestrus* (mainly *O. ovis*) develops in the nasal-sinus cavities of small ruminants (sheep and goats), and occasionally in humans [Alcaide *et al.* 2003; Moreno *et al.* 2015; Sante-Fernández *et al.* 2015]; the genus *Hypoderma* (mainly *H. bovis* and *H. lineatum*) causes subcutaneous warbles and primarily affect bovids, but have also been reported in equids and even in humans [Colwell *et al.* 2006; Boulard *et al.* 2008; Weigl *et al.* 2010a; Panadero-Fontán & Otranto 2015; Wanda *et al.* 2015]; the genus *Gasterophilus* (mainly *G. intestinalis* and *G. nasalis*) causes gastrointestinal myiasis in equids, but have also been reported in humans [Zumpt 1965; Egri *et al.* 1995; Royce *et al.* 1999; Colwell *et al.* 2006; Otranto *et al.* 2005; Ibrayev *et al.* 2015]. Furthermore, facultative parasitism in Europe is commonly caused by species of Calliphoridae, Sarcophagidae and Muscidae families, which are represented by genera: *Chrysomya* (*Ch. albiceps* and *Ch. megacephala*), *Phormia* (*P. regina*), *Calliphora* (*C. vicina* and *C. vomitoria*), *Lucilia* (*L. sericata*, *L. cuprina*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris*); *Sarcophaga* (*S. carnaria* and *S.*

haemorrhoidalis) and *Musca* (*M. domestica* and *M. sorbens*), among others [Zumpt 1965; Rognes 1993; Hall & Wall 1995; Stevens & Wall 1997b; Soler-Cruz 2000; Stevens 2003; Salvetti *et al.* 2012; Clarke 2013; Williams *et al.* 2016]. All these types of myiasis can cause stress and serious economic losses as well as severe damage in animal hosts, such as lost of weight and milk production, and even death [Otranto & Stevens 2002]. Moreover, these larvae may be also a source of information for detecting abuses, abandonments or neglects in medico-legal and veterinary investigations [Benecke & Lessig 2001; Benecke *et al.* 2004; Hall *et al.* 2016].

A challenging step in medico-legal and veterinary entomology is the rapid and accurate identification of insect evidence. Molecular methods seem to be the best option, especially dealing with immature stages where morphological diagnostic characters are frequently subtle. The mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome c oxidase subunit I barcode region (COI barcode, 658 bp) is currently considered the standard *locus* for insect identification. However, it has shown limitations in its ability to differentiate some closely related species of myiasic importance (*L. sericata*-*L. cuprina* or *L. caesar*-*L. illustris*) [Harvey *et al.* 2008; DeBry *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2012; Williams *et al.* 2016]. Other mitochondrial markers, such as the adjacent region of 3'- COI barcode (COI, 616 bp) or the COII *loci*, have been demonstrated to have a promising potential for Diptera differentiation [Wallman & Donnellan 2001; Hand & Ro 2005; Jordaens *et al.* 2013a; GilArriortua *et al.* 2014c]. Moreover, the most important markers in molecular systematics, the nuclear ribosomal DNA (rDNA) internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS1 and ITS2), has been widely employed in species identification, in evolutionary comparisons, and phylogenetic inference of different organisms [Álvarez & Wendel 2003; Coleman 2003; Müller *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008a-b, 2011; LaRue *et al.* 2009; Schultz & Wolf 2009]. Nevertheless, up to the date the taxonomy and phylogeny of some myiasic species remain unresolved, being necessary to perform further studies in this issue.

This work is aimed at characterizing and evaluating the efficacy and accuracy of the mitochondrial and nuclear markers to ensure myiasis-causing Diptera identification. To this end, the COI barcode (658 bp), COI (616 bp), COII (725-731 bp), and ITS2 (322-352 bp) regions were examined in the same individuals. Additionally, to increase the knowledge about ITS1 and ITS2 markers we characterize the ITS12 (1081-1083 bp) region in *L. caesar*. To the best of our knowledge, this is the first characterization of the whole length of COI barcode (658 bp) locus for *H. bovis*, the ITS2 (322-352 bp) region for *M. autumnalis* and the ITS12 (1081-1083 bp) region for *L. caesar* (all GenBank novelties). An added value is the first time record of the COII (725-731 bp) locus for myiasis-causing Calliphoridae, from Southern Europe.

5.4.3. Materials and methods

5.4.3.1. Study area, specimen collection and morphological identification

This study took place during a year, from 1st of January to 31th of December, 2011. The sampling was carried out mainly on local animals traditionally managed and reared under extensive conditions in an area located between the 42.5th and 43.5th parallel North and the 1.8th and 3.5th meridian West, in different localities of Northern Spain (Basque Country) (**Table S29**, Supplementary material). Detailed information regarding each host was recorded in an entomological evidence collection log sheet (**Cases S1-S8**, Supplementary material).

One hundred and fifty-five immature specimens were manually collected and, when possible, raised to adults. After the specimens were appropriately processed [Amendt *et al.* 2007], morphologically identified following taxonomic keys [Zumt 1965; Skidmore 1985; Smith 1986; González-Mora & Peris 1988; Peris & González-Mora 1991; Rognes 1991; Szpila 2010, 2012], preserved in ethanol [Amendt *et al.* 2007] and stored frozen at -20 °C up to the time of DNA extraction [GilArriortua *et al.* 2013]. Sixty from the 155 total specimens, mainly adult stages, were selected for molecular

approach as a representative sample of species diversity and abundance (**Table S30**, Supplementary material).

5.4.3.2. DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Before the extraction, all specimens were cleaned with a bleach solution (NaClO, 20 %) [Linville & Wells 2002]. DNA was extracted with Qiagen DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), using the manufacturer's instructions for animal tissues.

Amplification of the COI barcode (658 bp) *locus* was carried out with the primers LCO1490/HCO2198 [GilArriortua *et al.* 2014c]; the COI (616 bp) *locus* with the COI-3_F1978/COI-3_R2810 and COI-1-DEG_F2115/COI-2-DEG_R2808; the COII (725-731 bp) *locus* with the COII-F3016/COII-R3786; the ITS2 (322-352 bp) region with the ITS2_F2814-2835/ITS2_R3295-3317 [GilArriortua *et al.* 2014c]; and the ITS12 (1081-1083 bp) region with the ITS12- F/ITS12-R (**Table S31**, Supplementary material). PCR were performed in a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) under the following cycling conditions: 95 °C for 11 min (10 min for COI barcode), 35 cycles (40 cycles for COI barcode) 94 °C → 45 s (30 s for COI barcode), 60 °C (58 °C, 55 °C and 65 °C for COI 616 bp, COI barcode and ITS2, respectively) → 40 s (30 s for COI barcode) and 72 °C → 1 min, followed by a final extension at 72 °C for 5 min (10 min for ITS12).

Each PCR reaction was prepared with a final volume of 25 µl, containing 10 ng of DNA, 0.2 mM dNTP (Bioline, Berlin, Germany), 0.2 µM of each primer, 1.6 10⁻⁴ mg/µl BSA (Bioline, Berlin, Germany), 1 unit of Taq polymerase (Biotaq, Bioline, Berlin, Germany) and 1 x Buffer (pH: 8.8, Bioline, Berlin, Germany) and a variable amount of MgCl₂ (Bioline, Berlin, Germany), 1.5 mM for COI barcode (658 bp) or COII (725-731 bp), 2 mM for ITS2 (322-352 bp) or ITS12 (1081-1083 bp) and 2.5 mM for COI (616 bp). PCR products were purified with Exo-SAP (Exonuclease

I/Shrimp alkaline phosphatase; TaKaRa Bio, Otsu, Japan) and sequenced, using PCR primers as sequencing primers, with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Unincorporated terminators were removed with the BigDye® X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing reactions were performed with an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5.4.3.3. DNA sequence processing and data analysis

Forward and reverse DNA sequences were visualised and manually edited in BioEdit [Hall 1999] to remove primers and reading errors. Sequences for each molecular marker were aligned automatically using MUSCLE [Edgar 2004]. Translations of coding sequences to protein were checked in MEGA6 [Tamura *et al.* 2013]. Nucleotide consensus sequences were obtained with SeaView 4.0 [Galtier *et al.* 1996]. DNA-based species identification has been performed based on both similarity and phylogenetic approaches. Intra and inter-specific pairwise distance matrices were obtained in Arlequin Ver. 2000 [Schneider *et al.* 2000]. Phylogenetic trees were inferred with maximum likelihood (ML) and maximum parsimony (MP) algorithms in MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013]. Bayesian phylogenetic analyses were conducted using MrBayes 3.2 [Ronquist & Huelsenbeck 2003]. The best-fit models were chosen with the akaike information criterion (AIC) for the COI barcode (658 bp), COI (616 bp), COI barcode-COI 616 bp (1274 bp), COII (725-731 bp) and ITS2 (322-352 bp) independently with jModelTest 2.1.4 [Darriba *et al.* 2012]. The best DNA substitution model chosen was the general time reversible model combined with gamma distribution and invariable sites (GTR+G+I). The nucleotide substitution parameter values were exported to MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013]. The clades reliability was tested in MP trees with 1000 bootstrap replicates. In all phylogenetic analyses the mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Wiedemann, 1824) was used as the taxonomic out-group.

5.4.4. Results and discussion

One hundred and fifty-five specimens were morphologically identified belonging to three families (Oestridae, Calliphoridae and Muscidae), five genera and six species: the botfly *Hypoderma bovis* (Linnaeus, 1758); the blowflies, *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) and *L. illustris* (Meigen, 1826); and the face fly *Musca autumnalis* De Geer, 1776. Among them, sixty specimens were selected for the molecular study as a representative sample of species diversity and abundance. The mtDNA COI barcode (658 bp) and COI (616 bp) *loci* were studied in all specimens, while the COII (725-731 bp) was characterized only for blowflies. The nuclear region ITS2 (322-352 bp) was studied in Calliphoridae and Muscidae specimens, whereas the ITS12 (1081-1083 bp) region was characterized for only *L. caesar*. All sequences have been deposited in GenBank database (**Table S30**, Supplementary material). Consensus sequences for each species were provided for the studied markers (**Tables S32-S35**, Supplementary material).

5.4.4.1. Brief argument about cases

The results showed that seasonal myiasis incidence was higher in autumn (62.5 %) than in spring (25.0 %) or summer (12.5 %), and the most habitually affected livestock was cattle with previous wounds or ulcers. The most frequently observed disease was facultative myiasis (87.5 %), usually associated with the Calliphoridae family, represented by cosmopolite and ubiquitous genera *Calliphora*, *Chrysomya* and *Lucilia* [Anderson & Huitson 2004]. This family, which is often linked to cadavers, can also be attracted by faeces, regurgitated fluids and wounds [Anderson & Huitson 2004]. In general, the higher abundance of the *Lucilia* genus (90.32 %) is reasonable because some of them are the livestock ectoparasites of major economic importance, infesting primarily moist skin [Nelson *et al.* 2012]. Thus, the main source of primary strike

worldwide (Europe, Oceania, Australia, etc.), *L. sericata* and *L. cuprina* (Wiedemann, 1830) [Zumpt 1965; Wall *et al.* 1992; Hall & Wall 1995; Stevens & Wall 1997b; Tellam & Bowles 1997; Soler-Cruz 2000; Stevens 2003; Tourle *et al.* 2009; Sotiraki & Hall 2012; Wall 2012; Pezzi *et al.* 2015; Anstead *et al.* 2016], have been previously recorded in the studied area [Saloña-Bordas *et al.* 2009]. However, they were not involved in any of the myiasis cases here reported. In fact, *L. caesar* and *L. illustris*, which are secondary myiasic agents, were the only members of this genus related to myiasis in this work. Moreover, *Lucilia* and *Chrysomya* species are adapted to more temperate climates and remain inactive at temperatures under 13-15 °C [Schroeder *et al.* 2003b; Donovan *et al.* 2006]. Nevertheless, infestations were more frequently detected in autumn, despite adult flies are normally more abundant during the summer months [Saloña-Bordas *et al.* 2010]. This behaviour may be related with the host temperature, which exceeds the environmental temperature, modifying the insect activity period. Furthermore, in summer months the high temperatures may produce the desiccation of immature stages, with a drop in the infestation success [Levot 1995].

Other family, Muscidae, with larval development associated with dung or excrement may occasionally be considered accidental predators. However, some *Musca* species, such as *M. sorbens* Wiedemann, 1830 and *M. domestica* Linnaeus, 1758, have been previously related to myiasis [Dogra & Mahajan 2010; Clarke 2013]. In this work we found *M. autumnalis*, associated with a purulent wound on the hoof. Further studies should be conducted to link *M. autumnalis* to parasitic behaviour. Finally, the low incidence of obligate parasite (Hypodermatinae) observed may be related to our main focus on farm livestock, usually under strict hygienic, epidemiologic and veterinary controls in our country; even so, we could found several myiasis cases.

5.4.4.2. Phylogenetic and similarity analyses

DNA-based identification of myiasic-causing species was performed based on phylogeny and similarity approaches. In the phylogenetic analysis, the primary point is

the ability of the molecular marker to resolve each species as a monophyly, while in the similarity analysis the main aim is to delineate species limits comparing maximum levels of intra-specific variation to minimum levels of inter-specific variation. Both analyses were conducted using the haplotypes/variants obtained for the *loci*: COI barcode (658 bp), COI (616 bp), COII (725-731 bp) and ITS2 (322-352 bp) (**Table S30**, Supplementary material). Additionally, we included the myiasic species sequences for the studied regions recorded in GenBank for comparative purposes (**Tables S36-S37**, Supplementary material). We did not perform valuations about the ITS12 (1081-1083 bp) region because the sequences were obtained only for *L. caesar*, and there are no other records in GenBank.

Phylogenies were inferred separately from each set of sequences. Maximum likelihood and maximum parsimony analysis recovered similar topologies, matching with that derived from Bayesian inference. mtDNA-based reconstructions of independent (COI barcode, 658 bp; COI, 616 bp; and COII, 725-731 bp) and combined (COI barcode-COI 616 bp, 1274 bp) *loci* showed a high degree of topological congruence and a strong nodal support for the monophyly of most species (*H. bovis*: 100 %; *M. autumnalis*: 99-100 %; *Ch. albiceps*: 96-100 %; and *C. vicina*: 99-100 %) (**Figs. S1-S2**, Supplementary material). These phylogenies consistently supported the monophyly of *Lucilia* genus (63-92 %) (**Figs. S1-S2**, Supplementary material). However, within this genus the reconstructions based on mtDNA resolved closely related species relationship (*L. caesar*-*L. illustris*) generally as reciprocally paraphyletic (**Figs. S1-S2**, Supplementary material). This issue may be clarified by analyzing longer fragments or complete mitochondrial genomes in the future. However, larger targets may lead technical problems, especially in degraded samples where occurs a substantial reduction in the size of DNA fragments. Only through the phylogeny based on nuclear ITS2 (322-352 bp) was possible to resolve the relationship of all species as a monophyly, achieving similar consistence with a greatly reduced target size (*Ch.*

albiceps: 100 %; *C. vicina*: 99-100 %; *L. caesar*: 97-98 %; and *L. illustris*: 98 %) (**Fig. S3**, Supplementary material). Noteworthy, the small size of this nuclear marker added to its high copy number (similar to mitochondrial genes) [Alquezar *et al.* 2010] makes it advantageous working with degraded samples.

The intra-specific pairwise sequences divergence analysis of the mtDNA *loci* (COI barcode, COI 616 bp, COI barcode-COI 616 bp and COII) revealed strong similarity, and even identity in most cases (*H. bovis*: -, 0.0-0.5, -, -; *M. autumnalis*: 0.6, 0.5, 0.5, -; *Ch. albiceps*: 0.0-0.2, 0.0-0.3, 0.0-0.2, 0.0-0.8; *C. vicina*: 0.0-0.9, 0.0-1.0, 0.0-0.7, 0.0-0.4; *L. caesar*: 0.0-1.2, 0.0-1.5, 0.0-1.3, 0.0-1.1; *L. illustris*: 0.0-0.9, 0.0-0.5, 0.1-0.5, 0.8; excluding sister species shared haplotypes) (**Tables S38-S41**, Supplementary material). The high observed homology with GenBank reference sequences confirm most of the specimen diagnoses, matching the data obtained based on morphology (**Tables S38-S41**, Supplementary material). In general, our findings corroborate the maximum intra-specific threshold value of around 0.8-1 % previously observed for mitochondrial *loci* [Wallman & Donnellan 2001; Harvey *et al.* 2003a; Zehner *et al.* 2004b; Boehme *et al.* 2010; Salem *et al.* 2015]. However, some comparisons between certain haplotypes recorded in GenBank and those here obtained showed nucleotide variability over this limit, in *L. caesar* (COI barcode, H6-8/19-20: 1.2-1.5, H 10/19-20: 1.4-1.5, H12-18/19-20: 1.2-1.7, H19-20/21-23: 1.7-1.8; COI 616 bp, H1-15/16-17: 2.4-3.1; and COI barcode-COI 616 bp, H1-28/29-30: 1.6-2.3) and *L. illustris* (COI barcode, H1-7/8: 1.5-2.0; COI 616 bp, H1-9/10: 2.9-3.4; and COI barcode-COI 616 bp, H1-11/12: 2.2-2.6) (**Tables S38-S41**, Supplementary material). Most of these results are even above to the intra-specific maximum of 1.5 % found in mammals for mitochondrial markers [Tobe *et al.* 2010]. Moreover, the wide sequence divergence seems to be mostly linked to the geographic isolation of species populations. Further studies in this regard should be performed to ensure this hypothesis. However, it cannot be forgotten that forensic entomology is a locality-specific science and

extrapolations may result in inaccuracies [Wallman & Donnellan 2001; Harvey *et al.* 2003a, 2008; Jordaens *et al.* 2013a; Nakano & Honda 2015]. Therefore, DNA-based approaches should be focused to the specific fauna discovered in a region.

The inter-specific pairwise analysis of mitochondrial markers showed wide divergence values for most of the species (COI barcode: 2.7-16.6; COI 616 bp: 4.4-15.1; COI barcode-COI 616 bp: 4.5-15.2; COII: 3.8-17.9; excluding sister species) (**Tables S38-S41**, Supplementary material). The highest sequence divergence was obtained between obligatory myiasis-causing flies of Hypodermatinae subfamily, and facultative or accidental parasites of Chrysomyinae or Muscinae subfamilies in line with the taxonomic classification in the Oestridae, Calliphoridae and Muscidae families. Notably, the COII (725-731 bp) *locus* achieved the highest nucleotide divergence value (17.9) and showed differences in the length of the studied blowflies (*Ch. albiceps*: 728 bp; *C. vicina*: 725 bp; *L. caesar* and *L. illustris*: 731 bp). Moreover, within Calliphoridae species the COI (616 bp) *locus* exhibited higher genetic divergence values (4.4-11.5) than the other mtDNA *loci* (COI barcode: 3.2-11.2; COI barcode-COI 616 bp: 4.5-10.2; and COII: 3.8-8.8) (**Tables S38-S41**, Supplementary material). These findings are in line with a previous work, where COI (616 bp) was found to accumulate more variability than other mitochondrial markers (COI barcode, Cyt-b and Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1) in Calliphoridae [GilArriortua *et al.* 2014c]. Overall, the minimum inter-specific threshold values here found were over the 3 % found for mitochondrial *loci* in previous works [Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003a, 2008; Hebert *et al.*, 2003; Salem *et al.* 2015]. However, the nucleotide divergence values for *L. illustris*-*L. caesar* species failed below this threshold (COI barcode: 0.0-2.0; COI 616 bp: 0.0-3.4; COI barcode-COI 616 bp: 0.1-2.5; and COII: 0.0-1.0) (**Tables S38-S41**, Supplementary material). In this regard, some *L. illustris* mitochondrial haplotypes showed a far greater affinity for *L. caesar* ones than for conspecific haplotypes, due to the existence of shared haplotypes. Therefore, these

mitochondrial markers seem to be unsuitable for *L. caesar*-*L. illustris* species separation. Our results are reasonable considering that these last two species exhibit high similar external characters, making difficult the morphological diagnosis. This close relation in morphology, phylogeny and the lack of nucleotide divergence suggest introgression, or a recent or ongoing divergence of these sister species [Boehme *et al.* 2012; Sonet *et al.* 2012; Williams *et al.* 2016]. Further studies based on the whole mtDNA for *L. caesar*-*L. illustris* species should be performed to clarify the origin of these genetic mixtures.

The analysis of the nuDNA ITS2 (322-352 bp) region showed a distinctive base pair number for each species (*M. autumnalis*: 352 bp; *Ch. albiceps*: 327 bp; *C. vicina*: 337 bp; *L. caesar*: 322 bp; and *L. illustris*: 324 bp) and really scarce intra-species genetic divergence in most cases (*Ch. albiceps*: 0.0-0.3; *C. vicina*: 0.0; *L. caesar*: 0.0-0.3; and *L. illustris*: 0.0) (**Table S42**, Supplementary material). These findings are consistent with previous studies in which a lack of variability within species suggest homogenization processes generated through concerted evolution in Diptera [Song *et al.* 2008a; Nelson *et al.* 2008]. Moreover, this nuclear region exhibited the highest inter-specific pairwise divergence (ITS2: 15.8-46.2; excluding sister species), even between *L. caesar* and *L. illustris* species (1.2-1.5) (**Table S42**, Supplementary material), and a far greater resolution than any other mitochondrial *locus*. As a rule, intra-specific homogeneity is preferred, together with high inter-specific variability, when the aim is unequivocal species identification [Malewski *et al.* 2010]. Results here achieved support prior works, in which the ITS2 marker resolved phylogenetic relationships at different hierarchical levels, such as genus, species or lower levels, since it has undergone rapid evolution [Otranto & Stevens 2002; Trizzino *et al.* 2009; GilArriortua *et al.* 2014c]. Therefore, its suitability could also be extended to Southern European dipterans involved in myiasis cases.

Finally, this work also contributes new nucleotide data which may be valuable in myiasis-causing Diptera diagnosis. Noteworthy, to the best of our knowledge, the COI barcode (658 bp) *locus* for *H. bovis*, ITS2 (322-352 bp) region for *M. autumnalis* and ITS12 (1081-1083 bp) region for *L. caesar* have not been previously recorded in GenBank. Moreover, we characterize for the first time the COI barcode-COI 616 bp (1274 bp) *locus* for *M. autumnalis*, and the COII (725-731 bp) *locus* for *Ch. albiceps*, *C. vicina*, *L. caesar* and *L. illustris*, from Southern Europe.

5.4.5. Summary

As far as we know, this study characterized and examined for the first time the COI barcode (658 bp), COI (616 bp), COII (725-731 bp) and ITS2 (322-352 bp) regions to evaluate their ability in unequivocal identification of Southern European myiasis-causing species. The mitochondrial COI (616 bp) *locus* seem to be a promising diagnostic tool because it accumulates more variability than other regions. However, only the nuclear ITS2 (322-352 bp) region seems to reliably delineate sister species limits. The present work corroborates the convenience of mitochondrial and nuclear DNA-based approaches for unambiguous diagnostics. Thus, we recommend select of mitochondrial *loci* for outlining the taxonomy of unknown samples, and nuclear region for achieving the diagnosis of closely related species. Notably, the COI *locus* has a great deal of sequences available in genetic databases, which may be an advantage working with scarcely studied species, such as parasitic Diptera. Nevertheless, in degraded samples the ITS2 region is more helpful because of having a small size (around 350 bp) and similar copy number of mtDNA. Our newly contributed nucleotide sequences increase the information on Southern European myiasis-causing dipterans available in GenBank. This is an invaluable point considering the scarcity of molecular data about Diptera associated to myiasis in the Iberian Peninsula. Finally, we confirm the presence of obligate (Oestridae), facultative (Calliphoridae) and accidental (Muscidae) parasites in the Basque Country.

5.5. Aportación / Contribution I.V

Caracterización de los marcadores moleculares COI *barcode*, COI (616 pb), Cyt-b e ITS2 en Calliphoridae del sur de Europa (CAPV) / Characterization of the COI *barcode*, COI (616 bp), Cyt-b and ITS2 molecular markers in Calliphoridae from Southern Europe (Basque Country)

“Genetic characterization and molecular differentiation of blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in Southern Europe (Basque Country)”

International Journal of Legal Medicine (enviada / submitted)

Caracterización de los marcadores moleculares COI *barcode*, COI (616 pb), Cyt-b e ITS2 en Calliphoridae del sur de Europa (CAPV)

La **aportación I.V** contribuye a la consecución de los objetivos específicos “*Examinar las ventajas y limitaciones de los marcadores moleculares convencionales para la identificación de dípteros necrófagos y miásicos*”, “*Contribuir con nuevos marcadores moleculares, más resolutivos y eficaces, a la inequívoca clasificación taxonómica de dípteros de importancia médico-legal y veterinaria*”, “*Caracterizar molecularmente los dípteros de interés médico-legal y veterinario, tanto del sur como del centro de Europa, y estudiar su variabilidad nucleotídica*” y “*Elaborar un panel de marcadores para la identificación molecular de los dípteros Calliphoridae de importancia forense del sur de Europa (Península Ibérica)*”.

En este trabajo se han ampliado los conocimientos genéticos sobre los dípteros califóridos del sur de Europa (Península Ibérica), aumentando notablemente el número de especies y especímenes analizados. Hasta la fecha, en lo que respecta a la Península Ibérica, no se había abordado ninguna investigación en entomología forense desde una perspectiva molecular con esta profundidad, y únicamente los estudios realizados en Portugal expuestos en esta Tesis se aproximaban ligeramente.

En esta **aportación (I.V)** se caracterizaron los marcadores moleculares con mayor capacidad diagnóstica, COI *barcode* (658 pb), COI (616 pb), Cyt-b (307 pb) y el ITS2 (310-343 pb), en un estudio a gran escala sobre los dípteros necrófagos de interés forense más frecuentes en el sur de Europa (Península Ibérica: CAPV).

Se analizaron un total de 449 especímenes pertenecientes a diez especies de la familia Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar*, *L. illustris* y *L. bufonivora*). En general, estas especies son comúnmente utilizadas como indicadores IPM en la Península Ibérica, excepto *L. bufonivora* que es parásito obligado de anfibios.

5.5. Aportación I.V

Aunque globalmente el *locus* COI *barcode* (658 pb) presentó la mayor variabilidad nucleotídica entre especies, dentro del género *Lucilia* fueron los *loci* COI (616 pb) y Cyt-b (307 pb) los que revelaron la mayor divergencia. Sin embargo, el marcador nuclear ITS2 (310-343 pb) mostró mayor consistencia en la diferenciación entre las especies de Calliphoridae que cualquiera de los *loci* mitocondriales.

Un valor añadido fue la caracterización, por primera vez, de los marcadores: Cyt-b (307 pb) e ITS2 (310-343 pb) para las especies *L. richardsi*, *L. silvarum* y *L. bufonivora*; COI *barcode* (658 pb) para *L. richardsi* y *L. silvarum*; COI (616 pb) para *L. richardsi*; e ITS2 (310-343 pb) para especímenes de *C. vomitoria* de la Península Ibérica. Considerando la escasez de información genética sobre los califóridos del sur de Europa, recogida en las bases de datos hasta la fecha, esta aportación resulta de especial importancia.

Esta investigación se encuentra en proceso de publicación en la revista científica *International Journal of Legal Medicine* (ISSN: 0937-9827) con el título “**Genetic characterization and molecular differentiation of blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in Southern Europe (Basque Country)**”. Dicho artículo se muestra a continuación.

Characterization of the COI barcode, COI (616 bp), Cyt-b and ITS2 molecular markers in Calliphoridae from Southern Europe (Basque Country)

The **contribution I.V** collaborates to the achievement of the specific objectives “*To examine the advantages and limitations of conventional molecular markers for carrion-breeding and myiasic Diptera identification*”, “*To contribute with new molecular markers, more reliable and effective, for unambiguous taxonomic classification of Diptera of medico-legal and veterinary importance*”, “*To characterize molecularly the Diptera of medico-legal and veterinary interest both from Southern and Central Europe, and to study their nucleotide variability*” and “*To elaborate a panel of markers for identifying molecularly the Diptera Calliphoridae of forensic importance in Southern Europe (Iberian Peninsula)*”.

In this work has been extended the genetic knowledge about the Diptera Calliphoridae from Southern Europe (Iberian Peninsula), increasing considerably the number of species and specimens analyzed. So far, regarding to the Iberian Peninsula, it had not addressed any research in forensic entomology with this depth from a molecular perspective, and only the studies performed in Portugal exposed in this Thesis slightly approximate.

In this **contribution (I.V)** the molecular markers with greater diagnostic ability, COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) were characterized, in a large-scale study about the most frequent necrophagous Diptera of forensic interest in Southern Europe (Iberian Peninsula: Basque Country).

A total of 449 specimens belonging to ten species of the Calliphoridae family (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar*, *L. illustris* and *L. bufonivora*) were analyzed. In general, these species are commonly employed as PMI indicators in the Iberian Peninsula, except *L. bufonivora* which is an obligate parasite of amphibians.

5.5. Contribution I.V

Although overall the COI barcode (658 bp) *locus* comprised the largest inter-specific nucleotide variability, within the *Lucilia* genus were the COI (616 bp) and Cyt-b (307 bp) *loci* those that revealed the greatest divergence. However, the ITS2 (310-343 bp) nuclear marker showed a better consistency in differentiating between Calliphoridae species than any of the mitochondrial *loci*, even in the most complex genera.

An added value was the, first time, characterization of markers: Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) for *L. richardsi*, *L. silvarum* and *L. bufonivora* species; COI barcode (658 bp) for *L. richardsi* and *L. silvarum*; COI (616 bp) for *L. richardsi*; and ITS2 (310-343 bp) for *C. vomitoria* specimens from the Iberian Peninsula. Considering the scarcity of genetic information about the Southern European Calliphoridae, gathered in databases up to date, this contribution is of particular importance.

This research is under process of publication in the scientific journal *International Journal of Legal Medicine* (ISSN: 0937-9827) with the title “***Genetic characterization and molecular differentiation of blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in Southern Europe (Basque Country)***”. This paper is reported below.

5.5.1. Resumen

En la entomología médico-legal y veterinaria la rápida y precisa identificación de la entomofauna necrófaga es un paso crítico en la estimación del periodo de actividad de los insectos (PAI). El diagnóstico tradicional está limitado por la similitud física entre especies, particularmente en etapas inmaduras y en especies hermanas. La aproximación basada en ADN permite realizar diagnósticos más exactos y fiables de las especies de insectos. Este estudio se centró en la caracterización de algunas regiones mitocondriales (COI *barcode*, 658 pb; COI, 616 pb; y Cyt-b, 307 pb) y nucleares (ITS2, 310-343 pb) para mejorar los recursos de ADN disponibles para la identificación de los dípteros del sur de Europa. Analizamos un total de 449 especímenes pertenecientes a tres géneros y diez especies de Calliphoridae (*Chrysomya*: *Ch. albiceps*; *Calliphora*: *C. vicina* y *C. vomitoria*; y *Lucilia*: *L. sericata*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar*, *L. illustris* y *L. bufonivora*). La mayoría de estas especies son de gran importancia médico-legal y veterinaria en la Península Ibérica. Los resultados revelaron que, aunque, globalmente, el *locus* COI *barcode* (658 bp) presentó la mayor variabilidad nucleotídica, dentro del género *Lucilia*, COI (616 bp) y Cyt-b (307 bp) fueron los que revelaron la mayor diversidad. Sin embargo, el marcador nuclear ITS2 (310-343 pb) destacó por su resolución sobre cualquier otro *locus* mitocondrial, siendo el más consistente en la diferenciación de especies.

Cabe destacar que hemos proporcionado las primeras caracterizaciones de los marcadores Cyt-b (307 pb) e ITS2 (310-343 pb) para *L. richardsi*, *L. silvarum* y *L. bufonivora*. Además, la región ITS2 (310-343 pb) para *C. vomitoria* no había sido previamente registrada para la Península Ibérica. Este trabajo también aporta nuevas secuencias nucleotídicas de los *loci* COI *barcode* (658 pb) para *L. richardsi* y *L. silvarum*, y COI (616 pb) para *L. richardsi*.

Abstract

In medico-legal and veterinary entomology the fast and accurate identification of necrophagous entomofauna is a challenging step to estimate the period of insect activity (PIA). The traditional diagnosis is hampered by the physical similarities between species, especially at immature stages and sister species. DNA-based approach allows performing more precise and reliable diagnostics of insect species. This study was focused on characterizing some mitochondrial (COI barcode, 658 bp; COI, 616 bp; and Cyt-b, 307 bp) and nuclear (ITS2, 310-343 bp) regions to improve the DNA resources available for Southern European Diptera identification. We analyzed a total of 449 specimens belonging to three genera and ten species of Calliphoridae (*Chrysomya*: *Ch. albiceps*; *Calliphora*: *C. vicina* and *C. vomitoria*; and *Lucilia*: *L. sericata*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar*, *L. illustris* and *L. bufonivora*). The majority of these species are of great medico-legal and veterinary importance in the Iberian Peninsula. The results revealed that, while, overall, the COI barcode (658 bp) *locus* showed the maximum nucleotide variability, within *Lucilia* genus, COI (616 bp) and Cyt-b (307 bp) were ones that revealed the highest nucleotide diversity. However, the ITS2 (310-343 bp) nuclear marker highlighted for its greater resolution above any other mitochondrial *locus*, being the most consistent at species differentiation.

Notably, we have provided the first characterization of the Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) markers for *L. richardsi*, *L. silvarum* and *L. bufonivora*. Moreover, the ITS2 (310-343 bp) region for *C. vomitoria* have not been previously recorded from the Iberian Peninsula. This work also contributes new nucleotide sequences of the *loci* COI barcode (658 bp) for *L. richardsi* and *L. silvarum*, and COI (616 bp) for *L. richardsi*.

5.5.2. Introduction

Blowflies of the family Calliphoridae (Diptera: Oestroidea) are a diverse group with great veterinary and medico-legal importance. A large number of these Diptera are carrion-breeders, exhibiting important roles in recycling dead organic material from the environment [Salem *et al.* 2015]. Therefore, these insects are the first to arrive at carrion, representing the most common forensic indicators in criminal investigations [Smith 1986; Singh & Wells 2013]. Furthermore, some blowfly species are ectoparasites on vertebrates, causing myiasis in animals and humans [Zumpt 1965; Erzinclioglu 1989; Rognes 1993; Stevens 2003; Williams *et al.* 2016].

A challenging step for the accurate practice of entomology is unequivocal identification of insects to estimate the period of insect activity (PIA), which usually approximates the *post-mortem* interval (PMI) in criminal investigations [Wells & LaMotte 2001; Amendt *et al.* 2007]. The morphological diagnosis is hampered by physical similarities, especially in larval forms and between closely related species [Wallman & Donnellan 2001; Turchetto & Vanin 2004; Sonet *et al.* 2012]. Moreover, taxonomic characters may be absent in fragmented or poorly preserved specimens, making their diagnosis really difficult or unfeasible [Rolo *et al.* 2013; GilArriortua *et al.* 2014c]. DNA-based identification provides rapid and unambiguous diagnosis regardless the developmental stage or the preservation conditions [Harvey *et al.* 2003a; Saigusa *et al.* 2005].

Mitochondrial DNA (mtDNA) regions have been commonly used to assist with species identification in the Calliphoridae family: the non-conserved control region [Stevens & Wall 1997b]; the 12S ribosomal RNA (12S rRNA) [Singh & Wells 2013]; the 16S ribosomal RNA (16S rRNA) [Singh & Wells 2013]; the nicotinamide dehydrogenase subunits 4 and 4L (ND4 and ND4L) [Wallman *et al.* 2005]; the cytochrome b (Cyt-b) [GilArriortua *et al.* 2013; Singh & Wells 2013]; the cytochrome c oxidase subunits I and II (COI and COII) [Sperling *et al.* 1994; Wallman &

Donnellan 2001; Wells & Sperling 2001; Stevens *et al.* 2002; Wallman *et al.* 2005; Whitworth *et al.* 2007; Preativatanyou *et al.* 2010; DeBry *et al.* 2010]. Moreover, some nuclear genomic regions have also been studied to a lesser extent: the 28S ribosomal RNA (28S rRNA) [Stevens & Wall 2001; Stevens *et al.* 2002; Kutty *et al.* 2010; Williams *et al.* 2016]; the 18S ribosomal RNA (18S rRNA) [Kutty *et al.* 2010; Singh & Wells 2013]; the elongation factor one alpha (EF1 α) [McDonagh & Stevens 2011; Singh & Wells 2013]; the carbamoyl phosphate synthetase (CPS) [Kutty *et al.* 2010; Singh *et al.* 2011; Singh & Wells 2013]; the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA (rDNA) [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008b].

Nowadays, the COI gene is considered the standard *locus* for insect identification, being proposed the approximately 650 bp of its 5' end the universal DNA region for species identification (COI barcode) [Hebert *et al.* 2003]. This is the most studied mitochondrial *locus* for diagnosis of blowflies using regions ranging from about 230 bp to the entire gene length [Vincent *et al.* 2000; Harvey *et al.* 2003a-b, 2008; Chen *et al.* 2004; Wells *et al.* 2004, 2007; Nelson *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2007; Desmyter & Gosselin 2009; Park *et al.* 2009a-b; Liu *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011; Singh & Wells 2011; Boehme *et al.* 2012; Nakano & Honda 2015], being longer or more complete regions more consistent [GilArriortua *et al.* 2014c; Salem *et al.* 2015]. However, this *locus* has failed in its ability to differentiate between some closely related species within the genera *Chrysomya*, *Calliphora* or *Lucilia*, among others [Wallman & Donnellan 2001; Wells *et al.* 2004, 2007; Whitworth *et al.* 2007; Harvey *et al.* 2008; Reibe *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2012]. Therefore, multi-region approaches combining mitochondrial and nuclear markers have been proposed to overcome this problem [Zaidi *et al.* 2011; GilArriortua *et al.* 2014c, 2015].

For DNA-based identification is essential the use of suitable molecular marker and the knowledge of the populations genetic variability in the place of study. Noteworthy, entomology is a locality-specific science so genetic analysis should be directed to the

specific fauna discovered in a region [Malewski *et al.* 2010; Nakano & Honda 2015]. However, in the Iberian Peninsula (Southern Europe) only few works, performed in Portugal, employed the molecular approach to study the local species of medico-legal and veterinary importance [Cainé *et al.* 2006, 2009; Oliveira *et al.* 2011; Rolo *et al.* 2013; GilArriortua *et al.* 2013, 2015], being genetic data available very scarce.

This work is focused on improving the genetic resources available for Calliphoridae of medico-legal and veterinary impact from Iberian Peninsula (Southern Europe). To this aim a multi-region study based on a large sample size was performed using mitochondrial and nuclear markers: COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp). This is the first characterization of the Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) regions for *Lucilia richardsi*, *L. silvarum* and *L. bufonivora* (GenBank novelties), and the ITS2 (310-343 bp) region for *Calliphora vomitoria* from the Iberian Peninsula. Moreover, COI barcode (658 bp) for *L. richardsi* and *L. silvarum*, and COI (616 bp) for *L. richardsi*, have not been previously recorded in GenBank for their whole length.

5.5.3. Materials and methods

5.5.3.1. Specimen collection and morphological identification

A total of 449 adult blowflies were selected from a previously study performed during 2007-2008 [Saloña-Bordas *et al.* 2009]. Blowflies were collected using double bottle traps baited with animal viscera [Hwang & Turner 2005] at 21 locations of the Basque Country (Northern Spain) (**Table S43**, Supplementary material).

After the specimens were appropriately processed [Amendt *et al.* 2007], they were morphologically identified using taxonomic keys [Smith 1986; González-Mora & Peris, 1988; Peris & Gonzalez-Mora, 1991; Rognes 1991; Szpila 2012], preserved in

ethanol (70 %) and stored at -20 °C up to the time of DNA extraction [Amendt *et al.* 2007; GilArriortua *et al.* 2013].

5.5.3.2. DNA extraction, PCR amplification and sequencing

All specimens were cleaned with an ultrasonic bath (Symphony™ Ultrasonic Cleaner, VWR International, Radnor, PA, USA) during few minutes and with a bleach solution (NaClO, 20 %) to remove external contamination. DNA was extracted from the head of each specimen with Qiagen DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

The mtDNA COI barcode (658 bp) *locus* was amplified with the primer pair LCO1490/HCO2198 [GilArriortua *et al.* 2014c]; COI (616 bp) with the primers COI-1_F2115/COI-1_R2538 (384 bp) and COI-2_F2439/COI-2_R2808 (330 bp) in two separate steps; and Cyt-b (307 bp) with L14816/H15173 [Parson *et al.* 2000] (**Table S44**, Supplementary material). The nuclear ITS2 (310-343 bp) molecular marker analysis was carried out with the primers ITS2_F2814-2835/ITS2_R3295-3317 [GilArriortua *et al.* 2014c] (**Table S44**, Supplementary material).

PCR was performed using a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the following cycling conditions: 95 °C for 11 min (10 min for COI barcode), 35 cycles (40 cycles for COI barcode) 94 °C → 30 s (45 s for ITS2), 58 °C (55 °C, 50 °C and 65 °C for COI barcode, Cyt-b and ITS2, respectively) → 45 s (30 s and 40 s for COI barcode and ITS2, respectively) and 72 °C → 45 s (1 min for COI barcode and ITS2). For the COI barcode and ITS2 markers this last step is followed by a final extension at 72 °C for 5 minutes.

Each PCR reaction was carried out in a final volume of 25 µl that included 10 ng of DNA, 0.2 mM dNTP (Bioline, Berlin, Germany), 0.2 µM each primer, 1.6 10⁻⁴ mg/µl BSA (Bioline, Berlin, Germany), 1 unit of Taq polymerase (Biotaq, Bioline, Berlin,

Germany), 1 x Buffer (pH: 8.8, Bioline, Berlin, Germany) and a variable amount of MgCl₂ (Bioline, Berlin, Germany), from 1.5 mM for COI barcode, to 2 mM for COI (616 bp), Cyt-b and ITS2. The PCR included positive and negative controls.

The PCR products were purified with Exo-SAP (Exonuclease I/Shrimp alkaline phosphatase; TaKaRa Bio, Otsu, Japan) and sequenced with a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using PCR primers as sequencing primers. Unincorporated terminators were removed with a BigDye® X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Electrophoretic separation and sequencing reaction product detection were performed in an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5.5.3.3. Data processing and analysis

Forward and reverse DNA sequences were visualized and manually edited in BioEdit [Hall 1999] to remove primers and reading errors. The sequences for each molecular marker were aligned automatically using MUSCLE [Edgar 2004]. The translations of coding sequences to check the presence of stop codons and nonsynonymous substitutions was performed in MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013]. Nucleotide consensus sequences were conducted in SeaView 4.0 [Galtier *et al.* 1996]. Intra and Inter-specific analyses were performed with Arlequin V. 2000 [Schneider *et al.* 2000]. Pairwise distance matrices were obtained in MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013]. Additionally, we used the sequences of the Calliphoridae family species recorded in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) for the studied DNA regions with comparative purposes (Tables S45-S47, Supplementary material).

5.5.4. Results and discussion

The 449 analyzed specimens were identified belonging to 3 genera (*Chrysomya*, *Calliphora* and *Lucilia*) and 10 species of Calliphoridae: *Chrysomya albiceps*

(Wiedemann, 1819) (54 individuals), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 (83), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758) (67), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (50), *Lucilia richardsi* Collin, 1926 (20), *Lucilia ampullacea* Villeneuve, 1922 (59), *Lucilia silvarum* Meigen, 1826 (15), *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) (73), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826) (27) and *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876 (1). These species are the most common carrion-breeding taxa in the Iberian Peninsula and are usually employed as PMI indicators [Saloña-Bordas *et al.* 2009; Prado e Castro *et al.* 2011, 2012; GilArriortua *et al.* 2013, 2015], excluding *L. bufonivora* which is an obligate parasite of amphibians [Brumpt 1934; Zumpt 1965].

mtDNA COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) *loci* and nuDNA ITS2 (310-343 bp) region were characterized for all 449 specimens and sequences have been logged in GenBank under the following accession numbers: KJ394508-KJ394956; KJ405478-KJ405926; KF825559-KF826007 (**Table S43**, Supplementary material).

5.5.4.1. Intra-specific analysis of the studied specimens

The intra-specific analysis was conducted for each species with the information obtained from the COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) regions for the characterized specimens.

For the COI barcode (658 bp), COI (616 bp) and Cyt-b (307 bp) *loci*, *L. caesar* showed the highest haplotype diversity ($0.91 \pm 0.02/0.90 \pm 0.03/0.67 \pm 0.05$) and number of variable positions for COI markers (22/34) (**Table 22**). Similarly, *L. illustris* with only 27 specimens accumulated a big deal of variability for COI *loci* ($0.81 \pm 0.06/0.80 \pm 0.07$) (**Table 22**). In contrast, *C. vicina*, the most abundant species, exhibited poorer sequence variability ($0.66 \pm 0.06/0.59 \pm 0.07/0.51 \pm 0.07$) and an inferior number of variable sites for COI regions (21/27) (**Table 22**). Notably, *Ch. albiceps*, despite its great abundance, displayed a low number of variable sites (2/1/0) and gene diversity ($0.07 \pm 0.05/0.07 \pm 0.05/0.00 \pm 0.00$) (**Table 22**). This scarce intra-specific variability

5.5. Aportación / Contribution I.V

Table 22. Intra-specific analysis of the studied Calliphoridae for the COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp). The table shows species, number of specimens (N), molecular marker (MM), number of haplotypes/variants (NH/Vt), haplotypes/variants diversity (H/VtD), nucleotide diversity (ND), mean number of pairwise differences (MNPd) and number of variable sites (NVS).

Species	N	MM	NH/Vt	H/VtD	ND	MNPd	NVS
<i>Ch. albiceps</i>	54	COI barcode	3	0.073 ± 0.049	0.0001 ± 0.0003	0.0741 ± 0.1478	2
		COI 616 bp	2	0.073 ± 0.048	0.0001 ± 0.0003	0.0727 ± 0.1463	1
		Cyt-b	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
		ITS2	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
<i>C. vicina</i>	83	COI barcode	23	0.657 ± 0.059	0.0018 ± 0.0013	1.1840 ± 0.7677	21
		COI 616 bp	24	0.592 ± 0.065	0.0018 ± 0.0013	1.0973 ± 0.7270	27
		Cyt-b	17	0.509 ± 0.068	0.0022 ± 0.0019	0.6788 ± 0.5237	13
		ITS2	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
<i>C. vomitoria</i>	67	COI barcode	4	0.287 ± 0.066	0.0012 ± 0.0010	0.7816 ± 0.5764	4
		COI 616 bp	4	0.287 ± 0.066	0.0005 ± 0.0006	0.3175 ± 0.3279	3
		Cyt-b	3	0.342 ± 0.061	0.0011 ± 0.0013	0.3474 ± 0.3458	2
		ITS2	5	0.559 ± 0.057	0.0059 ± 0.0038	1.9150 ± 1.1039	6
<i>L. sericata</i>	50	COI barcode	11	0.629 ± 0.076	0.0013 ± 0.0011	0.8759 ± 0.6253	11
		COI 616 bp	10	0.362 ± 0.088	0.0008 ± 0.0008	0.4751 ± 0.4199	9
		Cyt-b	2	0.040 ± 0.038	0.0001 ± 0.0004	0.0400 ± 0.1076	1
		ITS2	3	0.117 ± 0.061	0.0004 ± 0.0006	0.1184 ± 0.1897	2
<i>L. richardsi</i>	20	COI barcode	2	0.100 ± 0.088	0.0002 ± 0.0003	0.1000 ± 0.1775	1
		COI 616 bp	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
		Cyt-b	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
		ITS2	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
<i>L. ampullacea</i>	59	COI barcode	5	0.163 ± 0.065	0.0031 ± 0.0004	0.2022 ± 0.2537	5
		COI 616 bp	10	0.312 ± 0.079	0.0006 ± 0.0007	0.3705 ± 0.3600	9
		Cyt-b	3	0.130 ± 0.058	0.0005 ± 0.0008	0.1625 ± 0.2247	2
		ITS2	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
<i>L. silvarum</i>	15	COI barcode	3	0.448 ± 0.135	0.0007 ± 0.0007	0.4762 ± 0.4367	2
		COI 616 bp	2	0.248 ± 0.131	0.0004 ± 0.0005	0.2476 ± 0.2959	1
		Cyt-b	3	0.362 ± 0.145	0.0012 ± 0.0014	0.3810 ± 0.3810	2
		ITS2	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
<i>L. caesar</i>	73	COI barcode	29	0.908 ± 0.020	0.0052 ± 0.0030	3.4171 ± 1.7677	22
		COI 616 bp	41	0.904 ± 0.030	0.0064 ± 0.0036	3.9186 ± 1.9872	34
		Cyt-b	12	0.668 ± 0.048	0.0041 ± 0.0029	1.2458 ± 0.7976	9
		ITS2	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
<i>L. illustris</i>	27	COI barcode	9	0.809 ± 0.064	0.0041 ± 0.0025	2.6952 ± 1.4789	12
		COI 616 bp	11	0.798 ± 0.065	0.0029 ± 0.0019	1.7892 ± 1.0668	11
		Cyt-b	4	0.336 ± 0.113	0.0016 ± 0.0016	0.5014 ± 0.4403	4
		ITS2	1	0.000 ± 0.000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0
<i>L. bufonivora</i>	1	COI barcode	1	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	0
		COI 616 bp	1	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	0
		Cyt-b	1	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	0
		ITS2	1	NCE ^a	NCE ^a	NCE ^a	0

^aNCE no estimates are drawn up.

has been previously observed in *Ch. albiceps* specimens from Africa, Oceania and Europe [Harvey *et al.* 2003b; GilArriortua *et al.* 2015]. Overall, COI barcode (658 bp) showed the major gene diversity and Cyt-b (307 bp) the minor. Only, *C. vomitoria* showed more variability for Cyt-b (307 bp) locus than for other mitochondrial markers (Cyt-b: 0.34 ± 0.06 ; COI barcode: 0.29 ± 0.07 ; COI 616 bp: 0.29 ± 0.07) (Table 22.

Finally, it is worth mentioning that the COI (616 bp) *locus* revealed, for most species, the same or more number of haplotypes than the rest of mitochondrial markers (**Table 22**).

The nuclear ITS2 (310-343 bp) marker revealed an almost complete intra-specific homology (**Table 22**). Only *C. vomitoria* and *L. sericata* harboured variable positions (6/2) (**Table 22**). These findings are consistent with previous assertions where the nearly lack of variability within Diptera (Brachycera and Nematocera) species suggested homogenization processes generated through concerted evolution [Song *et al.* 2008a; Alquezar *et al.* 2010]. The combination of high intra-specific homogeneity and inter-specific variability is preferred when the objective is unequivocal identification at specific level [Malewski *et al.* 2010].

5.5.4.2. Inter-specific analysis of the studied specimens

The COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) sequences were aligned separately, for each species, to obtain consensus sequences (**Tables S48-S50**, Supplementary material).

The COI barcode (658 bp), COI (616 bp) and Cyt-b (307 bp) mitochondrial *loci* revealed 119, 132 and 59 variable positions, respectively. For these *loci*, several characteristic sites differentiated between the genera *Chrysomya* (32/23/9), *Calliphora* (4/12/6) and *Lucilia* (8/2/3). In general, each species showed a variable number of distinctive positions (*Ch. albiceps*: 32/23/9; *C. vicina*: 4/7/2; *C. vomitoria*: 9/7/2; *L. sericata*: 1/1/0; *L. richardsi*: 3/1/2; *L. ampullacea*: 8/8/2; *L. silvarum*: 3/3/2; *L. caesar*: 0/2/1; *L. illustris*: 0/1/0; and *L. bufonivora*: 7/9/7). Moreover, within the most complex genus (*Lucilia*) COI (616 bp) appears to have, generally, more characteristic sites than COI barcode or Cyt-b (*L. sericata*: 4 and 3/1; *L. richardsi*: 2 and 5/2; *L. ampullacea*: 12 and 12/7; *L. silvarum*: 6 and 3/3; *L. caesar*: 2 and 0/1; *L. illustris*: 3 and 2/0; and *L. bufonivora*: 12 and 9/8). However, it is worth mentioning that Cyt-b achieved these

results with the half length than the rest of mitochondrial markers. Further studies should be performed to ensure that the positions assigned here remain characteristic.

The ITS2 (310-343 bp) nuclear region showed a characteristic number of base pairs for each species (*Ch. albiceps*: 327 bp; *C. vicina*: 337 bp; *C. vomitoria*: 321-325 bp; *L. sericata*: 330-331 bp; *L. richardsi*: 343 bp; *L. ampullacea*: 310 bp; *L. illustris*: 324 bp; *L. bufonivora*: 316 bp; with the exception of *L. silvarum* and *L. caesar*: 322 bp) and the highest number of variable positions 201 (113 substitutions and 139 INDELS). This inter-specific features in sequence length and nucleotide composition allow the separation of the ten studied species.

Finally, to the best of our knowledge, the Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) regions for *L. richardsi*, *L. silvarum* and *L. bufonivora*, and the ITS2 (310-343 bp) region for *C. vomitoria* from the Iberian Peninsula have not been previously characterized. Furthermore, there are no other records in GenBank for the whole length of COI barcode (658 bp) for *L. richardsi* and *L. silvarum*, and COI (616 bp) for *L. richardsi*.

5.5.4.3. Pairwise divergence analysis for the studied Calliphoridae species

Pairwise divergence analyses were conducted using all the haplotypes/variants obtained for the examined *loci*: COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp), and ITS2 (310-343 bp) (**Tables S51-S54**, Supplementary material).

The intra-specific pairwise divergence analysis for the mitochondrial *loci* (COI barcode, 658 bp; COI, 616 bp; and Cyt-b, 307 bp) from the Basque Country blowflies revealed a strong similarity, and even identity, in most cases (**Table 23; Tables S51-S53**, Supplementary material). Overall, these findings corroborated the maximum intra-specific threshold of around 1 % observed for mtDNA *loci* [Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008]. Only a few species showed nucleotide variability over this limit, in *C. vicina* (Cyt-b: 0.0-1.3), *L. caesar* (COI barcode: 0.0-1.4; COI 616

bp: 0.0-1.8; and Cyt-b: 0.0-1.3) and *L. illustris* (COI barcode: 0.0-1.4) (**Table 23; Tables S51-S53**, Supplementary material). These results are in line with the intra-specific divergence maximum of 1.5 % found for mitochondrial *loci*, in mammals and Diptera [Tobe *et al.* 2010; GilArriortua *et al.* 2015].

Table 23. Intra-specific pairwise divergence of the COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) studied molecular markers. The table shows species, number of specimens (N), sequences procedence (SP: Basque Country, BC, and GenBank, GB) and the range of pairwise divergence values (minimum-maximum) for each of the studied molecular markers.

Species	SP	N	COI barcode	COI 616 bp	N	Cyt-b	N	ITS2
<i>Ch. albiceps</i>	BC	54	0.0-0.3	0.0-0.2	54	0.0 ^a	54	0.0 ^a
	BC-GB	61 (54+7)	0.0-0.3	0.0-0.5	115 (54+61)	0.0-0.7	63 (54+9)	0.0-0.3
<i>C. vicina</i>	BC	83	0.0-0.9	0.0-1.1	83	0.0-1.3	83	0.0 ^a
	BC-GB	139 (83+56)	0.0-0.9	0.0-1.3	151 (83+68)	0.0-1.3	125 (83+42)	0.0 ^a
<i>C. vomitoria</i>	BC	67	0.0-0.6	0.0-0.5	67	0.0-0.7	67	0.0-1.5
	BC-GB	82 (67+15)	0.0-3.6	0.0-3.7	119 (67+52)	0.0-1.0	72 (67+5)	0.0-2.2
<i>L. sericata</i>	BC	50	0.0-0.6	0.0-0.6	50	0.0-0.3	50	0.0-0.6
	BC-GB	70 (50+20)	0.0-0.6	0.0-0.6	76 (50+26)	0.0-1.0	76 (50+26)	0.0-0.6
<i>L. richardsi</i>	BC	20	0.0-0.2	0.0 ^a	20	0.0 ^a	20	0.0 ^a
	BC-GB	20 (20+0)	N/A ^b	N/A ^b	20 (20+0)	N/A ^b	20 (20+0)	N/A ^b
<i>L. ampullacea</i>	BC	59	0.0-0.5	0.0-0.5	59	0.0-0.7	59	0.0 ^a
	BC-GB	67 (59+8)	0.0-0.5	0.0-0.8	65 (59+6)	0.0-1.0	74 (59+15)	0.0 ^a
<i>L. silvarum</i>	BC	15	0.0-0.3	0.0-0.2	15	0.0-0.7	15	0.0 ^a
	BC-GB	15 (15+0)	N/A ^b	N/A ^b	15 (15+0)	N/A ^b	15 (15+0)	N/A ^b
<i>L. caesar</i>	BC	73	0.0-1.4	0.0-1.8	73	0.0-1.3	73	0.0 ^a
	BC-GB	82 (73+9)	0.0-1.4 ^c	0.0-1.8 ^c	83 (73+10)	0.0-1.6 ^c	96 (73+23)	0.0 ^a
<i>L. illustris</i>	BC	27	0.0-1.4	0.0-1.0	27	0.0-1.0	27	0.0 ^a
	BC-GB	38 (27+11)	0.0-1.4 ^c	0.0-1.0 ^c	30 (27+3)	0.0-1.0 ^c	38 (27+11)	0.0 ^a
<i>L. bufonivora</i>	BC	1	NCE ^d	NCE ^d	1	NCE ^d	1	NCE ^d
	BC-GB	2 (1+1)	0.0 ^a	0.0 ^a	1 (1+0)	N/A ^b	1 (1+0)	N/A ^b

^aNo variability; ^bN/A not available; ^cExcluding sister species shared identical haplotypes; ^dNCE no estimates are drawn up.

When GenBank sequences are included in the intra-species pairwise analysis of mitochondrial *loci* (COI barcode; COI 616 bp; and Cyt-b), the high homology with reference haplotypes confirmed most of specimens identification, matching the data obtained based on morphology (**Table 23; Tables S51-S53**, Supplementary material). Only *C. vomitoria* revealed a substantial divergence for the COI *loci* (0.0-3.6/0.0-3.7) among the specimen from the West of North America (California; FR719157) and the rest, which include a sample from the East of North America (Ohio; GQ223336) (**Table 23; Table S45**, Supplementary material). This wide genetic variability, between *C. vomitoria* populations, suggests a speciation process that may be originated to the geographical isolation (by more than 3000 km of distance). Further studies in

this regard should be performed to confirm this assertion. Thus, as developmental time estimations are focused on the regional entomofauna, the genetic approaches should be performed from a locality perspective to avoid misidentifications or inaccuracies in species differentiation [Wallman & Donnellan 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008; Nakano & Honda 2015].

For the Basque Country specimens, the inter-species pairwise analysis of mitochondrial *loci* exhibited great divergence values for most of the species (COI barcode: 3.2-12.3; COI 616 bp: 3.2-11.2; Cyt-b: 2.9-10.4; excluding *L. caesar-L. illustris*, *L. sericata-L. silvarum* and *L. richardsi-L. silvarum* pairs of complex species), being the COI barcode the most variable (**Tables S51-S53**, Supplementary material). In contrast, the COI (616 bp) and Cyt-b (307 bp) mitochondrial *loci* analysis within *Lucilia* genus revealed a higher nucleotide diversity than the barcode marker (**Table 24**). However, a few *Lucilia* species showed low nucleotide divergence (*L. caesar-L. illustris*: 0.6-2.1/1.8-3.4/0.3-1.6; *L. sericata-L. silvarum*: 3.2-4.0/4.1-4.7/1.6-2.6; *L. richardsi-L. silvarum*: 1.7-2.0/2.1-2.3/2.6-3.3; **Table 24**), being several values below the minimum inter-species threshold value of 3 % [Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008]. Our findings support the convenience of analysing different molecular markers to improve the diagnosis reliability. It is worth mentioning that for *L. caesar* and *L. illustris* sister species some of the GenBank sequences appeared to share mitochondrial genomes, exhibiting minimum values of 0.0 (**Table 24**). In these situations, mitochondrial *loci* should be considered unsuitable to address species differentiation [Wells *et al.* 2007; Sonet *et al.* 2012; Williams *et al.* 2016]. Notably, the traditional identification for most of the problematic pair of species is hampered by highly similar physical characters. This closeness both in morphology and in sequence homology suggests introgression, or recent or ongoing speciation.

For the ITS2 (310-343 bp) nuclear region, intra-specific divergence was nearly absent for the Basque Country specimens (*Ch. albiceps*: 0.0; *C. vicina*: 0.0; *C. vomitoria*: 0.0-

1.5; *L. sericata*: 0.0-0.6; *L. richardsi*: 0.0; *L. ampullacea*: 0.0; *L. silvarum*: 0.0; *L. caesar*: 0.0; *L. illustris*: 0.0; for *L. bufonivora* there is only one sequence) (**Table 23**). Even including the GenBank sequences, the genetic divergence was reduced (*Ch. albiceps*: 0.0-0.3; *C. vicina*: 0.0; *C. vomitoria*: 0.0-2.2; *L. sericata*: 0.0-0.6; *L. ampullacea*: 0.0; *L. caesar*: 0.0; *L. illustris*: 0.0; *L. richardsi*, *L. silvarum* and *L. bufonivora* have no records in GenBank) (**Table 23**; **Table S54**, Supplementary material). Furthermore, this region exhibited the highest inter-specific pairwise divergence and a far greater resolution than the studied mitochondrial *loci*, allowing the clear and unambiguous differentiation even between the *Lucilia* genus species (**Table 24**; **Table S54**, Supplementary material). Our results contrast to a previous study about the Central European entomofauna where some *Lucilia* species showed unresolved mixtures [Sonet *et al.* 2012]. Overall, mitochondrial DNA evolves more rapidly than nuclear DNA after speciation events [Zajac *et al.* 2016]. Nevertheless, the ITS2 marker accumulates mutations relatively quickly within reproductively isolated populations, being one of the first indicators of the genetic discontinuity among populations [Muller *et al.* 2007; Coleman 2009; Alquezar *et al.* 2010]. These findings are in line with previous works, where ITS2 resolved complex species evolutionary relationships and delimitations in Acari and Diptera (Brachycera and Nematocera) [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008a-b, 2011; LaRue *et al.* 2009; Loaiza *et al.* 2013], extending its suitability to the Basque Country Calliphoridae of forensic importance.

Overall, there is a gap between intra-specific maximum and inter-specific minimum values for mitochondrial (COI barcode; COI 616 bp; Cyt-b) *loci* from 0.9/1.1/1.3 to 3.2/3.2/2.9 (from 1.4/1.8/1.3 to 0.6/1.8/0.3, including complex species) and for nuclear (ITS2, 310-343 bp) region from 0.6 to 8.4 (excluding *C. vomitoria* and sister species; from 1.5 to 1.5, including all species) (**Tables 23-24**). Further specimens should be analyzed to extent this assumption all over the Iberian Peninsula.

5.5. Aportación / Contribution I.V

Table 24. Inter-specific pairwise divergence of the COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) studied molecular markers for *Lucilia* genus species. The table shows species, molecular markers (MM) and the range of pairwise divergence values (minimum-maximum) for the studied molecular markers according to sequences origin (Basque Country, BC, and GenBank, GB).

Species	MM	1		2		3		4		5		6		7		
		BC	BC-GB	BC	BC-GB	BC	BC-GB	BC	BC-GB	BC	BC-GB	BC	BC-GB	BC	BC-GB	
1	<i>L. sericata</i>	COI barcode	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		COI 616 bp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cyt-b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ITS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>L. richardsi</i>	COI barcode	3.8-4.3	3.6-4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		COI 616 bp	3.2-3.7	3.2-3.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cyt-b	2.9-3.3	2.9-3.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ITS2	8.4-9.0	8.4-9.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>L. ampullacea</i>	COI barcode	4.4-6.4	4.4-6.4	7.3-7.6	7.3-7.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		COI 616 bp	6.5-7.5	6.7-7.5	6.3-6.7	6.3-6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cyt-b	7.2-7.8	7.2-7.8	6.5-6.8	6.5-6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ITS2	28.2-28.5	28.2-28.5	30.2	30.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>L. silvarum</i>	COI barcode	3.2-4.0	3.2-4.0	1.7-2.0	1.7-2.0	6.4-6.8	6.4-6.8	-	-	-	-	-	-	-	-
		COI 616 bp	4.1-4.7	4.1-4.7	2.1-2.3	2.1-2.3	7.5-8.0	7.5-8.0	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cyt-b	1.6-2.6	1.6-3.3	2.6-3.3	2.6-3.3	7.8-8.8	7.8-8.8	-	-	-	-	-	-	-	-
		ITS2	15.3-17.7	15.3-17.7	14.1	14.1	30.3	30.3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>L. caesar</i>	COI barcode	4.4-5.6	4.3-5.6	5.9-7.1	5.9-7.1	3.2-4.3	3.2-4.7	4.9-6.2	4.9-6.2	-	-	-	-	-	-
		COI 616 bp	5.7-7.1	5.7-7.3	6.2-6.8	6.2-6.8	5.7-6.8	5.2-6.8	7.3-8.1	7.3-8.1	-	-	-	-	-	-
		Cyt-b	4.9-6.2	4.6-6.8	5.5-6.5	5.2-6.5	3.6-5.2	3.6-5.2	5.2-6.5	4.9-6.8	-	-	-	-	-	-
		ITS2	28.6-33.3	28.6-33.3	30.3	30.3	17.9	17.9	32.1	32.1	-	-	-	-	-	-
6	<i>L. illustris</i>	COI barcode	4.4-5.3	4.3-5.5	6.1-6.8	6.1-7.0	4.1-4.9	3.3-4.9	5.3-6.5	5.3-6.5	0.6-2.1	0.0-2.1	-	-	-	-
		COI 616 bp	6.3-7.5	5.8-7.5	6.5-6.7	6.3-6.7	5.2-6.2	5.2-6.5	7.3-7.6	7.1-7.8	1.8-3.4	0.0-3.4	-	-	-	-
		Cyt-b	4.6-5.2	4.6-5.9	5.2-5.9	5.2-5.9	4.2-5.2	3.6-5.2	4.9-6.2	4.9-6.2	0.3-1.6	0.0-1.6	-	-	-	-
		ITS2	28.8-33.3	28.8-33.3	30.2	30.2	17.9	17.9	32.1	32.1	1.5	1.5	-	-	-	-
7	<i>L. bufonivora</i>	COI barcode	3.3-3.8	3.3-3.8	4.4-4.6	4.4-4.6	5.9-6.2	5.9-6.2	4.0-4.3	4.0-4.3	5.2-5.8	5.2-6.2	5.8-6.4	5.6-6.4	-	-
		COI 616 bp	5.7-6.2	5.7-6.2	5.0	5.0	8.3-8.6	8.3-8.6	6.2-6.3	6.2-6.3	6.8-8.0	6.8-8.0	7.6-8.0	7.6-8.0	-	-
		Cyt-b	3.9-4.2	3.9-4.9	5.5	5.5	8.5-9.1	8.5-9.1	4.9-5.5	4.9-5.5	6.8-7.8	6.5-7.8	6.5-7.2	6.5-7.5	-	-
		ITS2	14.8-17.3	14.8-17.3	14.3	14.3	28.5	28.5	4.6	4.6	29.7	29.7	30.0	30.0	-	-

5.5.5. Summary

We examined the COI barcode (658 bp), COI (616 bp), Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) regions to improve the genetic resources available for blowfly species of medico-legal and veterinary importance in the Iberian Peninsula.

Despite the great divergence values exhibited by COI barcode (658 bp) *locus* for most species, the COI (616 bp) and Cyt-b (307 bp) *loci* hold promise as diagnostic tools even within *Lucilia* genus. These last two markers accumulate higher inter-specific diversity than the standard *locus*. Notably, the COI (616 bp) marker exhibits nonoverlapping values of maximum intra-species and minimum inter-species, including *Lucilia* genus species. However, only the ITS2 (310-343 bp) nuclear region delineates more consistently the limits of Calliphoridae species, even within more complex genera. This study corroborates the convenience of analysing mitochondrial and nuclear markers for unequivocal diagnosis. Overall, we suggest choice mitochondrial *loci* (COI barcode, COI 616 bp and Cyt-b) for identifying unknown samples, and ITS2 region for more complex genera diagnosis.

Finally, our results demonstrate the importance of performing DNA-based approaches from a locality-specific perspective to avoid misidentifications. Therefore, the new genetic data here provided are invaluable considering the scarcity of information about the Calliphoridae from Southern Europe.

5.6. Aportación / Contribution I.VI

Nuevas técnicas analíticas: *High-resolution melting analysis* (HRM) / New analytical techniques: High-resolution melting analysis (HRM)

“High-resolution melting (HRM) analysis assay of the ITS2 region: A powerful method to identify entomological evidence (Diptera: Calliphoridae)”

Forensic Science International (enviada / submitted)

Nuevas técnicas analíticas: *High-resolution melting analysis* (HRM)

La **aportación I.VI** responde al objetivo específico “*Incorporar y validar tecnologías novedosas, como el análisis de los perfiles de disociación de alta resolución (*high-resolution melting*, HRM), para simplificar y mejorar la rapidez de los diagnósticos moleculares, reduciendo sus costes*”.

Este trabajo aborda uno de los retos principales de la biología molecular moderna: la utilización de nuevas tecnologías que mejoren las prestaciones ofrecidas por las convencionales. Así, el análisis *high-resolution melting* (HRM) es una herramienta novedosa, sensible y precisa, que permite la detección de variabilidad nucleotídica en un único paso, lo que supone un considerable ahorro de tiempo en comparación con otros métodos. Además, no requiere procesamiento post-PCR ni oligonucleótidos marcados con fluorescencia, reduciendo costes y riesgos de contaminación. Esta técnica se utiliza ampliamente en la identificación de patógenos clínicos, si bien su aplicación al diagnóstico entomológico se encuentra aún sin desarrollar, por lo que las referencias bibliográficas al respecto son prácticamente inexistentes.

En esta **aportación (I.VI)** se desarrolló y validó un ensayo basado en el análisis HRM del marcador ITS2 (310-343 pb) (HRM-ITS2), como herramienta diagnóstica alternativa para la diferenciación inequívoca de dípteros califóridos de importancia médico-legal y veterinaria en el sur de Europa (Península Ibérica: CAPV).

La selección del marcador a estudiar se hizo considerando que la región ideal para el análisis HRM debe poseer baja diversidad intra-específica y alta variabilidad inter-específica, suficiente para la diferenciación entre especies. Todos estos requerimientos concurren en el marcador ITS2, haciendo que sea un buen candidato para el análisis HRM.

Se estudiaron un total de 295 especímenes pertenecientes a siete especies de la familia Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L.*

5.6. Aportación I.VI

silvarum, *L. caesar* y *L. illustris*), seleccionadas por la mayor complejidad para su identificación morfológica y su interés médico-legal y veterinario en el sur de Europa.

Los ensayos de validación incluyeron: la identificación de perfiles HRM-ITS2 en muestras molecularmente caracterizadas mediante secuenciación, y estudios ciegos aleatorios, de especificidad, sensibilidad y variabilidad.

Los perfiles de disociación obtenidos permitieron la separación clara e inequívoca de todas las especies estudiadas, incluidas las más estrechamente relacionadas.

De este modo, el análisis HRM-ITS2 es una nueva técnica molecular altamente eficaz y con gran potencial para el diagnóstico de los califóridos de forma simple, rápida y económica, asequible incluso para no especialistas.

Finalmente, se debe destacar que la reducción de la vulnerabilidad a la contaminación es una inestimable ventaja, al ser un requisito de especial transcendencia en la investigación forense.

Este trabajo se encuentra en proceso de publicación en la revista científica *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) con el título “***High-resolution melting (HRM) analysis assay of the ITS2 region: A powerful method to identify entomological evidence (Diptera: Calliphoridae)***”. Dicho artículo se muestra a continuación.

New analytical techniques: High-resolution melting analysis (HRM)

The **contribution I.VI** responds to the specific objective “*To incorporate and validate novel technologies, such as high-resolution melting (HRM) analysis, to simplify and improve the speed of diagnosis, reducing costs*”.

This work addresses one of the major challenges of modern molecular biology: the use of new technologies to improve the services offered by conventional ones. Thus, high-resolution melting analysis (HRM) is a novel tool, sensible and accurate, that allows the detection of nucleotide variability in a single step, which is a considerable time-saving in comparison to other methods. Moreover, it does not required post-PCR processing or fluorescent-labelled oligonucleotides, reducing costs and risks of contamination. This technique is widely employed in the identification of clinical pathogens, even though its application to entomological diagnosis is still undeveloped, so that the bibliographical references thereon almost nonexistent.

In this **contribution (I.VI)** an assay based on the HRM analysis of the ITS (310-343 bp) marker (HRM-ITS2) was developed and validated, as an alternative diagnostic tool for unambiguous differentiation of the Calliphoridae Diptera of medico-legal and veterinary importance in Southern Europe (Iberian Peninsula: Basque Country).

The studied marker choice was taken considering that the ideal region for HRM analysis should exhibit low intra-specific diversity and high inter-specific variability, enough for distinguishing between species. All these requirements are met in the ITS2 marker, making it be a good candidate for HRM analysis.

A total of 295 specimens belonging to seven blowfly species (*Chrysomya albiceps*, *Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar* and *L. illustris*) were studied, selected for their greater complexity in the morphological identification and their medico-legal and veterinary interest in Southern Europe.

5.6. Contribution I.VI

The validation tests included: identifying HRM-ITS2 profiles in samples molecularly characterized by sequencing, and blind randomized, specificity, sensitivity and variability studies.

The obtained dissociation profiles enabled the unequivocal separation of all studied species, including the closely related ones.

Thus, the HRM-ITS2 analysis is a new molecular technique highly effective and with a great potential for the diagnosis of Calliphoridae in a simple, rapid and inexpensive way, affordable even from non-specialists.

Finally, it should be noted that the reduction of vulnerability to contamination is an invaluable advantage, being a requisite of special significance in forensic investigations.

This work is under process of publication in the scientific journal *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738) with the title “***High-resolution melting (HRM) analysis assay of the ITS2 region: A powerful method to identify entomological evidence (Diptera: Calliphoridae)***”. This paper is shown below.

5.6.1. Resumen

El prerrequisito crítico para la adecuada práctica de la entomología forense es la rápida e inequívoca identificación de las evidencias entomológicas para la estimación del período de actividad de los insectos (PAI), que suele aproximarse al intervalo *post-mortem* (IPM). El diagnóstico tradicional basado en caracteres físicos está limitado por la similitud anatómica entre especies, incluso en adultos de especies estrechamente relacionadas. Así, la identificación basada en ADN ha demostrado ser una alternativa fiable y menos ambigua que la interpretación de los caracteres morfológicos en los que se basa la taxonomía tradicional. Uno de los retos de la biología molecular es el desarrollo de técnicas efectivas y precisas para la identificación rápida e inequívoca de insectos. El análisis *high-resolution melting* (HRM) es una técnica viable y potente para la detección de la variabilidad nucleotídica, que supone un considerable ahorro de tiempo y costes en comparación con otros métodos convencionales. En este trabajo se describe y valida un ensayo basado en el análisis mediante HRM de la región del segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 310-343 pb), como herramienta diagnóstica para la diferenciación de dípteros. Un total de 295 especímenes, previamente caracterizados mediante secuenciación nucleotídica, pertenecientes a siete especies de Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. ampullacea*, *L. caesar* y *L. illustris*), fueron utilizados en este análisis HRM. Las especies seleccionadas se encuentran, habitualmente, involucradas en la descomposición cadavérica en el sur de Europa, y presentan diagnósticos morfológicos más complejos. Los perfiles de disociación generados permitieron diferenciar claramente las siete especies, coincidiendo con los resultados de la secuenciación y/o los especímenes utilizados como muestras de referencia para cada especie. El análisis HRM-ITS2 ofrece un simple, rápido y económico método para la identificación de califóridos, utilizando un único par de *primers* en una reacción de un único paso en tubo cerrado, y sin necesidad de pruebas con oligonucleótidos marcados con fluorescencia.

Abstract

The critical prerequisite for the accurate practice of forensic entomology is the rapid and unambiguous identification of entomological evidence to estimate the period of insect activity (PIA), which often approximates to the *post-mortem* interval (PMI). The traditional diagnosis based on physical characters is hampered by the anatomical similarities between species, even for adults of closely related species. Thus, DNA-based identification has been shown to be a reliable alternative and less ambiguous than interpretation of morphological characters in which traditional taxonomy is based. One of the challenges of molecular biology is to develop effective and accurate techniques for fast and unequivocal insect identification. High-resolution melting (HRM) analysis is a feasible and powerful technique for nucleotide variability detection, which offers considerable time and cost-saving, compared to other conventional methods. In this work it is described and validated an assay based on HRM analysis of the second internal transcribed spacer (ITS2, 310-343 bp) region, as a diagnostic tool for distinguishing dipterans. A total of 295 specimens, previously characterized through nucleotide sequencing as belonging to seven Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris*), were used in this HRM analysis. Selected species are, usually, associated with cadaver decomposition in Southern Europe, and have more complex morphological diagnosis. The melting profiles generated enabled the clear differentiation of the seven species, matching the sequencing results and/or the specimens used as reference samples for each species. This HRM-ITS2 analysis offers a simple, rapid and cost-effective method for blowfly identification, using a single primer pair in a one-step close-tube reaction, and without needing fluorescence-labelled oligonucleotide probes.

5.6.2. Introduction

The Calliphoridae family is frequently involved in legal issues of a judicial nature related to medico-legal and veterinary caseworks [Benecke & Lessig 2001; M de Pancorbo *et al.* 2006; Gennard 2012]. The most significant application of entomological evidence is in criminal investigations to estimate the period of insect activity (PIA), which approximates the *post-mortem* interval (PMI) [Amendt *et al.* 2007; Wells & LaMotte 2001]. In this task, a challenging step is the unequivocal and reliable entomological evidence diagnosis at species level because each species has unique habitat, developmental times and bio-geographical distribution [Hwang & Turner 2005; Richards *et al.* 2009; Fremdt & Amendt 2014]. Traditional diagnosis based on external taxonomic characters is hampered by the morphological similarities between species, especially in immature stages or even in adults of closely related species [Wallman & Donnellan 2001; Turchetto & Vanin 2004; Mazzanti *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2012]. Moreover, these features may be absent in degraded specimens or in partial samples, making the diagnosis labour-intensive and, sometimes, inconclusive [Malewski *et al.* 2010; Rolo *et al.* 2013]. However, DNA-based approach provides fast and reliable species identification in all developmental stages and under all preservation conditions [Saigusa *et al.* 2005].

One of the challenges of modern biology is to develop robust methods to perform fast and reliable species diagnosis. Molecular identification of insects at species level is currently performed combining DNA amplification (PCR, polymerase chain reaction) and sequencing. This method involves time-consuming processing steps and requires the use of relative expensive fluorescent-labelled oligonucleotides [Malewski *et al.* 2010; Wong *et al.* 2013]. Recently, high-resolution melting (HRM) analysis has been introduced as a sensible and accurate technique for genotyping polymorphisms, mutation scanning and sequencing matching [Reed *et al.* 2007; Radvansky *et al.* 2011; Wong *et al.* 2013]. This analysis records the dissociation rate of double-strand DNA

resulting from the gradual denaturation through increasing temperature, during the melting process [Wang *et al.* 2010; Wong *et al.* 2013]. Melting temperature (T_m) and specific shape of melting curve is the result of the nucleotide sequence, CG content and amplicon length [Wittwer 2009; Peña *et al.* 2012]. This technique makes possible the detection of single nucleotide polymorphism (SNP) without fluorescent-labelled oligonucleotides or post-PCR processing, making it faster, simpler and less vulnerable to contamination than conventional ones [Malewski *et al.* 2010; Ríos & Yuil de Ríos 2010].

This novel methodology has been widely used in clinical pathogens diagnosis, such as microorganism species (viruses, bacteria or protozoa) and their variants [Monis *et al.* 2005; Lin *et al.* 2008; Pietzka *et al.* 2009]. However, the application of HRM analysis in the entomology field is still in its infancy with only a few studies on the differentiation of insect of veterinary and agricultural importance [Kang & Sim 2013; Wetten *et al.* 2016]. To the date, there is only one study about Calliphoridae of forensic interest based on the analysis of mitochondrial gene cytochrome oxidase c subunit I (COI) [Malewski *et al.* 2010]. However, this gene has shown limitations in its ability to differentiate closely related species, such as some sister species of *Lucilia* genus [Harvey *et al.* 2008; DeBry *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2012]. Noteworthy, the ideal DNA region for HRM analysis has to consist in a sequence with low intra-specific diversity and high inter-specific variability [Malewski *et al.* 2010; Radvansky *et al.* 2010]. In this regard, one of the most important markers employed in insect molecular systematics, the second internal transcribed spacer (ITS2) of the nuclear ribosomal DNA (rDNA), has been used in identifying Diptera species with complex relationships [Müller *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008b; Alquezar *et al.* 2010]. This nuclear marker combines preserved and highly variable regions [Nelson *et al.* 2008], exhibiting considerably high inter-specific and nearly a lack of intra-specific divergence, in contrast to commonly used mitochondrial markers [Hillis & Dixon

1991; GilArriortua *et al.* 2014c, 2015]. These features seem to make it a good candidate to distinguish Diptera species by means of HRM analysis assay.

In this work, we developed and validated an assay based on the high resolution melting (HRM) analysis of the second internal transcribed spacer (ITS2) nuclear region as diagnostic method for unequivocal differentiation of blowflies. The assay was focused in seven Calliphoridae species belonged to *Chrysomya* and *Lucilia* genera. These species, *Chrysomya albiceps*, *Lucilia ampullacea*, *L. sericata*, *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. caesar* and *L. illustris*, were chosen because of their medico-legal and veterinary importance in Southern Europe [Soler-Cruz 2000; Prado e Castro *et al.* 2011, 2012; GilArriortua *et al.* 2013, 2015], and the complexity of the diagnosis based on external characters due to morphological similarities.

5.6.3. Materials and methods

A total of 295 blowfly adults were selected, from a previous study performed in North of Spain (Basque Country) [Saloña-Bordas *et al.* 2009], to be used in the validation of the HRM-ITS2 analysis assay. Each sample was morphologically identified, following taxonomic keys for Calliphoridae [Smith 1986; González-Mora & Peris 1988; Peris & González-Mora 1991; Rognes 1991; Szpila 2012], as belonging to seven species: *Chrysomya albiceps*, *Lucilia ampullacea*, *L. sericata*, *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. caesar* and *L. illustris*.

5.6.3.1. DNA extraction

Adults were individually cleaned, initially in an ultrasonic bath (Symphony™ Ultrasonic Cleaner, VWR International, Radnor, PA, USA) and, subsequently in a bleach solution (NaClO, 20 %), during few minutes, to eliminate external contamination. Afterwards, head tissues were disrupted with a pestle Sigma-Z3559947 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and digested by incubating with proteinase K

(Promega, Madison, WI, USA). DNA was extracted with the Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions for animal tissues. Total DNA quantification was performed by spectrophotometry (NanoDrop 1000 Spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and fluorometry (PicoGreen®; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and stored at -20 °C up to the use.

5.6.3.2. DNA amplification, sequencing and data processing

The ITS2 (310-343 bp) region amplification and sequencing were carried out with the primers ITS2_F2814-2835 (5'-TGC TTG GAC TAC ATA TGG TTG A-3') and ITS2_R3295-3317 (5'-GTA GTC CCA TAT GAG TTG AGG TT-3') following the specifications established by GilArriortua *et al.* 2014c. Forward and reverse DNA sequences were visualized and manually edited in BioEdit [Hall 1999] to remove primers and reading errors. Sequences were aligned automatically using MUSCLE [Edgar 2004]. Nucleotide consensus sequences for each species were obtained with SeaView 4.0 [Galtier *et al.* 1996]. The homology search was done using the BLAST [Zhang *et al.* 2000] option of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). All sequences were deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (**Table S55**, Supplementary material).

5.6.3.3. Real-time PCR, high-resolution melting (HRM) analysis and data processing

The primers previously employed for conventional amplification were used as HRM primers. Each PCR-HRM reaction mix was prepared for a final volume of 5 µl, using 2.5 µl of SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 0.75 µl of each primer (1 µM) and 1 µl (2.5 ng) of template DNA. In each set of reactions, were included positive and non-template controls. Thermal cycling was performed on a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as follows: 2 min at 98 °C, followed by 45 cycles of 98 °C for 5 s and 65 °C for 40 s. Afterwards, amplification

products were submitted to a denaturation, at 95 °C for 30 s, and hybridization period, at 60 °C for 2 min, before the HRM analysis. Melting curve analysis was conducted by increasing the temperature from 65 °C to 95 °C at a 0.2 °C increments for 10 s. HRM analysis was conducted in a Bio-Rad Real-time Thermal Cycler CFX96™ module and monitored with the software CFX Manager v2.0 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Data analyses of melting curves were carried out using the software Bio-Rad Precision Melt™ Analysis v1.0 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with normalization regions between 70.6-71.0 °C and 75.4-75.8 °C. The software auto-called the melt curves of each amplicon and provided a confidence percentage, the relative probability the sample has of being in a cluster, based on the sample's similarity to the mean melt curve across each sample in the cluster. A confidence level threshold of 90 % was applied [Kirkpatrick *et al.* 2009; Ganopoulos *et al.* 2012].

5.6.3.4. Validation of HRM-ITS2 analysis assay

The correctness of HRM-ITS2 profiles obtained was validated by the large number of specimens studied for each species and verified by examining the sequencing data (**Table S55**, Supplementary material).

5.6.3.4.1. Randomized blind study

The accuracy of the identification approach was evaluated performing a randomized blind study. Sixty samples were randomly selected from the 295 total studied, which were numbered and separated from the initial information. Afterwards, the HRM-ITS2 and the results analysis were conducted with the anonym samples. The identification at species level was performed by comparison with reference samples previously established for each of the seven species, and which were included in each run. Finally, the correctness of these results was checked by contrasting with the samples sequencing information.

5.6.3.4.2. *Specificity assay*

The specificity of the amplification targets was evaluated by the nucleotide sequences homology search using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) BLAST tool [Zhang *et al.* 2000].

5.6.3.4.3. *Sensitivity assay*

The HRM-ITS2 analysis sensitivity was evaluated using two master-mix final volumes (5 and 10 μ l), different DNA template concentrations (5, 2.5, 1.5 and 0.5 ng per reaction tube) and changing the cycling parameters, such as the number of cycles (40, 45 and 50 cycles) or annealing temperature (60, 63 and 65 °C).

5.6.3.4.4. *Variability assay*

As part of variability study, duplications in each run (intra-run) and different runs (inter-run) on different days were performed. Afterward, the standard deviation (SD) of T_m for intra and inter-run was calculated to assess the repeatability and reproducibility, respectively. Moreover, intra-specific consistence of HRM-ITS2 profiles was tested by analyzing a considerable amount of specimens for each species.

5.6.4. Results and discussion

In this study a total of 295 DNA samples extracted from specimens belonging to seven Calliphoridae species, *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *L. sericata* (Meigen, 1826), *L. richardsi* Collin, 1926, *L. ampullacea* Villeneuve, 1922, *L. silvarum* Meigen, 1826, *L. caesar* (Linnaeus, 1758) and *L. illustris* (Meigen, 1826), were selected to validate the HRM-ITS2 analysis assay. In general, these are the blowfly species, with more complex morphological identification, used as PMI indicators in the Iberian Peninsula (Southern Europe) [Prado e Castro *et al.* 2011, 2012; GilArriortua *et al.* 2013, 2015].

Neither non-specific amplifications nor non-targets sequences were detected in the BLAST search, after samples amplification and sequencing, indicating that primers amplified the selected ITS2 region of Calliphoridae species (**Table S56**, Supplementary material). The sensitivity test by running serial dilutions indicated that 0.5 ng of DNA template per reaction was sufficient for correct discrimination. The cycle number and final volume did not significantly affect the HRM profiles. However, the variation of annealing temperature slightly influenced the T_m , but without effects in samples discrimination. Thus, the HRM-ITS2 assay was performed optimizing the amount of DNA and reagent and thermal cycling conditions as it was shown in materials and methods.

HRM-ITS2 analysis generated one distinct melting profile for each of the seven species as it is shown in the normalized melt curves (**Fig. 20a**). Replicates of each species were grouped under one of the seven curves, and the clustering species were in agreement with nucleotide sequencing. Curves were distinguished by a shift on the temperature axis with *L. ampullacea* to the left and *L. richardsi* to the furthest right (**Fig. 20a**). The difference plots improved melting curves visualization and separation, accentuating the differences between individual melt curves relative to a single reference species melt curve plotted as baseline (**Fig. 20b**) [Wong *et al.* 2013]. When the software auto-called normalized HRM curves to genotype, samples were correctly assigned to one of the seven species with a confidence level (92.4-99.9 %) over the minimum established threshold of 90 % [Kirkpatrick *et al.* 2009; Ganopoulos *et al.* 2012]. Confidence levels differences may be a result of variability in DNA template quality or the presence of inhibitors, which affect the amplification efficiency [Malewski *et al.* 2010; Wong *et al.* 2013]. Although inhibition has been recently reported not to have influence on melting profiles [Herrmann *et al.* 2007; Jaakola *et al.* 2010; Malewski *et al.* 2010], the fact is that its effect is mostly related with the reaction (final) volume and the dilution effect. Working with reduced volumes inhibitors probably interfere in the amplification

effectiveness. Therefore, when we obtained a curve that does not fit to none of the patterns, it would be convenient to repeat the analysis using a larger reaction volume.

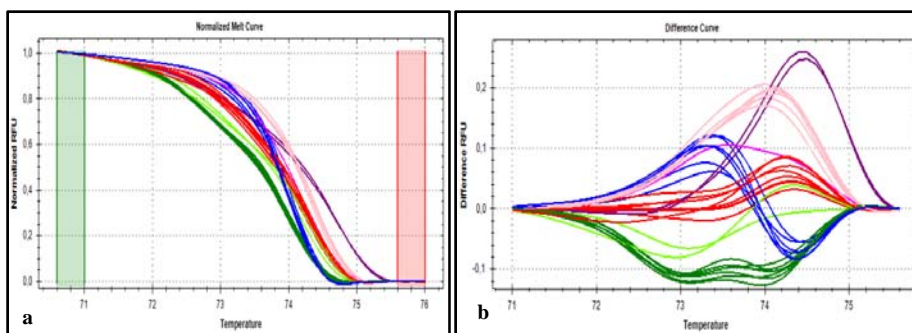


Fig. 20. High resolution melting (HRM) analysis curves generated for the seven studied Calliphoridae species. Normalized HRM curves showing melting profiles of *Chrysomya* and *Lucilia* species (**a**). The corresponding difference plots for **a**, using *L. caesar* as the reference genotype (**b**). Samples are colour coded: *Ch. albiceps*, blue; *L. sericata*, pink; *L. ampullacea*, dark green; *L. caesar*, red; *L. illustris*, light green; *L. richardsi*, purple; *L. silvarum*, fuchsia.

Moreover, HRM-ITS2 analysis exhibited minor variations in melting temperatures between duplications performed in each run, and runs performed on different days (intra and inter-runs), being melting curve profiles and order of temperatures consistent among and within each species. The low T_m standard deviation (SD) is usually related to high repeatability and reproducibility (**Table S57**, Supplementary material) [Buddhakosai *et al.* 2014]. Additionally, following previous recommendations about the production of consistent, reproducible and reliable HRM analysis data, we considered only those samples with amplification threshold cycle values less than 40 (between 25-35 cycles) and sigmoidal curve shape [Mitchell *et al.* 2009; Wong *et al.* 2013].

Finally, the randomized blind assay further confirmed the ability of the HRM-ITS2 analysis to distinguish the seven blowfly species. The approach was performed including representative samples for each Calliphoridae species as reference control in the same run. This also allowed to overcome the slightly variations in HRM profiles

between runs and ensure the typing to the closest standard genotype [Robertson *et al.* 2009]. Auto-calling of genotypes by the software revealed each of these specimens was identified with a confidence level up to 95 %. This indicates that there were only minor differences between HRM-ITS2 profiles from different individuals. Thus, the high intra-species consistency exhibited by the ITS2 region makes it suitable for successful HRM analysis assay.

The reliability of this method to distinguish species is affected by the intra-specific nucleotide diversity [Malewski *et al.* 2010]. Ideally, the structure of the DNA region to be analyzed has to consist of a variable sequence with low intra-specific and high inter-specific variability flanked by conserved regions [Malewski *et al.* 2010]. Recently, Malewski *et al.* have used high resolution melting analysis of COI *locus* (HRM-COI) to identify 27 Calliphoridae species from Poland [Malewski *et al.* 2010]. However, their approach showed limitations in identification at species level of some closely related species [Malewski *et al.* 2010], because of COI low inter-specific variability in these cases [GilArriortua *et al.* 2014c, 2015]. Moreover, COI *locus* has exhibited high intra-specific variability, which may increase the amount of reference samples required and the analytical costs. Furthermore, the HRM-COI analysis seems to be more labour-intensive, since the identification was possible only using two different pair of species-specific primers in two separated analysis [Malewski *et al.* 2010]. The present work demonstrates the efficacy of HRM-ITS2 analysis using only a single primer pair to identify, even closely related blowfly species. Noteworthy, the ITS2 nuclear region exhibited a lack of intra-specific divergence, and high amount of inter-specific nucleotide variability (Substitutions and, especially, INDELS) (**Table S58**, Supplementary material), which is a priceless advantage compared to mitochondrial markers (COI or Cyt-b, among others) [GilArriortua *et al.* 2014c, 2015]. A limitation with these data is that only Southern European species was included herein. Thus, further studies should be performed with more species and specimens from other

origins to corroborate its usefulness. However, it is noteworthy that forensic entomology is locality-specific, and molecular study should be directed to the specific entomofauna discovered in a region [Malewski *et al.* 2010].

This novel method is simple, rapid and reduces cross-contamination situations [Malewski *et al.* 2010; Wong *et al.* 2013]. With one-step close-tube assay without needing electrophoresis or sequencing [Malewski *et al.* 2010; Peña *et al.* 2012; Decat *et al.* 2013], performing the entire analysis within 3 h from the start of DNA amplification to the final result (or within 6-8 h beginning from DNA extraction). This supposes a great time-saving compared to nucleotide sequencing analysis. Furthermore, the reduced cost of the reagents required, lower than many other conventional techniques with fluorescent-labelled oligonucleotides [Wittwer 2009; Decat *et al.* 2013; Wong *et al.* 2013], makes it cost-effective [Buddhakosai *et al.* 2014]. It is worth mentioning that HRM is a non-destructive method, thus when samples could not be identified because they not resemble any of the species included in the representative reference set, the unidentified HRM products are available for sequencing [Peña *et al.* 2012; Decat *et al.* 2013]. All these features make the HRM-ITS2 analysis an attractive tool for forensic entomology purposes where rapid identification of blowflies is required for crime scene investigation in criminal research.

5.6.5. Summary

We describe and validate an assay based on HRM analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA (rDNA) (ITS2, 310-343 bp) region as useful method to identify Calliphoridae species of forensic importance. This work demonstrates the robustness and speed of this novel HRM-ITS2 analysis assay in distinguishing unequivocally the most common carrion-breeding species from *Chrysomya* and *Lucilia* genera used as PMI indicators in Southern Europe. HRM-ITS2

analysis seems to be a powerful tool for accurately identifying even closely related species of *Lucilia* genus.

This new method allows the diagnosis and differentiation of Diptera species using a single primer pair, in a one-step close-tube system without post-amplification processing and fluorescently labelled probes. These strong points make HRM approach a faster, simpler and more cost-effective alternative to other conventional molecular techniques. Moreover, the lack of post-amplification processing is the main improvement to reduce contamination risks, especially working with forensic evidence.

In summary, its ability to genotype unknown specimens to the closest reference species by auto-call is a great advantage as it facilitates identifications in studies where large set of samples should be analyzed, or samples have to be analyzed in a short time. However, it is important to obtain high-quality DNA and be mindful of the fauna of the study area to include an adequate number of reference species in each analysis.

VI. BLOQUE / BLOCK II

Entomología molecular aplicada /

Applied molecular entomology

Entomología molecular aplicada

El **Bloque II** se centra en el uso de la entomología molecular como herramienta de utilidad para resolver diversas situaciones que pueden presentarse en un contexto médico-legal y veterinario. En él se aborda tanto la identificación del ADN del insecto como del hospedador (humano), utilizando metodologías de análisis molecular convencional para la caracterización de marcadores mitocondriales, además de otras complementarias para el genotipado de *loci* STRs.

Finalmente, se proporcionan unas pautas básicas de actuación para la recogida, procesamiento y registro de las evidencias entomológicas, en versión bilingüe (Castellano/Euskera), para facilitar la incorporación de la entomología forense en las futuras investigaciones criminales de la CAPV.

VI. Block II

Applied molecular entomology

The **Block II** is focused on the use of molecular entomology as a useful tool to solve a variety of situations that can arise in a medico-legal and veterinary context. In it are addressed both the insect and host (human) DNA identification, using conventional molecular analysis methodologies for the characterization of mitochondrial markers, together with other complementary for the genotyping of *loci* STRs.

Finally, there are provided basic guidelines for the collection, processing and recording of entomological evidence in bilingual version (Spanish/Basque), to facilitate the incorporation of forensic entomology in future criminal investigations in the Basque Country.

6.1. Aportación / Contribution II.I

Identificación molecular como alternativa resolutive para muestras en malas condiciones / Molecular identification as a resolute alternative for samples in bad conditions

*“First record of *Musca autumnalis* De Geer, 1776 (Diptera: Muscidae) species involved in a myiasis case in the Basque Country cattle (Iberian Peninsula)”*

Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa, 2014, 55: 312-316

Identificación molecular como alternativa resolutive para muestras en malas condiciones

La **aportación II.I** responde al objetivo específico “*Aplicar la entomología molecular para superar las dificultades taxonómicas habituales en situaciones reales: identificación específica de insectos en malas condiciones y control de calidad de los diagnósticos convencionales*”.

En la actualidad, COI *barcode* (658 pb) está considerado como el marcador universal para la identificación de especies animales. Esto hace que su estudio sea casi obligado, aun teniendo una capacidad de discriminación limitada para algunos taxones. El constante aporte de nueva información a las bases de datos hace que el análisis de este marcador siga siendo muy atractivo como primera opción para la identificación taxonómica.

En esta **aportación (II.I)** el análisis del marcador COI *barcode* (658 pb) permitió la identificación de un espécimen inmaduro, cuyo diagnóstico morfológico resultaba no concluyente por sus pésimas condiciones de preservación.

Así, el enfoque molecular permitió clasificarlo como *Musca autumnalis*, siendo éste el primer registro de esta especie como miásica accidental asociada a un caso de miasis traumática en un individuo de la especie *Bos taurus* de la CAPV (Península Ibérica: CAPV, Abeltzain).

Un valor añadido fue la confirmación de la presencia de la especie *M. autumnalis* en el sur de la CAPV.

Finalmente, cabe destacar la necesidad de constituir equipos multidisciplinares y colaborativos donde se complementen los métodos empleados en taxonomía tradicional con otros métodos alternativos, como los basados en ADN.

6.1. Aportación II.1

Este trabajo ha sido publicado en la revista científica *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* (ISSN: 1134-6094) con el título “***First record of Musca autumnalis De Geer, 1776 (Diptera: Muscidae) species involved in a myiasis case in the Basque Country cattle (Iberian Peninsula)***”. Dicho artículo se muestra a continuación.

Molecular identification as a resolute alternative for samples in bad conditions

The **contribution II.I** responds to the specific objective “*To apply the molecular entomology to overcome the usual taxonomic difficulties in real situations: specific identification of insect in poor conditions and quality control of conventional diagnosis*”.

Nowadays, COI barcode (658 bp) is considered as the universal marker for animal species identification. This makes its study almost mandatory, although having a limited discriminatory ability for some taxa. The constant supply of new information to databases makes the analysis of this marker remains very attractive as a first choice for taxonomic identification.

In this **contribution (II.I)** the analysis of the COI barcode (658 bp) marker enabled the specific identification of an immature specimen, whose morphological diagnosis was inconclusive because of its poor preservation conditions.

Thus, the molecular approach allows to be classified as *Musca autumnalis*, being the first record of this species as an accidental myiasic associated with a case of traumatic myiasis in an individual of *Bos taurus* species of the Basque Country (Iberian Peninsula: Basque Country, Abeltzain).

An added value was the confirmation of the presence of the species *M. autumnalis* in Southern Basque Country.

Finally, it should be noted the need to establish multidisciplinary and collaborative teams where complementary methods are used in traditional taxonomy together with alternative methods, such as those based on DNA.

This work has been published in the scientific journal *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* (ISSN: 1134-6094) with the title “***First record of Musca***

6.1. Contribution II.1

autumnalis De Geer, 1776 (Diptera: Muscidae) species involved in a myiasis case in the Basque Country cattle (Iberian Peninsula)". This paper is reported below.

6.1.1. Resumen

La miasis, considerada como la infestación de los tejidos vivos de animales vertebrados por dípteros inmaduros, se asocia comúnmente a áreas tropicales y subtropicales. No obstante, pueden presentarse casos de la misma en todo el mundo, provocando serios daños en el bienestar y la economía del ganado y de la fauna salvaje. En Europa, generalmente, estas infestaciones están causadas por especies de las familias Oestridae, Sarcophagidae, Calliphoridae y Muscidae (Diptera), entre otras. Éste es el primer registro donde la especie *Musca autumnalis* se ha asociado a una miasis accidental detectada en un individuo de la especie *Bos taurus* en el norte de la Península Ibérica. Un espécimen inmaduro fue extraído e identificado a nivel de especie, utilizando la región *barcode* del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI *barcode*, 658 pb). Además, este trabajo confirma la presencia de esta especie en el sur de la CAPV, ampliándose el área de distribución conocida desde la costa atlántica, de clima oceánico, a la zona de transición, de clima sub-mediterráneo.

Abstract

Myiasis, understood as the infestation of living vertebrate tissues by dipterans larvae, is considered to be normally linked with tropical and subtropical areas. Nevertheless, it may occur all over the world, causing serious damage to the welfare and the economy of livestock and wildlife fauna. In Europe, generally, these infestations are caused by species of the families Oestridae, Sarcophagidae, Calliphoridae and Muscidae (Diptera), among others. This is the first record where *Musca autumnalis* species has been associated with an accidental myiasis occurred in an individual of *Bos taurus* species of the North of the Iberian Peninsula. An immature specimen was extracted and identified at species level, using the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I barcode region (COI barcode, 658 bp). Additionally, this work confirms the presence of this species in the South of the Basque Country, expanding the known distribution area from the Atlantic watershed of oceanic climate, to the transition zone of sub-mediterranean climate.

6.1.2. Introduction

Myiasis refers to vertebrate infestation by Diptera larvae, which feed, at least for a period of time, on the necrotic or alive tissues, liquids or foods ingested by the host [Zumpt 1965]. This serious pest causes a considerable impact on production economy, principally, of the livestock industry all over the world, causing serious health and welfare problems [Petney 1997; Catts & Mullen 2002]. However, it may affect not only to animals (domestic or wild) but also to humans (children and elderly), being the period of insect activity (PIA) an important estimation to detect mistreatments situations and occupational risks [Benecke & Lessig 2001; Amendt *et al.* 2007; Charabidze 2012].

In the Palaearctic region, obligate myiasis species are mainly related to four genera of Oestridae family, *Oestrus* (*O. ovis* and *O. pictus*), commonly found in *Ovis*, *Capreolus* and *Cervus*; *Hypoderma* (*H. bovis* and *H. lineatum*), that primary affect to bovids; *Gasterophilus* (*G. intestinalis* and *G. nasalis*), which mostly infest equids; *Cephenemyia* (*C. stimulator*), that is frequently found in wild cervids; one of Sarcophagidae (*Wohlfahrtia*: *W. magnifica*), that may infest a great number of mammals (bovids, ovids, equids, etc.); and one of Calliphoridae (*Lucilia*: *L. bufonivora*), specialized in amphibians [Ruíz-Martínez *et al.* 1992a-b; Ruíz-Matínez & Palomares 1993; Soler-Cruz 2000; Alcaide *et al.* 2003; Anderson 2006; Otranto *et al.* 2005; Gosá *et al.* 2009; Weigl *et al.* 2010a; Giangaspero *et al.* 2011; Calero-Bernal & Habela 2013; GilArriortua *et al.* 2014a]. Meanwhile, the facultative or accidental myiasis in Europe, may affect to a wide range of vertebrates and is commonly caused by species of the Calliphoridae (*Chrysomya*: *Ch. albiceps*; *Phormia*: *P. regina*; *Calliphora*: *C. vicina* and *C. vomitoria*; *Lucilia*: *L. sericata*, *L. cuprina*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris*), Sarcophagidae (*Sarcophaga*: *S. carnaria* and *S. haemorrhoidalis*) or Muscidae (*Musca*: *M. domestica* and *M. sorbens*; and *Muscina*: *M. stabulans*) families [Rognes 1993; Hall & Wall 1995; Stevens & Wall 1997b; Soler-

Cruz 2000; Bolek & Coggins 2002; Stevens 2003; Shivekar *et al.* 2008; Derraik *et al.* 2010; Salvetti *et al.* 2012; Clarke 2013].

Until the date, as we know, myiasic species of Muscidae family recorded, all over the world, in documented cases have been exclusively referred to *Musca domestica*, *Musca sorbens* and *Muscina stabulans* [Soler-Cruz 2000; Shivekar *et al.* 2008; Clarke 2013]. Only Gállego-Berenguer (2007) mentioned *Musca autumnalis*, together with *M. domestica*, just as possible cause of accidental myiasis, but without reporting any specific case. These last two species show substantial morphological similarities, being *M. autumnalis* originally Palaearctic, with an Old World distribution [Savage & Vockeroth 2010]. Nevertheless, *M. autumnalis* currently has a cosmopolite distribution, and its presence as part of the livestock insect fauna has been recently confirmed in the North of the Basque Country (Province: Bizkaia, Spain) [Valbuena & Saloña-Bordas 2011]. Additionally, it is worth to mention that in this species, adults feed on livestock secretions (eyes, nose and mouth) and excretions (mature), even on blood or wounds exudates [Matthew & Dobson 1959], being mechanic vectors of infection agents (virus, bacteria, parasites, etc.), and causing the lost of weight and milk production [Bowman 2004]. Whereas immature, essentially coprophagous, develop on any kind of mature or faeces, although could be associated to other substrates [Skidmore 1985].

Finally, it should be considered that traditional identification of immature specimens is usually hampered by species morphological similarities and could be delayed by the need to wait until the adult emergence [Wallman & Donnellan 2001; Sonet *et al.* 2013], which may be a difficult task especially for host-dependent species. Moreover, sometimes the specimens can be collected in bad conditions or fragmented, making unsuccessful the identifications, even for experts [GilArriortua *et al.* 2013; Rolo *et al.* 2013]. In these situations, molecular methods represent a useful alternative for fast and accurate species identification at any developmental stages, even for which show subtle

differences in the taxonomic diagnostic characters. For this task, the analysis of the mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome c oxidase subunit I barcode region (COI barcode, 658 bp) could be the most suitable option, since it is widely used for metazoan species molecular taxonomy and, nowadays, is considered the standard *locus* for insect identification [Hebert *et al.* 2003; Nelson *et al.* 2012]. Unfortunately, the applicability of molecular diagnosis depends on the representativeness and reliability of the database reference sequences [Sonet *et al.* 2013]. This issue makes it necessary to analyze the database information with special care.

This paper reports for the first time the capability of *M. autumnalis* to operate as a myiasic agent associated to an accidental infestation of an individual of *Bos taurus* species (cow) from the South of the Basque Country (Spain). Additionally, the present work proposes DNA-based molecular approach to perform reliable and unambiguous myiasis-causing Diptera species identification as a valuable alternative to morphological methods, since this type of casework involves, almost exclusively, immature stages.

6.1.3. Materials and methods

6.1.3.1. Case details

In June 2011, during a yearly study, conducted by the University of the Basque Country (UPV/EHU) in collaboration with the Cooperative Society of Veterinary Services Abeltzain, about the incidence of myiasis in the Basque Country livestock, an approximately six-year-old female crossbred cow of about 550 kg was found with a foot infection on the right hind limb, in Ozaeta village (42° 92' North, 2° 30' West) at the Álava province in Southern Basque Country (North Spain). The wound exploration showed a severe infection of the limb phalange with tissue necrosis and inflammation, exudation and purulent secretions. Immature specimen was manually removed after washing the lesion with physiologic saline solution (NaCl, 0.9 %), collecting only one

larva. The infested autochthonous cow was in a grassland area located about 70 km far away from the Cantabrian sea coast at 578 m altitude, and it is characterized by a sub-mediterranean climate. The larva recovered from the animal was placed in a closed vial with small holes for air entry, and transferred to the Forensic Entomology Service of the General Research Services (SGIker), University of the Basque Country (UPV/EHU). Additionally, it was elaborated a document to record all the information associated to myiasis cases (Entomological evidence collection log sheet; **Case S9**, Supplementary material), following European standards which allow to standardize the information to perform comparative studies in the future [Amendt *et al.* 2007].

6.1.3.2. Morphological identification

It was impossible to raise the specimen until the imago emergence because it did not arrive alive to the laboratory. Therefore, the larva was processed by boiling it in hot water (approximately 80-100 °C), preserved in ethanol 80 % [Amendt *et al.* 2007] and stored frozen at -80 °C up to the time of DNA extraction [GilArriortua *et al.* 2013]. Morphological identification was carried out under stereomicroscope (Motic microscopes SMZ 168, Motic, Barcelona, Spain; and Nikon E100-LED, Nikon instruments, Tokyo, Japan) following specific taxonomic keys [Skidmore 1985; Smith 1986].

6.1.3.3. Molecular identification: DNA extraction, amplification and sequencing

The immature specimen was washed with a bleach solution (NaClO, 20 %) to remove all external contamination [GilArriortua *et al.* 2013, 2014a]. DNA was extracted with the Qiagen DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer instructions for animal tissues.

Molecular identification was performed amplifying the mtDNA COI barcode (658 pb) *locus* using the adapted primers LCO1490 (5'-TTT CAA CTA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') and HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGA TGA CCA AAG AAT CA-3'), as

modified from Folmer *et al.* 1994; via PCR in a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), using approximately 10 ng of DNA in a final volume of 25 µl: 0.2 mM dNTP (Bioline, Berlin, Germany), 1.5 mM MgCl₂ (Bioline, Berlin, Germany), 0.2 µM of each primer, 1.6 x 10⁻⁴ mg/µl BSA (Bioline, Berlin, Germany), 1 unit of Taq polymerase (Biotaq, Bioline, Berlin, Germany) and 1 x Buffer (pH: 8.8, Bioline, Berlin, Germany); under the following cycling conditions: 95 °C for 10 min, 40 cycles 94 °C → 30 s, 55 °C → 30 s and 72 °C → 1 min, followed by final extension at 72 °C during 5 min [GilArriortua *et al.* 2014a].

Electrophoretic separation and sequencing reaction product detection were handled in an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The forward and reverse sequences obtained were edited with BioEdit [Hall 1999], the absence of stop codons was confirmed in MEGA6 [Tamura *et al.* 2013] and the homology search was done using the BLAST option of the National Centre for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the BOLD-IDS tool of the Barcode of Life Database (BOLD: <http://www.boldsystems.org/index.php/IDSOpenIdEngine>).

6.1.4. Results and discussion

For the collected specimen, the morphological identification based on the taxonomic characters was unfeasible, due to the bad conditions. Nevertheless, it was possible to identify the larva morphologically as Muscidae family and *Musca* genus, while the species diagnosis based on external characters was not conclusive enough. Afterwards, to overcome this problem, we performed the analysis of the COI barcode (658 pb) molecular marker which allowed the specimen unequivocal classification as *Musca autumnalis* De Geer, 1776. This final result was achieved after applying BLAST and BOLD-IDS search tools of GenBank and BOLD databases, with results of a maximum identity of 99 % and a similarity of 99.81-99.49 % to *M. autumnalis*, respectively. In

GenBank, BLAST obtains only 3 highly similar best matches of 99 %, with coverage of 99-100 % for the species *M. autumnalis*. However, in BOLD, IDS returns a list of 20 best matches with a closest species under the 1 % divergence, in all cases *M. autumnalis* species. Additionally, we ensure the reliability of the database sequences record considering if the works are published and the authors' expertise in Diptera morphological identification. In this regard, it is worth to highlight that some sequences are part of international contributions published by Kutty *et al.* 2008 or Sonet *et al.* 2013, where collaborate highly qualified taxonomists. The new COI barcode (658 bp) sequence has been deposited in GenBank as accession number KF751383 (**Table S59**, Supplementary material).

It is well known that other *Musca* species, such as *M. domestica* Linnaeus, 1758 and *M. sorbens* Wiedemann, 1830 could cause accidental myiasis in animals, or even in humans [Dogra & Mahajan 2010; Clarke 2013], while *M. autumnalis*, also called face fly, has not been previously reported related to myiasis. However, it is noteworthy that these species have common nutritional habits for immature stages, which development is associated to animal excrements or faeces. Furthermore, *M. autumnalis* and *M. domestica* larvae show an extremely high morphological similarity with plenty of taxonomic characters shared, which difficult considerably the unequivocal diagnosis through morphological methods [Matthew & Dobson 1959; Skidmore 1985] unless maggots are properly reared into adult for specific identification. Probably, this complexity to differentiate the external features between these species may be related to the lack of myiasis case reported for *M. autumnalis*. All these confluence of biological points, suggest the reasonable possibility of associating *M. autumnalis* to accidental myiasis, since its adults, as those of the other two species, are attracted to soiling or mature odours, which may be sometimes similar to necrotic animal flesh. In fact, *M. autumnalis* has recently been associated to cadaveric decomposing processes in Portugal [Rolo *et al.* 2013].

6.1.5. Summary

In conclusion, this study records for the first time *M. autumnalis* species as an accidental parasite that may be involved in traumatic myiasis cases. Additionally, the findings here reported confirm the presence of *M. autumnalis* in the Álava region, extending it to the South of the Basque Country (North Spain). As an added value, our study contributes with new nucleotidic information which is of great interest for accurate species identification. Moreover, this work demonstrates the need to complement the traditional methodology with alternative nowadays methods, such as DNA-based approach, which allow performing reliable identifications even when specimens are degraded or lack of diagnostic characters.

6.2. Aportación / Contribution II.II

Diagnóstico molecular como control de calidad /

Molecular diagnosis as quality control

*“Confirmación de la presencia de *Lucilia bufonivora* (Diptera: Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco (norte de España)”*

Boletín de la Asociación española de Entomología, 2014, 38: 25-31

Diagnóstico molecular como control de calidad

La **aportación II.II** responde al objetivo específico “*Aplicar la entomología molecular para superar las dificultades taxonómicas habituales en situaciones reales: identificación específica de insectos en malas condiciones y control de calidad de los diagnósticos convencionales*”.

Este trabajo sigue la línea del estudio anterior (**II.I**) en la que se destacaba la necesidad de mantener colaboraciones interdisciplinares que complementen los métodos de taxonomía clásicos (basados en el reconocimiento visual de caracteres externos) con los moleculares (basados en la detección de variabilidad nucleotídica) para efectuar diagnósticos inequívocos y fiables en muestras comprometidas. Aquí, además, se subraya la subjetividad de las identificaciones convencionales, que requieren de gran preparación y experiencia por parte de los especialistas, frente a la objetividad, irrefutabilidad y precisión que aportan las basadas en ADN. De ahí que estas últimas sean de interés como test de calidad para corroborar la fidelidad de los diagnósticos dudosos.

En esta **aportación (II.II)**, el análisis del marcador COI *barcode* (658 pb) se planteó para el control de calidad de las identificaciones morfológicas realizadas en un estudio a gran escala, en la CAPV.

En esta ocasión el abordaje genético permitió detectar el diagnóstico erróneo, realizado según a su morfología, de un espécimen que finalmente se identificó molecularmente como *Lucilia bufonivora*. Este resultado permitió corroborar la presencia de dicha especie en la CAPV.

Una vez más se constata la importancia de estrechar lazos de colaboración entre especialistas de distintas disciplinas para descartar incertidumbres en los resultados.

Este trabajo se ha publicado en la revista científica *Boletín de la Asociación española de Entomología* (ISSN: 0210-8984) con el título “**Confirmación de la presencia de**

6.2. Aportación II.II

Lucilia bufonivora (Diptera: Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco (norte de España)”. Dicho artículo se muestra a continuación.

Molecular diagnosis as quality control

The **contribution II.II** responds to the specific objective “*To apply the molecular entomology to overcome the usual taxonomic difficulties in real situations: specific identification of insect in poor conditions and quality control of conventional diagnosis*”.

This work follows the line of the previous study (**II.I**) in which it is noted the need to maintain interdisciplinary collaborations that complement classical taxonomy methods (based on visual recognition of external characters) with molecular ones (based on the detection of nucleotide variability) to perform unambiguous and reliable diagnosis in compromised samples. Here, moreover, it is underlined the subjectivity of conventional identifications, which require great preparation and expertise on the part of specialists, versus the objectivity, irrefutability and accuracy that provide those based on DNA. Hence, these latter are of interest as quality test to corroborate the accuracy of doubtful diagnoses.

In this **contribution (II.II)**, the COI barcode (658 bp) marker analysis was proposed as a quality control of morphological identifications performed on a large-scale study in the Basque Country.

On this occasion the genetic approach allowed to detect the erroneous diagnosis, performed based on its morphology, of a specimen that finally was molecularly identified as *Lucilia bufonivora*. This result corroborates the presence of this species in the Basque Country.

Once again it is stated the importance of strengthening collaboration links between specialists from different disciplines to rule out uncertainties in results.

This work has been published in the scientific journal *Boletín de la Asociación española de Entomología* (ISSN: 0210-8984) with the title “**Confirmación de la**

6.2. Contribution II.II

presencia de Lucilia bufonivora (Diptera: Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco (norte de España)". This paper is shown below.

6.2.1. Resumen

El presente trabajo corrobora la presencia de *Lucilia bufonivora* en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). En él se subraya la necesidad así como la utilidad de las técnicas moleculares, más objetivas y precisas, no solo como complemento a los métodos de identificación tradicional, basados en la detección de caracteres taxonómicos externos, sino también para el control de calidad de los diagnósticos morfológicos realizados. Además, esta investigación aporta nuevas secuencias nucleotídicas de gran interés para la correcta identificación específica.

Abstract

The present work corroborates the presence of *Lucilia bufonivora* in the Basque Country. Therefore, it evidences the necessity as well as the utility of molecular techniques, more objective and accurate, not only as a complement to the traditional identification methods, based on the detection of external taxonomic features, but also as a quality control of the carried out morphological diagnostics. Additionally, this research also contributes new nucleotidic sequences of great interest for correct species identification.

6.2.2. Introducción

La especie *Lucilia bufonivora*, perteneciente al género *Lucilia*, es un parásito obligado de anfibios [Brumpt 1934; Zumpt 1965; Díaz *et al.* 2012] que principalmente infesta al sapo común (*Bufo bufo*) [Lundbeck 1927] y a la rana común (*Rana temporaria*) [Koskela *et al.* 1974]. Dicha especie presenta una distribución Paleártica, que se extiende hacia el norte de África y China [Rognes 1991]. Además, se suele encontrar con relativa frecuencia en algunos países del centro y oeste de Europa, como Francia, República Checa y Holanda [Fischer 2000; Huijbregts 2002; Séguy 2012], y puntualmente en Dinamarca, y en el sur de Noruega, Suecia y Finlandia [Rognes 1991]. En la Península Ibérica, aunque se sospechaba su presencia desde hacía décadas [Peris & González-Mora 1991; Gosá *et al.* 2009; Díez de Salazar *et al.* 2012], ésta no se pudo confirmar hasta 2012, año en que fueron capturados unos pocos ejemplares inmaduros en la Selva de Irati, bosque de la Comunidad Autónoma de Navarra; una adecuada conservación de los especímenes hizo posible su identificación morfológica a nivel específico [Díaz *et al.* 2012; Díez de Salazar *et al.* 2012]. No obstante, si consideramos la elevada capacidad de desplazamiento de los dípteros miásicos adultos, que puede llegar a ser de 20 o 25 Km al día [Spickler 2012], su detección en las regiones colindantes en las que se encuentren establecidos los anfibios hospedadores, como la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), es una cuestión casi exclusiva de tiempo, así como de esfuerzo de muestreo. Concretamente, cuando se trata de especies miásicas, se hace imprescindible la colaboración de especialistas herpetólogos, mastozoólogos, ornitólogos, etc., con los entomólogos, como en el caso previamente citado.

La investigación aquí realizada confirma la presencia de *L. bufonivora* en la CAPV, y sugiere la utilización de las técnicas moleculares como complemento a las técnicas morfológicas tradicionales y para el control de calidad en las identificaciones basadas

en caracteres anatómicos externos, al requerir éstas de gran preparación y destreza por parte del especialista.

6.2.3. Materiales y métodos

Recientemente se ha llevado a cabo una selección, para su revisión molecular, del 1,3 % de los 25.598 especímenes adultos, capturados mediante trampas de atracción selectiva [Hwang & Turner 2005], en la CAPV, entre Agosto del 2007 y Julio del 2008, y cuyos resultados se encuentran recogidos en el trabajo “Estudio sobre la distribución de Califóridos (Diptera: Calliphoridae) en la CAPV” [Saloña-Bordas *et al.* 2009]. Durante el análisis molecular, se detectó que la secuencia nucleotídica obtenida para uno de los ejemplares recogidos en el entorno rural de Ondarroa (43° 19' 37 N, 02° 24' 52 O), localidad situada a nivel del mar y al noroeste de la provincia de Bizkaia, no presentaba homología con ninguna de las especies de dípteros califóridos habitualmente asociadas a los procesos de reducción cadavérica en la CAPV (*Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. cuprina*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar* o *L. illustris*) [Saloña-Bordas *et al.* 2009]. Ante estos resultados, el espécimen erróneamente etiquetado como *L. illustris* fue revisado y minuciosamente examinado, junto a su secuencia nucleotídica, para determinar la especie a la que pertenecía.

6.2.3.1. Identificación morfológica

La identificación morfológica del espécimen adulto se llevó a cabo bajo la lupa (Motic microscopes SMZ 168, Motic, Barcelona, España), con ayuda de pinzas, alfileres y soportes entomológicos, siguiendo las claves taxonómicas específicas para estadios adultos de Calliphoridae: Luciliinae [Peris & González-Mora 1991; Rognes 1991].

6.2.3.2. Identificación molecular

6.2.3.2.1. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El espécimen adulto que se encontraba preservado en etanol al 70 %, se lavó con una solución de hipoclorito sódico (NaClO, 20 %), para eliminar la contaminación externa [GilArriortua *et al.* 2013]. El ADN se extrajo utilizando el kit comercial Qiagen DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante.

La identificación molecular se hizo amplificando la región *barcode* del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI *barcode*, 658 pb) con los *primers* LCO1490 (5'-TTT CAA CTA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') y HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGA TGA CCA AAG AAT CA-3'), modificados a partir de Folmer *et al.* 1994. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA), utilizando aproximadamente 10 ng de ADN en un volumen final de 25 µl: 0,2 mM dNTP (Bioline, Berlín, Alemania), 1,5 mM MgCl₂ (Bioline, Berlín, Alemania), 0,2 µM de cada *primer*, 1,6 x 10⁻⁴ mg/µl BSA (Bioline, Berlín, Alemania), 1 unidad de Taq polimerasa (Biotaq, Bioline, Berlín, Alemania) y Buffer 1 x (pH: 8,8, Bioline, Berlín, Alemania), bajo las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C, 40 ciclos 94 °C → 30 s, 55 °C → 30 s y 72 °C → 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C durante 5 min.

La separación electroforética y la detección de los productos de la reacción de secuenciación se llevaron a cabo en el Analizador Genético ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas se editaron con el programa BioEdit [Hall 1999] y la búsqueda de homología se realizó con las herramientas informáticas, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), del *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI), y BOLD-IDS (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine), del *Barcode of Life Database* (BOLD).

6.2.4. Resultados y discusión

La región *barcode* de 658 pb del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI *barcode*, 658 pb) se caracterizó satisfactoriamente para el espécimen problema (**Tabla S60**, Material suplementario). Finalmente, el califórido fue molecularmente identificado como *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876, tras realizarse sendas búsquedas BLAST y BOLD-IDS en las bases de datos GenBank y BOLD y obtenerse el 100 % de cobertura, de homología y de similitud con la especie *L. bufonivora*. La nueva secuencia nucleotídica ha sido depositada en la base de datos GenBank con el número de acceso: KF751384.

A su vez, se realizó una revisión morfológica para corroborar la identidad de la especie y confirmar la presencia de los caracteres taxonómicos diagnósticos propios de los adultos de esta especie. En este sentido, el individuo presentó las características específicas de *L. bufonivora*, destacando tórax y abdomen de color verde metalizado, basicosta alar oscura, dos setas acrosticales post-suturales en el tórax, primer y segundo terguito abdominal (TI y TII) más oscuro en contraste con el verde de los sucesivos, tercer terguito abdominal (TIII) con dos recias setas robustas y quinto terguito abdominal (TV) con setas discales [Peris & González-Mora 1991].

Hay que destacar que *L. bufonivora* se desarrolla exclusivamente en anuros vivos y no en sus restos cadavéricos [Brumpt 1934], por lo que su captura en trampas de doble embudo cebadas con víscera animal, aunque parezca un hecho fortuito, puede explicarse por el efecto aglutinador producido por el acúmulo de dípteros, tanto adultos como inmaduros, en torno a un cebo, y que puede inducir la atracción de los califóridos de las proximidades [Ives 1988; Charabidze *et al.* 2011].

6.2.5. Sumario

Este trabajo ha permitido detectar un error de diagnóstico y confirmar la presencia de *Lucilia bufonivora*, en la CAPV. No había sido posible confirmarla hasta la fecha por no haberse conservado en condiciones óptimas las larvas miásicas que permitieran su correcta identificación. Asimismo, constatamos la necesidad de estrechar lazos de colaboración entre especialistas, que posibiliten la detección e identificación, de forma adecuada, las especies causantes de miasis en nuestro país. Por último, consideramos imprescindible complementar los métodos taxonómicos tradicionales con otros alternativos, como los moleculares, más objetivos y precisos, que han demostrado ser de gran utilidad para el control de calidad de los resultados.

6.3. Aportación / Contribution II.III

Identificación a nivel específico e individual de cadáveres mediante el contenido digestivo de larvas necrófagas en casos reales / Identification at specific and individual level of cadavers by means of the digestive content of necrophagous larvae in real cases

“STR and mtDNA analyses of human DNA recovered from crops of blowfly maggots in forensic casework”

International Journal of Legal Medicine (enviada / submitted).

Identificación a nivel específico e individual de cadáveres mediante el contenido digestivo de larvas necrófagas en casos reales

La **aportación II.III** responde al objetivo específico “*Mejorar la efectividad y utilidad del análisis del ADN del hospedador contenido en la evidencia entomológica, para determinar, a nivel específico e individual, la fuente de alimento*”.

Los trabajos presentados hasta el momento se han centrado en el análisis del material genético del insecto. Sin embargo, el insecto se puede utilizar además como reservorio de ADN del hospedador (fuente de alimento), siendo de interés para su identificación tanto a nivel específico como individual. No obstante, hasta la fecha, esta aplicación en el ámbito forense se limita a unas pocas publicaciones, generalmente sobre situaciones simuladas donde se obtienen resultados experimentales ideales y, frecuentemente, de difícil extrapolación a las situaciones reales.

En esta **aportación (II.III)** se estudió la recuperación y el análisis de forma efectiva del ADN del hospedador, contenido en el tracto digestivo de especímenes inmaduros procedentes de casos reales (Alemania: *Westphalia*, IML Münster). La identificación individual humana se hizo utilizando sistemas comerciales de amplificación de *loci* STRs (Mentype® Nonaplex^{QS}, AmpFℓSTR® NGM™ y AmpFℓSTR® MiniFiler™), mientras que el diagnóstico, a nivel de especie, se realizó con el *locus* Cyt-b (307 pb).

Los resultados demostraron que la calidad y cantidad de ADN obtenido estaba condicionada por la apariencia y el tamaño de los buchets. En general, los *loci* STRs amplificados coincidieron con los perfiles de referencia. La caracterización del marcador Cyt-b (307 pb) fue satisfactoria, incluso cuando el genotipado de *loci* STRs falló.

Este trabajo proporciona datos de interés para aumentar la efectividad del análisis del contenido digestivo de insectos necrófagos en casos reales. Así, el ADN del hospedador puede considerarse como un recurso de utilidad para identificar a la

6.3. Aportación II.III

víctima o vincular una evidencia entomológica con un cadáver concreto, bien cuando éste ha sido recolocado o bien cuando concurren varios de diferentes especies.

Este trabajo se encuentra en proceso de publicación en la revista científica *International Journal of Legal Medicine* (ISSN: 0937-9827) con el título “***STR and mtDNA analyses of human DNA recovered from crops of blowfly maggots in forensic casework***”. Dicho artículo se muestra a continuación.

Identification at specific and individual level of cadavers by means of the digestive content of necrophagous larvae in real cases

The **contribution II.III** responds to the specific objective “*To improve the effectiveness and usefulness of the host DNA analysis contained in the entomological evidence, to determine at a specific and individual level the food source*”.

The works presented so far have focused on the analysis of the insect genetic material. However, the insect can be also used as a reservoir of host DNA (food source), being of interest for its identification at both specific and individual level. Nonetheless, to date, this application in the forensic field is limited to few publications, generally on simulated situations from which results are ideal experimentally obtained and, frequently, not translatable to real situations.

In this **contribution (II.III)** the effective recovery and analysis of the host DNA, contained in the digestive tract of immature specimens from real cases was studied (Germany: Westphalia, ILM Münster). Human individual identification was performed using commercial systems for STRs *loci* amplification (Mentype® Nonaplex^{QS}, AmpFℓSTR® NGMTM and AmpFℓSTR® MiniFilerTM), while the diagnostic, at species level, was conducted with the Cyt-b (307 bp) *locus*.

Results demonstrated that the quality and quantity of DNA obtained was conditioned by the crops appearance and size. In general, the amplified STRs *loci* matched the reference profiles. The Cyt-b (307 bp) marker characterization was satisfactory, even when the STRs *loci* genotyping failed.

This work provides data of interest to increase the effectiveness of the crop-content analysis of necrophagous insects in real cases. Thus, the host DNA can be considered as a useful resource to identify the victim or to link entomological evidence to a particular corpse, when it has been relocated or when several of different species concur.

6.3. Contribution II.III

This work is under process of publication in the scientific journal *International Journal of Legal Medicine* (ISSN: 0937-9827) with the title “***STR and mtDNA analyses of human DNA recovered from crops of blowfly maggots in forensic casework***”. This paper is reported below.

6.3.1. Resumen

Las larvas de califóridos recogidas de cadáveres humanos se utilizan frecuentemente, en un contexto forense, para la estimación del intervalo *post-mortem* (IPM). Sin embargo, el contenido digestivo de las larvas, con ADN del hospedador, puede ser también decisivo para determinar la especie o, incluso, la identidad del cadáver. Este estudio se centra en la recuperación y el análisis del ADN humano contenido en la larva, de una forma apropiada y eficiente, que pueda servir de apoyo en las investigaciones criminales. Con este propósito, se recogieron larvas de insectos que presentaban buches con diferente aspecto físico, en cadáveres humanos en diferentes estadios de descomposición. El ADN humano se cuantificó mediante PCR a tiempo real (Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit) y los *short tandem repeats* (STRs) utilizados para la identificación individual se amplificaron con diferentes sistemas comerciales de uso forense (Mentype® Nonaplex^{QS}, AmpFℓSTR® NGM™ y AmpFℓSTR® MiniFiler™). Además, el gen citocromo b (Cyt-b, 307 pb) del ADN mitocondrial (ADNmt) se analizó para determinar, a nivel específico, la fuente de alimento. Nuestros resultados demostraron la influencia de la apariencia y el tamaño de los buches en la cantidad y calidad del ADN extraído del hospedador. Los perfiles STR obtenidos coincidieron con los de referencia. El gen Cyt-b (307 pb) aportó resultados satisfactorios, incluso en las muestras altamente degradadas, cuando el genotipado de *loci* STRs falló. Todos estos hallazgos tienen aplicabilidad para realizar asociaciones en situaciones problemáticas, bien por la ausencia de cadáver, por la existencia de más de una fuente de alimento o por la incierta procedencia del insecto.

Abstract

Blowfly larvae recovered from dead bodies are frequently used, in a forensic context, to estimate the *post-mortem* interval (PMI). However, the gut-content of maggots, with host DNA, may also be decisive to determine the species or, even, the corpse identity. This study aims to recover and analysis of human DNA contained in the larva, in a suitable and efficient way, which may help in criminal investigations. To this end, insect larvae with different crop physical appearance were collected from cadavers in different decomposition stages. Human DNA was quantified by means of real-time PCR (Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit) and short tandem repeats (STRs) used for individual identification were amplified with different forensic commercial systems (Mentype® Nonaplex^{QS}, AmpFℓSTR® NGM™ and AmpFℓSTR® MiniFiler™). Moreover, the cytochrome b (Cyt-b, 307 bp) gene of mitochondrial DNA (mtDNA) was analyzed to determine the food source at specific level. Our results demonstrated the influence of crops appearance and size in the quality and quantity of the DNA extracted from the host. STR profiles obtained matched with reference ones. The Cyt-b (307 bp) gene achieved satisfactory results, even in highly degraded samples when STRs *loci* genotyping failed. All these findings have applicability for establishing connections in complicated situations, either by cadaver absence, by the existence of more than one food source or by the doubtful origin of insect.

6.3.2. Introduction

In forensic caseworks immature insects are commonly used to estimate the period of insect activity (PIA) [Campobasso *et al.* 2005], referred as *post-mortem* interval (PMI). In this, the most important task is the insect identification at species level. However, in several situations, larvae may also be employed as a source of vertebrate DNA. The host DNA recovered from digestive tract of insects may be useful for associating the insect with its last meal [Wells *et al.* 2001a]. In a medical and veterinary context, haematophagous insects meals (blood of living vertebrates) has been widely used to identify the host at species level and at individual level [Coulson *et al.* 1990; Boakye *et al.* 1999; Kreike & Kampfer 1999; Mukabana *et al.* 2002; Curic *et al.* 2014], linking insects with a particular host for epidemiological control purposes. In a forensic context, human DNA has been isolated from lice blood meals [Replogle *et al.* 1994; Lord *et al.* 1998; Mumcuoglu *et al.* 2004], showing its potential to identify suspects involved in sexual assaults. Similarly, necrophagous insects feed on soft tissues of vertebrates through their larval stages [Carvalho *et al.* 2005; Di Luise *et al.* 2008], and crop-content DNA analysis may be critical to associate a specific maggot with a particular corpse when it has been relocated, there is more than one food source at the same place, or the maggot relation with a crime scene is doubtful [Zehner *et al.* 2004a; Campobasso *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2005; Di Luise *et al.* 2008; Sanford 2015]. In addition to its usefulness in murder casework, the crop-content analysis may be used to clarify the insect food source and to detect *ante-mortem* neglects or abandonments [Hall *et al.* 2016]. In forensic laboratories, the human individual identification is routinely performed using short tandem repeats (STRs) of nuclear DNA (nuDNA). The diagnosis over the individual level (species, subspecies or population) rely on mitochondrial DNA (mtDNA) markers, being the cytochrome b (Cyt-b) used to differentiate vertebrate species or subspecies [Zehner *et al.* 1998; Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003], and the hypervariable *loci* (HVI and HVII) of the non-coding

control region or D-loop for human populations [Anderson *et al.* 1981; Sullivan *et al.* 1992].

In this work we examine the relation between crop morphology and colour (pre-extraction), with the host DNA quality and quantity (post-extraction) in maggots from real casework. We also compare the sensibility and efficacy between several forensic PCR multiplex systems for autosomal STRs, when human individual identification is performed using the biological material of insect crop-content. Additionally, we analyzed the mtDNA Cyt-b gene to perform the food source identification at species level. These molecular approaches have applicability to identify the victim or to link a particular maggot with a corpse when the cadaver has been relocated or there is more than one food source.

6.3.3. Materials and methods

6.3.3.1. Sampling, selection and dissection

Maggots were manually collected from two human cadavers, one bloated and the other in advanced decomposition (following the criteria established by Gisbert-Calabuig, 1991), during autopsies performed at the Institute of Legal Medicine of the University Hospital of Münster (Germany). At least 15 actively feeding third-instar larvae (LIII) were selected (from each cadaver), and immediately sacrificed at -20 °C without preservation fluids [Di Luise *et al.* 2008]. Immatures too small for dissection, late third-instar (post-feeding stage) or early pupae with nearly-empty/empty crops were discarded. Each maggot was thoroughly cleaned with a bleach solution (NaClO, 20 %) [Linville & Wells 2002; Campobasso *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2005] to eliminate external contamination and placed into sterilized tubes. Dissections for crop isolation were individually performed under stereomicroscope by cutting off with micro-scissors the posterior segments of the maggot, followed with a ventral incision from posterior to anterior end [Linville & Wells 2002; Campobasso *et al.* 2005]. Then the crop was

easily removed with forceps and deposited in a sterile tube. The insect remains were used for morphological identification using taxonomic keys [Smith 1986; Rognes 1991; Szpila 2010]. Apart from entomological samples, one tissue sample was collected as a reference from each cadaver.

6.3.3.2. Human DNA extraction and quantification

DNA was extracted with the DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Reference samples were extracted in the same way. The amount of DNA extracted was estimated using Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's recommendations.

6.3.3.3. DNA amplification and STR genotyping

Short tandem repeats (STRs) analyses were performed with commercial multiplex amplification systems: Mentype® Nonaplex^{QS} (Biotype, Dresden, Germany), AmpFℓSTR® NGM™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and AmpFℓSTR® MiniFiler™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). In general, we utilized values above 100 pg of DNA (between 100-500 pg) for all the systems. The amplification reactions were carried out following the manufacturer's protocol, but increasing the number of PCR cycles (30-32). Blanks and DNA controls were included to detect possible contamination and to test the proper amplification.

Three µl of each amplification product was analyzed by mixing with 9 µl of Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 0.5 µl of GeneScan™ 500 Liz® Size Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The mixture was denatured by heating 96 °C during 6 min and cooling them at 4 °C during 4 min. Electrophoretic separation and amplicon products detection were performed on ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with an injection

voltage of 1.2 kV and injection time of 16 s. The data analyses were conducted using Genemapper v4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

6.3.3.4. DNA amplification and nucleotide sequencing

The mitochondrial cytochrome b (Cyt-b, 307 bp; *Homo sapiens* NC012920: 14842-15148 positions) locus was amplified with the primer pair L14816 (5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3') and H15173 (5'-CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3') from Parson *et al.* 2000. Amplification and sequencing reactions were performed following the instructions established by GilArriortua *et al.* 2013, but increasing the number of PCR cycles (35-40). Forward and reverse DNA sequences were visualized and manually edited in BioEdit [Hall 1999] to remove primers and reading errors. The protein translation of the coding sequences in MEGA 6 [Tamura *et al.* 2013] presented open reading frames without stop codons. The homology search was done with the BLAST option of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

6.3.4. Results and discussion

The specimens were identified as belonging to the species *Phormia regina* (Meigen, 1826), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758) and *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758). The third-instar larvae measured from 1.0 to 1.5 cm in length, while their crops ranged between 2-5 mm of size (**Tables S61-S62**, Supplementary material). Similar crop sizes were successfully used in a previous study with *C. vicina* [Di Luise *et al.* 2008]. Moreover, it should be considered that the crop size varies depending on the species immature final size.

The extracted host DNA range was about 4-124 pg/μl (**Tables S61-S62**, Supplementary material). In general, there is a positive correlation between the crop size and the amount of DNA extracted [Clery 2001; Campobasso *et al.* 2005].

However, occasionally, smaller crops got better quantification results than bigger ones (**Tables S61-S62**, Supplementary material). It is noticed that the tissues decomposition of food source has a negative influence in DNA quality and quantity recovered from crop-content. Thus, crop appearance has an important effect on the extraction success. Crops full and bright (red coloured) from the relatively fresher tissues (first corpse) showed higher DNA quantifications (12-124 pg/ μ l) than similar crops from the advanced decomposition tissues (second cadaver) (7-8 pg/ μ l) (**Tables S61-S62**, Supplementary material). Noteworthy, within Diptera, Cyclorrhapha (Muscidae, Fanniidae, Calliphoridae and Sarcophagidae) maggots have a crop, food storage organ, where no enzymes are secreted [Clery 2001; Zehner *et al.* 2004a; Campobasso *et al.* 2005]. Any digestion in the crop is due to the salivary enzymes action secreted during the pre-oral digestion process [Kettle 1995; Zehner *et al.* 2004a], which do not have a significant effect on degradation [Kondakci *et al.* 2009]. Thus, the crop appearance is directly related to the degradation state of the food source.

In the present study, nearly full STR profiles were generally obtained for crops from less decomposed tissues (first cadaver) with higher amount of DNA. However, more incomplete STR profiles were obtained for crops from more decomposed tissues (second corpse). All obtained *loci* matched the homologous ones in reference profiles. Moreover, it has been observed a difference in amplification success between STR *loci* with different amplicon length (short and long). The genotyping failure may be due to the highly degradation of crop-DNA. When Mentype® Nonaplex^{QS} and AmpF ℓ STR® NGMTM multiplex amplification systems (with longer STRs *loci*) obtained incomplete STR profiles or failed in amplification, AmpF ℓ STR® MiniFilerTM (with shorter STRs *loci*) increase the reportable alleles (**Table S63**, Supplementary material). This amplification strategy allows completing the profiles, increasing the number of genotyped alleles. Additionally, mitochondrial Cyt-b (307 bp) molecular marker of crop-content DNA sequencing was successfully performed allowed to associate the

maggot with a food source of human origin, even in highly degraded samples in which STR genotyping failed (**Table S64**, Supplementary material). GenBank database Blast search tool matches achieved showed a 100 % of identity with *Homo sapiens* Linnaeus, 1758, being the coverage also of 100 % (**Table S65**, Supplementary material).

It is worth mentioning that although for some authors the *post-mortem* interval stage appeared not to influence on the quality of DNA results [Zehner *et al.* 2004a; Campobasso *et al.* 2005], only exceptionally human STRs have been successfully obtained for long term *post-mortem* periods (after 4 months in winter) [Zehner *et al.* 2004a]. The fact is that tissue conditions are directly related to the host DNA degradation degree, and the main factor to obtain complete, partial or no profiles [Hoff-Olsen *et al.* 2001]. However, it is important to interpret each finding (STR genotyping or DNA sequencing) with regard to each specific case. Further studies should be conducted to better understand how food source decomposition stage, as well as crop size and appearance, could influence the gut-content DNA analysis. Moreover, future research also demands to use the latest human individualizations approaches based on mitochondrial and nuclear SNP analysis [Sánchez *et al.* 2006; Kondakci *et al.* 2009; Köhnmann & Pfeiffer 2011] as well as massive parallel sequencing (MPS) [Elena *et al.* 2016] when other methods failed in gut-content DNA analysis.

6.3.5. Summary

This work obtains useful data about the critical steps for the successful analysis of insect last meal DNA. Here we examine the influence of crop appearance and DNA genotyping strategies (STR profiles and mtDNA sequences) to yield useful DNA information from crop-content. One of the main factors for the extraction success seems to be the crop size and appearance. Full crops with bright red colour obtained higher amount of DNA with better quality. Moreover, DNA genotyping success

decreased with increasing decomposition stage of the food source. Dealing with highly degraded DNA Mini STRs multiplex systems (AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ MiniFiler TM) analysis obtains better results. However, when STR genotyping fails, mtDNA analysis (Cyt-b) seems to be the best way to achieve satisfactory results, at least for host species identification.

This work contributes new valuable data about the host DNA analysis from maggots' crops, increasing the effectiveness of the entomological evidence molecular analysis. This is a decisive issue, especially when it is applied as an investigative tool in real caseworks to identify corpses or link the cadaver with a particular specimen, for PMI estimation. Further studies should be performed on this approach to test the SNP analysis and to individualize biological material in highly degraded samples.

6.4. Aportación / Contribution II.IV

Protocolo de actuación en entomología forense (bilingüe:
Castellano / Euskera) / Action protocol in forensic
entomology (bilingual: Spanish / Basque)

“Protocolo de actuación para la recogida y registro de muestras entomológicas en una investigación pericial forense / Auzitegi ikerkuntza perizialetan lagin entomologikoen bilketa eta erregistrorako jarduera protokoloa”

Eguzkilore, 2014, 28: 275-286

Protocolo de actuación en entomología forense (bilingüe: Castellano / Euskera)

La **aportación II.IV** responde al objetivo específico “*Elaborar unas directrices básicas que permitan la integración de la entomología forense como un proceso más en las investigaciones criminales que se lleven a cabo en la CAPV*”.

En este último trabajo, como colofón al recorrido realizado en esta ciencia forense, y contando con la experiencia adquirida durante el mismo, hemos tratado de plasmar nuestros conocimientos y recomendaciones para una buena práctica en las primeras etapas de la investigación entomológica (inspección, recogida y procesamiento).

En esta **aportación (II.IV)** se proporcionan las pautas básicas (en versión bilingüe, Castellano/Euskera) que siguen los estándares internacionales, sobre los procedimientos a seguir durante la recogida y procesamiento de evidencias entomológicas para que tengan validez ante un Tribunal de Justicia. Asimismo, se incluye un formulario para el registro de la información más relevante a tener en cuenta.

Cabe destacar que esta guía simplificada puede servir para proporcionar una mejor cobertura de los requerimientos, en el ámbito de la entomología forense, en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). Ésta es una cuestión de relevancia si tenemos en cuenta la transferencia de competencias a la CAPV.

Este trabajo se ha publicado en la revista científica *Eguzkilore (Cuaderno del Instituto Vasco de Criminología)* (ISSN: 0210-9700) con el título “***Protocolo de actuación para la recogida y registro de muestras entomológicas en una investigación pericial forense/Auzitegi ikerkuntza perizialetan langin entomologikoen bilketa eta erregistrorako jarduera protokoloa***”. Dicho artículo se muestra a continuación.

6.4. Contribution II.IV

Action protocol in forensic entomology (bilingual: Spanish / Basque)

The **contribution II.IV** responds to the specific objective “*To elaborate basic guidelines that enable the integration of forensic entomology as a further process in criminal investigations carried out in the Basque Country*”.

In this last work, as the culmination to the tour undertaken on this forensic science, and with the experience gained during it, we have tried to capture our knowledge and recommendations for good practice in the early stages of entomological research (inspection, collection and processing).

In this **contribution (II.IV)** there are provided basic guidelines (in bilingual version, Spanish/Basque) according to international standards, about the procedures to be followed during the collection and processing of entomological evidence in order to have validity at a Court of Justice. Moreover, it is included a form for recording the most important information to be considered.

Notice that this simplified guide may serve to provide better coverage of these requirements, in the field of forensic entomology, in the Basque Country. This is an issue of relevance if we consider the transfer of powers to the Basque Country.

This work has been published in the scientific journal *Eguzkilore (Cuaderno del Instituto Vasco de Criminología)* (ISSN: 0210-9700) with the title “***Protocolo de actuación para la recogida y registro de muestras entomológicas en una investigación pericial forense/Auzitegi ikerkuntza perizialetan langin entomologikoen bilketa eta erregistrorako jarduera protokoloa***”. This paper is shown below.

6.4.1. Resumen

Los artrópodos asociados a restos cadavéricos aportan información fundamental para la estimación del intervalo *post-mortem* (IPM). Por ello, su recolección es imprescindible durante una investigación pericial. En este trabajo, se presentan unas pautas básicas sobre los procedimientos a seguir durante la inspección, recogida y preservación de evidencias de origen entomológico, tanto en el lugar de los hechos como durante la posterior autopsia, que aseguren la fiabilidad y validez de dichas evidencias ante un Tribunal de Justicia. Asimismo, se adjunta la ficha de registro elaborada para permitir una recogida sencilla de la información complementaria que pueda resultar esencial para la adecuada interpretación de las evidencias entomológicas.

Abstract

Arthropods associated to cadaveric remains provide relevant information for the *post-mortem* interval (PMI) estimation. Therefore, their collection is necessary during a forensic investigation. In this work, we provide basic guidelines about procedures to be followed during the inspection, collection and preservation of entomological evidence, both at the crime scene and during the autopsy, ensuring the reliability and validity of such evidences at a Court of Justice. Furthermore, it is attached a registration form which simplify the collection of additional information essential for the proper identification of the entomological evidence.

6.4.2. Introducción

La entomología forense estudia los artrópodos que pueden considerarse como evidencias en los procesos legales [Hall 1990; Amendt *et al.* 2011], incluidos los problemas civiles derivados de la contaminación de mercancías, inmuebles, etc. [Catts & Goff 1992; Byrd & Tomberlin 2001; Arnaldos *et al.* 2006]. No obstante, en la práctica, esta disciplina se aplica principalmente a casos de fallecimientos que requieran de una investigación de las causas de la muerte [Catts & Goff 1992; Byrd & Tomberlin 2001; Amendt *et al.* 2011]. De esta forma, el conocimiento de la distribución, biología y comportamiento de los insectos encontrados en un cadáver puede ser utilizado como apoyo, en las investigaciones forenses, para determinar el tiempo, lugar y modo en el que se produjo el crimen o la muerte [Anderson 1997; Campobasso & Introna 2001; Greenberg & Kunich 2002]. En la actualidad, el papel más relevante de esta ciencia forense es la estimación del intervalo *post-mortem* (IPM) [Nuorteva 1977; Greenberg 1991; Dadour *et al.* 2001; M de Pancorbo *et al.* 2006]. Del mismo modo, el adecuado conocimiento de los insectos presentes en un determinado entorno puede ayudar a estimar el origen, tiempo y tipo de contaminación de alimentos, muebles y otros enseres [Catts & Goff 1992; Byrd & Tomberlin 2001]; incluso de personas dependientes como enfermos, ancianos, niños (en casos asociados a miasis) [M de Pancorbo *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2011], y de otras especies animales (ganado, mascotas, etc.). Por ello, toda la información obtenida durante la recogida de muestras de origen entomológico puede ser de gran utilidad para el desarrollo de la investigación pericial.

En este sentido, al igual que las huellas dactilares, pelos, fibras o muchos otros vestigios biológicos, los especímenes de insectos deberían considerarse como evidencias físicas [Lord & Burger 1983; Amendt *et al.* 2007], tanto en el lugar del suceso como durante una autopsia, siendo debidamente recolectadas, procesadas, registradas, almacenadas y custodiadas [Catts & Haskell 1990; Haskell *et al.* 2001].

Recientemente, algunos trabajos han puesto de manifiesto la importancia de la calidad de las evidencias en la ciencia forense [Randall *et al.* 1998; Ritz-Timme *et al.* 2000]. Por ello, es fundamental tener un especial cuidado durante las etapas más críticas de la toma de muestras entomológicas, recolección, procesamiento y preservación, para prevenir tanto la contaminación como el deterioro o destrucción de dichas evidencias [Amendt *et al.* 2007]. Además, el mantenimiento de la cadena de custodia es esencial para asegurar la validez de las mismas [Amendt *et al.* 2007; Ramos-Pastrana *et al.* 2012].

Así, la aplicación de la entomología a las investigaciones forenses requiere de especialistas con formación previa, entrenamiento y destreza [Arnaldos *et al.* 2006]. Dado que la toma de muestras entomológicas debería de considerarse una rutina más durante una pesquisa, resulta necesario el adiestramiento del personal adscrito a los Organismos Oficiales pertinentes, como peritos forenses, agentes forestales y fuerzas policiales, en conocimientos entomológicos básicos, especialmente en lo referido al procedimiento de recogida y conservación de dichas evidencias [Klotzbach *et al.* 2004; Arnaldos *et al.* 2006].

Además, teniendo en cuenta la transferencia de competencias a la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), resulta fundamental disponer de guías simplificadas de consulta, centradas en la toma y el procesamiento de muestras, que tengan en cuenta los estándares internacionales, no solo por su utilidad y aplicabilidad, sino también para proporcionar una mejor cobertura a las necesidades que surjan en el ámbito de la entomología forense.

Este trabajo proporciona un protocolo de actuación en edición bilingüe (Castellano/Euskera), siguiendo estándares internacionales, que sirva de modelo para la recogida y procesamiento de muestras entomológicas en la CAPV, y como referencia en la formación de nuevos colaboradores. Es además, una introducción simplificada de la metodología entomológica de trabajo en el ámbito forense.

6.4.3. Protocolo de actuación

Para la realización de exámenes entomológicos de calidad, los expertos recomiendan seguir estrictamente determinados estándares y guías de trabajo [Amendt *et al.* 2007; Byrd *et al.* 2010], y disponer del material e indumentaria adecuados. La mayoría del material referido a continuación se puede adquirir en la red comercial habitual, siendo conveniente mantenerlo preparado y revisado hasta el momento de su utilización.

6.4.3.1. Equipamiento, herramientas y conservantes

Para la recogida de evidencias entomológicas se recomienda vestir ropa de protección adecuada, que evite la exposición a posibles agentes infecciosos y la contaminación cruzada, por transferencia, entre el investigador y el entorno [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007]. En general, es imprescindible el uso de buzo, calzas, gorro, guantes desechables, mascarilla y gafas protectoras [Amendt *et al.* 2007].

Para la recogida de evidencias entomológicas y el registro de la información asociada, se recomienda disponer del siguiente equipamiento [Amedt *et al.* 2007, 2011; Ramos-Pastrana *et al.* 2012]:

1. Formulario de toma de muestras en el que se registre toda la información.
2. Lapicero de grafito o bolígrafo de tinta resistente al agua y al alcohol.
3. Etiquetas para identificación y registro de cada muestra.
4. Cinta adhesiva, para el fijado de etiquetas en el exterior de los viales.
5. Viales y botes de almacenamiento de diferentes tamaños para preservar los especímenes, a ser posible de cierre hermético que eviten pérdidas del conservante.
6. Pinzas que ejerzan diferentes niveles de presión.
7. Cucharillas desechables para la recogida masiva de los primeros estadios (huevos, larvas LI-II).

8. Pinceles finos para la recogida selectiva de huevos y ácaros.
9. Mangas entomológicas para la captura de dípteros adultos en el lugar de los hechos.
10. Cámara de fotos (o de vídeo) para la documentación fotográfica.
11. Termómetro electrónico para el registro de la temperatura ambiental, del suelo y del cadáver durante la toma de muestras.
12. *Datalogger* para el registro de las temperaturas del lugar durante un periodo de 5 a 10 días tras la inspección.
13. Etanol (alcohol) para preservar los especímenes (adultos 70 % e inmaduros 80-95 %).
14. Rastrillo de mano para remover y recoger la tierra del entorno del cadáver y bajo él.
15. Bolsas de plástico para el transporte de las muestras de tierra.

6.4.3.2. Toma de muestras entomológicas

Las evidencias entomológicas únicamente tendrán valor si son recolectadas, etiquetadas, procesadas y almacenadas de forma adecuada. Por ello, la recogida de la información asociada a la muestra es fundamental. Se deberán anotar datos como fecha, hora, lugar de recogida y su entorno, así como, detalles del individuo, sexo, edad aproximada y situación, entre otros [Wolff & Pérez 2003; Arnaldos *et al.* 2006]. En las páginas finales de este documento se adjunta un modelo de formulario.

En el cadáver y su entorno

Normalmente, la colonización de las diferentes regiones corporales es secuencial y cumple un patrón definido. Las primeras zonas del cuerpo donde ovopositan los insectos son los orificios naturales (ojos, nariz, boca, oídos, ano o zona genital) [Wolff & Pérez 2003; Amendt *et al.* 2011]. Cualquier otra área en la que aparezcan

larvas durante los estadios tempranos de descomposición, seguramente están indicando la presencia de heridas [Wolff & Pérez 2003; Amendt *et al.* 2011].

Además, hay que considerar que los diferentes orificios naturales y regiones corporales de un cadáver pueden estar infestados por especies diferentes; por ello, todos deben examinarse y muestrearse minuciosamente [Amendt *et al.* 2011]. Si el cuerpo estuviera vestido, envuelto o introducido en una bolsa, todos estos materiales y tejidos deberán inspeccionarse [Arnaldos *et al.* 2006; Byrd *et al.* 2010].

La toma de muestras en las diferentes regiones corporales tiene que ser identificada y distribuida en diferentes viales etiquetados, especificando su procedencia.

Los muestreos deben incluir [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007, 2011; Ramos-Pastrana *et al.* 2012]:

- Los orificios naturales y los ojos (sitios preferidos de ovoposición).
- Las heridas traumáticas (sitios preferidos de ovoposición).
- La zona debajo del cadáver y su entorno.
- Los materiales en los que se encontraba el cuerpo envuelto.
- La bolsa en la que los restos cadavéricos se han almacenado hasta el momento de la autopsia.

La toma de muestras, en el cadáver, tiene que ser homogénea, no sólo de las zonas donde se concentran los insectos [Arnaldos *et al.* 2006]. Hay que recoger especímenes de todos los tipos, formas y tamaños (huevos, larvas pequeñas y grandes, pupas y adultos), utilizando diferentes viales para cada tipo de insecto, tamaño y lugar de muestreo [Amendt *et al.* 2007, 2011]. El muestreo no debe limitarse a las larvas más grandes, aunque en teoría sean las más antiguas. Algunas veces, las larvas pequeñas de una especie, son más antiguas que las grandes de otras especies [Amendt *et al.* 2011]. También es muy importante recolectar los puparios

vacíos, ya que pertenecen a insectos que han completado el desarrollo, y pueden proporcionar una idea sobre la primera oleada de colonización [Wolff & Pérez 2003; Amendt *et al.* 2011].

El tamaño de muestra depende del número de especímenes que se encuentren; como orientación, del 1 % al 10 %, cuando el número presente es elevado, aumentando el porcentaje al disminuir el número de individuos [Amendt *et al.* 2007].

Además, se recomienda muestrear los adultos cuando estén presentes, en especial, de dípteros y de coleópteros. Los adultos de dípteros recientemente emergidos se reconocen por su color grisáceo, alas recogidas [Amendt *et al.* 2007], y aspecto similar a una araña. Asimismo, también es recomendable recoger los insectos muertos que se encuentren en el entorno cadavérico [Amendt *et al.* 2007].

Registro y etiquetado de muestras

- Anotar el tiempo de comienzo y finalización de la toma de muestras con la mayor precisión posible.
- Especificar el código del muestreo, asignándole un número o nombre. Este código servirá de referencia para el caso en el futuro, y se debe indicar en todas las muestras.
- Recoger las larvas de morfologías y tamaños diferentes utilizando unas pinzas suaves y colocarlas en viales separados según su morfología y región corporal de la que proviene [Magaña 2001; Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007]. Esta disposición selectiva es muy importante ya que, por ejemplo, las larvas de coleópteros se alimentan habitualmente de larvas de dípteros y los estadios inmaduros de algunos dípteros, como *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), son caníbales.

- Etiquetar cada muestra indicando el código del caso, la región corporal de origen y el número de muestra [Magaña 2001]. Para evitar pérdidas, duplicar el etiquetado colocando una etiqueta en el exterior y otra en el interior del recipiente.
- Escribir una relación de las muestras recogidas, indicando el código de muestreo, el modo de conservación, etc.

Es muy importante considerar que una muestra previamente sin etiquetar será posteriormente invalidada, dado que no podrá ser relacionada de forma indubitada con el caso forense [Arnaldos *et al.* 2006]. Por ello, se debe tener especial cuidado en incluir en cada muestra, una etiqueta que contenga la siguiente información (**Fig. 21**):

Código del Caso:
Código de la muestra:
Lugar:
Fecha:
Hora:
Recolector/-a:

Fig. 21. Modelo de etiqueta.

Toda la información complementaria a esta etiqueta se incluirá en el formulario de registro del muestreo detallado al final de este documento. Cualquier descripción general de las condiciones del cadáver, puede ser de gran utilidad, especialmente si está complementada con documentación fotográfica o de video [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2004, 2011]. Si es posible, se recomienda el registro de la temperatura ambiental durante los días posteriores (de 5 a 10 días), al descubrimiento del cadáver [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007, 2011]. Toda esta información es fundamental para realizar una estimación más precisa del IPM [Wolff & Pérez 2003].

6.4.3.3. Método de preservación de evidencias entomológicas

En el caso de que los individuos recolectados, adultos e inmaduros, estén muertos, deberán ser preservados en etanol (70 % adultos y 80 % estadios inmaduros) [Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2007, 2011]. Se utiliza etanol como

conservante por razones de salud y seguridad. No es recomendable el uso de otras sustancias químicas, como la formalina, el formaldehído o el etilacetato, por su menor eficacia, al alterar los tejidos y tener un efecto negativo en la calidad del ADN, lo que puede dificultar la identificación tanto morfológica como molecular [Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2007, 2011].

Si es posible, se recomienda la recolección de especímenes vivos en las diferentes fases de desarrollo presentes.

- Huevos:

Colocar los huevos, sobre papel humedecido, en viales que permitan el flujo de aire [Amendt *et al.* 2007]. Transferir las muestras a un recipiente con sustrato adecuado para su cría. Si no fuera posible, sacrificar y preservar todos los especímenes en etanol 70-95 % [Amendt *et al.* 2007].

- Inmaduros (Larvas):

Se almacenará la mayoría de los individuos de cada muestra bajo condiciones controladas (temperatura y humedad) [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007]. Se recomienda mantenerlos refrigerados (2-6 °C), para ralentizar su desarrollo, hasta el momento de su examen [Amendt *et al.* 2007, 2011]. Los recipientes de almacenaje permitirán la entrada de aire y evitarán la fuga de las larvas [Amendt *et al.* 2007, 2011]. Se colocará un papel de filtro en el fondo del recipiente para absorber los fluidos producidos por las larvas [Amendt *et al.* 2007, 2011]. Tras su examen, los inmaduros vivos se deben transferir, lo antes posible, a un contenedor adecuado para su cría.

Los inmaduros restantes deberán sacrificarse según las siguientes pautas:

Los especímenes se colocarán en agua muy caliente (80-100 °C) [Tantawi & Greenberg 1993; Adams & Hall 2003] al menos durante 30 segundos (se recomienda de 1 a 2 minutos, en función del tamaño) [Adams & Hall 2003]. Este

procesamiento acondiciona los tejidos y destruye la protección cuticular que impediría la penetración del conservante (etanol 80-95 %) [Adams & Hall 2003]. En caso de no disponer de medios para calentar el agua, las larvas serán sacrificadas mediante congelación (-20 °C) y en seco [Amendt *et al.* 2007]. En ningún caso se deben sacrificar las larvas de díptero sumergiéndolas directamente en etanol (a temperatura ambiente), al quedar inservibles en menos de una semana (por encogimiento, oscurecimiento y putrefacción) [Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2007].

Los coleópteros inmaduros se sacrificarán sometiéndolos a temperaturas de congelación (-20 °C) o directamente en etanol (70 %) [Midgley & Villet 2009; Amendt *et al.* 2011].

- Pupas:

Las pupas se mantendrán bajo condiciones controladas de temperatura y humedad para su cría [Amendt *et al.* 2007]. La tapa del contenedor deberá permitir el flujo de aire.

Las pupas se sacrificarán y conservarán directamente en etanol (70 %). Los puparios vacíos se preservarán de la misma manera.

- Adultos:

Los adultos vivos se sacrificarán sometiéndolos a temperaturas de congelación (-20 °C) [Amendt *et al.* 2007], durante un periodo de tiempo de 30 minutos a 1 hora. Después se pueden preservar en etanol 70 %, que evita el endurecimiento de las membranas articulares y la fragilidad de las articulaciones, o en seco, utilizando alfileres y cajas entomológicas [Amendt *et al.* 2007], y salvaguardando el material del ataque de otros insectos necrófagos.

Los adultos recogidos con manga entomológica en el lugar de los hechos se sacrificarán directamente en etanol 70 %.

6.4.2. Sarrera

Auzitegi entomologiak lege prozesuetan parte hartzen duten artropodoak aztertzen ditu, merkantzia, eraikuntza eta bestelakoetan sortutako kontaminazioetatik eratorritako arazo zibilak barne [Hall 1990; Catts & Goff 1992; Byrd & Tomberlin 2001; Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2011]. Dena den, praktikan heriotzarekin erlazionatutako kausen azterketa behar duten hildakoen kasuetan batez ere erabiltzen da [Catts & Goff 1992; Byrd & Tomberlin 2001; Amendt *et al.* 2011]. Era honetan, gorpu batetan aurkitutako intsektuen sakabanaketa, biologia eta jokaeraren ezaguera laguntza bezala erabili daiteke auzitegi-ikerkuntzetan krimena edo heriotza noiz, non eta nola gertatu zen zehazteko [Anderson 1997; Campobasso & Introna 2001; Greenberg & Kunich 2002]. Gauzak horrela, Auzitegi Zientzia honen zeregin garrantzitsuenak *post-mortem* tartearen (PMT) estimazioa zehaztea da [Nuorteva 1977; Greenberg 1991; Dadour *et al.* 2001; M de Pancorbo *et al.* 2006]. Era berean, ingurune jakin batean dauden intsektuen ezaguera zuzenak elikagaien, altzari eta beste tresnen [Catts & Goff 1992; Byrd & Tomberlin 2001], baita ume, elbarri edota ahurrak bezalako mendeko pertsonen kutsaduraren jatorria, iraupena eta mota estimatzen lagundu dezake (miasis kasuetan) [M de Pancorbo *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2011]. Hori dela eta, gorpu batetatik laginak jasotzeko informazio guztia mendeko pertsonen, altzari eta beste elementuen peritaziorako erabili daiteke.

Intsektu espezimenak ebidentzia fisiko bezala kontsideratu behar dira, hatz-markak, ileak, zuntzak eta bestelako material biologikoak bezala [Lord & Burger 1983; Amendt *et al.* 2007], bai gertaerak eman diren lekuan baita autopsian bertan, eta bermatuz, prozesatuz, erregistratuz eta baldintza egokietan biltegitatuz behar dira [Catts & Haskell 1990; Haskell *et al.* 2001].

Duela gutxi, zenbait lanek Auzitegi Zientzian ebidentzien kalitateak daukan garrantzia adierazi dute [Randall *et al.* 1998; Ritz-Timme *et al.* 2000]. Hau dela eta, derrigorrezkoa da kontu handiz ibiltzea lagin bilketaren etapa kritikoetan, batez ere

jasotze prozesuan, prozesatzean eta preserbatzean, laginen kutsadura eta suntsipena ekiditeko [Amendt *et al.* 2007]. Horren beste, haien balioa ziurtatzeko zaintza-katea bermatzea garrantzitsua da [Amendt *et al.* 2007; Ramos-Pastrana *et al.* 2012].

Auzitegi-ikerkuntzetarako entomologiaren aplikazioak aldez aurretiko heziketa, prestakuntza eta trebezia dauzkaten adituak behar dituela kontuan hartu behar da [Arnaldos *et al.* 2006]. Dena den, ikerketa batean lagin entomologikoen bilketa errutina bat bezala kontsideratu beharko litzatekeenez, beharrezkoa da perituen, basozainen, polizia gorputzen eta bestelako erakunde ofizialen heziketa oinarrizko ezagutza entomologikoan, batez ere ebidentzia hauen bilketa eta kontserbazioan [Klotzbach *et al.* 2004; Arnaldos *et al.* 2006].

Gainera, EAEk jasotako eskuduntzak kontuan hartuz, ezinbestekoa da laginen bilketan eta prozesatzean oinarritutako kontsulta-gida sinplifikatuak izatea, estandar internazionalak kontutan dauzkatenak, ez soilik beraien erabilera eta aplikagarritasunagatik, baizik eta estaldura hobeagoa emateko auzitegi entomologia arloan sortu diren beharrezane.

Lan honek estandar internazionalen araberako jarduera protokolo bat aurkezten du, laginen bilketan eta prozesatzean eredu bezala eta kolaboratzaile berrien heziketan erreferentzi bezala erabili daitekeena. Honetaz gain, auzitegi arloko metodologia entomologikorako sarrera sinplifikatua da.

6.4.3. Jarduera protokoloa

Kalitatezko azterketa entomologikoak egiteko, adituek estandar eta lan gidak hertsiki jarraitzea aholkatzen dute [Amendt *et al.* 2007; Byrd *et al.* 2010], eta material eta lanabes egokiak edukitzea. Hurrengo lerroetan zehaztutako material gehiena ohizko saltzaile komertzialengandik eskuratu daiteke, erabili behar direnerako prest edukitzeko.

6.4.3.1. Ekipamendu, tresna eta kontserbagarriak

Ebidentzia entomologikoen bilketan babeserako janzkera aproposa erabiltzea aholkatzen da, ikertzaile eta inguruaren arteko kutsadura gurutzatua saihesteko eta potentzialki infekziosoak diren agenteekiko esposizioa ekiditeko [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007]. Orokorrean, derrigorrezkoa da lan-jantzi, galtza, kapela, eskularru, maskara eta babes-betaurrekoen erabilera [Amendt *et al.* 2007].

Ebidentzia entomologikoak biltzeko eta erlacionatutako informazioaren erregistrorako, hurrengo ekipamendua edukitzea gomendatzen da [Amendt *et al.* 2007, 2011; Ramos-Pastrana *et al.* 2012]:

1. Laginen bilketarako formularioa, non informazio guztia erregistratuko da.
2. Grafitozko arkatza edo ura eta alkoholarentzat erresistentea den boligrafoa.
3. Laginen identifikazio eta erregistrorako etiketak.
4. Zinta itsaskorra, etiketak poteen kanpoaldean itsasteko.
5. Aleak gordetzeko tamaina ezberdinetako Saio-hodi eta poteak, ahal den heinean itxiera hermetikoa daukatenak, kontserbagarriaren jarioak ekiditeko.
6. Presio maila ezberdinak egiten duten pintzak.
7. Fase heldugabeak (arrautzak, larbak LI-LII) era masiboa batzeko erabili eta botatzeko koilaratxoak.
8. Akaro eta arrautzen bilketa selektiborako pintzel meheak.
9. Gertaerako lekuan diptero helduko harrapaketakako mahuka entomologikoak.
10. Argazki- dokumentaziorako argazki- kamera (edo bideo-kamera).
11. Termometro elektronikoa ingurune, zoru eta gorputzaren tenperatura neurtzeko, lagin bilaketaren bitartean.
12. Bostik hamar egunera bitarteko ingurune tenperaturaren erregistrorako *Datalogger*.

13. Beheratutako etanola (alkohola) aleen kontserbaziorako (% 70 helduentzat eta % 80 heldugabeentzat).

14. Eskuko arrastelua gorpuaren azpiko eta inguruko lurra eragiteko eta batzeko.

15. Plastikozko poltsak gorpu azpiko lur-laginak garraiatzeko.

6.4.3.2. Lagin entomologikoak bilketa

Ebidentzia entomologikoak baliozkoak izango dira ahalik eta behar bezala jasoak, etiketatuak eta metatuak izan badira. Horregatik, derrigorrezkoa da laginari buruzko informazioa biltzea. Data, ordua, bilketa lekua, ingurunearen deskribapena, indibiduoaren ezaugarriak, sexua, gutxi gorabeherako adina eta kokapena, besteak beste, erregistratu behar dira [Wolff & Pérez 2003; Arnaldos *et al.* 2006]. Dokumentu honen azken orrialdeetan formulario baten eredia eranstean da.

Gorpuan eta bere ingurunean

Normalean, gorputzaren erregio ezberdinetako kolonizazioa sekuentziala da eta patroia jakin bat betetzen du. Intsektuek arrautzak erruten dituzten lehenengo lekuak zulo naturalak (begiak, sudurzuloak, ahoa, uzkia eta zonalde genitala) dira [Wolff & Pérez 2003; Amendt *et al.* 2011]. Bestelako zonalde batetan deskonposizio fase goiztiarretan larbak aurkitzeak segur aski, zaurien adierazle izango litzateke [Wolff & Pérez 2003; Amendt *et al.* 2011].

Gainera, kontuan izan behar dugu gorpu baten zulo natural eta zonalde ezberdinak espezie ezberdinengandik kolonizatuak egon daitezkeela [Amendt *et al.* 2011]. Hori dela eta, guztiak aztertu eta lagindu behar dira. Gorpua jantzita, estalita edota poltsa batetan sartuta egotekotan, material eta ehun guzti hauek aztertu beharko lirateke [Arnaldos *et al.* 2006; Byrd *et al.* 2010].

Gorputzeko zonalde ezberdinetako laginketak beraien jatorria azalduz etiketatu, identifikatu eta saio-hodi ezberdinetan sartuak izan beharko lirateke.

Laginketetan egon behar dira [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007, 2011; Ramos-Pastrana *et al.* 2012]:

- Zulo naturalak eta begiak (Arrautzak erruteko leku gogokoenak)
- Zauri traumatikoak (Arrautzak erruteko leku gogokoenak)
- Gorpu azpian eta bere inguruan.
- Egotekotan, gorpua estaltzen zituzten materialak.
- Autopsia egin baino lehen bertan gorpua gorde zen poltsa.

Gorpuan, laginketa homogenea izan behar da, ez soilik intsektuak kontzentratzen diren tokietan [Arnaldos *et al.* 2006]. Mota, tamaina eta itxura ezberdineko aleak jaso behar dira (arrautzak, larba txiki zein handiak, pupak eta helduak), saio-hodi ezberdinak erabiliz intsektu mota, tamaina eta laginketa leku ezberdinetarako [Amendt *et al.* 2007, 2011]. Laginketa ez da soilik larba handienetara mugatu behar, nahiz eta teoriar zaharrenak izan. Batzuetan, espezie jakin bateko larba txikiak beste espezie baten larba handiagoak baino zaharragoak dira [Amendt *et al.* 2011]. Baita ere, oso garrantzitsua da pupario hutsak batzea, bizi zikloa amaitu duten intsektuen adierazleak direlako eta gorpua kolonizatu zuten lehenengo intsektuei buruzko informazioa eman dezaketelako [Wolff & Pérez 2003; Amendt *et al.* 2011].

Jaso behar den laginaren tamaina aurkitutako larba kopuruaren arabera izango da, % 1etik % 10era, kopurua handia denean, eta proportzio hau handituz joango da aurkitutako larben kopurua txikitu ahala [Amendt *et al.* 2007].

Gainera, aholkatzen da helduak daudenean, bai dipteroak baita koleopteroak, lagintzea. Dipteroen heldu garatu berriak beraien metalezko gris kolorearengatik eta garaturik ez dauden hegoengatik ezagutzen dira [Amendt *et al.* 2007], armiarma baten antza izan dezaketelarik. Honetaz gain, gorpuaren inguruan aurkitutako intsektu hilak batzea ere gomendagarria da [Amendt *et al.* 2007].

Laginen Erregistroa eta Etiketen Kokapena

- Laginketaren hasiera eta amaiera ordua erregistratu ahal den zehaztasun guztiarekin.
- Laginaren kodea espezifikatu, izen edo zenbaki baten bitartez. Kode hau erreferentzi gisa erabiliko da etorkizunean kasurako, eta lagin guztietan adierazi behar da.
- Tamaina eta morfologi ezberdinetako larbak batu pintza leunekin eta morfologi eta batutako gorpuaren zonaldearen arabera saio-hodi desberdinetan jarri [Magaña 2001; Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007]. Kokapen selektibo hau oso garrantzitsua da besteak beste koleoptero ugariren larbak dipteroen larbez elikatzen direlako, eta baita ere zenbait dipteroen larbak (*Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819)-enak adibidez) kanibalak direlako.
- Lagin bakoitza etiketatu kasuaren kodea, gorputzaren ze zonaldeetik jaso izan den eta laginaren zenbakia adieraziz [Magaña 2001]. Galerak ekiditeko etiketak bikoiztu, bat ontziaren kanpoaldean eta bestea barruan jarritz.
- Jasotako laginen erlazio bat idatzi, laginketa kodea, kontserbazio-egoera eta abar adieraziz.

Oso garrantzitsua da etiketatu gabeko lagin bat baliogabetua izango dela kontuan hartzea, ezin izango delako dudarik gabe auzitegi-kasuarekin erlazionatu [Arnaldos *et al.* 2006]. Hori dela ezinbestekoa da kasuaren lagin bakoitzak etiketa batean hurrengo informazioa izatea (21. Irudia):

Kasuaren kodea:
Laginaren kodea:
Lekua:
Data:
Ordua:
Biltzailea:

21. Irudia. Etiketa erdua.

Argazki zein bideo dokumentazioz lagundutako gorpuaren deskripzio orokorra oso lagungarria izan daiteke [Amendt *et al.* 2004, 2011; Arnaldos *et al.* 2006]. Ahal izanez gero, gomendagarria da gorpua aurkitu osteko 5-10 egunetan tenperaturen erregistroa jasotzea [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007, 2011]. Informazio hau ezinbestekoa da PMT-ren estimazio zehatzerako [Wolff & Pérez 2003].

6.4.3.3. *Ebidentzia entomologikoak preserbatzeko metodoa*

Jasotako aleak hilak egotekotan, etanolean preserbatu beharko dira (% 70 helduak eta % 80 larbak) [Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2007, 2011]. Kontserbatzailea etanola izango da, segurtasun eta osasun arrazoiengatik. Ez da gomendatzen formalina, formaldehido edota etilazetatoa bezalako substantzia kimikoen erabilera, haien eraginkortasun ahularengatik, ehunen preserbatzea txarragoa baita eta DNA kaltetu dezaketelako, identifikazio morfologiko eta molekularra zailduz [Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2007, 2011].

Ahal den heinean, hurrengo aleak bizirik jasotzea gomendatzen da:

- Arrautzak:

Arrautzak airearen sarrera bermatzen duten saio-hodietan kokatu, paper heze baten gainean [Amendt *et al.* 2007]. Laginak hazkuntzarako substratua egokia daukan ontzi batera transferitu. Ezinezkoa izatekotan, % 70-95-eko etanolean jarriz sakrifikatu eta preserbatu [Amendt *et al.* 2007].

- Heldugabeak (Larbak):

Lagin bakoitzeko ale gehienak tenperatura eta hezetasun baldintza kontrolatuetan biltegitratuko dira [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007]. Gomendatzen da azterketa hasi aurretik lagin hauek hozkailuan 2-6 °C tartean mantentzea beraien garapena moteltzeko [Amendt *et al.* 2007, 2011]. Bilketarako ontziek airearen sarrera bermatu behar dute larbek ihes egitea galarazten duten bitartean [Amendt *et al.* 2007, 2011]. Larbek ekoizten dituzten fluidoek xurgapena ahalbidetzen duen

iragazki-papera ontziaren hondoan jartzea ere komenigarria da [Amendt *et al.* 2007, 2011]. Azterketaren ondoren, bizirik dauden heldugabeak ahalik eta azkarren beraien hazkuntzarako aproposa den ontzi batera transferitu behar dira.

Gelditzen diren heldugabeak ondorengo arauak kontuan hartuz sakrifikatu behar dira:

Diptero heldugabeak irakiten hasi aurreko ur beroan (80-100 °C) sartuko dira [Tantawi & Greenberg 1993; Adams & Hall 2003], gutxienez 30 segundotan (1etik 2 minutara edukitzea gomendagarria delarik) [Adams & Hall 2003]. Prozesamendu honek ehunen egokitzapena bermatu eta kutikularen babesa suntsitzen du, kontserbagarriaren (% 80-eko alkoholaren) sarrera ahalbidetuz [Adams & Hall 2003]. Ur berorik ez izatekotan, larbak izoztuz sakrifikatu daitezke (-20°C-tan) [Amendt *et al.* 2007]. Ezin dira inola ere dipteroen larbak zuzenean alkoholean sartu, aste baten epean baliogabeko baitira (txikituz, beltzatuz eta ustelduz) [Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2007].

Koleopteroen heldugabeak izoztuz (-20 °C-tara) edota zuzenean alkoholean (% 70-eko) murgilduz sakrifikatuko dira [Midgley & Villet 2009; Amendt *et al.* 2011].

- Pupak:

Pupak temperatura baldintza kontrolatupean jarriko dira beraien hazkuntzarako [Amendt *et al.* 2007]. Ontziaren estalkia airearen fluxua bermatu ahal du.

- Helduak:

Bizirik dauden helduak sakrifika daitezke -20 °C inguruko tenperaturetan izoztuz 30 minututik ordu batera [Amendt *et al.* 2007]. Ondoren, % 70-eko alkoholean preserbatuko dira, artikulazioen hauskortasuna areagotuko lukeen mintz artikularren gogortzea saihesteko [Amendt *et al.* 2007]. Kutxa entomologikoak izanez gero, lehorrean ere orratz entomologikoak erabiliz preserba daitezke, materiala hondar lehorrez elikatzen diren intsektu nekrofagoetatik babestuz.

6.4.4. Formulario para la toma de muestras en cadáveres humanos / Giza gorpuetan lagin bilketarako formularioa

Recolector / Fecha / Hora /
Biltzailea: _____ Data: _____ Ordua: _____
Localidad / Provincia / País /
Herria: _____ Probintzia: _____ Herrialdea: _____
Número de caso /
Kasuaren zenbakia: _____

ESPECIFICACIONES / ESPEZIFIKOTASUNAK

Edad / Sexo / Peso / Altura / Raza-Etnia /
Adina: _____ Sexua: _____ Pisua: _____ Altuera: _____ Arraza-Etnia: _____

Posición / Posizioa:

Enterrado / (Profundidad estimada / Sobre el suelo / Tumbado /
Lurperatua Sakonera estimatua: _____) Lur gainean Etzanda
Colgado / (En contacto con el suelo / En agua /
Eskegita Lurrarekin kontaktuan: _____) Uretan

Observaciones /
Behaketak: _____

Vestimenta / Jantziak:

Completo / Parcial / Desnudo / Cuerpo cubierto /
Osoa Partziala Biluzik Gorputza estalita

Observaciones /
Behaketak: _____

Grado de descomposición / Deskonposizio-gradua:

Fresco / Hinchado / Descomposición activa /
Freskoa Hanpatua Deskonposizio goiztiarra

Descomposición avanzada / Esqueletización /
Deskonposizio aurreratua Eskeletizazioa

Observaciones /
Behaketak: _____

Evidencia de carroñeros /
Sarraskijaleen ebidentzia *: _____

6.4. Aportación / Contribution II.IV

Presencia de lesiones traumáticas /

Lesio traumatikoen presentzia *: _____

Tipo de lesión /

Lesio mota: _____

* Por favor, marque su posición en la página 3 / Mesedez adierazi kokapena 3. orrialdean.

LUGAR DE LA MUERTE / HERIOTZAREN ESZENATOKIA

Rural /

Landa-giroa _____

Urbano /

Hiritarra _____

Exterior / Kanpoaldean:

Bosque /

Basoa

Campo /

Landa

Pastizal /

Larrea

Matorrales /

Sasi-tartean

Parque público /

Parke publikoa

En el suelo /

Lurrean

En un terreno cerrado /

Itxitako alorra

Otros /

Bestelakoak: _____

Interior / Barrualdean:

Garaje-Almacén /

Garaje-Biltegi

Establo-Granero /

Ukuilu-Aletegi

Piso /

Pisua

Casa de campo /

Baserría

Otros /

Bestelakoak: _____

Suelo (alfombra, moqueta, parquet, baldosa, etc.) /

Lurrean (alfonbra, moketa, parquet, baldosa, eta abar): _____

Tipo de habitación /

Gela mota: _____

Climatizada /

Klimatizatua: _____

Ventanas abiertas /

Leiho irekirik: _____

Miscelánea (coche, etc.) /

Bestelakoak (kotxea, eta abar): _____

Observaciones /

Behaketak: _____

Localización / Kokapena:

A la sombra / En el sol / Mixto /
Itzalpean Eguzkipean Mistoa

Observaciones /

Behaketak: _____

CONDICIONES AMBIENTALES / INGURUNEAREN BALDINTZAK

Temperatura / Tenperatura:

Habitación / Ambiental 1 (2 m sobre el suelo) /
Gela / Ingurunea 1 (2 m zoruaren gainetik): _____

Habitación / Ambiental 2 (5 cm sobre el suelo) /
Gela / Ingurunea 2 (5 cm zoruaren gainetik): _____

Superficie del cuerpo /
Gorputzaren gainazala: _____

Si hubiera, masa larvaria ML1/ ML2/
Egotekotan, larba-masa LM1 *: _____ LM2 *: _____

* Por favor, indique la posición en la página 3 / Mesedez, posizioa adierazi 3. orrialdean.

Interfaz entre el cuerpo y el suelo / Suelo (a 20 cm de profundidad) /
Gorputzaren eta zoruaren arteko muga: _____ Zorua (20 cm-tako sakoneran): _____

Si hubiera, agua /
Egotekotan, ura: _____

METEOROLOGÍA / METEREOLOGIA

Ese día / Egun horretan:

Lluvioso / Tormentoso / Soleado / Ventoso / Cálido /
Euritsua Ekaiztsu Eguzkitsua Haizetsua Berotsu

Observaciones /

Behaketak: _____

Días anteriores / Aurreko egunak:

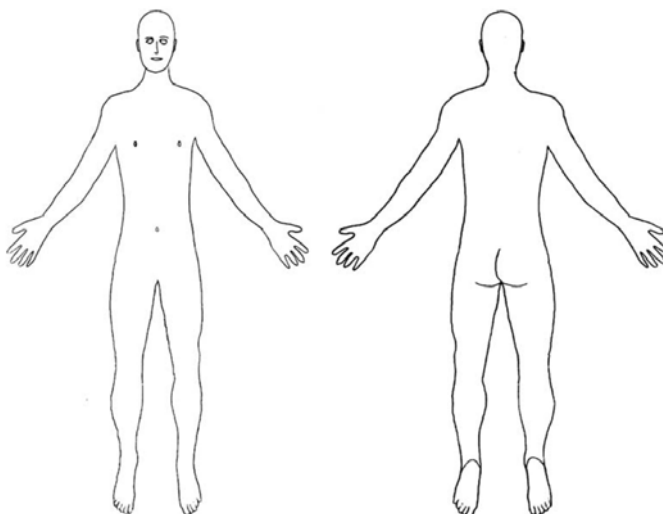
Lluvioso / Tormentoso / Soleado / Ventoso / Cálido /
Euritsua Ekaiztsu Eguzkitsua Haizetsua Berotsu

Observaciones /

Behaketak: _____

Por favor, señale en el dibujo la localización de / Mesedez, adierazi marrazkian:

- Vestimenta / Janzkera
- Evidencias de carroñeros (EC) / Sarraskijaleen ebidentziak (SE)
- Heridas (H) / Zauriak (Z)
- Masa larvaria (ML1, ML2...) / Larva-masak (LM1, LM2...)
- Localización de la muestra (1, 2, 3...) / Laginaren kokapena (1, 2, 3...)



AUTOPSIA / AUTOPSIA

Lugar / Fecha / Hora /
Tokia: _____ Data: _____ Ordua: _____

Tiempo en cámara frigorífica / Temperatura /
Denbora hozkailuan: _____ Tenperatura: _____

Lesiones /
Lesioak *: _____

Posibles causas /
Kausa posibleak: _____

Observaciones /
Oharrak: _____

* Por favor, indique su posición en el dibujo / Mesedez, posizioa adierazi irudian.

MUESTRAS / LAGINAK

Recolector / Fecha / Hora /
 Biltzailea: _____ Data: _____ Ordua: _____
 Localidad / Provincia / País /
 Herria: _____ Probintzia: _____ Herrialdea: _____
 Número de Caso /
 Kasuaren zenbakia: _____

Nº muestra Lagin zk	Nº individuos Ale kopurua	* Tipo de muestra * Lagin mota	** Preservado / vivo ** Preserbatua / bizirik	*** Localización en el cuerpo *** Kokapena gorputzean
1		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		
2		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		
3		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		
4		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		
5		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		
6		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		
7		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		
8		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		
9		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		
10		H / A <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A / H <input type="checkbox"/>		

* **H / A** = Huevos / Arrautzak, **L** = Larvas / Larbak, **P** = Pupas / Pupak y / eta **A / H** = Adultos / Helduak
 ** **Preservación / Preserbatua:** Preservado muerto en alcohol / Preserbatua hilik alkoholean; **Vivo / Bizirik:** Mantiene vivo para la cría / Bizirik mantenduta hazkunderako.
 *** Por favor, indique la posición en la página anterior / Mesedez, adierazi posizioa aurreko orrialdean.

Este formulario está basado en las pautas europeas consensuadas y publicadas por Amentdt *et al.* “Best practice in forensic entomology: standards and guidelines” International Journal of Legal Medicine.

Testu hau Amentdt *et al.*-ek “Best practice in forensic entomology: standards and guidelines” International Journal of Legal Medicine-en publikatutako adostuak dauden gidalerro europarretan oinarrituta dago.

VII. Discusión general /
General discussion

7.1. Identificación molecular de dípteros

La importancia de la identificación molecular en entomología está basada principalmente en el diagnóstico, a nivel específico, de las evidencias entomológicas durante el curso de una investigación. Esta disciplina se utiliza para aclarar aspectos como el tiempo, modo e incluso el lugar en el que se produjo un suceso. Sin embargo, aunque se encuentra bien establecida en países próximos, en la Península Ibérica la entomología molecular médico-legal y veterinaria aún está dando sus primeros pasos. Por ello, la información genética disponible es muy escasa o completamente inexistente. En el contexto forense, los primeros estudios Ibéricos para la identificación molecular de algunos dípteros necrófagos se han realizado en Portugal, estando el número de trabajos limitado a unas pocas y sucintas publicaciones [Cainé *et al.* 2006, 2009; Oliveira *et al.* 2011; Rolo *et al.* 2013].

El presente trabajo de Tesis desea cubrir la necesidad de caracterizar molecularmente las principales especies de dípteros de importancia médico-legal y veterinaria de la Península Ibérica (incidiendo en la zona Atlántica) y de una región centroeuropea, incluyendo además especímenes de otras áreas del mundo para visualizar la situación taxonómica y filogenética de los mismos, y enmarcar su realidad en un contexto global.

Esta investigación sobre dípteros con hábitos necrófagos y/o miásicos, desde una perspectiva molecular, abarca el mayor número de marcadores en un amplio rango de especies de interés médico-legal y veterinario que se ha realizado, hasta la fecha, en Europa, así como el primer estudio de estas características llevado a cabo en la Península Ibérica. Durante el desarrollo de la misma, se han diseñado y optimizado protocolos de extracción y análisis, se han sentado las bases de un inventario genético de buena parte de las principales especies indicadoras forenses de la Península Ibérica, se ha determinado la utilidad de los marcadores de ADN para la identificación de

VII. Discusión general

especies, y se han aportado nuevos datos moleculares para especímenes centro y sur europeos, de utilidad en el diagnóstico de las evidencias de insectos, aplicables a futuros casos tanto forenses como médicos y veterinarios.

7.1.1. Biología y etología de dípteros de interés médico-legal y veterinario

El trabajo se ha centrado en la familia Calliphoridae (Diptera: Oestroidea), constituida por un grupo diverso de dípteros de gran importancia médico-legal y veterinaria, ya que sus ciclos de vida implican el desarrollo en restos cadavéricos (necrofagia) o en animales vivos (parasitismo) [Stevens *et al.* 2002; Stevens & Wallman 2006]. Estos insectos suelen ser los colonizadores primarios de cadáveres, y, como consecuencia, los indicadores forenses más comunes en investigaciones criminales [Smith 1986; Boehme *et al.* 2010; Malewski *et al.* 2010; Singh & Wells 2013]. Así, su utilización en la estimación del intervalo *post-mortem* (IPM) les confiere gran relevancia médico-legal [Greenberg 1991; Catts & Goff 1992; Amendt *et al.* 2004]. Buena parte de las especies de interés forense son también ectoparásitas de vertebrados, y causan miasis en animales y humanos [Zumpt 1965; Erzinclioglu 1989; Rognes 1993; Stevens 2003].

Mientras que los insectos necrófagos asociados a procesos de reducción cadavérica ocupan un lugar principal en las investigaciones forenses [Di Luise *et al.* 2008], normalmente, no se confiere la importancia que merecen a los miásicos que se desarrollan en individuos vivos, por parecer que su estudio carece de aplicación inmediata en la ciencia forense. Sin embargo, el actual envejecimiento de la población, la ganadería intensiva y la crisis económica, están produciendo un cambio en el enfoque de la entomología forense al haberse incrementado el número de casos en los que el período de actividad de los insectos (PAI) excede el IPM [Benecke & Lessig 2001; Amendt *et al.* 2007], lo que puede ser indicativo de la existencia de mala gestión, malos tratos o abandonos previos a la muerte [Benecke *et al.* 2004; Franza *et al.* 2006]. Además, los califóridos con mayor importancia económica son ectoparásitos del ganado, en particular las especies *L. sericata* (Meigen, 1826) y/o *L. cuprina*

(Wiedemann, 1830), frecuentemente responsables primarias de las infestaciones, tanto en Europa como en otras muchas áreas del mundo [Miller 1939; MacLeod 1943; Ryan 1954; Zumpt 1965; Tenquist & Wright 1976; Bishop 1991, 1995; Hall & Wall 1995; Stevens & Wall 1996, 1997a-b; Stevens *et al.* 2002; Heath & Bishop 2006]. Finalmente, se debe mencionar que los califóridos comparten los hábitos miásicos con sus parientes cercanos Muscidae y Oestridae (**Aportación I.IV**).

En este trabajo, se han recogido especímenes de las familias Calliphoridae [*Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819); *Phormia regina* (Meigen, 1826); *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *C. vomitoria* (Linnaeus, 1758); *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), *L. richardsi* Collin, 1926, *L. ampullacea* Villeneuve, 1922, *L. silvarum* Meigen, 1826, *L. illustris* (Meigen, 1826), *L. caesar* (Linnaeus, 1758) y *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876], Muscidae [*Musca autumnalis* De Geer, 1776] y Oestridae [*Hypoderma bovis* (Linnaeus, 1758)] (**Aportaciones I.I-I.IV/II.I-II.II**; **Clasificación S1**, Material suplementario).

En general, las especies de califóridos aquí registradas se asocian habitualmente a materia orgánica en descomposición en la costa atlántica de la Península Ibérica [Saloña-Bordas *et al.* 2009; Prado e Castro *et al.* 2011, 2012], a excepción de *P. regina*, no detectada en la Península Ibérica [Martínez-Sánchez *et al.* 2015], pero frecuente en latitudes norte europeas. La mayor parte de estas especies se utilizan regularmente como indicadores en investigaciones forenses en Europa y además, pueden actuar como ectoparásitos facultativos, primarios (iniciando infestaciones) o secundarios (colonizando animales ya infestados), en vertebrados mamíferos (incluso en humanos) [Hall 1948; Zumpt 1965; Hall *et al.* 1986; Smith 1986; González-Mora 1989; Rognes 1991; Stevens & Wall 1997b; Davies 1999; Soler-Cruz 2000; Fremdt *et al.* 2012]. Como excepción, *L. bufonivora* se desarrolla exclusivamente en anuros vivos y no en sus restos cadavéricos [Brumpt 1934; Zumpt 1965; Weddeling & Kordges 2008; Fremdt *et al.* 2012], por lo que su captura utilizando cebos con víscera

VII. Discusión general

de mamíferos (**Aportación II.II**) podría explicarse por el efecto aglutinador en torno al cebo, que atrae a los dípteros de los alrededores [Ives 1988; Charabidze *et al.* 2011]. Cabe destacar que, aunque *L. sericata* y *L. cuprina* forman parte de la entomofauna del sur de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) [Saloña-Bordas *et al.* 2009] y son frecuentemente citadas en casos de miasis en Europa y África [Lucientes 1995; Hall & Wyatt 1996; Stevens & Wall 1997b; Soler-Cruz 2000; Tourle *et al.* 2009; Sotiraki & Hall 2012; Wall 2012; Pezzi *et al.* 2015], no se recogieron en ninguna de las infestaciones miásicas aquí estudiadas (**Aportación I.IV**). *L. caesar* y *L. illustris*, fueron las únicas especies de *Lucilia* que intervinieron como agentes miásicos en la CAPV (**Aportación I.IV**). En consecuencia, otras citas de dípteros asociados a casos de miasis que no se correspondan con las especies detalladas deberían ser interpretadas con más cautela por expertos entomólogos.

La familia Muscidae produce miasis accidentales siendo *Musca domestica* Linnaeus, 1758, *Musca sorbens* Wiedemann, 1830 y *Muscina stabulans* (Fallén, 1817) las especies más comunes [Soler-Cruz 2000; Shivekar *et al.* 2008; Clarke 2013]. En esta investigación encontramos una especie no documentada previamente como miásica, *M. autumnalis*, asociada a infestaciones en ganado (**Aportaciones I.IV/II.I**). Gállego-Berenguer mencionó exclusivamente a *M. autumnalis*, junto con *M. domestica*, como un agente miásico accidental potencial, pero sin aportar referencias sobre casos concretos registrados [Gállego-Berenguer 2007]. En general, *M. autumnalis* y *M. domestica*, comparten hábitos nutricionales y sus estadios inmaduros presentan morfologías muy similares, lo que dificulta su identificación si no se crían hasta la emergencia de los adultos, algo complejo en poblaciones miásicas [Matthew & Dobson 1959; Skidmore 1985]. Así, las coincidencias biológicas, hacen razonable la presencia de *M. autumnalis* en miasis accidentales, siendo su complejidad diagnóstica la posible causa de ausencia de registros previos. De hecho, recientemente se ha encontrado *M.*

autumnalis asociada a procesos de descomposición cadavérica en Portugal [Rolo *et al.* 2013].

La familia Oestridae se asocia principalmente con el endoparasitismo obligado en mamíferos. No obstante, algunos de sus miembros pueden actuar como ectoparásitos, de forma análoga a los Calliphoridae [Stevens & Wallman 2006]. Así, entre las especies tradicionalmente incluidas en el género *Hypoderma*, únicamente dos *H. bovis* y *H. lineatum* (Villers, 1789) son endoparásitos obligados de animales [Zumpt 1965], en los que causan hipodermosis. Si bien a nivel de subfamilia el diagnóstico morfológico no entraña dificultad, a nivel específico se puede complicar por presentar estas especies características ecológicas, biológicas y morfológicas similares y compartir hospedadores [Otranto & Stevens 2002]. La especie *H. bovis*, identificada en esta investigación (**Aportación I.IV**), afecta principalmente a ganado vacuno e interviene con cierta frecuencia en casos de infestaciones humanas accidentales. En nuestro país, la importancia de la hipodermosis se ha constatado en diversos estudios realizados en Galicia [Morroondo *et al.* 1999; Panadero *et al.* 2007], Asturias [Prieto *et al.* 1990], León [Cordero del Campillo 1962], Extremadura [Reina *et al.* 1994] y Andalucía [Martínez-Gómez *et al.* 1988; Martínez-Moreno 1992; Martínez-Moreno *et al.* 1995]. Actualmente, el control de esta parasitosis en Europa requiere vigilancia continua y, aunque existen tratamientos eficaces, su incidencia sigue siendo notable en amplias zonas de la Península Ibérica y otras regiones europeas. Por ello, si bien en nuestro estudio únicamente detectamos un caso de hipodermosis, su presencia en ganado bajo continuos controles epidemiológicos y veterinarios pone de manifiesto la trascendencia de estas infestaciones en la CAPV (**Aportación I.IV**).

Finalmente, se debe subrayar que la recogida de *L. bufonivora* y *M. autumnalis* durante esta investigación representa un nuevo registro local bien para la CAPV o bien para el sur de la misma, respectivamente (**Aportaciones II.I/II.II**). Asimismo, aunque *H. bovis* está bien estudiada y se ha registrado en regiones próximas, hasta donde nosotros

VII. Discusión general

conocemos, su presencia en la CAPV no se ha documentado previamente, siendo éste el primer registro local para la misma (**Aportación I.IV**).

En este punto, es importante destacar que el prerrequisito crítico para la estimación del período de actividad de los insectos (PAI) es la correcta identificación de las evidencias entomológicas, ya que cada especie tiene hábitat, tasa de desarrollo y distribución geográfica característicos [Reibe *et al.* 2009; Richards *et al.* 2009]. Incluso entre especies estrechamente relacionadas los parámetros de desarrollo pueden ser muy dispares. Así, a la misma temperatura, 19 °C, *L. cuprina* completa su ciclo en 47 días (de huevo a adulto), mientras que *L. sericata* requiere 84 [Ash & Greenberg 1975]. Por ello, un mínimo error diagnóstico introduciría incertidumbres que podrían dañar o invalidar una investigación y conducir a errores judiciales [Benecke & Wells 2001].

La identificación entomológica tradicional es una técnica comparativa, basada en las características morfológicas externas, que requiere el dominio de claves taxonómicas complejas y el uso comparativo de colecciones de referencia. Por ello, las principales dificultades para la identificación de dípteros son:

- La mayoría de las claves taxonómicas morfológicas están incompletas, fragmentadas y/o sin actualizar. Generalmente se ciñen a la entomofauna regional autóctona, obviándose las especies alóctonas de reciente introducción. Como ejemplo, la familia Sarcophagidae solo tiene morfotipos establecidos para machos [Smith 1986; Wells *et al.* 2001b; Nakano & Honda 2015], mientras que Oestridae no dispone de claves generales más allá del gran compendio de Zumpt 1965 [Otranto & Stevens 2002].
- Las colecciones de referencia están disponibles en número reducido y suelen ser incompletas. Además, miembros de una misma especie pueden mostrar morfologías variables en áreas geográficas diferentes, o incluso, en la misma región, como ocurre en las familias Calliphoridae y Oestridae [González-Mora & Peris 1988; Otranto & Stevens 2002].

- La pérdida de caracteres taxonómicos diagnósticos en especímenes dañados o la similitud física, entre huevos, larvas, pupas y adultos de especies diferentes, pueden complicar o imposibilitar las identificaciones, incluso a los especialistas [Greenberg & Singh 1995; Wallman 2001a-b].
- Las fases inmaduras, frecuentemente, requieren la cría hasta la emergencia del adulto para su identificación inequívoca [Wallman & Donnellan 2001; Wells & Sperling 2001]. Esta tarea precisa tiempo y carece de garantía de éxito [Turchetto & Vanin 2004; Mazzanti *et al.* 2010], especialmente en especies miásicas que requieren un hospedador.

Estas razones hacen que los métodos morfológicos resulten comprometidos e, incluso, inviables. Considerando que en el ámbito médico-legal y veterinario, los errores pueden repercutir en terceras personas, la identificación específica requiere de procedimientos complementarios o alternativos, en los que las técnicas moleculares juegan un papel fundamental.

Uno de los mayores beneficios del diagnóstico molecular es la identificación inequívoca de especies, independientemente del estadio de desarrollo o del sexo del individuo, y tiene el potencial de distinguir especies morfológicamente similares [Tan *et al.* 2010]. Sin embargo, se debe subrayar que la identificación tradicional constituye la base fundamental para el diagnóstico genético específico. Por lo anteriormente mencionado, el desarrollo de colaboraciones entre especialistas de diferentes disciplinas es esencial para la adecuada identificación de las especies de interés.

El presente estudio explora la ciencia entomológica desde un punto de vista molecular, tratando aspectos clave que no se deben obviar en las pesquisas médico-legales y veterinarias (**Aportaciones I.I-I.VI/II.I-II.II**).

VII. Discusión general

7.1.2. Identificación molecular convencional

En la actualidad, la metodología de referencia para la identificación de los insectos a nivel de especie combina amplificación mediante PCR y secuenciación de marcadores moleculares, proporcionando una información nucleotídica detallada de la región de interés.

Asimismo, cabe destacar la creciente incorporación de tecnologías novedosas, como el análisis *high-resolution melting* (HRM), que permiten el procesamiento de un número elevado de muestras en un tiempo breve y son de protocolo más sencillo [Wells & Stevens 2010; Radvansky *et al.* 2011]. Sin embargo, no debe olvidarse que la utilización eficaz de estas nuevas técnicas requiere disponer de la información de base que proporcionan las convencionales.

7.1.2.1. Marcadores mitocondriales y nucleares en la identificación de especies de dípteros

Las ventajas que presenta el ADN mitocondrial (ADNmt), dado su alto número de copias y tasa de mutación, fácil aislamiento y regiones conservadas que permiten utilizar *primers* universales, han hecho que las investigaciones taxonómicas, poblacionales y evolutivas se centren en él [Xiong & Kocher 1991]. A día de hoy, existe un amplio repertorio de marcadores mitocondriales con los que abordar, de forma efectiva, la identificación de insectos.

Tradicionalmente, los genes más utilizados para la caracterización de invertebrados han sido los que codifican las subunidades I y II del citocromo c oxidasa (COI y COII) [Sperling *et al.* 1994; Malgorn & Coquoz 1999; Caterino *et al.* 2000; Wallman & Donnellan 2001; Wallman *et al.* 2005; Wells & Stevens 2008; Zaidi *et al.* 2011; Nelson *et al.* 2012]. En los últimos años, los investigadores han adoptado al COI como *locus* de referencia en la identificación de insectos, analizando un rango de tamaño que puede variar desde 229 pb hasta el gen completo [Vincent *et al.* 2000; Harvey *et al.*

2003a-b, 2008; Chen *et al.* 2004; Wells *et al.* 2004, 2007; Wallman *et al.* 2005; Nelson *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2007; Desmyter & Gosselin 2009; Park *et al.* 2009a-b; Liu *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011; Singh & Wells 2011; Boehme *et al.* 2012; Nakano & Honda 2015]. Este gen, que codifica el catalizador terminal de la cadena respiratoria mitocondrial, se ha utilizado en filogenia molecular por su largo tamaño y por presentar regiones tanto altamente conservadas como variables, con diversos rangos de tasa de mutación [Lunt *et al.* 1996]. Asimismo, el *locus* COI puede presentar tasas de evolución distintas en linajes diferentes, que dependen principalmente de las restricciones funcionales en regiones específicas [Otranto & Stevens 2002].

Actualmente, el paradigma del ADN *barcode*, fragmento de unas 650 pb, es el que domina el diagnóstico molecular [Hebert *et al.* 2003]. En general, esta región (COI *barcode*, 658 pb) ha demostrado ser adecuada como marcador universal para la diferenciación taxonómica y los estudios evolutivos de insectos, aunque ocasionalmente puede mostrar limitaciones en especies estrechamente relacionadas, como ocurre en los géneros *Calliphora*, *Lucilia* o *Chrysomya* de la familia Calliphoridae [Wallman & Donnellan 2001; Stevens *et al.* 2002; Wells *et al.* 2002, 2004, 2007; Whitworth *et al.* 2007; Tourle *et al.* 2009; McDonagh & Stevens 2011], todos ellos de importancia médico-legal y veterinaria. En estos casos, la escasez de divergencia genética suele concurrir con la similitud morfológica extrema entre especies, dificultando las identificaciones a personal que carezca del adiestramiento apropiado (**Aportaciones I.II-I.V**). Estos patrones suelen asociarse a introgresiones o especiaciones incompletas. La falta de divergencia también podría estar condicionada por las diferentes tasas de evolución de unas regiones respecto de otras, en función de la especie y el marcador analizado (**Aportación I.V**).

Estudios previos han demostrado la idoneidad de otros *loci* mitocondriales analizados con menos frecuencia en taxonomía de insectos. Así, la aplicación del citocromo b (Cyt-b), uno de los *loci* convencionales en el diagnóstico de vertebrados mamíferos

VII. Discusión general

[Bataille *et al.* 1999; Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003; Tobe *et al.* 2010], está reducida a unos pocos dípteros de interés forense (Calliphoridae y Piophilidae) en el contexto entomológico [M de Pancorbo *et al.* 2004; Zaidi *et al.* 2011]. Por su parte, la región no codificante, situada entre el ARN transferente para la serina (ARNt^{ser}) y la subunidad 1 de la nicotinamida deshidrogenasa (ND1) (ARNt^{ser}-ND1), se ha utilizado con éxito en la diferenciación de dípteros de la familia Oestridae [Weigl *et al.* 2010b]. Sin embargo, la escasez de información sobre estos marcadores mitocondriales en las bases de datos, hace que prevalezca el atractivo de los tradicionales, con abundantes datos disponibles para el diagnóstico taxonómico.

En cuanto al ADN nuclear, es el ADN ribosómico (ADNr) el más habitualmente estudiado, incluyendo genes y regiones intergénicas. El ADNr nuclear consiste en una serie de unidades repetidas en tándem formadas por regiones intergénicas no codificantes conocidas como espaciadores transcritos internos (ITSs) y genes ARNr asociados (18S, 5,8S y 28S), con una tasa de evolución variable a lo largo de la unidad de repetición e incluso dentro de un gen [Hillis & Dixon 1991; Wells & Stevens 2010]. Así, en contraste con otros muchos genes nucleares, en un genoma eucariota típico podemos encontrar cientos de copias en tándem de ARNr [Coleman 2003]. Comúnmente, la región ITS incluye el primer espaciador (ITS1), el gen 5.8S, y el segundo espaciador (ITS2), siendo el marcador nuclear más relevante en taxonomía y sistemática molecular [Coleman 2003]. Los marcadores ITS1 e ITS2 han sido ampliamente utilizados para resolver las relaciones entre especies estrechamente relacionadas y crípticas [Paskewitz *et al.* 1993; Navajas *et al.* 1998]. En artrópodos estos dos segmentos han mostrado una variación intra-específica reducida e inter-específica alta, idónea para los diagnósticos a nivel de especie [Otranto & Stevens 2002]. Únicamente los híbridos pueden presentar, ocasionalmente, variabilidad entre las secuencias ITS de un mismo organismo [Buckler *et al.* 1997; Coleman 2003]. Excepto en estos casos, esta familia multigénica presenta una evolución concertada

que, habitualmente, homogeneiza las diferencias entre copias y hace posible su tratamiento como un único gen [HersHKovitz *et al.* 1999].

Los genes mitocondriales y nucleares, y las regiones inter-génicas, acumulan mutaciones nucleotídicas con diferentes tasas según su estructura, función y modo de herencia [Otranto & Stevens 2002]. Generalmente, el ADN mitocondrial presenta mayor tasa de sustitución que el nuclear. En insectos se estima que, tras un evento de especiación, los genes mitocondriales evolucionan de 2-9 veces más rápido que los genes nucleares que codifican proteínas [DeSalle *et al.* 1987; Moriyama & Powell 1997; Monteiro & Pierce 2001]. Por ello, cabría esperar que las diferencias entre especies que han divergido recientemente se manifestasen antes en los genes mitocondriales [Dowton 2004; Lin & Danforth 2004; McDonagh & Stevens 2011]. No obstante, los intrones y las regiones no codificantes, como los segmentos ITSs nucleares, muestran una alta tasa de mutación comparada con el ADNmt codificante [Otranto & Stevens 2002]. Por ejemplo, en algunos taxones como *Tetranychus* (Acari: Prostigamata), ITS2 evoluciona 2,5 veces más rápido que COI [Navajas *et al.* 1998]. Esta variabilidad tiene que considerarse para seleccionar una región con una tasa de mutación adecuada al propósito de la investigación; las regiones altamente variables, de evolución rápida, pueden no ser apropiadas cuando se quieren resolver las filogenias de taxones con divergencia ancestral de más de 5-10 millones de años [Lin & Danforth 2004], mientras que las secuencias bien conservadas no lo serán para establecer relaciones filogenéticas poblacionales o entre especies de reciente divergencia.

Algunos autores sugieren el análisis multi-región como la opción más indicada para abordar las muestras complejas. Lo habitual es que las investigaciones se centren en uno o en un par de genes, mitocondriales y/o nucleares. No obstante, en esta investigación se examinaron varios marcadores de ADNmt, la región *barcode* del citocromo c oxidasa I (COI *barcode*, 658 pb), un fragmento de 616 pb del mismo gen (COI, 616 pb), el citocromo c oxidasa II (COII, 725-731 pb), el citocromo b (Cyt-b,

VII. Discusión general

307 pb) y la región que comprende parte del citocromo b, el ARN transferente para la serina y parte de la subunidad 1 de la nicotinamida deshidrogenasa (Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1, 495-496 pb), que incluye un fragmento no codificante. Asimismo, se estudió la región del segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 310-352 pb), además de otra que contiene el primer y segundo espaciador transcrito interno (ITS12, 1081-1083 pb) del ADN ribosómico nuclear (ADNr).

7.1.2.2. Análisis de la variabilidad intra-específica

En general, los diferentes marcadores mitocondriales estudiados mostraron el fuerte sesgo AT característico del ADN mitocondrial de insectos [Harvey *et al.* 2003a; Ames *et al.* 2006].

La diversidad de secuencias y haplotipos de diferentes genes parecen tener pautas similares en cada especie, exhibiendo un mismo *locus* resultados análogos en diferentes muestras poblacionales. Así, la especie *C. vicina* mantuvo una gran diversidad genética para todos los *loci* (COI *barcode*: $0,68 \pm 0,06$; COI 616 pb: $0,59 \pm 0,07$; Cyt-b: $0,51-0,54 \pm 0,07-0,08$) (**Aportaciones I.I/I.III/I.V**), siendo máxima si *L. caesar* y *L. illustris* no se consideran. Por el contrario, cuando se tienen en cuenta ambas especies, son ellas las que revelan la mayor variabilidad global (COI *barcode*: $0,91 \pm 0,02/0,81 \pm 0,06$; COI 616 pb: $0,90 \pm 0,03/0,80 \pm 0,07$; Cyt-b: $0,67 \pm 0,05/0,34 \pm 0,11$) (**Aportación I.V**). Por su parte, *Ch. albiceps*, una de las especies más abundante en este trabajo, mostró reiteradamente una diversidad genética muy reducida (**Aportaciones I.I/I.III/I.V**). Esta baja diversidad intra-específica ha sido anteriormente documentada para poblaciones de la misma especie procedentes de África y Oceanía [Harvey *et al.* 2003a-b].

Sin embargo, un estudio más reciente sobre el género *Chrysomya* realizado en Egipto, sugiere que una escasa variabilidad genética o su ausencia está provocada por el sesgo inherente a muestras pequeñas y fragmentadas, que no son representativas de la variación poblacional a escala global [Salem *et al.* 2015]. Así, la única forma de

registrar la verdadera diversidad genética es muestrear, cuidadosa y exhaustivamente, un amplio rango geográfico [Salem *et al.* 2015]. En dicho trabajo estudiaron 70 especímenes de *Ch. albiceps* procedentes de diferentes regiones de Egipto (Giza, Minya, Dayrot y Sinai del Norte), con una distancia máxima de unos 600 km, encontrando un total de 12 haplotipos en COI (1400-1509 pb) [Salem *et al.* 2015]. Comparativamente, en nuestro trabajo, estudiamos un número superior de especímenes (113) procedentes de regiones diferentes de la Península Ibérica (norte de Portugal y CAPV), con una distancia geográfica máxima mayor (más de 800 km), presentando COI *barcode* (658 pb) y Cyt-b (307 pb) un número muy inferior de haplotipos (7 y 2, respectivamente) (**Aportaciones I.III/I.V**). Esta escasa diversidad podría asociarse a la corta longitud de dichos marcadores. No obstante, si nos fijamos únicamente en los 58 especímenes de *Ch. albiceps* estudiados en la CAPV (**Aportaciones I.IV-I.V**) la diferencia de haplotipos obtenida por separado, para COI *barcode* (658 pb) (4) y COI (616 pb) (2), y de forma conjunta, COI *barcode*-COI 616 pb (1274 pb) (5), no parece relevante (**Aportación I.V**).

Como norma general, las especies con amplia distribución geográfica contienen una variabilidad genética considerable. En este sentido, aunque el muestreo realizado abarca un amplio rango peninsular, es muy probable que los linajes más divergentes de las poblaciones ibéricas todavía estén sin registrar. Sin embargo, la uniformidad intra-específica observada en las poblaciones europeas de *Ch. albiceps*, en ésta y otras investigaciones, sugieren razonamientos alternativos, como la reducida variabilidad genética propia de especies en expansión cuando se encuentran fuera de su área de distribución original [Tsutsui *et al.* 2001; Shufan & Payton 2009], y no solo la desviación inherente a las muestras fragmentadas. Así, considerando que la distribución inicial de *Ch. albiceps* parecía abarcar desde la India hasta África, las poblaciones en Egipto (área de distribución original) deberán mostrar mayor variabilidad, mientras que la representada en las regiones europeas se limitará al

VII. Discusión general

conjunto de haplotipos de los especímenes que hayan intervenido en su reciente expansión hacia el Norte [Szpila *et al.* 2008]. Por ello, se requiere la realización de muestreos más exhaustivos en las diferentes áreas de distribución actual para confirmar esta hipótesis.

En general, el marcador COI *barcode* mostró la mayor diversidad intra-específica, mientras que Cyt-b la más reducida (**Aportaciones I.I/I.III/I.V**). Solamente el *locus* Cyt-b, aun teniendo la mitad de longitud, exhibió variabilidades muy cercanas o superiores a las del marcador tradicional en *L. ampullacea* y *C. vomitoria* (**Aportaciones I.III/I.V**). Estos resultados son coincidentes con estudios previos en los que Cyt-b presentó mayor variabilidad que otros marcadores moleculares (COI y ND5) en insectos de China y Pakistan [Zaidi *et al.* 2011].

El análisis del marcador nuclear ITS2 reveló una homología intra-específica casi completa. Solamente, *C. vomitoria* y *L. sericata* exhibieron posiciones variables (**Aportación I.III/I.V**). Estos resultados corroboran estudios previos en los que la ausencia de variabilidad intra-específica sugiere procesos de homogeneización generados mediante evolución concertada en Diptera [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008a; Alquezar *et al.* 2010]. Como norma general, cuando el propósito es la identificación inequívoca a nivel de especie, una diana con baja variabilidad intra-específica y alta variación inter-específica será la idónea [Otranto & Stevens 2002; Malewski *et al.* 2010]. Sin embargo, si se quieren comparar dos poblaciones de una misma especie originadas en dos áreas geográficamente diferenciadas, un marcador con alta variabilidad intra-específica será más adecuado [Otranto & Stevens 2002].

Nuestros hallazgos aportan nueva información haplotípica intra-específica y revelan variabilidad genética novedosa, no estudiada anteriormente. En general, ninguno de los haplotipos parece ser característico de una población o propio de las diferentes zonas ecológicas, por lo que no hemos podido identificar ningún patrón geográfico-regional en la distribución de los mismos (**Aportaciones I.I/I.III-I.V**).

7.1.2.3. *Análisis de la variabilidad inter-específica*

El ratio transiciones/transversiones ($R = ts:tv$) aquí encontrado para COI *barcode* (658 pb) y COI (616 pb) (1,35 y 1,45, respectivamente) (**Aportación I.II**) se aproxima al comúnmente encontrado en la familia Calliphoridae para el gen COI ($R = 1,37$) [Cainé *et al.* 2009]. Otros grupos de insectos presentan prácticamente el doble de transiciones que de transversiones, como Hemiptera ($R = 1,81$) [Damgaard *et al.* 2000] y moscas Tephritidae ($R = 1,78$) [Han & McPheron 1994]. Por su parte, Cyt-b (307 pb) mostró una relación paritaria ($R = 1,04$), revelando un número elevado de transversiones (**Aportación I.I**), lo que posiblemente repercute positivamente en la divergencia y el poder de discriminación entre especies.

COI (616 pb) destacó frente a otros marcadores de ADNmt, como COI *barcode* (658 pb) o Cyt-b (307 pb), mostrando más posiciones características en los géneros más complejos (**Aportaciones I.II/I.V**). Esto coincide con estudios previos en los que COI *barcode* presentaba una capacidad discriminativa muy inferior a otros *loci* mitocondriales (COII, ND6 y Cyt-b) [Wallman *et al.* 2005; Cameron & Whiting 2007, 2008; Roe & Sperling 2007; Nelson *et al.* 2012]. Se debe remarcar que Cyt-b proporciona estos resultados con la mitad de longitud de secuencia analizada. Sin embargo, al comparar regiones de la misma longitud, mientras el *locus* COI mostró más sitios variables entre géneros, dentro de cada género es Cyt-b el que reveló mayor variabilidad (**Aportación I.I**). Estos hallazgos están en línea con los obtenidos recientemente en genomas mitocondriales completos en los que, en el género *Lucilia*, el gen Cyt-b mostró mayor variabilidad [Nelson *et al.* 2012]. Asimismo, para las especies de califóridos aquí estudiadas, el marcador Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1 (495-496 pb) no reveló una resolución comparable a la encontrada en *Hypoderma* [Weigl *et al.* 2010b], aunque posibilitó la diferenciación inter-específica en la mayoría de los casos (**Aportación I.II**). El diferente resultado obtenido puede estar relacionado con la

VII. Discusión general

existencia de dos regiones altamente conservadas, ARNt y no codificante (de unas 84 pb), en los califóridos aquí analizados (**Aportación I.II**).

En general, los marcadores mitocondriales estudiados fallaron en la separación de especies estrechamente relacionadas (*L. sericata*-*L. cuprina* y *L. caesar*-*L. illustris*) (**Aportaciones I.II- I.V**). Resultados similares han sido, reiteradamente, descritos por otros autores para diferentes *loci* mitocondriales (COI) [Vincent *et al.* 2000; Wells *et al.* 2007; Reibe *et al.* 2009]. Frecuentemente, la dificultad en el diagnóstico molecular coincide con las especies de identificación morfológica más compleja [Rognes 1991], generalmente por su reciente o incompleta especiación.

El marcador nuclear ITS2 (310-352 pb) reveló un número característico de pares de bases para cada especie (*Ch. albiceps*: 327 pb, *C. vicina*: 337 pb, *C. vomitoria*: 321-325 pb, *L. sericata*: 330-331 pb, *L. richardsi*: 343 pb, *L. ampullacea*: 310 pb, *L. illustris*: 324 pb, *L. bufonivora*: 316 pb, *Musca autumnalis*: 352 pb, excepto *L. silvarum* y *L. caesar*: 322 pb) y el mayor número de posiciones variables (sustituciones e INDELS) (**Aportaciones I.II-I.V**). Estas características inter-específicas en términos de longitud y composición nucleotídica de secuencia, con regiones preservadas y altamente variables [Nelson *et al.* 2008], permiten la separación inequívoca de las especies estudiadas, incluso las del género *Lucilia*. El potencial diagnóstico de ITS2 se había utilizado previamente en Acari y algunos Díptera (Brachycera y Nematocera) para resolver las relaciones evolutivas y delimitaciones de algunas especies complejas [Walton *et al.* 2007a-b; Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008a-b, 2011; LaRue *et al.* 2009; Loaiza *et al.* 2013]. En contraste, un estudio realizado con dípteros necrófagos centroeuropeos sugiere la imposibilidad de distinguir algunas especies hermanas [Sonet *et al.* 2012]. En este sentido, especialmente cuando se trabaja con especies problemáticas, se recomienda tener sumo cuidado para evitar errores. Así, la realización de más estudios, que incluyan un amplio rango de poblaciones, será

necesaria para asegurar que los cambios nucleotídicos en las posiciones asignadas son especie-específicos, y no solo característicos de las poblaciones estudiadas.

Finalmente, un valor añadido de este estudio es la caracterización, por vez primera, de los marcadores: Cyt-b (307 pb) para *Ch. albiceps*, *P. regina*, *C. vicina*, *C. vomitoria*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar*, *L. illustris* y *L. bufonivora* (**Aportaciones I.I-I.III/I.V**); Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1 (495-496 pb) para *P. regina*, *L. ampullacea* y *L. caesar* (**Aportación I.II**); COII (725-731 pb) para especímenes de *Ch. albiceps*, *C. vicina*, *L. caesar* y *L. illustris* del sur de Europa (**Aportación I.IV**); la región que comprende COI *barcode* (658 pb) y el COI (616 pb) para los especímenes europeos de *P. regina* (**Aportación I.II**) y sur europeos de *M. autumnalis* (**Aportación I.IV**); ITS2 (310-352 pb) para *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. bufonivora* y *M. autumnalis*, para las especies de *Lucilia* (*L. sericata*, *L. ampullacea*, *L. caesar* y *L. illustris*) del sur de Europa, y para especímenes de *C. vomitoria* de la Península Ibérica (**Aportaciones I.III/I.V**); e ITS12 (1081-1083 pb) para *L. caesar* (**Aportación I.IV**). Este trabajo también aporta nuevas secuencias nucleotídicas de los *loci* COI *barcode*, para *L. richardsi*, *L. silvarum* y *H. bovis*, y COI (616 pb) para *L. richardsi*, que no habían sido caracterizados previamente en toda su longitud (**Aportación I.V**).

7.1.2.4. Filogenia de dípteros de interés médico-legal y veterinario

En general, la clasificación de especies depende de nuestra comprensión de la morfología, etología, ecología y genética de los organismos [Tobe *et al.* 2010]. Así, las comparaciones genéticas más recientes han llevado a un mejor conocimiento de los linajes de especies relacionadas [Tobe *et al.* 2010]. La mayoría de estudios filogenéticos utilizan uno o varios marcadores de ADN mitocondrial (ADNmt), y los contrastan con secuencias de referencia recogidas en las bases de datos [Caterino *et al.* 2000]. En estas comparaciones se asume que los datos registrados son correctos, representativos, no contienen errores, y que todos los individuos de una especie son genéticamente idénticos o muy similares [Tobe *et al.* 2010]. Normalmente, la

VII. Discusión general

homología entre dos individuos de la misma especie se aproxima al 100 %, siendo la variabilidad la responsable de las desviaciones hacia valores inferiores [Tobe *et al.* 2010].

En esta investigación las filogenias inferidas con ADNmt mostraron, en general, elevada consistencia y congruencia topológica en la resolución de los taxones como monofiléticos (**Aportaciones I.I/I.IV**). La mayor parte de los análisis moleculares basados en *loci* mitocondriales apoya la monofilia de la familia Calliphoridae con las diferentes subfamilias, formando una agrupación consistente, y diferenciada de las familias Muscidae y Oestridae (**Aportación I.IV**).

Dentro de la familia Calliphoridae, tanto los marcadores mitocondriales como nucleares clasifican a las subfamilias Calliphorinae y Luciliinae como grupos hermanos (**Aportaciones I.II/I.IV**). Estos resultados coinciden con otros estudios moleculares anteriores realizados para estos géneros [Wells *et al.* 2002; Stevens 2003; Wallman *et al.* 2005; Harvey *et al.* 2008; McDonagh & Stevens 2011; Nelson *et al.* 2012], y no concuerdan con algunos de los patrones definidos por la morfología, que agrupa a la subfamilia Calliphorinae con Chrysomyinae [Rognes 1997]. Por ello, se propuso la revisión de la morfología basada en el status de estas últimas subfamilias como grupos hermanos [Stevens 2003].

La monofilia de la subfamilia Chrysomyinae está apoyada por la mayoría de los marcadores mitocondriales (**Aportaciones I.II/I.IV**). En esta subfamilia, algunos taxones de las tribus Chrysomyini y Phormiini, como los géneros (*Protophormia*, *Phormia* y *Chrysomya*), presentan relaciones evolutivas diferentes según sus filogenias moleculares (**Aportación I.II**). Otros trabajos también clasificaron algunas tribus de esta subfamilia como parafiléticas y polifiléticas repetidamente [Wells & Sperling 2001; Stevens 2003; McDonagh & Stevens 2011; Singh *et al.* 2011; Nelson *et al.* 2012]. En general, en el género *Chrysomya*, la monofilia encontrada en las inferencias filogenéticas (**Aportaciones I.II/I.IV**) concuerda con estudios previos [Wells &

Sperling 2001; McDonagh & Stevens 2011; Nelson *et al.* 2012]. Algunas de las inconsistencias observadas en ciertos marcadores podrían explicarse bien por el reducido número de especies incluidas en el estudio, o bien por las diferencias geográficas entre poblaciones de una misma especie (**Aportaciones I.I/I.II**). Una vez más, será necesario realizar más estudios para confirmar esta hipótesis.

Dentro de la subfamilia Luciliinae encontramos un fuerte apoyo para la monofilia del género *Lucilia*, en línea con trabajos anteriores [Wallman *et al.* 2005; Kutty *et al.* 2010; Marinho *et al.* 2012; Nelson *et al.* 2012; Singh & Wells 2013]. Generalmente, los árboles filogenéticos construidos con los datos globales (incluyendo las secuencias del GenBank), a partir de ADNmt, revelaron la monofilia recíproca entre especies, a excepción de las especies *L. sericata*-*L. cuprina* y *L. caesar*-*L. illustris* (**Aportaciones I.I-I.III/I.IV**). Estas especies hermanas han sido reiteradamente resueltas como parafiléticas en estudios previos con *loci* mitocondriales [McDonagh & Stevens 2011; Williams *et al.* 2016]. Dichas relaciones filogenéticas podrían ser clarificadas analizando fragmentos de mayor longitud o genomas mitocondriales completos, que proporcionan mucha más información que los genes individuales [Avice *et al.* 1987; Harrison 1989; Simon *et al.* 1994; Nelson *et al.* 2012]. Sin embargo, dianas de mayor tamaño pueden presentar problemas de amplificación, especialmente en muestras degradadas en las que tiene lugar una importante reducción en el tamaño de los fragmentos de ADN (**Aportación I.IV**). Únicamente a través de la filogenia basada en el marcador nuclear ITS2 se pudieron resolver como monofiléticas las relaciones de todas las especies estudiadas (**Aportaciones I.II/I.IV**).

En general, COI *barcode* (658 pb) mostró mayor consistencia en los nodos exteriores y COI (616 pb) en los más profundos (**Aportación I.II**). Los árboles más robustos se obtuvieron mediante el análisis de los fragmentos de mayor tamaño (COI *barcode*-COI 616 pb, 1274 pb) (**Aportación I.II**), probablemente porque al analizar secuencias largas se minimiza la influencia de la varianza en la estimación de las distancias

VII. Discusión general

[Otranto & Stevens 2002]. Sin embargo, el marcador nuclear ITS2 (310-352 pb) aportó resultados similares con un tamaño considerablemente más reducido (**Aportación I.II**). Este es un aspecto destacable ya que, algunos análisis pueden resultar improductivos cuando se trabaja con secuencias de alrededor de 300 pb. Cabe destacar que la región ITS2 presenta un número de copias similar a la de los genes mitocondriales [Alquezar *et al.* 2010]. Esta característica, junto a su pequeña longitud, es ventajosa, especialmente en muestras degradadas.

Las limitaciones de ciertos *loci* en la resolución de las relaciones filogenéticas, de algunas especies (*L. sericata*, *L. cuprina*, *L. caesar* y *L. illustris*) incluidas en esta investigación, requieren de un trabajo más detallado con un mayor número de especímenes y marcadores para aclarar completamente el estatus filogenético de los miembros de esta importante familia. No obstante, los hallazgos aquí presentados constituyen un marco sólido para estudios futuros.

7.1.2.4.1. Especies hermanas del género Lucilia

En el género *Lucilia* algunos pares de especies, como *L. sericata*-*L. cuprina*, *L. caesar*-*L. illustris* o *L. coeruleiviridis* Macquart, 1855-*L. mexicana* Macquart, 1843, presentan una considerable similitud física que dificulta la identificación morfológica, incluso en los adultos, requiriendo éstos el examen minucioso de sus caracteres taxonómicos diagnósticos [Smith 1986; Norris 1990; Holloway 1991; Peris & González-Mora 1991; Szpila 2012]. Esta estrecha relación suele originar también problemas para el diagnóstico molecular inequívoco, haciéndolo infructuoso cuando se utilizan *loci* mitocondriales [Wells *et al.* 2007; Sonet *et al.* 2012; DeBry *et al.* 2013; Williams *et al.* 2016].

Las especies hermanas *L. sericata*-*L. cuprina* son las más estudiadas por su relevancia en el ámbito veterinario. Algunos trabajos señalan que la parafilia de *L. cuprina* con respecto a *L. sericata* se limita a los genes mitocondriales (ej. COI), mientras que los nucleares (ej. 28S o *per*) las agrupan en dos clados monofiléticos bien diferenciados

[Stevens *et al.* 2002; Tourle *et al.* 2009; McDonagh & Stevens 2011; Williams & Villet 2013]. Recientemente se ha demostrado que en los especímenes, morfológicamente definidos como *L. cuprina* con ADNmt de *L. sericata*, la parafilia es reflejo del genoma mitocondrial completo, y no una introgresión limitada a un único gen mitocondrial [Nelson *et al.* 2012].

Ciertos autores sugirieron que esta parafilia es un reflejo de diferencias sub-específicas en *L. cuprina*, constituyendo los especímenes con ADNmt de *L. sericata* la subespecie *L. c. cuprina* y el resto *L. c. dorsalis* [Waterhouse & Paramonov 1950; Norris 1990; Stevens & Wall 1996, 1997a; Stevens *et al.* 2002; Stevens 2003; Wallman *et al.* 2005; Wells *et al.* 2007; DeBry *et al.* 2010]. Así, *a priori* parece factible la diferenciación de las dos subespecies en función del ADNmt. El problema surgió cuando algunos híbridos (*L. c. cuprina*) presentaron índices morfológicos más parecidos a *L. cuprina* que los considerados como puros (*L. c. dorsalis*) [Tourle *et al.* 2009]. Por ejemplo, los especímenes africanos de *L. cuprina* morfológicamente considerados como *L. c. dorsalis* [Waterhouse & Paramonov 1950], se agrupaban en el clado *L. c. cuprina* según los datos genéticos [Tourle *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010].

Otra explicación para esta parafilia es que haya tenido lugar una hibridación entre las dos especies. En condiciones de laboratorio, *L. sericata* y *L. cuprina* se cruzan con éxito, aunque con una baja frecuencia, produciendo sistemáticamente híbridos morfológicamente similares a *L. cuprina* [Mackerass 1933; Ulllyett 1945; Waterhouse & Paramonov 1950]. Sin embargo, no se ha demostrado que esto ocurra de forma natural [Ulllyett 1945; Stevens *et al.* 2002]. Asimismo, la hibridación en el medio natural no debería ser direccional y tendría que proporcionar un patrón de múltiples haplotipos no relacionados [Nelson *et al.* 2012]. No obstante, a pesar del enorme esfuerzo de muestreo realizado hasta la fecha para estas especies, solo se han encontrado haplotipos híbridos en un sentido (*L. cuprina* ♂-*L. sericata* ♀) [Harvey *et al.* 2008; Tourle *et al.* 2009; McDonagh & Stevens 2011; Nelson *et al.* 2012].

VII. Discusión general

A este respecto, se debe mencionar que el componente genético de la morfología de los organismos está determinado en su ADN nuclear (ADNnu) [Williams & Villet 2013]. Así, cabría esperar que de la recombinación del ADNnu, tras el cruce entre especies, resultase una morfología intermedia (en rasgos multi-*locus*) o un mosaico de los dos fenotipos parentales (en rasgos de copia única) [Williams & Villet 2013]. Sin embargo, normalmente tiene lugar una hibridación asimétrica, siendo el fenotipo de la especie con los alelos dominantes el que prevalece [Lewin 1997; Funk & Omland 2003]. Como ejemplo, en garrapatas (Acari: Ixodidae: *Hyalomma*) es común no observar morfologías intermedias y que únicamente se presenten los caracteres externos de uno de los progenitores [Rees *et al.* 2003]. Este patrón de la hibridación asimétrica permite fundamentar que los especímenes que presentan el ADNmt similar a *L. sericata* se definan físicamente como *L. cuprina*, evidenciando la existencia de hibridación y la dominancia de los alelos de *L. cuprina* en la determinación final de la morfología [Williams & Villet 2013].

Sin embargo, la ausencia de evidencias detectables en el genoma nuclear, sugiere que este evento ocurrió hace suficiente tiempo para que las trazas de los alelos nucleares de *L. sericata* se eliminaran por dilución o pérdida estocástica, a la vez que se fijaba el nuevo linaje mitocondrial con el haplotipo de *L. sericata* [Stevens *et al.* 2002; Williams & Villet 2013]. Asimismo, las peculiaridades encontradas a lo largo de todo el genoma mitocondrial de *L. cuprina* parecen ser un argumento de peso contra la hibridación reciente [Nelson *et al.* 2012].

En este punto, cabe destacar que la hibridación ancestral y la separación incompleta de linajes son difíciles de distinguir de forma analítica, ya que pueden presentar patrones similares [Funk & Omland 2003; Degnan & Rosenberg 2009; Joly *et al.* 2009]. Sin embargo, la propuesta de que la parafilia de *L. cuprina* sea consecuencia de una separación incompleta de linajes, requeriría que los genes nucleares codificantes (28S y *per*) se fijaran más rápido que los mitocondriales, cuestión improbable considerando

que muestran una tasa de sustitución inferior [Ballard & Whitlock 2004; Lin & Danforth 2004; Haag-Liautard *et al.* 2008]. Asimismo, la selección positiva podría propiciar la fijación rápida de alelos concretos en distintos genes nucleares, pero esto no afectaría al genoma nuclear ampliamente [Stevens & Wall 1997a].

Por todo ello, la explicación más plausible, según el patrón filogenético mitocondrial encontrado en *L. cuprina*, es considerarlo un evento de hibridación anterior al último ancestro común a las poblaciones contemporáneas de *L. sericata* [Stevens & Wall 1996; Stevens *et al.* 2002; Tourle *et al.* 2009; Nelson *et al.* 2012]. Recientemente, han sido detectados algunos especímenes definidos morfológicamente como *L. cuprina*, ADNmt similar al de *L. sericata*, y genotipos nucleares diferentes a los típicamente encontrados en *L. cuprina* [Williams & Villet 2013]. Esto proporciona, según algunos autores, la primera evidencia genética de hibridación natural actual [Williams & Villet 2013]. No obstante, este nuevo planteamiento parece no tener una amplia acogida, por lo que se requerirá un estudio más profundo incluyendo más especímenes procedentes de poblaciones naturales de diferentes localidades a lo largo de un amplio rango geográfico y ecológico para aclarar el estatus filogenético de estas especies.

De forma similar, las especies hermanas, *L. coeruleiviridis*-*L. mexicana* (Estados Unidos) y *L. caesar*-*L. illustris* (Europa), también han mostrado relaciones parafiléticas en las inferencias con genes mitocondriales [Sonet *et al.* 2012, 2013; DeBry *et al.* 2013], lo que impide su diferenciación inequívoca mediante los marcadores mitocondriales estudiados. Así, *L. mexicana* es parafilética con respecto a *L. coeruleiviridis*, al presentar los especímenes definidos como *L. mexicana* el haplotipo mitocondrial (COI) de *L. coeruleiviridis* [DeBry *et al.* 2013; Williams *et al.* 2016]. Esta parafilia se ha detectado en Tejas y Nuevo Méjico [Williams *et al.* 2016]. Sin embargo, la utilización de genes nucleares (28S y *per*) permite la separación inequívoca de ambas especies [Williams *et al.* 2016]. Todo esto, sugiere que la

VII. Discusión general

introgresión entre estas dos especies es similar a la encontrada en *L. sericata*-*L. cuprina* [DeBry *et al.* 2013].

Por su parte, en las filogenias basadas en genes mitocondriales, *L. caesar* y *L. illustris* se resuelven como parafileticas recíprocas al compartir haplotipos (**Aportación I.IV**), en concordancia con otros estudios [Sonet *et al.* 2012; Williams *et al.* 2016]. Además, ciertos trabajos sugieren que la identificación de estas especies utilizando marcadores nucleares no es posible o no está asegurada, al tratarse de muestras reducidas de orígenes geográficamente aislados (ej. 28S; *L. caesar*: Francia, 2 especímenes; *L. illustris*: Japón, Suiza, Canadá y USA, 7) [Williams *et al.* 2016]. Sin embargo, la presente investigación ha demostrado la efectividad del marcador nuclear ITS2 en la discriminación inequívoca de dichas especies, al resolver sus filogenias como monofiléticas, en un número elevado de especímenes de la Península Ibérica (**Aportaciones I.III-I.V**). Así, encontrar un marcador apropiado para la identificación molecular es fundamental, pero también lo es el muestreo exhaustivo de la variabilidad genética potencial a través de las poblaciones de cada especie en el lugar donde el método vaya a ser utilizado. Asimismo, serán necesarios estudios adicionales para aclarar la historia filogenética de estas dos especies.

Los resultados aquí presentados corroboran la idea de que el análisis simultáneo de marcadores mitocondriales y nucleares es la mejor manera para resolver de forma precisa las relaciones filogenéticas, detectando introgresiones e incoherencias que el estudio de un solo marcador puede no reflejar [Whitworth *et al.* 2007; Tourle *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010].

7.1.2.4.2. Filogenia en especies miásicas

Hay que incidir en la importancia de muchas especies de la familia Calliphoridae, no solo como colonizadores tempranos de cadáveres sino también como ectoparásitos facultativos de mamíferos (generalmente individuos enfermos o heridos).

En cuanto a los hábitos miásicos, en el género *Lucilia* se podrían esperar relaciones filogenéticas más estrechas entre especies que actúan como agentes miásicos facultativos, primarios (ej. *L. sericata* y *L. cuprina*), secundarios (ej. *L. caesar* y *L. illustris*), y obligados (ej. *L. bufonivora*). Sin embargo, estas especies se agrupan con otras normalmente no asociadas a miasis (ej. *L. ampullacea* y *L. silvarum*) (**Aportaciones I.III.IV**; resultados no mostrados), lo que sugiere que dentro de los grupos filogenéticos no existe progresión en el hábito miásico [Stevens & Wall 1997b; Williams *et al.* 2016]. La explicación más plausible de estos hallazgos es la evolución polifilética del hábito miásico tras varios eventos independientes. Asimismo, a nivel intra-específico cabría esperar la existencia de una marcada variabilidad nucleotídica en función de las diferencias etológicas según el origen geográfico de algunas especies. Sin embargo, en concordancia con estudios anteriores [Stevens & Wall 1997b], no se aprecia una relación reseñable entre las diferencias genéticas en especímenes de distinta procedencia y su comportamiento patogénico (**Aportaciones I.I-I.V**). Esto sugiere que el hábito miásico ha surgido de forma relativamente reciente e independiente en poblaciones de diferentes orígenes [Stevens & Wall 1997b]. Además, el clima parece ser un factor determinante para que una especie se constituya como agente miásico dominante en una región [Stevens & Wall 1997b]. Como ejemplo, *L. sericata* es la especie miásica por excelencia en hábitats templados-fríos (Europa y Nueva Zelanda), mientras que *L. cuprina* incide en hábitats subtropicales y templados-cálidos (Australia y Suráfrica) [Hall 1997; Stevens & Wall 1997b]. Asimismo, aunque *L. caesar* y *L. illustris* están presentes en toda la zona Paleártica templada [Stevens & Wall 1997b], se asocian más frecuentemente a miasis en las zonas más frías de la misma [Brikmann 1976; Hall 1997]. No obstante, estos patrones de comportamiento dependientes del clima parecen no cumplirse en esta investigación. Así, aunque la presencia de *L. sericata* y *L. cuprina* en la CAPV se haya confirmado previamente [Salóña-Bordas *et al.* 2009], estas especies no han intervenido en ninguna de las infestaciones aquí estudiadas, siendo *L. caesar* el agente miásico dominante en nuestra

VII. Discusión general

región (**Aportación I.IV**). Estudios previos registraron etologías similares en las poblaciones de *L. sericata* del sur de la Península Ibérica [Martínez-Sánchez *et al.* 2007]. Se requiere una investigación más exhaustiva, ampliando el número de casos de miasis en mamíferos, para corroborar esta discordancia.

7.1.2.5. Divergencia entre pares en dípteros de interés médico-legal y veterinario

En la actualidad, existe cierta controversia sobre el porcentaje umbral que permite una sólida discriminación entre especies. Generalmente, la identificación molecular se considera fiable cuando el nivel máximo de variación intra-específica está por debajo del nivel mínimo de variación inter-específica. Así, algunos autores establecieron para el marcador universal (COI *barcode*) que la divergencia entre individuos de la misma especie debe estar por debajo del 3 %, mientras que entre distintas especies debe superar este porcentaje [Hebert *et al.* 2003]. Otros autores registraron, para diferentes *loci* mitocondriales (ej. COI o COI-COII), máximos intra-específicos inferiores al 0,8-1,0 % y mínimos inter-específicos superiores al 3,0-3,6 % para Calliphoridae [Wallman & Donnellan 2001; Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008; Zehner *et al.* 2004b; Boehme *et al.* 2010; Salem *et al.* 2015]. Por su parte, en mamíferos se detectó un hueco, o *gap*, entre el valor máximo intra-específico (<1,5 %) y el mínimo inter-específico (>2,5 %) en el ADNmt (COI y Cyt-b) [Tobe *et al.* 2010]. Sin embargo, el establecimiento de umbrales extrapolables entre grupos taxonómicos puede resultar controvertido ya que, a menudo, los taxones no mantienen rangos fijos y pueden mostrar notables fluctuaciones. Como ejemplo, en la familia Oestridae se detectó una divergencia intra-específica única del 0,35 %, mientras que la inter-específica varía considerablemente en cada subfamilia (Hypodermatinae: 13,1 %; Oestrinae: 13,3 %; Gasterophilinae: 9,6 %; Cuterebrinae: 5,3 %) [Otranto & Stevens 2002]. Además, frecuentemente, estos límites universales no satisfacen la discriminación entre especies estrechamente relacionadas.

En nuestra investigación, el análisis de la divergencia intra-específica entre pares de secuencias para los *loci* mitocondriales estudiados (COI *barcode*, COI 616 pb, COII, Cyt-b y Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1) reveló una importante similitud, e incluso la coincidencia, en la mayoría de los casos (excluyendo los haplotipos compartidos en especies hermanas) (**Aportaciones I.II-I.V**). La notable homología con los haplotipos de referencia registrados en GenBank confirmó la mayoría de los diagnósticos, en concordancia con la información relativa a la morfología (**Aportaciones I.II-I.V**). En general, nuestros hallazgos corroboran el valor umbral máximo intra-específico establecido entre 0,8-1 % para *loci* mitocondriales (Diptera) (**Aportaciones I.III-I.IV**) [Wallman & Donnellan 2001; Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003a-b, 2008; Zehner *et al.* 2004b; Boehme *et al.* 2010; Salem *et al.* 2015]. Solamente unas pocas especies revelaron variabilidades nucleotídicas superiores a este límite (**Aportaciones I.II-I.V**), y, por lo general, en línea con la divergencia intra-específica máxima (1,5 %) encontrada para *loci* mitocondriales en mamíferos [Tobe *et al.* 2010]. Excepcionalmente, los valores encontrados en algunas especies para ciertos haplotipos del GenBank (*P. regina*, *C. vomitoria*, *L. cuprina*, *L. caesar* y *L. illustris*) superaron holgadamente incluso este último máximo (**Aportaciones I.II/I.IV-I.V**). Normalmente, se tiende a cuestionar la precisión en la identificación inicial de las secuencias que manifiestan divergencias fuera de lo común (*outliers*). No obstante, las marcadas discrepancias intra-específicas aquí encontradas coinciden con poblaciones geográficamente separadas, y por tanto genéticamente aisladas, en las que se va acumulando la divergencia que puede desencadenar el inicio del proceso de especiación (**Aportaciones I.II/I.IV-I.V**). Se requieren más estudios a este respecto para confirmar esta hipótesis. En este sentido, no hay que olvidar que la entomología forense es una ciencia específica del lugar; por eso, al igual que los tiempos de desarrollo deben estimarse centrándose en la entomofauna característica de la región, las aproximaciones genéticas deben hacerse desde una perspectiva local para evitar

VII. Discusión general

errores o incertidumbres en las identificaciones [Wallman & Donnellan 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008; Jordaens *et al.* 2013a; Nakano & Honda 2015].

El análisis de la divergencia inter-específica entre pares de secuencias para los *loci* mitocondriales mostró valores elevados para la mayoría de las especies (excluyendo las especies hermanas) (**Aportaciones I.II-I.IV**). Los valores mínimos inter-específicos aquí encontrados superaban, generalmente, el límite del 3 % establecido para *loci* mitocondriales [Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003a, 2008; Hebert *et al.* 2003; Salem *et al.* 2015]. Únicamente algunas especies del género *Lucilia* (*L. caesar-L. illustris*, *L. sericata-L. silvarum* y *L. richardsi-L. silvarum*) revelaron una divergencia nucleotídica por debajo de este límite (**Aportaciones I.III-I.IV**). Así, globalmente, *L. caesar-L. illustris* mostraron algunos haplotipos mitocondriales compartidos con divergencia inter-específica de 0,0 % (**Aportaciones I.III-I.V**). Sin embargo, para estas especies hermanas, en las poblaciones de la CAPV (excluyendo los datos del GenBank) no se detectaron haplotipos idénticos, aunque las distancias intra e inter-específicas seguían siendo muy reducidas (**Aportaciones I.IV-I.V**). Por su parte, se debe destacar que en los pares de especies no hermanas los mismos marcadores (COI *barcode*, COI 616 pb y Cyt-b) revelaron valores de divergencia genética irregulares y frecuentemente inferiores al valor umbral (*L. sericata-L. silvarum*: 3,2-4,0/4,1-4,7/1,6-2,6 y *L. richardsi-L. silvarum*: 1,7-2,0/2,1-2,3/2,6-3,3) (**Aportación I.V**). Dichas singularidades concuerdan con las notables diferencias de variabilidad en función del clado mostradas por algunos marcadores al estudiar genomas mitocondriales completos [Nelson *et al.* 2012]. Estos hallazgos, sugieren que la evolución asimétrica no se limita únicamente a distintas regiones de un mismo marcador o a diferentes marcadores, sino también parece estar condicionada por los taxones objeto de estudio (**Aportación I.V**). Así, mientras para *L. sericata-L. silvarum* el marcador COI (616 pb) es más discriminativo, para *L. richardsi-L. silvarum* lo es el *locus* Cyt-b (**Aportación I.V**). Tradicionalmente, la dificultad de discriminación del ADNmt a nivel específico se

asocia a especies estrechamente relacionadas, como *L. caesar*-*L. illustris*, en las que la identificación morfológica suele estar condicionada por la similitud física extrema. Este patrón se ha observado previamente en diferentes géneros, *Chrysomya* [Harvey *et al.* 2008], *Calliphora* [Wallman & Donnellan 2001] y *Lucilia* [Wells *et al.* 2007; Sonet *et al.* 2012; DeBry *et al.* 2013]. Sin embargo, los pares de especies problema aquí mencionados no solo se agrupan en subgéneros diferentes de acuerdo a su morfología (*Phaenicia*: *L. sericata* y *L. richardsi*; *Bufolucilia*: *L. silvarum*) [Peris & González-Mora 1991], sino que también presentan valores de divergencia elevados en el ADNnu (ITS2) (*L. sericata*-*L. silvarum*: 15,3-17,7 y *L. richardsi*-*L. silvarum*: 14,1) que las descartan como especies hermanas (**Aportación I.V**). Considerando que la delimitación específica fiable depende fundamentalmente de la magnitud y del mantenimiento entre la variabilidad intra-específica y la divergencia inter-específica en la región seleccionada [Tan *et al.* 2010], nuestros hallazgos cuestionan la fidelidad y fiabilidad de las generalizaciones en los marcadores mitocondriales.

Globalmente, el *locus* COI *barcode* (658 pb) mostró una variabilidad nucleotídica inter-específica máxima similar, o incluso superior a la del resto de marcadores mitocondriales (**Aportaciones I.II-I.V**). Sin embargo, dentro del género *Lucilia*, COI (616 pb) y Cyt-b (307 pb) revelaron mayor divergencia que el marcador más habitual (**Aportaciones I.I-I.V**). Asimismo, el *locus* COII (725-731 pb) presentó la mayor divergencia (17,9) y diferencias en las longitudes de las secuencias para algunas de las especies de Calliphoridae (*Ch. albiceps*: 728 pb; *C. vicina*: 725 pb; *L. caesar* y *L. illustris*: 731 pb) (**Aportación I.IV**). En general, para los Calliphoridae de la Península Ibérica (Portugal y CAPV) la divergencia máxima intra-específica registrada en los *loci* mitocondriales (COI *barcode*/COI 616 pb/Cyt-b) fue 0,9-1,3 % y la mínima inter-específica 2,9-3,2 % (excluyendo las especies complejas) (**Aportaciones I.III/I.V**). Además, estos marcadores presentaron un hueco, o gap, entre los valores máximos intra-específicos y los mínimos inter-específicos desde 0,9/1,1/1,3 a 3,2/3,2/2,9

VII. Discusión general

(excluyendo las especies complejas) (**Aportaciones I.III/I.V**). Cabe destacar que el análisis del marcador COI (616 pb) en las poblaciones de la CAPV, incluyendo las especies problemáticas, presentaron divergencias intra e inter-específicas sin solapamiento, siendo la variación máxima intra-especies igual que la mínima inter-especies (1.8) (**Aportación I.V**).

Por su parte, el marcador nuclear ITS2 (310-352 pb), prácticamente carece de divergencia genética intra-específica (**Aportaciones I.II-I.V**). Incluso cuando se consideran las secuencias recogidas en GenBank, el número de variantes es sumamente reducido (**Aportaciones I.II-I.V**). Esta baja variabilidad nucleotídica se ajusta a los procesos de homogeneización, a través de evolución concertada, previamente observados en Diptera [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008a]. Únicamente las especies *C. vomitoria* y *L. sericata* presentaron heterogeneidad en sus secuencias (0,0-1,5 % y 0,0-0,6 %, respectivamente) (**Aportaciones I.III/I.V**). Sin embargo, esta región exhibió la mayor divergencia inter-específica y una resolución superior a cualquier *locus* mitocondrial, permitiendo la clara e inequívoca diferenciación incluso de las especies más complejas del género *Lucilia* (**Aportaciones I.III-I.V**). Estos resultados contrastan con estudios previos sobre la entomofauna centroeuropea, donde algunas especies de *Lucilia* mostraron mezclas en los haplotipos nucleares [Sonet *et al.* 2012]. No obstante, coinciden con otros trabajos en los que la rápida evolución de la región ITS2 permitió la resolución de las relaciones filogenéticas a diferentes niveles jerárquicos: género, especie, o inferiores (subespecie) [Otranto & Stevens 2002; Trizzino *et al.* 2009]. Globalmente, en el marcador nuclear ITS2 (310-352 pb) la variación máxima intra-específica y la mínima inter-específica observada fue 0,5-0,6 % y 8,4-12,8 %, respectivamente (excluyendo las especies complejas) (**Aportaciones I.III/I.V**). Además, este marcador presentó un hueco, o *gap*, claramente definido incluso en las especies de reciente divergencia *L. caesar* y *L. illustris* (0,0 y 1,5-1,7 %) (**Aportaciones I.III/I.V**). Por ello, su idoneidad como herramienta diagnóstica puede

ser extendida, al menos, a los dípteros de interés médico-legal y veterinario del sur de Europa (Portugal y España) (**Aportaciones I.III-I.V**).

Nuestros datos apoyan que el uso combinado de marcadores mitocondriales y nucleares proporciona la discriminación más robusta entre especies. La escasa divergencia nucleotídica inter-específica detectada para COI *barcode* (658 pb) sugiere cierta cautela en los diagnósticos específicos, principalmente en especies estrechamente relacionadas. Sin embargo, ITS2 (310-352 pb) parece ser el marcador más apropiado para la discriminación de las especies más complejas.

Igualmente, este trabajo destaca la importancia de realizar muestreos exhaustivos, tanto a nivel local como global, registrando toda la riqueza específica y diversidad genética posible, para mejorar la comprensión de las relaciones filogenéticas y la precisión en las identificaciones moleculares. Todo esto, sin obviar el carácter local de la entomología y evitando generalizaciones al realizar los diagnósticos. Además, la información biológica adicional es también importante para ayudar a la correcta interpretación de los resultados, si bien los conocimientos actuales sobre algunas de las especies estudiadas son todavía limitados.

La presente investigación hizo posible la determinación de la variabilidad intra e inter-específica para cada marcador, y la identificación de los más eficaces para diferenciar las especies estrechamente relacionadas. Todos estos nuevos conocimientos moleculares sobre los dípteros de interés médico-legal y veterinario del sur de Europa (Península Ibérica) resultan de interés para la adecuada praxis de la entomología molecular forense.

7.1.2.6. *Problemática del ADN barcode y las bases de datos*

Históricamente, diferentes regiones del gen mitocondrial COI se han utilizado para la identificación de invertebrados, incluidos los dípteros de interés médico-legal y, veterinario. Actualmente, la región *barcode* es la más habitual en los estudios genéticos

VII. Discusión general

[Boehme *et al.* 2010; Meiklejohn *et al.* 2011; Jordaens *et al.* 2013b; Rolo *et al.* 2013]. La idea de utilizar una parte del *locus* COI como marcador diagnóstico universal (COI *barcode*) surgió para permitir la identificación de los especímenes desconocidos al compararlos con las secuencias de referencia de especies previamente identificadas [Roe & Sperling 2007].

Aunque, por norma general, su utilización en identificación de dípteros es sostenible, el uso exclusivo de este marcador puede conducirnos a diagnósticos taxonómicos inexactos en especies estrechamente relacionadas (ej. *L. sericata*-*L. cuprina* o *L. caesar*-*L. illustris*) [Wallman *et al.* 2005; Harvey *et al.* 2008; Tourle *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2013], por la existencia de permeabilidad genética (hibridación, transgresión, etc.) [Zimmer 2001; Baudry *et al.* 2003; Whitworth *et al.* 2007]. En estos casos, la inferencia filogenética en función del ADNmt puede no proporcionar necesariamente una identificación acorde con su morfología o su ADNnu. Por ello, es necesaria la utilización combinada de genes nucleares y mitocondriales para detectar situaciones potencialmente confusas y aclarar el estatus filogenético [Rubinoff *et al.* 2006; Nelson *et al.* 2007; Roe & Sperling 2007; Williams *et al.* 2008; Tantawi *et al.* 2010].

Asimismo, un estudio realizado utilizando regiones del gen COI (mínimo de 300 pb) en un número elevado de especies de dípteros (449) proporcionaba una tasa de éxito inferior al 70 % en el diagnóstico específico [Meier *et al.* 2006]. Este fracaso ocasional del *locus* COI para discriminar entre especies de dípteros podría ser en realidad una deficiencia inherente a las identificaciones basadas únicamente en ADNmt.

Además, algunos autores recalcan la importancia de considerar la información no genética, como la historia natural, estacionalidad o rangos geográficos de las especies [Wells & Williams 2007]. Como ejemplo, aunque *L. caesar*-*L. illustris* comparten haplotipos, solo *L. illustris* está presente en el Nuevo Mundo [Wells *et al.* 2007]. Sin

embargo, cuando ambas especies problema coexisten, se requieren análisis genéticos o morfológicos adicionales que aporten fiabilidad a la identificación.

Por todo ello, un enfoque combinado es el idóneo para verificar el diagnóstico específico y hacer frente a estos retos, incluyendo la identificación morfológica del espécimen, la aplicación de los conocimientos biológicos, ecológicos y etológicos, así como el análisis de ADN de múltiples regiones diana.

Otra de las cuestiones a considerar es la integridad de los datos: en general, el éxito de la identificación molecular estará condicionado por el número de especies y la validez de la información recogida en las bases de datos.

Es importante disponer de un conjunto de datos originales, lo más completo posible, para asegurar los diagnósticos a nivel de especie e inferiores, y para documentar las variaciones entre poblaciones de diferentes regiones geográficas [Stevens & Wall 2001; Wells & Williams 2007]. En este sentido, el moderado coste de secuenciación está generando un incremento exponencial del volumen de información molecular registrada en las bases de datos. Generalmente, se confía en el material publicado, y no se realizan estudios regionales de forma activa que permitan conocer la variabilidad de los especímenes locales. Sin embargo, el valor de esta información y la validez de su extrapolación está limitado por la precisión y la integridad de la muestra de referencia [Dawnay *et al.* 2007].

Ocasionalmente, la comparación de secuencias de ADN con las bases de datos revela desviaciones del patrón general, o *outliers*, que podrían representar una muestra extrema o parte de una población sin muestrear [Harvey *et al.* 2008]. Algunas de las razones que pueden explicar la elevada divergencia, son las introgresiones, el aislamiento genético, o las identificaciones erróneas. Desafortunadamente, las identificaciones erróneas son un problema más frecuente de lo deseado [Bridge *et al.* 2003; Harris 2003; Nilsson *et al.* 2006; Dawnay *et al.* 2007; Valkiunas *et al.* 2008; Park *et al.* 2009b; Jordaens *et al.* 2013b; Salem *et al.* 2015; Williams *et al.* 2016]. Por

VII. Discusión general

eso, es fundamental establecer normas y controles estrictos que verifiquen las secuencias enviadas para eliminar los registros erróneos de las bases de datos, y mantener su integridad [Nakano & Honda 2015].

7.1.2.7. Síntesis

Esta investigación demuestra la utilidad de las regiones COI (616 pb) y Cyt-b (307 pb) de ADN mitocondrial, e ITS2 (310-352 pb) de ADN nuclear, como herramientas diagnósticas prometedoras para la diferenciación inequívoca de especies (**Aportaciones I.II-I.V**). En general, los dos primeros marcadores acumulan elevada variabilidad nucleotídica en comparación con el *locus* estándar (COI *barcode*) o el resto de marcadores mitocondriales estudiados en las especies complejas (**Aportaciones I.II/I.V**). Asimismo, entre los *loci* de ADNmt, Cyt-b (307 pb) destacó al presentar una divergencia inter-específica considerable dentro del género *Lucilia*, a pesar de su corta longitud (**Aportaciones I.III/I.V**). Sin embargo, únicamente la región nuclear ITS2 (310-352 pb) permitió delinear los límites de las especies de forma clara y consistente, y resolver como monofiléticas incluso las especies estrechamente relacionadas (**Aportaciones I.III-I.IV**).

De esta manera señalamos la conveniencia del análisis multi-región para el diagnóstico inequívoco a nivel específico, en especial en las resoluciones forenses, recomendando la selección de *loci* mitocondriales como primera aproximación taxonómica en muestras desconocidas, así como de los nucleares para lograr el diagnóstico a nivel de especie, fundamentalmente en especies complejas.

Cabe destacar que el *locus* COI dispone de gran cantidad de secuencias en las bases de datos, lo que supone una ventaja cuando se trabaja con especies poco estudiadas a nivel genético, como los dípteros miásicos. Este marcador se ha utilizado con éxito en el diagnóstico de un inmaduro en malas condiciones de preservación, y morfología no concluyente, que finalmente se identificó como *M. autumnalis* (**Aportación II.I**), y para el control de calidad en un estudio a gran escala, en el que se detectó falta de

congruencia entre el diagnóstico morfológico y molecular de un adulto, que finalmente se resolvió como *L. bufonivora* (**Aportación II.II**). Asimismo, considerando que la estimación del IPM no solo precisa el diagnóstico inequívoco a nivel específico, sino también requiere la aplicación de estudios fiables sobre desarrollo, la identificación molecular puede aplicarse para confirmar hibridaciones y mantener la pureza de las especies en las colonias experimentales. Esto evidencia la necesidad de complementar la taxonomía tradicional con la molecular para evitar incertidumbres que puedan conducir a errores.

Nuestra contribución incrementa los recursos genéticos disponibles y aporta nuevos datos de interés para el correcto diagnóstico específico y la comprensión de la historia filogenética de los dípteros de relevancia médico-legal y veterinaria, del centro (región europea de *Westphalia*, Alemania) y sur de Europa (Península Ibérica: Portugal y norte de España) (**Aportaciones I.I-I.V**). Este aspecto resulta de incuestionable valor considerando la escasez de información disponible al respecto en las bases de datos moleculares, especialmente para la Península Ibérica.

Éste es el primer estudio en profundidad, con un enfoque molecular, de la entomofauna de interés médico-legal y veterinario de la Península Ibérica (España y Portugal) y que constituye un primer paso para establecer una base de datos de referencia para la Península Ibérica que facilite los diagnósticos específicos en futuras investigaciones.

7.1.3. Nuevas técnicas de identificación molecular

En un principio, esta investigación se había centrado en la identificación molecular de insectos, combinando amplificación de ADN mediante PCR y secuenciación. Uno de los principales retos de la biología molecular es la incorporación de tecnologías que mejoren las prestaciones ofrecidas por las convencionales. Recientemente, el análisis de los perfiles de disociación de alta resolución (*high-resolution melting*, HRM) se ha introducido como una técnica, sensible y rápida, para el genotipado de polimorfismos,

VII. Discusión general

la detección de mutaciones y la asignación de homología [Reed *et al.* 2007; Radvansky *et al.* 2011; Wong *et al.* 2013]. Este método permite determinar la variación en un único paso, sin requerir oligonucleótidos marcados con fluorescencia o procesamiento post-PCR, reduciendo tiempos, costes y riesgo de contaminación [Malewski *et al.* 2010; Ríos & Yuil de Ríos 2010; Buddhakosai *et al.* 2014].

Aunque esta técnica se utiliza ampliamente para el diagnóstico clínico de patógenos (virus, bacterias o protozoos y sus variantes) [Monis *et al.* 2005; Lin *et al.* 2008; Pietzka *et al.* 2009], en el contexto entomológico su aplicación se encuentra aún sin desarrollar. Únicamente, un número reducido de estudios aborda el diagnóstico de insectos vectores de enfermedades, principalmente de importancia veterinaria y agrícola [Kang & Sim 2013; Wetten *et al.* 2016]. En el contexto forense, hasta ahora, un único trabajo ha utilizado el análisis HRM del *locus* mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI) (HRM-COI), para el diagnóstico de los califóridos de Polonia [Malewski *et al.* 2010]. Sin embargo, el análisis del *locus* COI presenta algunos inconvenientes, como una discriminación limitada entre especies estrechamente relacionadas [Harvey *et al.* 2008; DeBry *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2012], y una elevada variabilidad intra-específica, que puede incrementar el gasto analítico al requerirse un mayor número de muestras de referencia. Asimismo, los diagnósticos mediante HRM-COI son más laboriosos y gravosos al requerir el análisis de dos pares de *primers* diferentes en reacciones separadas [Malewski *et al.* 2010].

En general, la fiabilidad de esta técnica en la diferenciación de especies está principalmente condicionada por la diversidad nucleotídica intra-específica [Malewski *et al.* 2010]. Las características ideales para el análisis HRM consisten en una secuencia de ADN con baja diversidad intra-específica y alta variabilidad inter-específica flanqueada por regiones conservadas [Malewski *et al.* 2010; Radvansky *et al.* 2010]. En este sentido, el segundo espaciador transcrito interno (ITS2) de ADN ribosómico nuclear (ADNr), combina una reducida o nula divergencia intra-específica

con una elevada variabilidad nucleotídica (sustituciones e INDELS) entre especies [Hillis & Dixon 1991], posibilitando la identificación inequívoca incluso de especies hermanas (**Aportaciones I.II-I.V**). Estas características lo convierten en el candidato ideal para el análisis HRM.

En esta investigación se desarrolló y validó un ensayo basado en el análisis mediante HRM de la región nuclear ITS2 (310-343 pb) (HRM-ITS2) como herramienta diagnóstica para la diferenciación inequívoca de dípteros (**Aportación I.VI**). El ensayo se centró en siete especies de califóridos (*Ch. albiceps*, *L. ampullacea*, *L. sericata*, *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. caesar* y *L. illustris*) de importancia médico-legal y veterinaria de la Península Ibérica (sur de Europa) [Soler-Cruz 2000; Prado e Castro *et al.* 2011, 2012], considerando la complejidad de los diagnósticos morfológicos por las similitudes físicas. La validación de los diagnósticos mediante HRM-ITS2 se realizó en un elevado número de especímenes (295), que habían sido previamente identificados morfológicamente y molecularmente, mediante secuenciación.

Los perfiles de disociación obtenidos permitieron la clara diferenciación de las siete especies, en concordancia con los datos de secuenciación y/o las muestras de referencia para cada especie (**Aportación I.VI**). En general, las curvas normalizadas fueron asignadas a una de las especies con un nivel de confianza (92,4-99,9 %, **Aportación I.VI**) superior al umbral mínimo establecido en 90 % [Kirkpatrick *et al.* 2009; Ganopoulos *et al.* 2012]. Las diferencias en el nivel de confianza están probablemente relacionadas con la variabilidad en la calidad del ADN o con la presencia de inhibidores, que pueden limitar la eficiencia de amplificación [Malewski *et al.* 2010; Wong *et al.* 2013]. Aunque algunos autores han sugerido que los inhibidores no influyen en los perfiles de disociación [Herrmann *et al.* 2007; Jaakola *et al.* 2010; Malewski *et al.* 2010], lo cierto es que su efecto estará condicionado por la dilución final. Así, a mayor volumen final menor será la interferencia de los inhibidores.

VII. Discusión general

Globalmente, el análisis HRM-ITS2 mostró variaciones menores en las temperaturas de disociación (T_m) entre las duplicaciones en una misma reacción (intra-reacción) y las reacciones en diferentes días (inter-reacción), siendo las curvas de disociación y los órdenes de temperatura consistentes para cada especie (**Aportación I.VI**). Los reducidos valores en la desviación estándar (DS) de la T_m aquí encontrados se asocian con una elevada repetitividad y reproducibilidad [Buddhakosai *et al.* 2014].

La metodología desarrollada en esta aportación demostró la robustez del análisis HRM-ITS2 para la diferenciación, simple, rápida y fiable de dípteros necrófagos, utilizando solo un único par de *primers*, en una reacción en tubo cerrado, y sin procesamiento post-PCR ni pruebas con oligonucleótidos marcados con fluorescencia (**Aportación I.VI**). De esta forma, se reducen costes y riesgos de contaminación, ventajas a considerar cuando se trabaja en un contexto forense. Además, el HRM es un método no destructivo, pudiendo ser secuenciados los productos de las muestras que no se agrupan con los perfiles de referencia [Peña *et al.* 2012; Decat *et al.* 2013].

El actual estudio proporciona los primeros perfiles HRM-ITS2 que pueden ser de utilidad, en investigaciones futuras, como estándares para la identificación práctica de especies. No obstante, en este trabajo se ha analizado únicamente una selección de las especies de califóridos de mayor interés en el sur de Europa. Serán necesarios estudios adicionales con especies y especímenes de diferentes procedencias para confirmar la utilidad de su extrapolación, sin olvidar que la entomofauna es específica del lugar, y que el análisis HRM-ITS2 debe incluir los perfiles de referencia de las especies características de la región.

7.2. Identificación a nivel específico e individual de cadáveres utilizando el contenido digestivo de dípteros inmaduros en casos reales

La aplicación principal del análisis molecular en un contexto forense es el diagnóstico a nivel específico de los insectos para estimar el periodo de actividad de los mismos

(PAI), que suele aproximarse al intervalo *post-mortem* (IPM). Sin embargo, en determinadas situaciones, pueden ser igualmente de interés como fuente de ADN de vertebrados. Así, el contenido digestivo de los mismos, con ADN del hospedador (fuente de alimento), se puede emplear para la identificación de la última comida del insecto a nivel de especie, e, incluso, de individuo.

En un contexto médico o veterinario, la mayoría de estudios se orientan a la investigación de insectos hematófagos para el control epidemiológico [Coulson *et al.* 1990; Boakye *et al.* 1999; Kreike & Kampfer 1999; Mukabana *et al.* 2002; Curic *et al.* 2014]. En el ámbito forense, su aplicación más relevante es la determinación de la identidad de la víctima o del sospechoso, bien a partir de los insectos hematófagos [Replogle *et al.* 1994; Lord *et al.* 1998; Mumcuoglu *et al.* 2004] transferidos durante agresiones sexuales o localizados en un lugar determinado, bien a partir de los necrófagos [Carvalho *et al.* 2005; Di Luise *et al.* 2008] cuando el cuerpo ha sido recolocado, o concurren varios cadáveres y la conexión de la larva con los mismos es dudosa [Wells *et al.* 2001a; Zehner *et al.* 2004a; Campobasso *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2005; Di Luise *et al.* 2008], y por último, a partir de los miásicos en casos de negligencia o maltrato. No obstante, hasta la fecha, su utilización en casos reales es limitada [Zehner *et al.* 2004a; Di Luise *et al.* 2008; Li *et al.* 2011; Marchetti *et al.* 2013], basándose los estudios más consistentes en situaciones simuladas de las que se obtienen resultados experimentales ideales, que frecuentemente no son extrapolables [Clery 2001; Mumcuoglu *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2005; Kondakci *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014].

Actualmente, en los laboratorios forenses, para el diagnóstico de especies o subespecies de animales vertebrados, se utiliza el gen mitocondrial citocromo b (Cyt-b) [Zehner *et al.* 1998; Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003; Wells & Stevens 2010], mientras que para la diferenciación de poblaciones humanas los *loci* hipervariables (HVI y HVII) de la región control no codificante, o D-loop, proporcionan información

VII. Discusión general

adicional [Anderson *et al.* 1981; Sullivan *et al.* 1992]. Además, debemos mencionar que la reciente avalancha de datos genéticos obtenidos para el marcador COI *barcode*, probablemente favorezca su utilización como herramienta diagnóstica en las investigaciones forenses en un futuro próximo.

Por su parte, la identificación individual en humanos, y algunos otros mamíferos, se realiza mediante el análisis de una batería de microsátélites (STRs, *short tandem repeats*) bien establecidos [Vallejo & Alonso 2009; Phillips *et al.* 2011; Gamarra *et al.* 2015]. Generalmente, para ADN en buenas condiciones se utilizarán amplificadores de STRs de mayor longitud como AmpFLSTR® Identifiler®, mientras que para ADN degradado serán de menor longitud como AmpFLSTR® MiniFiler™ [Sánchez *et al.* 2006; Di Luise *et al.* 2008; Kondakci *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014]. Finalmente, hay que destacar que en muestras altamente degradadas, con ADN fragmentado o escaso, la integridad de las secuencias puede verse comprometida, repercutiendo también en la eficiencia de amplificación de *loci* STRs. Así, en los últimos años, para llevar a cabo la identificación individual humana en estas muestras problemáticas se están desarrollando paneles de SNPs altamente polimórficos, principalmente, nucleares [Sánchez *et al.* 2006; Kondakci *et al.* 2009], cuya exitosa aplicación propiciará que, en un corto periodo de tiempo, se utilicen de forma complementaria o como alternativa a los *loci* STRs tradicionales.

En esta investigación nos centramos en la recuperación y el análisis, de forma efectiva, del ADN del hospedador (humano) contenido en el tracto digestivo de dípteros inmaduros procedentes de casos reales (**Aportación II.III**). Para ello, se recogieron larvas de insectos, con buchec (o *crops*) de distinto aspecto, en dos cadáveres humanos en diferentes estados de descomposición. La identificación individual humana se hizo utilizando el kit AmpFLSTR® MiniFiler™, junto con otros dos Mentype® Nonaplex^{QS} y AmpFLSTR® NGM™, de uso forense habitual y anteriormente no aplicados en este tipo de muestras. El diagnóstico, a nivel de especie, se llevó a cabo con el *locus* Cyt-b

(307 pb), por estar ampliamente establecido en el campo de la genética forense para la identificación de vertebrados y ser de inmediata aplicación en las evidencias entomológicas.

En la división Cyclorrhapha (Muscidae, Fanniidae, Calliphoridae y Sarcophagidae) los dípteros inmaduros presentan un órgano de almacenamiento (buche o *crop*) donde no se secretan enzimas [Clery 2001; Zehner *et al.* 2004a; Campobasso *et al.* 2005]. Por ello, la digestión que tiene lugar en el buche está relacionada con las enzimas salivares secretadas durante la digestión pre-oral [Kettle 1995; Zehner *et al.* 2004a], y no tienen un efecto significativo en la degradación [Kondakci *et al.* 2009]. Así, el aparente color del buche estará directamente relacionado con el estado de degradación tisular (**Aportación II.III**). Buches grandes con colores rojos brillantes contienen más ADN y de mejor calidad (**Aportación II.III**). Los resultados demostraron la influencia directa de la apariencia y el tamaño de los buches en la calidad y cantidad del ADN del hospedador extraído (**Aportación II.III**). En general, hay una correlación positiva entre el tamaño de los buches y la cantidad de ADN extraída [Clery 2001; Campobasso *et al.* 2005]. Sin embargo, la descomposición de los tejidos que sirven como fuente de alimento puede actuar en detrimento de la cantidad y calidad de ADN recuperado, obteniéndose en algunos de los buches de menor tamaño, cuantificaciones de ADN superiores a las de los más grandes (**Aportación II.III**). Esto puede ocurrir, incluso, en un mismo cadáver si presenta una descomposición diferencial en tejidos de regiones anatómicas u órganos distintos.

Globalmente, los perfiles obtenidos para los *loci* STRs coincidieron con los de referencia. Asimismo, se observó una clara diferencia en el éxito de amplificación según el tamaño del fragmento (amplicones largos o cortos de *loci* STRs) (**Aportación II.III**). No obstante, cuando los kits comerciales con amplicones STRs de mayor longitud (Mentype® Nonaplex^{QS} y AmpFℓSTR® NGM™) obtuvieron perfiles incompletos o fallaron, los de amplicones STRs más cortos (AmpFℓSTR®

VII. Discusión general

MiniFiler™) aumentaron el número de alelos genotipados (**Aportación II.III**). Esta estrategia de amplificación utilizando sistemas multiplex con diferentes *primers* resultó de gran ayuda para completar los perfiles. Asimismo, la caracterización del *locus* Cyt-b (307 pb) fue satisfactoria, incluso en las muestras más degradadas en las que el genotipado de *loci* STRs falló (**Aportación II.III**).

Por último, destacaremos que en algunos estudios el estado de descomposición cadavérico parece no influir en la calidad del ADN [Zehner *et al.* 2004a; Campobasso *et al.* 2005], ya que, excepcionalmente, se obtienen perfiles STR tras largos periodos de descomposición (4 meses en invierno) [Zehner *et al.* 2004a]. Sin embargo, se observa el hecho de que la condición de los tejidos está directamente relacionada con el grado de degradación del ADN contenido en el digestivo del insecto, siendo el factor principal para conseguir perfiles completos, parciales o no tener resultados [Hoff-Olsen *et al.* 2001]. Por eso, es importante considerar las particularidades de cada caso al interpretar los resultados. Igualmente, se deben realizar más estudios utilizando los últimos avances basados en el análisis de SNPs mitocondriales y nucleares [Sánchez *et al.* 2006; Kondacki *et al.* 2009; Köhnemann & Pfeiffer 2011], así como otras tecnologías como la secuenciación masiva (*massive parallel sequencing*, MPS, o *next generation sequencing*, NGS) [Elena *et al.* 2016], que permitan identificar a nivel individual el material biológico en muestras altamente degradadas en las que otros métodos fallan.

En resumen, esta investigación proporciona datos novedosos de interés, que mejoran la efectividad del análisis del contenido digestivo de insectos necrófagos en las etapas más críticas. Especialmente en casos reales es una cuestión decisiva identificar individualmente a un cadáver o vincularlo con una evidencia entomológica. Así, uno de los factores principales a tener en cuenta es el tamaño y la apariencia de los buches. Es más, cuanto mayor sea la descomposición de los tejidos menor será el éxito del genotipado. Trabajando con ADN altamente degradado, los sistemas multiplex Mini

STRs (ej. AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ MiniFiler TM) obtienen mejores resultados. No obstante, cuando el genotipado de *loci* STRs falla, el análisis de ADNmt (Cyt-b) parece ser la mejor opción para lograr resultados satisfactorios, al menos a nivel específico.

7.3. Protocolo de actuación en entomología forense

Los artrópodos asociados a restos cadavéricos utilizados como apoyo en las investigaciones forenses, proporcionan información trascendente para precisar el tiempo, lugar y modo en el que se produjo un suceso [Anderson 1997; Campobasso & Introna 2001; Greenberg & Kunich 2002], por lo que su recogida y adecuada conservación, registro y etiquetado son fundamentales durante una investigación pericial. Así, al igual que las huellas dactilares, pelos, fibras o muchos otros vestigios biológicos, las muestras entomológicas deben de considerarse como evidencias físicas que forman parte del conjunto de pruebas en los procesos legales [Hall 1990; Amendt *et al.* 2007, 2011].

En la actualidad, su contribución más relevante es la estimación del intervalo *post-mortem* (IPM) en casos médico-legales [Nuorteva 1977; Greenberg 1991; Dadour *et al.* 2001; M de Pancorbo *et al.* 2006], aunque también pueden ser de utilidad para demostrar malos tratos, abandono y otro tipo de negligencias, así como estimar el origen, tiempo y tipo de contaminación de alimentos, mobiliario y otros enseres [Catts & Goff 1992; Byrd & Tomberlin 2001]. Por ello, uno de los requisitos esenciales es garantizar la validez de las evidencias entomológicas ante un Tribunal de Justicia, empezando por una toma de muestras rigurosa y diligente. Debemos considerar que una incorrecta actuación en algunas de las etapas más críticas, puede comprometer la integridad de dichas evidencias e invalidarlas

Por ello, en este último trabajo (**Aportación II.IV**) se ha adecuado el protocolo de actuación que incluye los fundamentos básicos para la recogida, procesamiento y registro de evidencias entomológicas [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007; Byrd

VII. Discusión general

et al. 2010], de forma sencilla, siguiendo los estándares europeos, y que facilitará la incorporación de esta disciplina como una rutina más en las futuras investigaciones forenses en la CAPV. Los documentos se han redactado en versión bilingüe (Castellano/Euskera) (**Aportación II.IV**).

Cabe destacar que en el protocolo elaborado solo se hace una mención esporádica del ADN. Por ello, y considerando el enfoque molecular de esta Tesis, mencionaremos, en este apartado, algunas pautas y recomendaciones a seguir cuando el objetivo sea la obtención de ADN de las evidencias entomológicas para su posterior análisis.

En general, la calidad del ADN extraído es un parámetro que se encuentra influido, principalmente, por el modo de sacrificio y las condiciones de preservación, variando su ejecución según el tipo de vestigio [Amendt *et al.* 2007, 2011].

Cuando se trata de realizar identificaciones moleculares de los insectos a nivel específico, habitualmente se suelen obtener buenos resultados si los especímenes se almacenan en las mismas condiciones que se utilizan para la identificación morfológica (**Tabla S66**, Material suplementario). Por ejemplo, en dípteros inmaduros la extracción de ADN se suele realizar del individuo completo [Saigusa *et al.* 2005; Meiklejohn *et al.* 2013; Tuccia *et al.* 2016], preferiblemente tras su cocción y la limpieza de su superficie externa con una disolución de hipoclorito sódico (NaClO, 20 %) [Linville & Wells 2002; Campobasso *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2005]. Sin embargo, también se pueden llevar a cabo extracciones satisfactorias con secciones relativamente pequeñas, de varios milímetros (**Aportaciones I.I-I.IV**), para evitar posibles interferencias con el ADN contenido en el tracto digestivo. En el caso de pupas, puparios y dípteros adultos, su preservación en etanol diluido (70-95 %), o incluso en seco, resulta adecuada. Ocasionalmente, la utilización de este último método puede comprometer la eficiencia de extracción en los especímenes más antiguos [Stevens & Wall 1997b; Malewski *et al.* 2010; Mazzanti *et al.* 2010]. Asimismo, se recomienda evitar el uso de otros conservantes, como la formalina, el formaldehído o el etilacetato, dado que además de

alterar los tejidos, influyen negativamente en la calidad del ADN [Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2011]. Debemos destacar que en insectos mantenidos en seco, la degradación de ADN suele estar más relacionada con la proliferación de hongos y otros microorganismos que con la degradación natural en sí misma. En insectos adultos, la extracción del ADN se hace en función del tamaño, utilizando el espécimen completo si es muy pequeño, o algunas partes como sus patas, cabeza o músculos torácicos [Stevens & Wall 2001; Stevens 2003; Tan *et al.* 2010; Nakano & Honda 2015; Salem *et al.* 2015; Williams *et al.* 2016; Zajac *et al.* 2016].

Por otra parte, las herramientas biomoleculares actuales permiten la detección del ADN tanto humano como de otras especies, contenido en el tracto digestivo de insectos inmaduros o adultos [Di Luise *et al.* 2008; Wells & Stevens 2008; Kondacki *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014], y que no debe obviarse. Según el hábito de alimentación, su estudio puede presentar las siguientes aplicaciones:

- Necrófagos inmaduros: permiten identificar un cadáver, en ausencia de éste o de tejidos blandos que analizar, y relacionarlo indubitablemente con un lugar concreto detectando desplazamientos *post-mortem* [Di Luise *et al.* 2008; Kondacki *et al.* 2009; Wells & Stevens 2010].
- Miásicos inmaduros: permiten identificar a la víctima y revelan negligencias, abusos o abandonos, frecuentemente en individuos dependientes [Benecke & Lessig 2001; Benecke *et al.* 2004; Amendt *et al.* 2011].
- Hematófagos adultos: su localización en un lugar concreto hace posible ubicar al sujeto (víctima o sospechoso) en un entorno, mientras que su transferencia durante abusos o malos tratos permite relacionar al sospechoso con la víctima [Lord *et al.* 1998; Mumcuoglu *et al.* 2004; Amendt *et al.* 2011; Curic *et al.* 2014].

Según lo expuesto, la identificación del ADN del hospedador, tanto del individuo como de la especie resulta de gran interés (**Aportación II.III**). Una de las etapas decisivas

VII. Discusión general

para obtener ADN de calidad es la detención del proceso de digestión mediante el inmediato sacrificio del insecto y el adecuado aislamiento del contenido digestivo [Di Luise *et al.* 2008; Kondacki *et al.* 2009; Garipey *et al.* 2012]. Hay que tener en cuenta que la tasa de digestión varía considerablemente entre grupos de insectos, y depende de factores ambientales, fisiológicos y etológicos [Garipey *et al.* 2012]. Así, mientras que el ADN contenido en el digestivo de algunos hematófagos adultos, como los mosquitos, es viable para la identificación individual incluso tres días después de la ingestión de sangre [Curic *et al.* 2014], en los necrófagos inmaduros en situación de ayuno se metaboliza rápidamente (en cuestión de horas) [Linville *et al.* 2004]. Además, en estos últimos existe digestión pre-oral parcial mediante secreción de enzimas al medio que fluidifican los tejidos facilitando su ingestión y almacenamiento en el buche (o *crop*), hasta el momento de su digestión [Wells *et al.* 2001a; Linville *et al.* 2004; Zehner *et al.* 2004a].

Por ello, se recomienda el sacrificio del espécimen (adulto o inmaduro) mediante congelación a -20 °C (sin conservantes), lo antes posible [Linville *et al.* 2004; Di Luise *et al.* 2008; Kondacki *et al.* 2009] y su preservación a -20 o -80 °C. En necrófagos inmaduros, se aconseja diseccionar el espécimen, aislar el buche y extraer el ADN del mismo en las 24 horas inmediatas a su recogida para prevenir la degradación [Coulson *et al.* 1990; Linville *et al.* 2004]. Además, se debe destacar que el etanol, al igual que otros conservantes utilizados en la preservación de inmaduros, pueden afectar a la calidad del ADN [Di Luise *et al.* 2008].

Finalmente, considerando que la calidad de las evidencias es fundamental en la ciencia forense, esta aportación proporciona unas directrices básicas de trabajo que facilitaran la integración de la entomología forense en las investigaciones criminales en la CAPV.

7.1. Molecular identification of Diptera

The importance of molecular identification in entomology is mainly based on the diagnosis, at specific level, of entomological evidence during the course of an investigation. This discipline is used to clarify aspects such as time, manner and even the place where an event occurred. However, although it is well established in nearby countries, in the Iberian Peninsula the medical, veterinary and forensic molecular entomology is still taking its first steps. Therefore, the available genetic information is very scarce or completely absent. In the forensic context, the first Iberian studies for molecular identification of some necrophagous Diptera have been performed in Portugal, being the number of works limited to a few and succinct publications [Cainé *et al.* 2006, 2009; Oliveira *et al.* 2011; Rolo *et al.* 2013].

The present Thesis work wishes to cover the necessity of characterizing molecularly the main Diptera species of medico-legal and veterinary importance of the Iberian Peninsula (stressing in the Atlantic Area) and of a Central European region, further including specimens from other parts of the world to visualize the taxonomic and phylogenetic status thereof, and to frame their reality in a global context.

This research about Diptera with saprophagous and/or myiasic habits from a molecular perspective, covers the largest number of markers in a wide range of species and medico-legal and veterinary interest that has been performed to date in Europe, as well as the first study of these characteristics conducted in the Iberian Peninsula. During thereof development, has been designed and optimized extraction and analysis protocols, it has been laid the groundwork for a genetic inventory of a large part of the main forensic indicator species of the Iberian Peninsula, it has been determined the usefulness of DNA markers for species identification, and it has been contributed new molecular data for specimens from Central and Southern Europe, of usefulness in the

VII. General discussion

diagnostic of insect evidence, applicable to future cases such as both medico-legal and veterinary.

7.1.1. Biology and ethology of Diptera of medico-legal and veterinary interest

The work has been mainly focused on the Calliphoridae family (Diptera: Oestroidea), grouping Diptera of great medico-legal and veterinary importance, since their life cycles involve the development in cadaveric remains (necrophagy) or in alive animals (parasitism) [Stevens *et al.* 2002; Stevens & Wallman 2006]. These insects are typically the primary colonizers of corpses, and therefore, the most common forensic indicators in criminal investigations [Smith 1986; Boehme *et al.* 2010; Malewski *et al.* 2010; Singh & Wells 2013]. Thus, their use in the *post-mortem* interval (PMI) estimation gives them great medico-legal relevance [Greenberg 1991; Catts & Goff 1992; Amendt *et al.* 2004]. Major part of forensic interest species are also ectoparasites of vertebrates, and cause myiasis in human and non human animals [Zumpt 1965; Erzinclioglu 1989; Rognes 1993; Stevens 2003].

While necrophagous insects associated with cadaveric reduction processes take central place in forensic investigations [Di Luise *et al.* 2008], normally, it is not conferred the importance they deserve to the myiasis ones that develop in living individuals, because their study, apparently, lacks immediate application in forensic science. However, the current aging population, intensive livestock and the economic crisis, are causing a change in the focus of forensic entomology, by the increase in the number of cases where the period of insect activity (PIA) exceeds the IPM [Benecke & Lessig 2001; Amendt *et al.* 2007], which may be indicative of the existence of mismanagement, abuse or abandonment prior to death [Benecke *et al.* 2004; Franza *et al.* 2006]. In addition, the most economically important Calliphoridae are livestock ectoparasites, particularly *L. sericata* (Meigen, 1826) and/or *L. cuprina* (Wiedemann, 1830) species, frequently responsible of primary infestations, both in Europe and in many other areas of the world [Miller 1939; MacLeod 1943; Ryan 1954; Zumpt 1965; Tenquist &

Wright 1976; Bishop 1991, 1995; Hall & Wall 1995; Stevens & Wall 1996, 1997a-b; Stevens *et al.* 2002; Heath & Bishop 2006]. Finally, it should be mentioned that Calliphoridae share the habits of causing myiasis with their close relatives Muscidae and Oestridae (**Contribution I.IV**)

In this work, we have been collected specimens of the families Calliphoridae [*Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819); *Phormia regina* (Meigen, 1826); *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *C. vomitoria* (Linnaeus, 1758); *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), *L. richardsi* Collin, 1926, *L. ampullacea* Villeneuve, 1922, *L. silvarum* Meigen, 1826, *L. illustris* (Meigen, 1826), *L. caesar* (Linnaeus, 1758) and *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876], Muscidae [*Musca autumnalis* De Geer, 1776] and Oestridae [*Hypoderma bovis* (Linnaeus, 1758)] (**Contributions I.I-I.IV/II.I-II.II; Classification S1**, Supplementary material).

In general, blowflies species here recorded are usually associated with decaying organic matter in the Atlantic seaboard of the Iberian Peninsula [Saloña-Bordas *et al.* 2009; Prado e Castro *et al.* 2011, 2012], with the exception of *P. regina*, not detected in the Iberian Peninsula [Martínez-Sánchez *et al.* 2015], but common in more Northerly European latitudes. Most of these species are regularly used as indicators in forensic investigations in Europe and moreover, they may act as facultative ectoparasites, primary (initiating infestations) or secondary (colonizing animals already infested), in vertebrate mammals (even human) [Hall 1948; Zumpt 1965; Hall *et al.* 1986; Smith 1986; González-Mora 1989; Rognes 1991; Stevens & Wall 1997b; Davies 1999; Soler-Cruz 2000; Fremdt *et al.* 2012]. As an exception, *L. bufonivora* exclusively develops in alive Anura and not in cadaveric remains [Brumpt 1934; Zumpt 1965; Weddeling & Kordges 2008; Fremdt *et al.* 2012], so its catch using baits with mammal viscera (**Contribution II.II**) could be explained by the binder effect around the bait, that attract the surrounding Diptera [Ives 1988; Charabidze *et al.* 2011]. Notably, although *L. sericata* and *L. cuprina* are part of the entomofauna of

VII. General discussion

Southern Basque Country [Saloña-Bordas *et al.* 2009] and are frequently reported from myiasis cases in Europe and Africa [Lucientes 1995; Hall & Wyatt 1996; Stevens & Wall 1997b; Soler-Cruz 2000; Tourle *et al.* 2009; Sotiraki & Hall 2012; Wall 2012; Pezzi *et al.* 2015], they were not collected in any of the myiasic infestations here studied (**Contribution I.IV**). *L. caesar* and *L. illustris* were the only *Lucilia* species involved as myiasic agents in the Basque Country (**Contribution I.IV**). Therefore, other Diptera citations associated with myiasis cases that do not correspond with the above detailed species should be more carefully examined by expert entomologists.

Muscidae family is associated to accidental myiasis being *Musca domestica* Linnaeus, 1758, *Musca sorbens*, Wiedemann, 1830 and *Muscina stabulans* (Fallén, 1817) the most commonly reported species [Soler-Cruz 2000; Shivekar *et al.* 2008; Clarke 2013]. In this study we found one species not previously documented as myiasic, *M. autumnalis*, associated with infestations in cattle (**Contribution I.IV/II.I**). Gállego-Berenguer exclusively mentioned *M. autumnalis*, together with *M. domestica*, as a potential accidental myiasic agent, but without providing references for recorded particular cases [Gállego-Berenguer 2007]. In general, *M. autumnalis* and *M. domestica* share nutritional habits and their immature stages exhibit very similar morphologies, hampering their identification if they are not raised until the adult emergence, something complex in myiasic populations [Matthew & Dobson 1959; Skidmore 1985]. Thus, biological coincidences make reasonable the presence of *M. autumnalis* in accidental myiasis, being their diagnostic complexity the possible cause of absence of previous records. In fact, *M. autumnalis* has been recently found related to cadaveric decomposition processes in Portugal [Rolo *et al.* 2013].

The family Oestridae is mainly associated with obligate endoparasitism in mammals. However, some of its members may act as ectoparasites, analogously to Calliphoridae [Stevens & Wallman 2006]. Thus, among the species traditionally included in *Hypoderma* genus, only two *H. bovis* and *H. lineatum* (Villiers, 1789) are obligated

endoparasites of animals [Zumpt 1965], causing hypodermosis. While at subfamily level the morphological diagnosis involves no difficulty, at specific level may be complicated as these species show similar ecological, biological and morphological characteristics and share hosts [Otranto & Stevens 2002]. *H. bovis* species, identified in this research (**Contribution I.IV**), mainly affects cattle and is involved with certain frequency in cases of accidental human infestations. In our country, the importance of hypodermosis has been verified in several studies conducted in Galicia [Morrondo *et al.* 1999; Panadero *et al.* 2007], Asturias [Prieto *et al.* 1990], León [Cordero del Campillo 1962], Extremadura [Reina *et al.* 1994] and Andalucía [Martínez-Gómez *et al.* 1988; Martínez-Moreno 1992; Martínez-Moreno *et al.* 1995]. Currently, the control of this parasitosis in Europe requires continuous vigilance and, although there are effective treatments, their incidence is still noticeable in large areas of the Iberian Peninsula and in other European regions. Therefore, while in our study only one hypodermosis case has been detected, its presence in livestock under continuous epidemiologic and veterinary control highlights the transcendence of these infestations in the Basque Country (**Contribution I.IV**).

Finally, we emphasize that the collection of *L. bufonivora* and *M. autumnalis* during this research represent a new local record both for the Basque Country and for the South of it, respectively (**Contributions II.I/II.II**). Moreover, despite *H. bovis* is well studied and has been recorded in nearby regions, as far as we known, its presence in the Basque Country has not been previously documented, being this the first local record for it (**Contribution I.IV**).

At this point, it is important to highlight that the critical prerequisite to estimate the period of insect activity (PIA) is the correct identification of entomological evidence, since each species has a characteristic habitat, developmental rate and geographic distribution [Reibe *et al.* 2009; Richards *et al.* 2009]. Even between closely related species, development parameters may be really uneven. Thus, at the same temperature,

VII. General discussion

19°C, *L. cuprina* completes its cycle in 47 days (from egg to adult), while *L. sericata* requires 84 days [Ash & Greenberg 1975]. Therefore, a minimum misidentification would introduce uncertainties that could damage or invalidate an investigation, and lead to judicial errors [Benecke & Wells 2001].

The traditional entomological identification is a comparative technique, based on external morphological characteristics, which requires the domain of complex taxonomic keys and the comparative use of reference collections. Therefore, the major obstacles in identifying Diptera are:

- Most of morphological taxonomic keys are incomplete, fragmented and/or not updated. Generally focused on native regional entomofauna, overlooking recently introduced non-native species. As an example, the Sarcophagidae family only has established morphotypes for males [Smith 1986; Wells *et al.* 2001b; Nakano & Honda 2015], while Oestridae has no general keys beyond the great compendium of Zumpt 1965 [Otranto & Stevens 2002].
- Reference collections are available in small numbers and are often incomplete. Furthermore, members of the same species may show variable morphologies in different geographical areas, or even, in the same region, as occur in Calliphoridae and Oestridae families [González-Mora & Peris 1988; Otranto & Stevens 2002].
- The loss of taxonomic diagnostic characters in damaged specimens or the physical similarity between eggs, larvae, pupae and adults of different species, may complicate or make impossible the identifications, even to experts [Greenberg & Singh 1995; Wallman 2001a-b].
- Immature stages often require breeding to adult emergence for unambiguous identification [Wallman & Donnellan 2001; Wells & Sperling 2001]. This task requires time and lacks success guarantee [Turchetto & Vanin 2004; Mazzanti *et al.* 2010], especially for myiasic species that require a host.

These reasons make morphological methods awkward and, even, unfeasible. Considering that in medico-Legal and veterinary fields, errors may affect third parties, specific identification requires complementary or alternative procedures, in which molecular techniques play an essential role.

One of the greatest benefits of molecular diagnosis is unambiguous identification of species, regardless of the developmental stage or the sex of the individual, and has the potential to distinguish morphologically similar species [Tan *et al.* 2010]. However, it should be notice that the traditional identification constitutes the elementary basis for the specific genetic diagnosis. For the foregoing, the development of collaborations between specialists from different disciplines is essential for proper identification of relevant species.

The present study explores the entomological science from a molecular point of view, dealing with key aspects that should not be overlooked in medico-legal and veterinary inquires (**Contributions I.I-I.VI/II.I-II.II**).

7.1.2. Conventional molecular identification

Currently, the reference methodology for insect identification at species level combines PCR amplification and sequencing of molecular markers, providing detailed nucleotide information of the region of interest.

Moreover, it should be noticed the increasing incorporation of new technologies, such as high-resolution melting analysis (HRM), which enable processing a large number of samples in a short time and are of simpler protocol [Wells & Stevens 2010; Radvansly *et al.* 2011]. However, it should not be forgotten that the effective use of these new techniques require having available basis information provided by conventional ones.

VII. General discussion

7.1.2.1. Mitochondrial and nuclear markers in Diptera species identification

The advantages offered by mitochondrial DNA (mtDNA), due to its high copy number and mutation rate, easy isolation and preserved regions that enable the use of universal primers, have made that taxonomic, population and evolutionary research are focused on it [Xiong & Kocher 1991]. Nowadays, there is a wide collection of mitochondrial markers to address effectively the identification of insects.

Traditionally, the most widely used genes for invertebrate characterization have been those encoding the cytochrome c oxidase subunits I and II (COI and COII) [Sperling *et al.* 1994; Malgorn & Coquoz 1999; Caterino *et al.* 2000; Wallman & Donnellan 2001; Wallman *et al.* 2005; Wells & Stevens 2008; Zaidi *et al.* 2011; Nelson *et al.* 2012]. In recent years, researchers have adopted COI as reference *locus* in insect identification, analyzing a size range that can vary from 229 bp to the entire gene [Vincent *et al.* 2000; Harvey *et al.* 2003a-b, 2008; Chen *et al.* 2004; Wells *et al.* 2004, 2007; Wallman *et al.* 2005; Nelson *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2007; Desmyter & Gosselin 2009; Park *et al.* 2009a-b; Liu *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011; Singh & Wells 2011; Boehme *et al.* 2012; Nakano & Honda 2015]. This gene, encoding the terminal catalyst of the mitochondrial respiratory chain, has been used in molecular phylogeny due to its long size and for presenting both highly preserved and variable regions, with different ranges of mutation rates [Lunt *et al.* 1996]. Furthermore, the COI *locus* may exhibit distinct evolutionary rates in different lineages, which mainly depend on the functional restrictions in specific regions [Otranto & Stevens 2002].

Currently, the DNA barcode paradigm, fragment of about 650 bp, is which dominates the molecular diagnostic [Hebert *et al.* 2003]. In general, this region (COI barcode, 658 bp) has demonstrated to be suitable as a universal marker for insects taxonomic differentiation and evolutionary studies, although it may occasionally display limitations in closely related species, as occurs in the Calliphoridae family genera *Calliphora*, *Lucilia* or *Chrysomya* [Wallman & Donnellan 2001; Stevens *et al.* 2002;

Wells *et al.* 2002, 2004, 2007; Whitworth *et al.* 2007; Tourle *et al.* 2009; McDonagh & Stevens 2011], all of them of medico-legal and veterinary importance. In these cases, the lack of genetic divergence usually concurs with the extreme morphological similarity between species, hampering the identifications to staff that lacks appropriate training (**Contribution I.II-I.V**). These patterns are often associated with introgression or incomplete speciation. The lack of divergence may also be influenced by the different evolutionary rates from some regions regarding to others, according to the species and analyzed marker (**Contribution I.V**).

Previous studies have demonstrated the suitability of less frequently analyzed mitochondrial *loci* in insect taxonomy. Thus, the application of cytochrome b (Cyt-b), one of the conventional *loci* in diagnosing vertebrate animals [Parson *et al.* 2000; Bataille *et al.* 1999; Branicki *et al.* 2003; Tobe *et al.* 2010], is reduced to a few Diptera of forensic interest (Calliphoridae and Piophilidae) in the entomological context [M de Pancorbo *et al.* 2004; Zaidi *et al.* 2011]. For its part, the non-coding region, located between serine transfer RNA (tRNA^{ser}) and nicotinamide dehydrogenase subunit 1(ND1) (tRNA^{ser}-ND1), has been successfully used in the Oestridae family Diptera differentiation [Weigl *et al.* 2010b]. However, the scarcity of information about these mitochondrial markers in databases makes prevail the appeal of traditional ones, with plenty of available data for taxonomic diagnosis.

Regarding the nuclear DNA, the ribosomal (rDNA) is the most commonly studied, including genes and intergenic regions. The nuclear rDNA consists of a series of tandem repeated units formed by intergenic non-coding regions known as internal transcribed spacers (ITSs) and rRNA genes associated (18S, 5.8S and 28S), with a variable evolutionary rate along the repeating unit or even within a gene [Hillis & Dixon 1991; Wells & Stevens 2010]. Thus, in contrast with many other nuclear genes, in a typical eukaryotic genome we may find hundreds of tandem copies of rRNA [Coleman 2003]. Commonly, the ITS region includes the first transcribed spacer

VII. General discussion

(ITS1), the 5.8S gene, and the second transcribed spacer (ITS2), being the most relevant nuclear marker in molecular taxonomy and systematics [Coleman 2003]. The ITS1 and ITS2 markers have been widely used to resolve relationships between closely related and cryptic species [Paskewitz *et al.* 1993; Navajas *et al.* 1998]. In arthropods these two segments have exhibited reduced intra-specific and high inter-specific variation, suitable for diagnostics at species-level [Otranto & Stevens 2002]. Only hybrids may show, occasionally, variability between the ITS sequences of the same organism [Buckler *et al.* 1997; Coleman 2003]. Excluding these cases, this multigenic family has a concerted evolution, which, generally, homogenized the differences between copies and makes possible their treatment as a single gene [Hershkovitz *et al.* 1999].

Mitochondrial and nuclear genes, and intergenic regions, accumulate nucleotide mutations with different rates according to their structure, function and mode of inheritance [Otranto & Stevens 2002]. Typically, mitochondrial DNA exhibits greater substitution rate than nuclear. In insects is estimated that, after speciation event, mitochondrial genes evolve 2-9 time faster than nuclear genes that encode proteins [DeSalle *et al.* 1987; Moriyama & Powell 1997; Monteiro & Pierce 2001]. Therefore, one would expect that the differences between species that have recently diverged should be manifested earlier in mitochondrial genes [Dowton 2004; Lin & Danforth 2004; McDonagh & Stevens 2011]. However, introns and non-coding regions, as nuclear ITSs, show a high mutation rate compared to coding mtDNA [Otranto & Stevens 2002]. For example, in some taxa as *Tetranychus* (Acari: Prostigamata), ITS2 evolves 2.5 times faster than COI [Navajas *et al.* 1998]. This variability has to be considered to select a region with a substitution rate appropriate to the research purpose; highly variable regions, of rapid evolution, may not be suitable when it is desired to resolve phylogenies of taxa with ancestral divergence of more than 5-10 million years [Lin & Danforth 2004], while well preserved sequences will not be

adequate to establish phylogenetic relationships population or between species with recent divergence.

Some authors suggest the multi-region analysis as the most suitable option to address complex samples. It is common that investigations are focused on one or a couple of genes, mitochondrial and/or nuclear. However, in this research several mtDNA markers were examined, the barcode region of cytochrome c oxidase I (COI barcode, 658 bp), a fragment of 616 bp of the same gene (COI, 616 bp), cytochrome c oxidase II (COII, 725-731 bp), cytochrome b (Cyt-b, 307 bp) and the region comprising part of the cytochrome b, the serine transfer RNA and part of the nicotinamide dehydrogenase subunit I (Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1, 495-496 bp), which includes a non-coding fragment. Moreover, it was studied the second internal transcribed spacer (ITS2, 310-352 bp) region, in addition to other that contains the first and second transcribed spacer (ITS1, 1081-1083 bp) of nuclear ribosomal DNA (rDNA).

7.1.2.2. Analysis of intra-specific variability

In general, the different mitochondrial markers studied exhibited strong AT bias characteristic of insect mitochondrial DNA [Harvey *et al.* 2003a; Ames *et al.* 2006].

Sequence and haplotypes diversity in different genes seems to have similar pattern for each species, exhibiting the same *locus* analogous results in different populations of samples. Thus, *C. vicina* species maintain a great genetic diversity for all *loci* (COI barcode: 0.68 ± 0.06 ; COI 616 bp: 0.59 ± 0.07 ; Cyt-b: $0.51-0.54 \pm 0.07-0.08$) (**Contributions I.I/I.III/I.V**), being the maximum if *L. caesar* and *L. illustris* are not considered. In contrast, when both species are taken into account, they are the ones that reveal the greatest overall variability (COI barcode: $0.91 \pm 0.02/0.81 \pm 0.06$; COI 616 bp: $0.90 \pm 0.03/0.80 \pm 0.07$; Cyt-b: $0.67 \pm 0.05/0.34 \pm 0.11$) (**Contribution I.V**). For its part, *Ch. albiceps*, one of the most abundant species in this work, repeatedly showed a really reduced genetic diversity (**Contributions I.I/I.III/I.V**). This low intra-specific

VII. General discussion

diversity has been previously documented for populations of the same species from Africa and Oceania [Harvey *et al.* 2003a-b].

However, a more recent study conducted in Egypt on *Chrysomya* genus, suggest that little genetic variability or its absence is caused by the inherent bias to small and fragmented samples, which are not representative of the population variation at a global scale [Salem *et al.* 2015]. Thus, the only way to record the true genetic diversity is to sample a wide geographic range carefully and thoroughly [Salem *et al.* 2015]. In that work, 70 specimens of *Ch. albiceps* from different regions of Egypt (Giza, Minya, Dayrot and North Sinai) were studied, with a maximum distance of about 600 km, finding for the COI (1400-1509 bp) a total of 12 haplotypes [Salem *et al.* 2015]. Comparatively, in our work, we have studied an upper number of specimens (113) from different regions of the Iberian Peninsula (Northern Portugal and Basque Country), with a higher maximum geographic distance (over 800 km), exhibiting the COI barcode (658 bp) and Cyt-b (307 bp) far a lower number of haplotypes (7 and 2, respectively) (**Contributions I.III/I.V**). This scarce diversity could be associated with the short length of these markers. However, if we only focus on the 58 specimens of *Ch. albiceps* studied in the Basque Country (**Contributions I.IV-I.V**) the difference of haplotypes obtained separately, for the COI barcode (658 bp) (4) and COI 616 bp (2), and in combination, COI barcode-COI 616 bp (1274 bp) (5), does not seem relevant (**Contribution I.V**).

As a general rule, species with broad geographic distribution contain a considerable genetic variability. In this regard, although the sampling conducted covers a wide peninsular range, it is very likely that the most divergent lineages of the Iberian populations are still unrecorded. However, the intra-specific uniformity observed in *Ch. albiceps* European populations, both in this and other researches, suggest alternative arguments, such as the reduced genetic variability typical of expanding species when they are outside their original distribution range [Tsutsui *et al.* 2001;

Shufran & Payton 2009], and not only the deviation inherent to fragmented samples. Thus, considering that the initial distribution of *Ch. albiceps* seems to range from India to Africa, populations in Egypt (original distribution area) should show greater variability, while those represented in European regions will be limited to a set of haplotypes of specimens that have been involved in its recent expansion to the North [Szpila *et al.* 2008]. Therefore, it is already required the performance of more exhaustive samplings in the different areas of the current distribution to confirm this hypothesis.

In general, the COI barcode marker showed the highest intra-specific diversity, while Cyt-b showed the lowest (**Contributions I.I/I.III/I.V**). Only the Cyt-b *locus*, even having half the length, exhibited close or greater variability to those of the traditional marker in *L. ampullacea* and *C. vomitoria* (**Contributions I.III/I.V**). These results are in agreement to previous studies where Cyt-b exhibited more variability than other molecular markers (COI and ND5) in insect from China and Pakistan [Zaidi *et al.* 2011].

The analysis of the ITS2 nuclear marker revealed an almost complete intra-specific homology. Only, *C. vomitoria* and *L. sericata* exhibited variable positions (**Contribution I.III/I.V**). These results corroborate previous studies in which the absence of intra-specific variability suggest homogenization processes generated by concerted evolution in Diptera [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008a; Alquezar *et al.* 2010]. As a general rule, when the purpose is the unequivocal identification at species level, a target with low intra-specific variability and high inter-specific variation will be the ideal [Otranto & Stevens 2002; Malewski *et al.* 2010]. However, if we want to compare two populations of the same species originated from two different geographical areas, a marker with high intra-specific variability will be more appropriate [Otranto & Stevens 2002].

VII. General discussion

Our findings provide new intra-specific haplotypic information and reveal novel genetic variability, not previously studied. In general, none of the haplotypes seems to be characteristic of a population or typical of the diverse ecological zones, so we could not identify any geographical-regional pattern in their distribution (**Contributions I.I/I.III-I.V**).

7.1.2.3. Analysis of inter-specific variability

The transitions/transversions ratio ($R = ts:tv$) here obtained for COI barcode (658 bp) and COI (616 bp) (1.35 and 1.45, respectively) (**Contribution I.II**) is close to the commonly reported in the Calliphoridae family for the COI gene ($R = 1.37$) [Cainé *et al.* 2009]. Other analyzed insect groups exhibit almost double of transitions than transversions, such as Hemiptera ($R = 1.81$) [Damgaard *et al.* 2000] and Tephritidae flies ($R = 1.78$) [Han & McPherson 1994]. Meanwhile, Cyt-b (307 bp) showed a parity ratio ($R = 1.04$), revealing a high number of transversions (**Contribution I.I**), which probably has a positive effect on the divergence and the discrimination power between species.

COI (616 bp) highlighted against other mtDNA markers, such as COI barcode (658 bp) or Cyt-b (307 bp), displaying more characteristic positions in more complex genera (**Contributions I.II/I.V**). This agrees with previous research in which COI barcode showed much lower discriminative capacity to other mitochondrial *loci* (COII, ND6 and Cyt-b) [Wallman *et al.* 2005; Cameron & Whiting 2007, 2008; Roe & Sperling 2007; Nelson *et al.* 2012]. It should be stressed that Cyt-b provides these results with a shorter length. However, comparing regions of the same length, while the COI *locus* exhibited more variable sites between genera, within each genus is Cyt-b the one that showed greater variability (**Contribution I.I**). These findings are in line with those recently obtained in complete mitochondrial genomes where, the gene Cyt-b exhibited higher variability in *Lucilia* genus [Nelson *et al.* 2012]. Likewise, for Calliphoridae species here studied, the Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) marker did not reveal a

comparable resolution to that found in *Hypoderma* [Weigl *et al.* 2010], although enabled the inter-specific differentiation in most cases (**Contribution I.II**). Different results obtained may be related to the existence of two highly conserved regions, tRNA and non-coding (of about 84 bp), in the Calliphoridae here analyzed (**Contribution I.II**).

In general, the mitochondrial markers studied failed in separation of closely related species (*L. sericata*-*L. cuprina* and *L. caesar*-*L. illustris*) (**Contributions I.II- I.V**). Similar results have been, repeatedly, described by other authors for different mitochondrial *loci* (COI) [Vincent *et al.* 2000; Wells *et al.* 2007; Reibe *et al.* 2009]. Frequently, the difficulty in molecular diagnostics matches with species of more complex morphological identification [Rognes 1991], generally by their recent or unfinished speciation.

The ITS2 (310-352 bp) nuclear marker revealed a characteristic number of base pairs for each species (*Ch. albiceps*: 327 bp, *C. vicina*: 337 bp, *C. vomitoria*: 321-325 bp, *L. sericata*: 330-331 bp, *L. richardsi*: 343 bp, *L. ampullacea*: 310 bp, *L. illustris*: 324 bp, *L. bufonivora*: 316 bp, *Musca autumnalis*: 352 bp; except *L. silvarum* and *L. caesar*: 322 bp) and the largest number of variable positions (substitutions and INDELS) (**Contributions I.II/I.V**). These inter-specific characteristics in terms of length and of nucleotide sequence composition, with highly preserved and variable regions [Nelson *et al.* 2008], enable clear separation of the studied species, even those from *Lucilia* genus. The potential diagnostic of ITS2 had been previously employed in Acari and certain Diptera (Brachycera and Nematocera) to resolve evolutionary relations and delimitations of some complex species [Walton *et al.* 2007a-b; Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008a-b, 2011; LaRue *et al.* 2009; Loaiza *et al.* 2013]. In contrast, a study carried out with Central European necrophagous Diptera suggests the incapability to distinguish between certain sister species [Sonet *et al.* 2012]. Therefore, it is recommended to take extreme care to avoid mistakes, especially when working with

VII. General discussion

problematic species. Thus, the performance of further studies, including a wide range of populations, will be needed to ensure that nucleotide changes in assigned positions are really species-specific, and not only distinctive of the populations studied here.

Finally, an added value of this study is the novel characterization of the markers: Cyt-b (307 bp) for *Ch. albiceps*, *P. regina*, *C. vicina*, *C. vomitoria*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar*, *L. illustris* and *L. bufonivora* (**Contributions I.I-I.III/I.V**); Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495-496 bp) for *P. regina*, *L. ampullacea* and *L. caesar* (**Contribution I.II**); COII (725-731 bp) for specimens of *Ch. albiceps*, *C. vicina*, *L. caesar* and *L. illustris* from Southern Europe (**Contribution I.IV**); the region comprising COI barcode (658 bp) and COI (616 bp) for European specimens of *P. regina* (**Contribution I.II**) and South European *M. autumnalis* (**Contribution I.IV**); ITS2 (310-352 bp) for *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. bufonivora* and *M. autumnalis*, for *Lucilia* species (*L. sericata*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris*) of Southern Europe, and for specimens of *C. vomitoria* from the Iberian Peninsula (**Contribution I.III/I.V**); and ITS12 (1081-1083 bp) for *L. caesar* (**Contribution I.IV**). This work also provides new nucleotide sequences of the COI barcode *loci*, for *L. richardsi*, *L. silvarum* and *H. bovis*, and of COI (616 bp) for *L. richardsi*, which had not been previously characterized throughout its length (**Contribution I.V**).

7.1.2.4. Phylogeny of Diptera of medico-legal and veterinary interest

In general, the species classification depends on our understanding of the morphology, ethology, ecology and genetics of organisms [Tobe *et al.* 2010]. Thus, the most recent genetic comparisons have led to a better knowledge of the lineages of related species [Tobe *et al.* 2010]. The majority of phylogenetic studies utilize one or more mitochondrial DNA (mtDNA) markers, and contrast them with reference sequences included in databases [Caterino *et al.* 2000]. In these comparisons it is assumed that the data recorded are correct, representative, contain no errors, and that all individuals of a species are genetically identical or very similar [Tobe *et al.* 2010]. Usually, the

homology between two individuals of the same species approaches 100 %, being the variability responsible of the deviations towards lowers values [Tobe *et al.* 2010].

In this research phylogenies inferred from mtDNA showed, in general, high consistency and topological congruence in the resolution of taxa as monophyletic (**Contributions I.I/I.IV**). Most of the molecular analyses based on mitochondrial *loci* support the monophyly in Calliphoridae family, with different subfamilies forming a consistent group and different from families Muscidae and Oestridae (**Contribution I.IV**).

Within the Calliphoridae family, both mitochondrial and nuclear markers classify the Calliphorinae and Luciliinae subfamilies as sister groups (**Contributions I.II/I.IV**). These results are consistent with previous molecular studies for these genera [Wells *et al.* 2002; Stevens 2003; Wallman *et al.* 2005; Harvey *et al.* 2008; McDonagh & Stevens 2011; Nelson *et al.* 2012], but do not match with some patterns defined through morphology, which group Calliphorinae with Chrysomyinae subfamilies [Rognes 1997]. Therefore, it was proposed the review of the morphology based on the status of the latter subfamilies as sister groups [Stevens 2003].

The monophyly of the subfamily Chrysomyinae is supported by most of the mitochondrial markers (**Contributions I.II/I.IV**). In this subfamily, some taxa of Chrysomyini and Phormiini tribes, such as genera (*Protophormia*, *Phormia* and *Chrysomya*), exhibit different evolutionary relationships according to their molecular phylogenies (**Contribution I.II**). Other works also classified some tribes of this subfamily as paraphyletic and polyphyletic repeatedly [Wells & Sperling 2001; Stevens 2003; McDonagh & Stevens 2011; Singh *et al.* 2011; Nelson *et al.* 2012]. In general, in the *Chrysomya* genus, the monophyly found in the phylogenetic inferences (**Contributions I.II/I.IV**) is consistent with previous studied [Wells & Sperling 2001; McDonagh & Stevens 2011; Nelson *et al.* 2012]. Some inconsistencies observed in certain markers could be explained either by the small number of species included in

VII. General discussion

this study, or by the geographic differences between populations of the same species (**Contributions I.I/I.II**). Once again, it will be necessary further studies to confirm this hypothesis.

Within Luciliinae subfamily we found a strong support for the monophyly of *Lucilia* genus, in line with previous works [Wallman *et al.* 2005; Kutty *et al.* 2010; Marihno *et al.* 2012; Nelson *et al.* 2012; Singh & Wells 2013]. Generally, phylogenetic trees constructed on global data (including sequences from GenBank), based on mtDNA, revealed the reciprocal monophyly between species, except in *L. sericata*-*L. cuprina* and *L. caesar*-*L. illustris* species (**Contributions I.I-I.II/I.IV**). These sister species have been repeatedly resolved as paraphyletic in previous studies with mitochondrial *loci* [McDonagh & Stevens 2011; Williams *et al.* 2016]. Such phylogenetic relationships could be clarified by analyzing fragments of greater length or complete mitochondrial genomes, which provide much more information than individual genes [Avice *et al.* 1987; Harrison 1989; Simon *et al.* 1994; Nelson *et al.* 2012]. However, larger targets may have amplification problems, especially in degraded samples in which a significant reduction in the size of the DNA fragments takes place (**Contribution I.IV**). Only through the phylogeny based on the ITS2 nuclear marker could be resolved as monophyletic the relationships of all studied species (**Contributions I.II/I.IV**).

In general, COI barcode (658 bp) exhibited greater consistency in external nodes and COI (616 bp) in the deepest (**Contribution I.II**). The most robust trees were obtained by analyzing larger fragments (COI barcode-COI 616 bp, 1274 bp) (**Contribution I.II**), probably because when analyzing long sequences the influence of the variance in distances estimation is minimized [Otranto & Stevens 2002]. However, the ITS2 (310-352 bp) nuclear marker provided similar results with a considerable smaller size (**Contribution I.II**). This is a noteworthy issue as some analysis may result unproductive when working with sequences of about 300 bp. Notably the ITS2 region

exhibits a number of copies similar to mitochondrial genes [Alquezar *et al.* 2010]. This feature, together with its short length, is advantageous, especially in degraded samples.

The limitations of certain *loci* in resolving the phylogenetic relationships, for some species (*L. sericata*, *L. cuprina*, *L. caesar* and *L. illustris*) included in this study require more detailed work involving a larger number of specimens and markers to clarify completely the phylogenetic status of the members of this important family. However, the findings here presented provide a solid framework for future studies.

7.1.2.4.1. Sister species of *Lucilia* genus

In *Lucilia* genus a few species pairs, such as *L. sericata*-*L. cuprina*, *L. caesar*-*L. illustris* or *L. coeruleiviridis* Macquart, 1855-*L. Mexicana* Macquart, 1843, exhibit a considerable physical similarity that difficult the morphological identification, even in adults, requiring a detailed examination of their taxonomic characters for diagnosis [Smith 1986; Norris 1990; Holloway 1991; Peris & González-Mora 1991; Szpila 2012]. This close relationship usually cause also problems for unambiguous molecular diagnostic, making it unsuccessful when utilized mitochondrial *loci* [Wells *et al.* 2007; Sonet *et al.* 2012; DeBry *et al.* 2013; Williams *et al.* 2016].

L. sericata-*L. cuprina* sister species are the most studied due to their relevance in veterinary field. Some studies indicate that the parapyly of *L. cuprina* regarding *L. sericata* is limited to mitochondrial genes (e.g. COI), while nuclear ones (e.g. 28S *oper*) grouped them into two clearly differentiated monophyletic clades [Stevens *et al.* 2002; Tourle *et al.* 2009; McDonagh & Stevens 2011; Williams & Villet 2013]. Recently, it has been demonstrated that in specimens, morphologically defined as *L. cuprina* with mtDNA of *L. sericata*, the parapyly is a reflect of the complete mitochondrial genome, and not an introgression limited to a single mitochondrial gene [Nelson *et al.* 2012].

VII. General discussion

Certain authors suggest that this paraphyly is a reflection of sub-specific differences in *L. cuprina*, constituting those specimens with mtDNA of *L. sericata* the subspecies *L. c. cuprina* and the remainder *L. c. dorsalis* [Waterhouse & Paramonov 1950; Norris 1990; Stevens & Wall 1996, 1997a; Stevens *et al.* 2002; Stevens 2003; Wallman *et al.* 2005; Wells *et al.* 2007; DeBry *et al.* 2010]. Thus, *a priori* it seems feasible the distinction of the two subspecies according to mtDNA. The issue arose when some hybrids (*L. c. cuprina*) exhibited morphological indexes more similar to *L. cuprina* than the considered as pure (*L. c. dorsalis*) [Tourle *et al.* 2009]. For example, African specimens of *L. cuprina* morphologically considered as *L. c. dorsalis* [Waterhouse & Paramonov 1950] were clustered on the clade *L. c. cuprina* based on genetic data [Tourle *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010].

Another explanation for this paraphyly is that hybridization could have taken place between the two species. Under laboratory conditions, *L. sericata* and *L. cuprina* cross successfully, although with a low frequency, producing systematically hybrids morphologically similar to *L. cuprina* [Mackerass 1933; Ulllyett 1945; Waterhouse & Paramonov 1950]. However, it has not been proved that this occurs in natural conditions [Ulllyett 1945; Stevens *et al.* 2002]. Furthermore, hybridization in natural environments should not be directional and should provide a pattern of multiple unrelated haplotypes [Nelson *et al.* 2012]. However, despite the enormous sampling effort conducted to date for these species, only hybrid haplotypes have been found in one sense (*L. cuprina* ♂-*L. sericata* ♀) [Harvey *et al.* 2008; Tourle *et al.* 2009; McDonagh & Stevens 2011; Nelson *et al.* 2012].

In this regard, it should be mentioned that the genetic component of the morphology of the organism is determined in their nuclear DNA (nuDNA) [Williams & Villet 2013]. Thus, one would expect that from the nuDNA recombination, after species crossing results an intermediate morphology (in multi-*locus* traits) or a mosaic of the two parental phenotypes (in single copy traits) [Williams & Villet 2013]. However, it

normally takes place an asymmetric hybridization, being the phenotype of the species with dominant alleles the one that prevails [Lewin 1997; Funk & Omland 2003]. As an example, in ticks (Acari: Ixodidae: *Hyalomma*), it is common not to observe intermediate morphologies and that only external characters of one of the parents are present [Rees *et al.* 2003]. This pattern of asymmetric hybridization enables to substantiate that specimens exhibiting similar mtDNA to *L. sericata* were physically defined as *L. cuprina*, evidencing the existence of hybridization and the dominance of alleles of *L. cuprina* in the final determination of the morphology [Williams & Villet 2013].

However, the absence of detectable evidence in the nuclear genome suggest that this event occurred enough time ago for the traces of *L. sericata* nuclear alleles being removed by dilution or stochastic loss, whilst the new mitochondrial lineage with *L. sericata* haplotype was set up [Stevens *et al.* 2002; Williams & Villet 2013]. Likewise, the peculiarities found along the *L. cuprina* entire mitochondrial genome seem to be an argument against the recent hybridization [Nelson *et al.* 2012].

At this point, it is noteworthy that the ancestral hybridization and incomplete lineage shorting are difficult to distinguish analytically, as they may exhibit similar patterns [Funk & Omland 2003; Degnan & Rosenberg 2009; Joly *et al.* 2009]. However, the proposal that the paraphyly of *L. cuprina* is the consequence of incomplete lineage shorting, would require that coding nuclear genes (28S and *per*) were fixed faster than mitochondrial ones, improbable issue considering that they exhibit a lower substitution rate [Ballard & Whitlock 2004; Lin & Danforth 2004; Haag-Liautard *et al.* 2008]. Likewise, the positive selection could lead to the rapid fixation of particular alleles at different nuclear genes, but this would have not affected the nuclear genome widely [Stevens & Wall 1997a].

Therefore, the most plausible explanation, according to the mitochondrial phylogenetic pattern found in *L. cuprina*, is considered a hybridization event earlier to the last

VII. General discussion

common ancestor from our contemporary populations of *L. sericata* [Stevens & Wall 1996; Stevens *et al.* 2002; Tourle *et al.* 2009; Nelson *et al.* 2012]. Recently, a few specimens have been detected morphologically defined as *L. cuprina*, but with mtDNA similar to *L. sericata*, and nuclear genotypes different to those typically found in *L. cuprina* [Williams & Villet 2013]. This provides, according to some authors, the first genetic evidence of current natural hybridization [Williams & Villet 2013]. However, this new approach seems not to have a broad acceptance, so it will be required a more thorough study including further specimens from field populations of different locations along a wide geographical and ecological range to clarify the phylogenetic status of these species.

Similarly, sister species, *L. coeruleiviridis*-*L. mexicana* (United States) and *L. caesar*-*L. illustris* (Europe), have also exhibited paraphyletic relations in the inferences with mitochondrial genes [Sonet *et al.* 2012, 2013; DeBry *et al.* 2013], which hampers their unequivocal differentiation based on the studied mitochondrial markers. Thus, *L. mexicana* is paraphyletic with respect to *L. coeruleiviridis*, exhibiting the specimens defined as *L. mexicana* the mitochondrial haplotype (COI) of *L. coeruleiviridis* [DeBry *et al.* 2013; Williams *et al.* 2016]. This paraphyly has been detected in populations from Texas and New Mexico [Williams *et al.* 2016]. However, the use of nuclear genes (28S *y per*) enables the unequivocal separation of both species [Williams *et al.* 2016]. All this, suggest that introgression between these two species is similar to that found in *L. sericata*-*L. cuprina* [DeBry *et al.* 2013].

Meanwhile, in phylogenies based on mitochondrial genes, *L. caesar* and *L. illustris* are resolved as reciprocally paraphyletic because of sharing haplotypes (**Contribution I.IV/I.V**), in line with other studies [Sonet *et al.* 2012; Williams *et al.* 2016]. In addition, certain studied suggest that the identification of these species using nuclear markers is not possible or is not guaranteed, dealing with small samples of geographically isolated origins (e.g. 28S; *L. caesar*: France, 2 specimens; *L. illustris*:

Japan, Switzerland, Canada and USA, 7) [Williams *et al.* 2016]. However, the present research has demonstrated the effectiveness of ITS2 nuclear marker in the unequivocal discrimination of these species, resolving their phylogenies as monophyletic, in a large number of specimens of the Iberian Peninsula (**Contributions I.III-I.V**). Thus, finding an appropriate marker for molecular identification is essential, but so is the exhaustive sampling of the potential genetic variability across each species populations in the area where the method is going to be used. Moreover, additional studies will be needed to clarify the phylogenetic history of these two species.

The results here presented corroborate the idea that the simultaneous analysis of mitochondrial and nuclear markers is the best way to accurately resolve the phylogenetic relationships, detecting introgression and inconsistencies that the study of single marker may not reflect [Whitworth *et al.* 2007; Tourle *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010].

7.1.2.4.2. Myiasic species Phylogeny

It should be emphasized the importance of many species of the Calliphoridae family, not only as early colonizers of cadavers but also as facultative ectoparasites of mammals (generally sick or injured individuals).

Regarding myiasic habits, in the *Lucilia* genus could be expected closer phylogenetic relationships between species that act as facultative myiasis agents, primary (e.g. *L. sericata* and *L. cuprina*), secondary (e.g. *L. caesar* and *L. illustris*), and obligated (e.g. *L. bufonivora*). However, these species are clustered with other normally not associated with myiasis (e.g. *L. ampullacea* and *L. silvarum*) (**Contributions I.III.IV**; results not shown), suggesting that within the phylogenetic groups there is no progression in the myiasic habit [Stevens & Wall 1997b; Williams *et al.* 2016]. The most plausible explanation for these findings is the polyphyletic evolution of myiasic habit after several independent events. Likewise, at an intra-specific level, one would expect the existence of noticeable nucleotide variability based on the ethological differences

VII. General discussion

according to the geographical origin of some species. However, in line with previous studies [Stevens & Wall 1997b], it is not appreciated a remarkable relationship between genetic differences in specimens from distinct origin and their pathogenic behaviour (**Contributions I.I-I.V**). This suggest that the myiasic habit has appeared relatively recently and independently in populations of different origins [Stevens & Wall 1997b]. Moreover, the climate seems to be a determining factor for a species being constituted as a dominant myiasis agent in a region [Stevens & Wall 1997b]. As an example, *L. sericata* is the myiasis species per excellence in cold-temperate habitats (Europe and New Zealand), while *L. cuprina* have an impact on subtropical and warm-temperate habitats (Australia and South Africa) [Hall 1997; Stevens & Wall 1997b]. Likewise, though *L. caesar* and *L. illustris* are found throughout the temperate Palearctic zone [Stevens & Wall 1997b], they are more frequently associated with myiasis in its coldest areas [Brikmann 1976; Hall 1997]. However, these behavioral patterns climate dependent seem not have been achieved in this research. Thus, although the presence of *L. sericata* and *L. cuprina* in the Basque Country has been confirmed in advance [Saloña-Bordas *et al.* 2009], these species have not been involved in any of the infestations here reported, being *L. caesar* the dominant myiasic agent in our region (**Contribution I.IV**). Previous studies reported similar ethologies in *L. sericata* populations from Southern Iberian Peninsula [Martínez-Sánchez *et al.* 2007]. Therefore, a more thorough investigation is required, increasing the number of cases of myiasis in mammals, to corroborate this discordance.

7.1.2.5. Pairwise divergence in Diptera of medico-legal and veterinary interest

Nowadays, there is certain controversy about the threshold percentage that enables the robust discrimination between species. Generally, the molecular identification is considered reliable when the maximum level of intra-specific variation is below the minimum level of inter-specific variation. Thus, some authors established for the universal marker (COI barcode) that the divergence between individuals of the same

species should be below 3 %, while among distinct species should exceed this percentage [Hebert *et al.* 2003]. Other authors recorded, for different mitochondrial *loci* (e.g. COI or COI-COII), intra-specific maximums below 0.8-1.0 % and inter-specific minimums above 3.0-3.6 % for Calliphoridae [Wallman & Donnellan 2001; Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008; Zehner *et al.* 2004; Boehme *et al.* 2010; Salem *et al.* 2015]. Meanwhile, in mammals was detected a hole, or gap, between the maximum intra-specific value (<1.5 %) and minimum inter-specific (>2.5 %) in mtDNA (COI and Cyt-b) [Tobe *et al.* 2010]. However, the establishment of translatable thresholds between taxonomic groups may be controversial, since often taxa do not maintain fixed ranges and may exhibit significant fluctuations. As an example, in the family Oestridae was detected a unique intra-specific divergence of 0.35 %, while the inter-specific varies considerably for each subfamily (Hypodermatinae: 13.1 %; Oestrinae: 13.3 %; Gasterophilinae: 9.6 %; Cuterebrinae: 5.3 %) [Otranto & Stevens 2002]. In addition, frequently, these universal limits do not satisfy the discrimination between closely related species.

In our research, the analysis of intra-specific divergence between sequence pairs for the studied mitochondrial *loci* (COI barcode, COI 616 bp, COII, Cyt-b and Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1) revealed an important similarity, and even the coincidence, in most cases (excluding shared haplotypes in sister species) (**Contributions I.II-I.V**). The noticeable homology with the reference haplotypes recorded in GenBank confirmed the majority of the diagnostics, in accordance with the information regarding morphology (**Contributions I.II-I.V**). Overall, our findings support the maximum intra-specific threshold value established between 0.8-1 % for mitochondrial *loci* (Diptera) (**Contributions I.III-I.IV**) [Wallman & Donnellan 2001; Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003a-b, 2008; Zhener *et al.* 2004; Boehme *et al.* 2010; Salem *et al.* 2015]. Only a few species revealed nucleotide variability above this limit (**Contributions I.II-I.V**) and, generally, in line with the maximum intra-specific

VII. General discussion

divergence (1.5 %) found for mitochondrial *loci* in mammals [Tobe *et al.* 2010]. Exceptionally, the observed values in some species for certain GenBank haplotypes (*P. regina*, *C. vomitoria*, *L. cuprina*, *L. caesar* and *L. illustris*) loosely exceeded even this last maximum (**Contributions I.II/I.IV-I.V**). Normally, it tends to question the accuracy of the initial identification of the sequences that reveal unusual divergences (outliers). However, the marked intra-specific discrepancies found here are consistent with geographically separated populations, and therefore genetically isolated, in which is accumulated the divergence that may trigger the onset of the speciation process (**Contributions I.II/I.IV-I.V**). Further studies in this regard are required to confirm this hypothesis. In this sense, we should not forget that forensic entomology is a locality specific science; therefore, as developmental times should be estimated focusing on the regional characteristic entomofauna, genetic approaches should be performed from a local perspective to avoid errors or uncertainties in identifications [Wallman & Donnellan 2001; Harvey *et al.* 2003b, 2008; Jordaens *et al.* 2013a; Nakano & Honda 2015].

The inter-specific pairwise divergence sequence analysis for mitochondrial *loci* exhibited high values for most species (excluding sister species) (**Contributions I.II-I.IV**). The minimum inter-specific values here found exceeded, generally, the established minimum of 3 % for mitochondrial *loci* [Wells & Sperling 2001; Harvey *et al.* 2003a, 2008; Hebert *et al.* 2003; Salem *et al.* 2015]. Only certain species of *Lucilia* genus (*L. caesar-L. illustris*, *L. sericata-L. silvarum* and *L. richardsi-L. silvarum*) revealed a nucleotide divergence below this limit (**Contributions I.III-I.IV**). Thus, globally, *L. caesar-L. illustris* exhibited some shared mitochondrial haplotypes with inter-specific divergence of 0.0 % (**Contributions I.III-I.V**). However, for these sister species, in the populations of the Basque Country (excluding GenBank data) they were not detected identical haplotypes, although the intra and inter-specific distances remained very limited (**Contributions I.IV-I.V**). For its part, it should be noticed that

in non-sister species pairs the same markers (COI barcode, COI 616 bp and Cyt-b) revealed irregular genetic divergence values and often below the threshold value (*L. sericata*-*L. silvarum*: 3.2-4.0/4.1-4.7/1.6-2.6 and *L. richardsi*-*L. silvarum*: 1.7-2.0/2.1-2.3/2.6-3.3) (**Contribution I.V**). Such singularities are consistent with the considerable variability differences depending on the clade exhibited by some markers studying complete mitochondrial genomes [Nelson *et al.* 2012]. These findings suggest that the asymmetric evolution is not only limited to dissimilar regions of the same marker, or to different markers, but also seems to be conditioned by the taxa under study (**Contribution I.V**). Thus, while for *L. sericata*-*L. silvarum* the COI (616 bp) marker is more discriminative, for *L. richardsi*-*L. silvarum* it is the Cyt-b (**Contribution I.V**). Traditionally, the discrimination difficulty of mtDNA at specific level is associated with closely related species, such as *L. caesar*-*L. illustris*, in which morphological identification is usually influenced by extreme physical similarity. This pattern has been previously observed in different genera, *Chrysomya* [Harvey *et al.* 2008], *Calliphora* [Wallman & Donnellan 2001] and *Lucilia* [Wells *et al.* 2007; Sonet *et al.* 2012; DeBry *et al.* 2013]. However, the complex species pairs here mentioned not only are gathered into different subgenera according to their morphology (*Phaenicia*: *L. sericata* and *L. richardsi*; *Bufolucilia*: *L. silvarum*) [Peris & González-Mora 1991], but also exhibit high divergence values in the nuDNA (ITS2) (*L. sericata*-*L. silvarum*: 15.3-17.7 and *L. richardsi*-*L. silvarum*: 14.1) that discard them as sister species (**Contribution I.V**). Considering that the reliable specific delimitation fundamentally depends on the magnitude and the maintenance between intra-specific variability and inter-specific divergence in the selected region [Tan *et al.* 2010], our findings call into question the accuracy and reliability of the generalizations in mitochondrial markers.

Overall, the COI barcode (658 bp) *locus* exhibited maximum inter-specific nucleotide variability similar, or even higher than the remaining mitochondrial markers (**Contributions I.II-I.V**). However, within *Lucilia* genus, COI (616 bp) and Cyt-b

VII. General discussion

(307 bp) revealed greater divergence than the most common marker (**Contributions I.I-I.V**). Moreover, the COII (725-731 bp) *locus* showed the greatest divergence (17.9) and differences in sequence lengths of some of the Calliphoridae species (*Ch. albiceps*: 728 bp; *C. vicina*: 725 bp; *L. caesar* and *L. illustris*: 731 bp) (**Contribution I.IV**). In general, for the Iberian Peninsula Calliphoridae (Portugal and Basque Country) the maximum intra-specific divergence recorded in mitochondrial *loci* (COI barcode/COI 616 bp/Cyt-b) was 0.9-1.3 % and the minimum inter-specific 2.9-3.2 % (excluding complex species) (**Contributions I.III/I.V**). Furthermore, these markers have a hole, or gap, between the maximum intra-specific and minimum inter-specific values from 0.9/1.1/1.3 to 3.2/3.2/2.9 (excluding complex species) (**Contributions I.III/I.V**). Notice that the analysis of the COI (616 bp) marker in the Basque Country populations, including problematic species, presented intra and inter-specific divergences without overlapping, being the intra-specific maximum variation equal to the inter-specific minimum (1.8) (**Contribution I.V**).

For its part, the ITS2 (310-352 bp) nuclear marker, almost lacks of intra-specific genetic divergence (**Contributions I.II-I.V**). Even when the sequences recorded in GenBank are considered, the number of variants is extremely reduced (**Contributions I.II-I.V**). This low nucleotide variability fits homogenization processes, through concerted evolution, previously observed in Diptera [Nelson *et al.* 2008; Song *et al.* 2008b]. Only *C. vomitoria* and *L. sericata* species exhibited heterogeneity in their sequences (0.0-1.5 % and 0.0-0.6 %, respectively) (**Contributions I.III/I.V**). However, this region showed the greatest inter-specific divergence and a higher resolution than any mitochondrial *locus*, enabling the clear and unambiguous differentiation of even the most complex species of the *Lucilia* genus (**Contributions I.III-I.V**). These findings contrast with previous studies about Central European entomofauna, where some species of *Lucilia* showed mixtures in nuclear haplotypes [Sonet *et al.* 2012]. However, results are consistent with other works where the fast

evolution of the ITS2 region allowed the resolution of phylogenetic relationships at different hierarchical levels: genus, species, or lower (subspecies) [Otranto & Stevens 2002; Trizzino *et al.* 2009]. Globally, in the nuclear marker ITS2 (310-352 bp) the maximum intra-specific and minimum inter-specific observed variation was 0.5-0.6 % and 8.4-12.8 %, respectively (excluding the complex species) (**Contributions I.III/I.V**). In addition, this marker showed a hole, or gap, clearly defined even in recent divergence species *L. caesar* and *L. illustis* (0.0 % and 1.5-1.7 %) (**Contributions I.III/I.V**). Therefore, its suitability as a diagnostic tool may be extended, at least to Diptera of medico-legal and veterinary importance from Southern Europe (Portugal and Spain) (**Contributions I.III-I.V**).

Our data support that the combined use of mitochondrial and nuclear markers provides the most robust discrimination between species. The scarce of inter-specific nucleotide divergence detected for the COI barcode (658 bp) suggest certain caution in the specific diagnoses, particularly in closely related species. However, the ITS2 (310-352 bp) seems to be the most appropriate marker for complex species discrimination.

Likewise, this work highlights the importance of conducting thorough samplings, both locally and globally, recording all the possible species richness and genetic diversity, to improve the understanding of the phylogenetic relationships and the accuracy in molecular identifications. All of this, without overlooking the local perspective of entomology and avoiding generalizations performing diagnostics. Furthermore, additional biological information is also important to help the correct interpretation of the results, although the actual knowledge about some of the studied species is still limited.

The present study enabled the determination of the intra and inter-specific variability, for each marker, and the identification of the most effective to differentiate closely related species. All these new molecular knowledge about Diptera of medico-legal and

VII. General discussion

veterinary interest from Southern Europe (Iberian Peninsula) are of interest for the proper practice of forensic molecular entomology.

7.1.2.6. DNA barcode and databases problematic

Historically, different regions of the mitochondrial COI gene have been utilized for identification of invertebrates, including Diptera of medico-legal and veterinary importance. Currently, the barcode region is the most commonly used in genetic studies [Meiklejohn *et al.* 2011; Boehme *et al.* 2010; Jordaens *et al.* 2013b; Rolo *et al.* 2013]. The idea of using a part of the COI *locus* as the universal diagnostic marker (COI barcode) was suggested to enable the identification of unknown specimens comparing them with reference sequences of previously identified species [Roe & Sperling 2007].

Although, as general rule, its use in Diptera identification is sustainable, the exclusive use of this marker may lead to inaccurate taxonomic diagnoses in closely related species (e.g. *L. sericata*-*L. cuprina* or *L. caesar*-*L. illustris*) [Wallman *et al.* 2005; Harvey *et al.* 2008; Tourle *et al.* 2009; DeBry *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2013], due to the existence of genetic permeability (hybridization, transgressions, etc.) [Zimmer 2001; Baudry *et al.* 2003; Whitworth *et al.* 2007]. In these cases, phylogenetic inference based on mtDNA will not necessarily provide identification accordance to its morphology or nuDNA. Therefore, the combined use of mitochondrial and nuclear markers is necessary to detect potentially misleading situations and to clarify its phylogenetic status [Rubinoff *et al.* 2006; Nelson *et al.* 2007; Roe & Sperling 2007; Williams *et al.* 2008; Tantawi *et al.* 2010].

Furthermore, a study conducted using COI gene regions (minimum of 300 bp) in a large number of Diptera species (449) provided a success rate lower than 70 % in the specific diagnostic [Meier *et al.* 2006]. This occasional failure of the COI *locus* to distinguish between Diptera species might actually be a deficiency inherent to identification based exclusively on mtDNA.

Furthermore, some authors emphasize the importance of considering non-genetic information, such as species natural history, seasonality or geographical ranges [Wells & Williams 2007]. As an example, although *L. caesar-L. illustris* share haplotypes, only *L. illustris* is present in the New World [Wells *et al.* 2007]. However, when both species in trouble coexist, additional morphological or genetic analyses are required to provide reliability to identification.

Therefore, a combined approach is appropriate to verify the specific diagnosis and to address these challenges, including the specimen morphological identification, the application of biological, ecological and ethological knowledge, as well as the analysis of multiple DNA target regions.

Another issue to consider is the data integrity: overall, the success of the molecular identification will be conditioned by the number of species and the validity of the information contained in the databases.

It is important to have a set of original data, as complete as possible, to ensure the diagnostic at species and lower levels, and to document the variations between populations from different geographical regions [Stevens & Wall 2001; Wells & Williams 2007]. In this sense, the moderate cost of sequencing is generating an exponential increase in the volume of molecular data recorded in databases. Generally, we rely on published material, and no regional studies enabling to know the variability of local specimens are actively conducted. However, the value of this information and the validity of extrapolations are limited by the accuracy and the integrity of the reference sample [Dawnay *et al.* 2007].

Occasionally, the comparison of DNA sequences with databases reveals deviations from the general pattern, or outliers, which could represent an extreme sample or part of an unsampled population [Harvey *et al.* 2008]. A few seasons may explain the high divergence, as introgressions, genetic isolation, and misidentifications. Unfortunately, misidentifications are a more common problem than we would desire [Bridge *et al.*

VII. General discussion

2003; Harris 2003; Nilsson *et al.* 2006; Dawnay *et al.* 2007; Valkiunas *et al.* 2008; Park *et al.* 2009b; Jordaens *et al.* 2013b; Salem *et al.* 2015; Williams *et al.* 2016]. Therefore, it is essential to establish rules and severe controls that verify submitted sequences to remove from databases erroneous records, and to maintain their integrity [Nakano & Honda 2015].

7.1.2.7. Synthesis

This research has demonstrated the usefulness of the regions COI (616 bp) and Cyt-b (307 bp) of mitochondrial DNA, and ITS2 (310-337 bp) of nuclear DNA, as promising diagnostic tools for unambiguous species differentiation (**Contributions I.II-I.V**). Overall, the first two markers accumulate high nucleotide variability in comparison with the standard *locus* (COI barcode) or with all other studied mitochondrial markers (**Contributions I.II/I.V**). Additionally, among mtDNA *loci*, Cyt-b (307 bp) highlighted exhibiting an appreciable inter-specific divergence within *Lucilia* genus, despite its short length (**Contributions I.III/I.V**). However, only the ITS2 (310-352 bp) nuclear region enabled to delineate clearly and consistently species boundaries, and to resolve as monophyletic even closely related species (**Contributions I.III-I.IV**).

Thus we remark the convenience of multi-region analysis for the unequivocal diagnosis at a specific level, especially in forensic resolutions, recommending the selection of mitochondrial *loci* as first taxonomic approach in unknown samples, as well as nuclear ones to achieve the diagnosis to species level, mainly in complex species.

Noteworthy COI *locus* has a large number of sequences in databases, which is an advantage when working with poorly studied species at genetic level, such as myiasis Diptera. This marker has been successfully used in the diagnosis of an immature under poor preservation conditions and inconclusive morphology, which finally was identified as *M. autumnalis* (**Contribution II.I**), as well as in quality control of a large-scale study, in which it was detected the lack of congruence between morphological

and molecular diagnosis of an adult, which was finally resolved as *L. bufonivora* (**Contribution II.II**). Furthermore, considering that the PMI estimation not only needs the unequivocal diagnosis at specific level, but also requires the application of reliable developmental studies, molecular identification may be applied to confirm hybridizations and to maintain the species purity in experimental colonies. All this demonstrates the need to supplement traditional taxonomy with molecular ones in order to avoid uncertainties that may lead to errors.

Our contribution increases genetic available resources and provides new relevant data to the correct specific diagnosis and to the better understanding of the phylogenetic history of Diptera of medico-legal and veterinary relevance, from Central (European region of Westphalia, Germany) and Southern Europe (Iberian Peninsula: Portugal and Northern Spain) (**Contributions I.I-I.V**). This aspect is of unquestionable value considering the scarcity of available information in this regard in the molecular databases, especially for the Iberian Peninsula.

This is the first study in depth with a molecular approach about entomofauna of medico-legal and veterinary interest in the Iberian Peninsula (Spain and Portugal) and constitutes a first step to establish a reference database for the Iberian Peninsula making easier the specific diagnoses in future research.

7.1.3. New techniques on molecular identification

Initially, this research was focused on the molecular identification of insects, combining DNA amplification by PCR and sequencing. One of the main challenges of molecular biology is the incorporation of technologies that improve the benefits offered by conventional ones. Recently, high-resolution melting profiles analysis (HRM) has been introduced as a technique, sensible and rapid, for genotyping polymorphisms, mutations detection and homology assignment [Reed *et al.* 2007; Radvansky *et al.* 2011; Wong *et al.* 2013]. This method enables to determine the

VII. General discussion

variation in a single step, without requiring fluorescence-labeled oligonucleotides or post-PCR processing, reducing time, costs and contamination risks [Malewski *et al.* 2010; Ríos & Yuil de Ríos 2010; Buddhakosai *et al.* 2014].

Although this technique is widely used for clinical diagnosis of pathogens (viruses, bacteria or protozoa and their variants) [Monis *et al.* 2005; Lin *et al.* 2008; Pietzka *et al.* 2009], in the entomological context its application is still underdeveloped. Only a small number of studies address the diagnosis of insect disease vectors, mainly of veterinary and agricultural significance [Kang & Sim 2013; Wetten *et al.* 2016]. In the forensic context, up to date, a single work has used the HRM analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) *locus* (HRM-COI), for the diagnosis of Calliphoridae from Poland [Malewski *et al.* 2010]. However, the COI *locus* analysis has some disadvantages, such as a limited discrimination power between closely related species [Harvey *et al.* 2008; DeBry *et al.* 2010; Sonet *et al.* 2012], and a high intra-specific variability, which may increase the analytical expenses by requiring a greater number of reference samples. Furthermore, the diagnoses with HRM-COI are more laborious and costly due to the necessity of the analysis using two different primer pairs in separate reactions [Malewski *et al.* 2010].

In general, the reliability of this technique in species differentiation is mainly conditioned by intra-specific nucleotide diversity [Malewski *et al.* 2010]. The ideal features for the HRM analysis consist of a DNA sequence with low intra-specific diversity and high inter-specific variability flanked by conserved regions [Malewski *et al.* 2010; Radvansky *et al.* 2010]. In this sense, the second internal transcribed spacer (ITS2) of nuclear ribosomal DNA (rDNA), combines a reduced or absent intra-specific divergence with a high nucleotide variability (substitutions and INDELs) between species [Hillis & Dixon 1991], enabling the unambiguous identification even of sister species (**Contributions I.II-I.V**). These features make it an ideal candidate for HRM analysis.

In this research it has been developed and validated an assay based on HRM analysis of the ITS2 (310-343 bp) region (HRM-ITS2) as a diagnostic tool for Diptera unambiguous differentiation (**Contribution I.VI**). The trial was focused on seven blowfly species (*Ch. albiceps*, *L. ampullacea*, *L. sericata*, *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. caesar* and *L. illustris*) of medico-legal and veterinary importance from the Iberian Peninsula (Southern Europe) [Soler-Cruz 2000; Prado e Castro *et al.* 2011, 2012], considering the complexity of morphological diagnostics because of the physical similarities. The validation of diagnostics by HRM-ITS2 was performed in a large number of specimens (295), which had been previously identified morphologically and molecularly by sequencing.

Dissociation profiles obtained enabled the clear differentiation of the seven species, in accordance with sequencing data and/or reference samples for each species (**Contribution I.VI**). In general, normalized curves were assigned to one of the species with a level of confidence (92.4-99.9 %, **Contribution I.VI**) higher than the minimum threshold set at 90 % [Kirkpatrick *et al.* 2009; Ganopoulos *et al.* 2012]. Differences in the confidence levels are probably related to the variation in DNA quality or to the presence of inhibitors, which may limit the amplification efficiency [Malewski *et al.* 2010; Wong *et al.* 2013]. Although some authors have suggested that inhibitors do not influence the dissociation profiles [Herrmann *et al.* 2007; Malewski *et al.* 2010; Jaakola *et al.* 2010], the fact is that their effect will be conditioned by the final dilution. Thus, the higher final volume is the less interference of inhibitors.

Overall, HRM-ITS2 analysis exhibited minor variations in melting temperatures (T_m) between duplications in the same run (intra-run) and runs in different days (inter-run), being dissociation curves and temperature orders consistent for each species (**Contribution I.VI**). The reduced values in the standard deviation (SD) of the T_m found here are associated with a high repeatability and reproducibility [Buddhakosai *et al.* 2014].

VII. General discussion

The methodology developed in this contribution demonstrated the robustness of the HRM-ITS2 analysis for simple, fast and reliable differentiation of necrophagous Diptera, using only a single primer pair, in a close-tube reaction, and without post-PCR processing or fluorescence-labeled oligonucleotides use (**Contribution I.VI**). Thus, costs and contamination risks are reduced, advantages to be considered when working in a forensic context. Additionally, HRM is a non-destructive method, making possible sequence the sample products that are not grouped with reference profiles [Peña *et al.* 2012; Decat *et al.* 2013].

The current study provides first HRM-ITS2 profiles that may be useful, in future investigations, as standards for rapid species identification. However, in this work it has been only analyzed a selection of the most important blowfly species from Southern Europe. Additional studies will be needed with species and specimens from different origins to confirm the usefulness of extrapolations, without forgetting that the insect fauna is locality specific, and that the HRM-ITS2 analysis should include reference profiles of regional characteristic species.

7.2. Identification at specific and individual level of cadavers using digestive content of immature Diptera in real cases

The main application of molecular analysis in a forensic context is the diagnosis at specific level of insects to estimate their period activity (PIA), which usually approximates the *post-mortem* interval (PMI). However, in certain situations, they may be also of interest as a source of vertebrate DNA. Thus, the digestive content of them, with host DNA (food source), could be used to identify the insect last meal at species or even individual level.

In a medical or veterinary context, most of the studies are focused to study haematophagous insects for epidemiological control [Coulson *et al.* 1990; Boakye *et al.* 1999; Kreike & Kampfer 1999; Mukabana *et al.* 2002; Curic *et al.* 2014]. In the

forensic field, the most important application is the determination of the victim or suspect identity, not only from haematophagous insects [Replogle *et al.* 1994; Lord *et al.* 1998; Mumcuoglu *et al.* 2004] transferred during sexual assaults or located in a particular place, but also from necrophagous ones [Carvalho *et al.* 2005; Di Luise *et al.* 2008] when the corpse has been relocated, or concur several cadavers and larva connection with them is doubtful [Wells *et al.* 2001a; Zhener *et al.* 2004; Campobasso *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2005; Di Luise *et al.* 2008], and finally, from myiasis ones in cases of negligence or mistreatment. However, up to date, their use in real cases is limited [Zehner *et al.* 2004; Di Luise *et al.* 2008; Li *et al.* 2011; Marchetti *et al.* 2013], based the most consistent studies on simulated situations from which results are ideal experimentally obtained and, frequently, not translatable [Clery 2001; Mumcuoglu *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2005; Kondakci *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014].

Currently, in forensic laboratories, for species or subspecies diagnosis of vertebrate mammals, it is used the mitochondrial cytochrome b (Cyt-b) [Zhener *et al.* 1998; Parson *et al.* 2000; Branicki *et al.* 2003; Wells & Stevens 2010], while for the differentiation of human populations the hypervariable *loci* (HVI and HVII) of the non-coding control region, or the D-loop, provided additional information [Anderson *et al.* 1981; Sullivan *et al.* 1992]. Moreover, we should mention that the recent avalanche of genetic data obtained for the marker COI barcode, probably favour its use as a diagnostic tool in near future forensic investigations.

Meanwhile, individual identification in humans, and some other mammals, is performed by analyzing a set of well established microsatellites (STRs, short tandem repeats) [Vallejo & Alonso 2009; Phillips *et al.* 2011; Gamarra *et al.* 2015]. Generally, for good quality DNA longer STRs amplicons as AmpFLSTR® Identifiler® are used, while for degraded DNA they will be shorter as AmpFℓSTR® MiniFiler™ [Sánchez *et al.* 2006; Di Luise *et al.* 2008; Kondakci *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014]. Finally, notice that in highly degraded samples, with scarce or fragmented DNA, sequences integrity

VII. General discussion

may be compromised, affecting also amplification efficiency of STRs *loci*. Thus, in recent years, to carry out human individual identification in these kind of problematic samples panels of highly polymorphic SNPs are being developed, mainly nuclear [Sánchez *et al.* 2006; Kondakci *et al.* 2009], whose successful application will promote that, in a short period of time, they are used in addition or as an alternative to traditional STRs *loci*.

In this research we focused on the effective recovery and analysis of host DNA (human) contained in the digestive tract of immature Diptera from real cases (**Contribution II.III**). For this purpose, insect maggots, with crops of diverse appearance, were collected from two human corpses in different decomposition stages. The human individual identification was performed using the AmpFℓSTR® MiniFiler™ kit, together with other two Mentype® Nonaplex^{QS} and AmpFℓSTR® NGM™ of usual forensic use and not previously applied for this type of samples. The diagnosis, at species level, was performed with the Cyt-b (307 bp) *locus*, as widely established in the forensic genetic field for vertebrates identification and having immediate application to the entomological evidence.

In the Cyclorrhapha division (Muscidae, Faniidae, Calliphoridae and Sarcophagidae) immature Diptera have a storage organ (crop) wherein no enzymes are secreted [Clery 2001; Zehner *et al.* 2004; Campobasso *et al.* 2005]. Therefore, the digestion that takes place in the crop is related to salivary enzymes secreted during pre-oral digestion [Kettle 1995; Zehner *et al.* 2004], and they have no significant effect on degradation [Kondakci *et al.* 2009]. Thus, the apparent crop colour will be directly related to the state of tissue degradation (**Contribution II.III**). Large bright red coloured crops contain more DNA and of higher quality (**Contribution II.III**). The results demonstrated the direct influence of crops appearance and size in the quality and quantity of extracted host DNA (**Contribution II.III**). Generally, there is a positive correlation between the crops size and the amount of extracted DNA [Clery 2001;

Campobasso *et al.* 2005]. However, the tissues decomposition that serve as food source may act in detriment of the quantity and quality of recovered DNA, obtaining in smaller corps higher DNA quantifications than in the bigger ones (**Contribution II.III**). This could happen, even, on the same cadaver if it exhibits different decomposition rates in tissues of diverse anatomical regions or distinct organs.

Overall, the obtained profiles for the STRs *loci* coincided with those of reference. Moreover, a clear difference was observed in the amplification success depending on the fragment size (long or short STRs *loci* amplicons) (**Contribution II.III**). However, when commercial kits with longer STRs *loci* amplicons (Mentype® Nonaplex^{QS} and AmpFℓSTR® NGMTM) obtained incomplete profiles or failed, shorter STRs *loci* amplicons (AmpFℓSTR® MiniFilerTM) increased the number of genotyped alleles (**Contribution II.III**). This amplification strategy using multiplex systems with different primers resulted of great helpfulness to complete the profiles. Furthermore, the characterization of the Cyt-b (307 bp) *locus* was satisfactory, even in the most degraded samples in which the genotyping of STRs *loci* failed (**Contribution II.III**).

Finally, we should emphasize that in some studies the cadaveric decomposition status seems not to influence the DNA quality [Zehner *et al.* 2004; Campobasso *et al.* 2005], hence they, exceptionally, obtained STR profiles after extended decomposition periods (4 months in winter) [Zehner *et al.* 2004]. However, the fact is that the tissue condition is directly related to the degradation degree of the DNA contained in the insect digestive tract, being the main factor to achieve profiles full, partial or not having results [Hoff-Olsen *et al.* 2001]. Therefore, it is important to consider the peculiarities of each case to interpret the findings. Similarly, further studies should be performed using the latest advances based on mitochondrial and nuclear SNPs analysis [Sánchez *et al.* 2006; Kondacki *et al.* 2009; Köhneemann & Pfeiffer 2011], as well as other technologies such as massive parallel sequencing (MPS, or next generation sequencing,

VII. General discussion

NGS) [Elena *et al.* 2016], that enable to identify the biological material at individual level in highly degraded samples where other methods failed.

In summarize, this research provides new data of interest that improve the effectiveness of the digestive content analysis of necrophagous insects in the most critical stages. Especially in real cases, the individual identification of a corpse or its connection with entomological evidence is a crucial issue. Thus, one of the main factors to consider is the crops size and appearance. Furthermore, the higher tissue decomposition the lower genotyping success. Working with highly degraded DNA Mini STRs multiplex systems (i.e. AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ MiniFiler TM) obtain better results. However, when the genotyping of STRs *loci* fails, the mtDNA (Cyt-b) analysis seems to be the best option to achieve successful results, at least at specific level.

7.3. Action protocol in forensic entomology

Arthropods associated with cadaveric remains are used as support in forensic investigations, providing transcendental information to determine time, place and procedure in which an event occurred [Anderson 1997; Campobasso & Introna 2001; Greenberg & Kunich 2002], so their collection and appropriate preservation, registration and labelling are essential during an expert investigation. Hence, as fingerprints, hairs, fibres or many other biological traces, entomological samples should be considered as physical evidence that are part of the body of proofs in trials [Hall 1990; Amendt *et al.* 2007, 2011].

Currently, their major contribution is the estimation of *post-mortem* interval (PMI) in medico-legal cases [Greenberg 1991; Nuorteva 1997; Dadour *et al.* 2001; M de Pancorbo *et al.* 2006], although they may also be useful to demonstrate mistreatment, abandonment and other kind of negligence, as well as to estimate the origin, time and type of contamination of food, furniture and other goods [Catts & Goff 1992; Byrd & Tomberlin 2001]. Thus, one of the essential requirements is to ensure the validity of

the entomological evidence in a Court of Justice, starting with a thorough and diligent sampling. It should be considered that bad practice in some of the most critical steps may compromise the integrity of such evidences and invalidate them.

Therefore, in this last work (**Contribution II.IV**) it has been adapted procedure guidelines, which includes the basics for entomological evidence collection, processing and registration [Arnaldos *et al.* 2006; Amendt *et al.* 2007; Byrd *et al.* 2010], in a simple way, according to European standards, and that will facilitate the incorporation of this discipline as another routine in future forensic investigations in the Basque Country. Documents have been written in bilingual version (Spanish/Basque) (**Contribution II.IV**).

Notice that in the elaborated protocol DNA is only sporadically mentioned. Therefore, and considering the molecular approach of the present Thesis, we will mention, in this section, some instructions and suggestions to follow when the objective is to obtain DNA from entomological evidence for further analysis.

In general, the quality of the extracted DNA is a parameter that is influenced, mainly, by the killing way and preservation conditions, varying its execution according to the trace type [Amendt *et al.* 2007, 2011].

Performing insect molecular identifications at specific level, frequently good results are obtained if specimens are stored under the same conditions used for morphological identification (**Table S66**, Supplementary material). For example, in immature Diptera the DNA extraction is usually performed from the whole specimen [Saigusa *et al.* 2005; Meiklejohn *et al.* 2013; Tuccia *et al.* 2016], preferably after being boiled and cleaned the exterior surface with a bleach solution (NaClO, 20 %) [Linville & Wells 2002; Campobasso *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2005]. However, they can also be carried out satisfactory extractions with relatively small sections, of several millimetres (**Contributions I.I-I.IV**), to avoid possible interference with DNA contained in the digestive tract. In the case of pupae, puparia, and adult Diptera, their preservation in

VII. General discussion

diluted ethanol (70-95 %), or even dried, is satisfactory. Occasionally, the use of the latter method may compromise the extraction efficiency in the most ancient specimens [Stevens & Wall 1997b; Malewski *et al.* 2010; Mazzanti *et al.* 2010]. Moreover, it is desirable to avoid the use of other preservatives, such as formalin, formaldehyde or ethylacetate, as they not only may alter the tissues but also have a negative influence on the DNA quality [Adams & Hall 2003; Amendt *et al.* 2011]. Notably, in insects kept dried, DNA degradation tends to be more related to the proliferation of fungi and other microorganisms than to natural degradation itself. In adult insects, DNA extraction is performed according to size, using the whole specimen if it is very small, or certain parts such as their legs, head or thoracic muscles [Stevens & Wall 2001; Stevens 2003; Tan *et al.* 2010; Nakano & Honda 2015; Salem *et al.* 2015; Williams *et al.* 2016; Zajac *et al.* 2016].

Moreover, current biomolecular tools enable the detection even of human and other species DNA, contained in the immature or adult insects digestive tract [Di Luise *et al.* 2008; Wells & Stevens 2008; Kondacki *et al.* 2009; Curic *et al.* 2014], and that should not be overlooked. According to the feeding habits, its study may have the following applications:

- Immature necrophagous: enable to identify a corpse, in its absence or without soft tissues to analyze, and link it indubitably to a specific place detecting *post-mortem* relocations [Di Luise *et al.* 2008; Kondacki *et al.* 2009; Wells & Stevens 2010].
- Immature myiasis: enable to identify the victim and reveal negligence, abuse or abandon, frequently in dependent individuals [Benecke & Lessig 2001; Benecke *et al.* 2004; Amendt *et al.* 2011].
- Adults haematophagous: their location in a particular place enable to locate the subject (victim or suspect) in an environment, while their transference during abuse or mistreatments enable to link the suspect with a victim [Lord *et al.* 1998; Mumcuoglu *et al.* 2004; Amendt *et al.* 2011; Curic *et al.* 2014].

As described, host DNA identification, both at individual and species level may be of great interest (**Contribution II.III**). One of the crucial steps to obtain quality DNA is stopping the digestion process in the insect by the immediate killing and the adequate isolation of the digestive content [Di Luise *et al.* 2008; Kondakci *et al.* 2009; Garipey *et al.* 2012]. It should be considered that the rate of digestion varies considerably among insects groups, and depends on environmental, physiological and behavioural factors [Garipey *et al.* 2012]. Thus, while the DNA contained in the digestive tract of some haematophagous adults, such as mosquitoes, is viable for individual identification even three days after the blood ingestion [Curic *et al.* 2014], in immature necrophagous it is rapidly metabolized (in hours) in fasting situations [Linville *et al.* 2004]. Moreover, in the latter ones exist a partial pre-oral digestion by means of enzymes secretion to the medium that fluidify tissues making easier their ingestion and storage in the crop, until the digestion [Wells *et al.* 2001a; Linville *et al.* 2004; Zhener *et al.* 2004].

Thus, it is recommended the specimen killing (adult or immature) by freezing at -20 °C (without preservatives), as soon as possible [Linville *et al.* 2004; Di Luise *et al.* 2008; Kondacki *et al.* 2009] and their preservation at -20 °C or -80 °C. In immature necrophagous, it is advised to dissect the specimen, isolate the crop and extract the host DNA within the 24 hours after the collection to prevent degradation [Coulson *et al.* 1990; Linville *et al.* 2004]. Moreover, it should be noted that the ethanol, as other preservatives used in the conservation of immatures, may affect the DNA quality [Di Luise *et al.* 2008].

Finally, considering that the evidence quality is essential in forensic science, this contribution provides some basic guidelines that will facilitate the integration of forensic entomology in criminal investigation in the Basque Country.

VIII. Conclusiones generales /
General conclusions

1. Los métodos basados en ADN juegan un papel crucial cuando los diagnósticos tradicionales son imposibles de realizar o pueden conducir a error, como en los casos de especímenes degradados o en malas condiciones. La identificación molecular es más objetiva, precisa y fiable, siendo indispensable como complemento a la taxonomía tradicional, además de ser un buen procedimiento para su control de calidad.
2. El análisis de los marcadores mitocondriales y nucleares [COI *barcode*, 658 pb; COI, 616 pb; COII, 725-731 pb; Cyt-b, 307 pb; Cyt-b-ARNt^{ser}-ND1, 495-496 pb; ITS2, 310-352 pb; e ITS12, 1081-1083 pb] en las diferentes especies estudiadas [Calliphoridae: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Phormia regina* (Meigen, 1826), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *C. vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), *L. richardsi* Collin, 1926, *L. ampullacea* Villeneuve, 1922, *L. silvarum* Meigen, 1826, *L. caesar* (Linnaeus, 1758), *L. illustris* (Meigen, 1826) y *L. bufonivora* Moniez, 1876; Muscidae: *Musca autumnalis* De Geer, 1776; y Oestridae: *Hypoderma bovis* (Linnaeus, 1758)] ha incrementado considerablemente el número de secuencias nucleotídicas para estas especies en el GenBank (2.772 secuencias); proporcionando una importante cantidad de nuevas aportaciones para diferentes especies y marcadores a nivel Europeo, Peninsular o de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV).
3. Los *loci* mitocondriales citocromo b (Cyt-b, 307 pb) y la región adyacente del extremo 3'- COI *barcode* (COI, 616 pb) son herramientas prometedoras para el diagnóstico de dípteros, y presentan un poder de discriminación mayor, en las especies más complejas, que el *locus* estándar (COI *barcode*) en identificación de insectos.
4. Los *loci* mitocondriales estudiados muestran limitaciones en su capacidad de diagnóstico cuando se trabaja con especies estrechamente relacionadas, lo que puede incrementar el riesgo de identificaciones erróneas.
5. El segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 310-352 pb) de ADN ribosómico nuclear (ADNr) permite claras diferenciaciones, incluso entre especies hermanas,

VIII. Conclusiones generales

siendo prometedor para los diagnósticos moleculares en entomología médico-legal y veterinaria.

6. El segundo espaciador transcrito interno (ITS2, 310-352 pb) de ADN ribosómico nuclear (ADNr) demostró ser un marcador apropiado para la identificación específica de califóridos mediante el análisis *high-resolution melting* (HRM).
7. Algunas especies de dípteros miásicos, como el parásito obligado, *Hypoderma bovis*, o los parásitos facultativos, *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *Lucilia caesar* y *L. illustris*, se han encontrado en infestaciones de animales de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV).
8. *Musca autumnalis* se ha registrado por primera vez en relación a un caso de miasis en ganado. Adicionalmente, se confirma la presencia de esta especie en el sur de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), ampliándose el área de distribución conocida desde la costa atlántica, de clima oceánico, a la zona de transición, de clima sub-mediterráneo.
9. La presencia de *Lucilia bufonivora* (parásito obligado de anfibios) se ha confirmado en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). Hasta la fecha, no había registros fiables sobre esta especie en la misma.
10. El ADN del hospedador (fuente de alimento) contenido en el tracto digestivo de insectos necrófagos inmaduros es adecuado para la identificación del cadáver tanto a nivel específico, utilizando la región de ADNmt Cyt-b (307 pb), como individual, mediante perfiles STR (Mentype® Nonaplex^{OS}, AmpFℓSTR® NGM™ o AmpFℓSTR® MiniFiler™).
11. El protocolo de actuación y la ficha de registro para la recogida de material entomológico (Castellano/Euskera), elaborada según estándares internacionales, servirá para asegurar la fiabilidad y la validez de las evidencias en las investigaciones forenses y como referencia en la formación del personal adscrito a los Organismos Oficiales pertinentes, principalmente en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV).

1. DNA-based methods play a crucial role when traditional diagnostics are impossible to address or may conduct to error, such as for bad conditions or degraded specimens. Molecular identification is more objective, accurate and reliable, being essential as a complement to traditional taxonomy and as a quality control test.
2. The mitochondrial and nuclear markers analysis [COI *barcode*, 658 bp; COI, 616 bp; COII, 725-731 bp; Cyt-b, 307 bp; Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1, 495-496 bp; ITS2, 310-352 bp; and ITS12, 1081-1083 bp] in the different studied species [Calliphoridae: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Phormia regina* (Meigen, 1826), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *C. vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), *L. richardsi* Collin, 1926, *L. ampullacea* Villeneuve, 1922, *L. silvarum* Meigen, 1826, *L. caesar* (Linnaeus, 1758), *L. illustris* (Meigen, 1826) and *L. bufonivora* Moniez, 1876; Muscidae: *Musca autumnalis* De Geer, 1776; and Oestridae: *Hypoderma bovis* (Linnaeus, 1758)] has considerably increased the number of nucleotide sequences for these species in the GenBank (2772 sequences); providing a significant amount of new contributions for different species and markers at European, peninsular or the Basque Country level.
3. The mitochondrial *loci* cytochrome b (Cyt-b, 307 bp) and the adjacent region of the 3'- COI barcode end (COI, 616 bp) are useful tools for Diptera diagnosis, and exhibit a greater discrimination power, in the most complex species, than the standard *locus* (COI barcode) for insect identification
4. The studied mitochondrial *loci* shown limitations in their diagnostic ability when dealing with closely related species, which may increase the risk of misidentifications.
5. The second internal transcribed spacer (ITS2, 310-352 bp) of nuclear ribosomal DNA (rDNA) enables clear differentiations, even between sister species, being promising for molecular diagnosis in medico-legal and veterinary entomology.

VIII. General conclusions

6. The second internal transcribed spacer (ITS2, 310-352 bp) of nuclear ribosomal DNA (rDNA) has demonstrated to be a suitable marker for blowfly species identification using high-resolution melting (HRM) analysis.
7. Some myiasis-causing Diptera species, such as the obligate parasite *Hypoderma bovis*, or facultative parasites *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *Lucilia caesar* and *Lucilia illustris*, were found in infestations of Basque Country animals.
8. *Musca autumnalis* has been recorded for the first time in association with myiasis in cattle. Additionally, it is confirmed the presence of this species in the South of the Basque Country, extending its known distribution area from the Atlantic watershed, with an oceanic climate, to the transition zone, with sub-mediterranean climate
9. The presence of *Lucilia bufonivora* (obligate parasite of amphibians) in the Basque Country has been confirmed. To the date, there were no reliable records about this species in this place.
10. The host DNA (food source) contained in the digestive tract of immature necrophagous insects is suitable to identify the cadaver either at species level, using the mtDNA region Cyt-b (307 bp), or at individual, with STR profiles (Mentype® Nonaplex^{QS}, AmpFℓSTR® NGM™ or AmpFℓSTR® MiniFiler™).
11. The standard guidelines and the registration form for entomological material collection (Spanish/Basque), following international standards, will ensure the reliability and validity of evidence in forensic investigations, being a reference in training to the secondment staff to related Official Entities, mainly in the Basque Country.

IX. Bibliografía / References

- Acuña-Morena Y, Cortés-Bernal D, Vargas M, Segura NA & Bello-García F. Caracterización citogenética de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae), CEPA Bogotá, Colombia. *Revista Ciencias de la Salud*, 2011, 9: 111-124.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM & Venter JC. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2000, 287: 2185-2195.
- Adams ZJ & Hall MJ. Methods used for the killing and preservation of blowfly larvae, and their effect on *post-mortem* larval length. *Forensic Science International*, 2003, 138: 50-61.
- Agrawal UR, Bajpai N, Kurahashi H & Tewari RR. Metaphase karyotypes of four species of Calliphoridae (Diptera). *Chromosome Science*, 2010, 13: 49-52.
- Ahmadian A, Ehn M & Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 363: 83-94.
- Ahvenniemi P, Wolf M, Lehtonen MJ, Wilson P, German-Kinnari M & Valkonen JP. Evolutionary diversification indicated by compensatory base changes in ITS2 secondary structures in a complex fungal species, *Rhizoctonia solani*. *Journal of Molecular Evolution*, 2009, 69:150-163.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson JD. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. Barcelona, 1996.
- Alcaide M, Reina D, Sánchez J, Frontera E & Navarrete I. Seasonal variations in the larval burden distribution of *Oestrus ovis* in sheep in the Southwest of Spain. *Veterinary Parasitology*, 2003, 118: 235-241.
- Alessandrini F, Mazzanti M, Onofri V, Turchi C & Tagliabracci A. mtDNA analysis for genetic identification of forensically important insects. *Forensic Science International: Genetics*, 2008, 1: 584-585.
- Alquezar DE, Hemmerter S, Cooper RD & Beebe NW. Incomplete concerted evolution and reproductive isolation at the rDNA locus uncovers nine cryptic species within *Anopheles longirostris* from Papua New Guinea. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10: 392-404.
- Álvarez I & Wendel JF. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29: 417-434.
- Álvarez M, Juusola J & Ballantyne J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Analytical Biochemistry*, 2004, 335: 289-298.
- Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN & Hall MJ. Best practice in forensic entomology: standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine*, 2007, 121: 90-104.

IX. Bibliografía / References

- Amendt J, Krettek R & Zehner R. Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, 2004, 91: 51-65.
- Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R & Hall MJ. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 2011, 7: 379-392.
- Ames C, Turner B & Daniel B. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species: *Calliphora vicina* and *C. vomitoria*. *Forensic Science International*, 2006, 164: 179-182.
- Anderson GS. The use of insects to determine time of decapitation: a case-study from British Columbia. *Journal of Forensic Sciences*, 1997, 42: 947-950.
- Anderson GS & Huitson NR. Myiasis in pet animals in British Columbia: the potential of forensic entomology for determining duration of possible neglect. *The Canadian Veterinary Journal*, 2004, 45: 993-998.
- Anderson JR. Oestrid myiasis of humans. Colwell DD, Hall MJ & Scholl PJ (eds.). *The Oestrid Flies: Biology, Host-parasite Relationships, Impact and Management*. CABI Publishing, Oxford, 2006.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R & Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290: 457-563.
- Andreasson H, Asp A, Alderborn A, Gyllensten U & Allen M. Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology. *Biotechniques*, 2002, 32:124-126.
- Anstead CA, Batterham P, Korhonen PK, Young ND, Hall RS, Bowles VM, Richards S, Scott MJ & Gasser RB. A blow to the fly: *Lucilia cuprina* draft genome and transcriptome to support advances in biology and biotechnology. *Biotechnology advances*, 2016, 34: 605-620.
- Arbeitman MN, Furlong EE, Imam F, Johnson E, Null BH, Baker BS, Krasnow MA, Scott MP, Davis RW & White KP. Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2002, 297: 2270-2275.
- Arnaldos MI, García MD, Romera E, Presa JJ & Luna A. Estimation of *post-mortem* interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Science International*, 2005, 149: 57-65.
- Arnaldos MI, Luna A, Presa JJ, López-Gallego E & García MD. Entomología forense en España: hacia una buena práctica profesional. *Ciencia Forense*, 2006, 8: 17-38.
- Arnaldos MI, Romera E, García MD & Luna A. An initial study on the succession of sarcosaprophagous Diptera (Insecta) on carrion in the Southeastern Iberian Peninsula. *International Journal of Legal Medicine*, 2001, 114: 156-162.
- Ash N & Greenberg B. Developmental temperature responses of the sibling species *Phaenicia sericata* and *P. pallescens* (= *cuprina*). *Annals of the Entomological Society of America*, 1975, 68: 197-200.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC. Intra-specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1987, 18: 489-522.
- Avise JC, Giblin-Davidson C, Laerm J, Patton JC & Lansman RA. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76: 6694-6698.
- Ballard JWO & Whitlock MC. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 2004, 13: 729-744.
- Bastos-Silveira C, Santos SM, Monarca R, Mathias Mda L & Heckel G. Deep mitochondrial introgression and hybridization among ecologically divergent vole species. *Molecular Ecology*, 2012, 21: 5309-5323.
- Bataille M, Crainic K, Leterreux M, Duringon M & de Mazancourt P. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Science International*, 1999, 99: 165-170.
- Baudry E, Bartos J, Emerson K, Whitworth T & Werren JH. *Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. *Molecular Ecology*, 2003, 12: 1843-1854.

- Bedo DG. Cytological characterization of heterochromatin in mitotic and meiotic chromosomes of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *Genome*, 1991, 34: 631-637.
- Bellis C, Ashton KJ, Freney L, Blair B & Griffiths LR. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Science International*, 2003, 134: 99-108.
- Benecke M. A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International*, 2001, 120: 2-14.
- Benecke M, Josephi E & Z Weihoff R. Neglect of the elderly: forensic entomology cases and considerations. *Forensic Science International*, 2004, 146 Suppl: 195-199.
- Benecke M & Lessig R. Child neglect and forensic entomology. *Forensic Science International*, 2001, 120: 155-159.
- Benecke M & Wells JD. DNA techniques for forensic entomology. Byrd JH & Castner JL (eds.). *Forensic Entomology: the Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, 2001.
- Bernasconi MV, Pawlowski J, Valsangiacomo C, Piffaretti JC & Ward PI. Phylogeny of the Scathophagidae (Diptera: Calypttratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 16: 308-315.
- Bishop DM. Variations in numbers of occipital setae for two species of *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae) in New Zealand. *New Zealand Entomologist*, 1991, 14: 28-31.
- Bishop DM. Subspecies of the Australian green blowfly (*Lucilia cuprina*) recorded in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 1995, 43: 164-165.
- Blair JE & Hedges SB. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22: 2275-2284.
- Boakye DA, Tang J, Truc P, Merriweather A & Unnasch TR. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome b heteroduplex analysis. *Medical and Veterinary Entomology*, 1999, 13: 282-287.
- Boehme P, Amendt J, Disney RH & Zehner R. Molecular identification of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. *International Journal of Legal Medicine*, 2010, 124: 577-581.
- Boehme P, Amendt J & Zehner R. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. *Parasitology Research*, 2012, 110: 2325-2332.
- Bolek MG & Coggins JR. Observations on myiasis by the calliphorid, *Bufo lucilia silvarum*, in the Eastern American toad (*Bufo americanus americanus*) from Southeastern Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases*, 2002, 38: 598-603.
- Boore JL, Collins TM, Stanton D, Daehler LL & Brown WM. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature*, 1995, 376: 163-165.
- Boulard C, Alvinerie M, Argente G, Languille J, Paget L & Petit E. A successful, sustainable and low cost control-programme for bovine hypodermosis in France. *Veterinary Parasitology*, 2008, 158: 1-10.
- Bowman DD. *Georgis Parasitología para Veterinarios*. Elsevier. Madrid, 2004.
- Boyes JW & Shewell GE. Cytotaxonomy of Calliphoridae (Diptera). *Genetica*, 1975, 45: 435-488.
- Boyes JW & Wilkes A. Somatic chromosomes of higher Diptera: I. Differentiation of tachinid parasites. *Canadian Journal of Zoology*, 1953, 31: 125-165.
- Braack LEO. Community dynamics of carrion-attendant arthropods in tropical African woodland. *Oecologia*, 1987, 72: 402-409.
- Braga MV, Pinto ZT, de Carvalho Queiroz MM, Matsumoto N & Blomquist GJ. Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: puparial cases from Sarcophagidae. *Acta Tropica*, 2013, 128: 479-485.
- Branicki W, Kupiec T & Pawlowski R. Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of Forensic Sciences*, 2003, 48: 83-87.
- Bridge PD, Roberts PJ, Spooner BM & Panchal G. On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist*, 2003, 160: 43-48.

IX. Bibliografía / References

- Brikmann A. Blowfly myiasis of sheep in Norway. *Norwegian Journal of Zoology*, 1976, 24: 325-330.
- Brown WM, George M & Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76: 1967-1971.
- Brown WM, Prager EM, Wang A & Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 1982, 18: 225-239.
- Brown WM & Wright JW. Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of partenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). *Science*, 1979, 203: 1247-1249.
- Brumpt E. Recherches expérimentales sur la biologie de la *Lucilia bufonivora*. *Annales de Parasitologie Humaine et comparée*, 1934, 12: 81-97.
- Buckler ES, Ippolito A & Holtsford TP. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics*, 1997, 145: 821-832.
- Buddhakosai W, Sukmak M, Klinsawat W, Duangchantrasiri S, Simcharoen A, Siriaronrat B & Wajjwalku W. Discrimination of tiger using a novel high-resolution melting (HRM) and multiplex SNP-specific HRM (MSS-HRM) technique. *Forensic Science International: Genetics*, 2014, 13: 30-33.
- Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology and Technology Behind STR Markers*. Elsevier Academic Press. London, 2001.
- Butler JM. *Advances Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Elsevier Academic Press. San Diego, 2012.
- Byrd JH, Lord WD, Wallace JR & Tomberlin JK. Collection of entomological evidence during legal investigations. Byrd JH & Castner JL (eds.). *Forensic Entomology: the Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, 2010.
- Byrd JH & Tomberlin JK. Laboratory rearing of forensic insects. Byrd JH & Castner JL (eds.). *Forensic Entomology: the Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, 2001.
- Cainé LM, Real FC, Lima G, Pontes L, Abrantes D & Pinheiro MF. Genetic identification of forensically important Calliphoridae in Portugal. *International Congress Series*, 2006, 1288: 846-848.
- Cainé LM, Real FC, Saloña-Bordas MI, M de Pancorbo M, Lima G, Magalhaes T & Pinheiro F. DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. *Forensic Science International*, 2009, 184: 21-23.
- Calero-Bernal R & Habela MA. First report of *Cephenemyia stimulator* (Diptera: Oestridae) parasitizing Roe deer (*Capreolus capreolus*) in Extremadura (Spain). *Galemys*, 2013, 25: 29-34.
- Cameron SL & Whiting MF. Mitochondrial genomic comparisons of the subterranean termites from the Genus *Reticulitermes* (Insecta: Isoptera: Rhinotermitidae). *Genome: National Research Council Canada*, 2007, 50: 188-202.
- Cameron SL & Whiting MF. The complete mitochondrial genome of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, (Insecta: Lepidoptera: Sphingidae), and an examination of mitochondrial gene variability within butterflies and moths. *Gene*, 2008, 408: 112-123.
- Campobasso CP & Introna F. The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. *Forensic Science International*, 2001, 120: 132-139.
- Campobasso CP, Linville JG, Wells JD & Introna F. Forensic genetic analysis of insect gut contents. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 2005, 26: 161-165.
- Cantatore P & Saccone C. Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. *International Review of Cytology*, 1987, 108: 149-208.
- Carlson DA & Brenner RJ. Hydrocarbon-based discrimination of three North American *Blattella* cockroach species (Orthoptera: Blattellidae) using gas chromatography. *Annals of the Entomological Society of America*, 1988, 81: 711-723.

- Carvalho F, Dadour IR, Groth DM & Harvey ML. Isolation and detection of ingested DNA from the immature stages of *Calliphora dubia* (Diptera: Calliphoridae): a forensically important blowfly. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 2005, 1: 261-265.
- Carvalho LM, Thyssen PJ, Linhares AX & Palhanes FA. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2000, 95: 135-138.
- Castillo-Miralbés M. Estudio de la entomofauna asociada a cadáveres en el Alto Aragón (España). *Monografías de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 2002, 6: 1-94.
- Caterino MS, Cho S & Sperling FA. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology*, 2000, 45: 1-54.
- Catts EP & Goff ML. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, 1992, 37: 253-272.
- Catts EP & Haskell NH. *Entomology and Death: a Procedural Guide*. Joyce's Print Shop. Clemson, 1990.
- Catts EP & Mullen GR. Myiasis (Muscoidea and Oestroidea). Mullen GR & Durden LA (eds.). *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier Academic Press, San Diego, 2002.
- Charabidze D. La biologie des insectes nécrophages et leur utilisation pour dater le décès en entomologie médico-légale. *Annales de la Société entomologique de France*, 2012, 48: 239-252.
- Charabidze D, Bourel B & Gosset D. Larval-mass effect: characterization of heat emission by necrophagous blowflies (Diptera: Calliphoridae) larval aggregates. *Forensic Science International*, 2011, 211: 61-66.
- Charles JP. The regulation of expression of insect cuticle protein genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40: 205-213.
- Charlesworth B, Conye JA & Barton NH. The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *The American Naturalist*, 1987, 130: 113-146.
- Chen WY, Hung TH & Shiao SF. Molecular identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *Journal of Medical Entomology*, 2004, 41: 47-57.
- Childress D. Polytene chromosomes and linkage group-chromosome correlations in the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Chromosoma*, 1969, 26: 208-214.
- Clarke KJ. Myiasis (fly disease) and insectal disease generally are causing mental illness. *Medical Hypotheses*, 2013, 81: 360-365.
- Clary DO & Wolstenholme DR. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 1985, 22: 252-271.
- Clayton DA. Structure and function of the mitochondrial genome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1992, 15: 439-447.
- Clerly JM. Stability of prostate specific antigen (PSA), and subsequent Y-STR typing, of *Lucilia (Phaenicia) sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) maggots reared from a simulated *post-mortem* sexual assault. *Forensic Science International*, 2001, 120: 72-76.
- Cognato AI & Sperling FA. Phylogeny of *ips* De Geer species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 14: 445-460.
- Coleman AW. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 2003, 19: 370-375.
- Coleman AW. Is there a molecular key to the level of biological species in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 50: 197-203.
- Collwel DD, Hall MJ & Scholl PJ. *The Oestrid Flies: Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management*. CABI publishing. Oxford, 2006.

IX. Bibliografía / References

- Cordero del Campillo M. Ensayos con “Neguvón” y “Trolene” sobre ganado vacuno. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, 1962, 8: 11-37.
- Coulson RM, Curtis CF, Ready PD, Hill N & Smith DF. Amplification and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. *Medical and Veterinary Entomology*, 1990, 4: 357-366.
- Curic G, Hercog R, Vrselja Z & Wagner J. Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae). *Forensic Science International: Genetics*, 2014, 8: 109-112.
- Dadour IR, Cook DF, Fissioli JN & Bailey WJ. Forensic entomology: application, education and research in Western Australia. *Forensic Science International*, 2001, 120: 48-52.
- Damgaard J, Andersen NM, Cheng L & Sperling FA. Phylogeny of sea skaters, *Halobates* Eschscholtz (Hemiptera: Gerridae), based on mtDNA sequence and morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2000, 130: 511-526.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R & Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 2012, 9: 772.
- Davies L. Seasonal and spatial changes in blowfly production from small and large carcasses at Durham in lowland Northeast England. *Medical and Veterinary Entomology*, 1999, 13: 245-251.
- Dawney N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR & Thorpe RS. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International*, 2007, 173: 1-6.
- Dayrat B. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2005, 85: 407-415.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J & Moritz RF. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 1733-1742.
- DeBry RW, Timm A, Dahlem GA & Stamper T. mtDNA-based identification of *Lucilia cuprina* (Wiedemann) and *L. sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) in the continental United States. *Forensic Science International*, 2010, 202: 102-109.
- DeBry RW, Timm A, Wong ES, Stamper T, Cookman C & Dahlem GA. DNA-based identification of forensically important *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae) in the continental United States. *Journal of Forensic Sciences*, 2013, 58: 73-78.
- Decat E, Van Mechelen E, Saerens B, Vermeulen SJ, Boekhout T, De Blaiser S, Vaneechoutte M & Deschaght P. Rapid and accurate identification of isolates of *Candida* species by melting peak and melting curve analysis of the internally transcribed spacer region 2 fragment (ITS2-MCA). *Research in Microbiology*, 2013, 164: 110-117.
- Degnan JH & Rosenberg NA. Gene tree discordance, phylogenetic inference and multispecies coalescent. *Trends in Ecology & Evolution*, 2009, 24: 332-340.
- Derraik JG, Heath AC & Rademaker M. Human myiasis in New Zealand: imported and indigenously-acquired cases: the species of concern and clinical aspects. *The New Zealand Medical Journal*, 2010, 123: 21-38.
- DeSalle R, Freedman T, Prager EM & Wilson AC. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, 1987, 26: 157-164.
- Desmyter S & Gosselin M. COI sequence variability between Chrysomyinae of forensic interest. *Forensic Science International: Genetics*, 2009, 3: 89-95.
- Devos KM & Gale MD. Genome relationships: the grass model in current research. *Plant Cell*, 2000, 12: 637-646.
- Di Luise E, Magni P, Staiti N, Spitaleri S & Romano C. Genotyping of human nuclear DNA recovered from the gut of fly larvae. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2008, 1: 591-592.
- Díaz B, Gosá A & Saloña-Bordas MI. Confirmación de la presencia de *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876 (Diptera: Calliphoridae) en la Península Ibérica. *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 2012, 36: 433-438.
- Díez de Salazar A, Gosá A, Rubio X & Díaz B. *Lucilia bufonivora*, díptero parásito de anuros, en la Selva de Irati (Navarra). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 2012, 23: 27-29.

- Dogra SS & Mahajan VK. Oral myiasis caused by *Musca domestica* larvae in a child. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2010, 5: 105-107.
- Donovan SE, Hall MJ, Turner B & Moncrieff CB. Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures. *Medical and Veterinary Entomology*, 2006, 20: 106-114.
- Dowton M. Assessing the relative rate of (mitochondrial) genomic change. *Genetics*, 2004, 167: 1027-1030.
- Drijfhout FP. Cuticular hydrocarbons: a new tool in forensic entomology? Amendt J, Campobasso CP, Goff ML & Grassberger M (eds.). *Current Concepts in Forensic Entomology*. Springer, London, 2010.
- Durando CM, Baker RH, Etges WJ, Heed WB, Wasserman M & DeSalle R. Phylogenetic analysis of the *repleta* species group of the genus *Drosophila* using multiple sources of characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 16: 296-307.
- Eberhardt TL & Elliot DA. A preliminary investigation of insect colonization and succession on remains in New Zealand. *Forensic Science International*, 2008, 176: 217-223.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: 1792-1797.
- Egri B, Sárközy P & Bánhidly G. Prevalence of botfly larvae and lice in studs of North Caucasus (Stawropol Country, Russia). *Acta Veterinaria Hungarica*, 1995, 43: 287-289.
- Elena S, Alessandro A, Ignazio C, Sharon W, Luigi R & Andrea B. Revealing the challenges of low template DNA analysis with the prototype Ion AmpliSeq™ Identity panel v2.3 on the PGM™ Sequencer. *Forensic Science International: Genetics*, 2016, 22: 25-36.
- Erpenbeck D, Hooper JNA & Wörheide G. COI Phylogenies in diploblasts and the Barcoding of Life: are we sequencing a suboptimal partition? *Molecular Ecology Notes*, 2005, 6: 550-553.
- Erzinclioglu YZ. The origin of parasitism in blowflies. *British Journal of Entomology and Natural History*, 1989, 2: 125-128.
- Everaerts CI, Farine JP & Brossut R. Changes of species specific cuticular hydrocarbon profiles in the cockroaches *Nauphoeta cinerea* and *Leucophaea maderae* reared in heterospecific groups. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1997, 85: 145-150.
- Fischer OA. Blowflies of the genera *Calliphora*, *Lucilia* and *Protophormia* (Diptera: Calliphoridae) in South-Moravian urban and rural areas with respect to *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876. *Acta Veterinaria Brno*, 2000, 69: 225-231.
- Fleischmann W, Grassberger M & Sherman R. *Maggot Therapy: a Handbook of Maggot-Assisted Wound Healing*. Thieme. Stuttgart, 2004.
- Fleming RI & Harbison S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Science International: Genetics*, 2010, 4: 244-256.
- Florin A-B & Gyllenstrand N. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the blowflies *Lucilia illustris* and *L. sericata*. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2: 113-116.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3: 294-299.
- Franza R, Leo L, Minerva T & Sanapo F. Myiasis of the tracheostomy wound: case report. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 2006, 26: 222-224.
- Frederickx C, Dekeirsschietter J, Brostaux Y, Wathélet JP, Verheggen FJ & Haubruge E. Volatile organic compounds released by blowfly larvae and pupae: new perspectives in forensic entomology. *Forensic Science International*, 2012, 219: 215-220.
- Fremdt H & Amendt J. Species composition of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) and flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) through space and time. *Forensic Science International*, 2014, 236: 1-9.

IX. Bibliografía / References

- Fremdt H, Szpila K, Huijbregts J, Lindström A, Zehner R & Amendt J. *Lucilia silvarum* Meigen, 1826 (Diptera: Calliphoridae): a new species of interest for forensic entomology in Europe. *Forensic Science International*, 2012, 222: 335-339.
- Funk DJ & Omland KE. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2003, 34: 397-423.
- Gállego-Berenguer JG. *Manual de Parasitología: Morfología y Biología de los Parásitos de Interés Sanitario*. Edicions Universitat de Barcelona. Barcelona, 2007.
- Galtier N, Gouy M & Gautier C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, 12: 543-548.
- Gamarrá D, López-Oceja A, Jiménez-Moreno S & M de Pancorbo M. Forensic efficacy of twelve STRs in Spanish cattle. *Forensic Science International: Genetics Supplementary Series*, 2015, 5: 253-255.
- Ganopoulos I, Madesis P, Zambounis A & Tsaftaris A. High-resolution melting analysis allowed fast and accurate closed-tube genotyping of *Fusarium oxysporum* formae speciales complex. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 334: 16-21.
- García CA, Ahmadian A, Gharizadeh B, Lundeberg J, Ronaghi M & Nyrén P. Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor supresor gene. *Gene*, 2000, 253: 249-257.
- García-Rojo AM. Estudio de la sucesión de insectos en cadáveres en Alcalá de Henares (Comunidad Autónoma de Madrid) utilizando cerdos domésticos como modelos animales. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 2004, 34: 263-269.
- Gariepy TD, Lindsay R, Ogden N & Gregory TR. Identifying the last supper: utility of the DNA barcode library for bloodmeal identification in ticks. *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12: 646-652.
- Gennard D. *Forensic Entomology: an Introduction*. Wiley-Blackwell. Oxford, 2012.
- Giangaspero A, Traversa D, Trentini R, Scala A & Otranto D. Traumatic myiasis by *Wohlfahrtia magnifica* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 2011, 175: 109-112.
- GilArriortua M, M de Pancorbo M & Saloña-Bordas MI. Confirmación de la presencia de *Lucilia bufonivora* (Diptera: Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco (norte de España). *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 2014a, 38: 25-31.
- GilArriortua M, M de Pancorbo M & Saloña-Bordas MI. First record of *Musca autumnalis* De Geer, 1776 (Diptera: Muscidae) species involved in a myiasis case in the Basque Country cattle (Iberian Peninsula). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 2014b, 55: 312-316.
- GilArriortua M, Saloña-Bordas MI, Cainé LM, Pinheiro F & M de Pancorbo M. Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 2013, 228: 132-136.
- GilArriortua M, Saloña-Bordas MI, Cainé LM, Pinheiro F & M de Pancorbo M. Mitochondrial and nuclear DNA approaches for reliable identification of *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae) species of forensic interest from Southern Europe. *Forensic Science International*, 2015, 257: 393-397.
- GilArriortua M, Saloña-Bordas MI, Köhnmann S, Pfeiffer H & M de Pancorbo M. Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera: Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers. *Forensic Science International*, 2014c, 242: 274-282.
- Gisbert-Calabuig JA. *Medicina Legal y Toxicología*. Masson-Salvat Medicina. Barcelona, 1991.
- González-Mora D. Los Calliphoridae de España II: Calliphorini (Diptera). *Eos*, 1989, 65: 39-59.
- González-Mora D & Peris SV. Los Calliphoridae de España I: Rhiniinae y Chrysomyinae (Diptera). *Eos*, 1988, 64: 91-139.

- Gosá A, Rubio X, Etxaniz M, Luengo A, García-Cardenete L & Océn M. Probables casos de parasitismo de *Lucilia bufonivora* (Diptera: Calliphoridae) en anuros del norte ibérico. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 2009, 20: 112-117.
- Gosselin M, Di Frazio V, Wille SM, Fernández Mdel M, Samyn N, Bourel B & Rasmont P. Methadone determination in puparia and its effect on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 2011, 209: 154-159.
- Grassberger M & Frank C. Initial study of arthropod succession on pig carrion in a Central European urban habitat. *Journal of Medical Entomology*, 2004, 41: 511-523.
- Grassberger M & Reiter C. Effect of temperature on development of the forensically important Holarctic blowfly *Protophormia terranova* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 2002, 128: 177-182.
- Greenberg B. Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*, 1991, 28: 565-577.
- Greenberg B & Kunich JC. Problems estimating time of death. Greenberg B & Kunich JC (eds.). *Entomology and the Law: Flies as Forensic Indicators*. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- Greenberg B & Singh D. Species identification of calliphorid (Diptera) eggs. *Journal of Medical Entomology*, 1995, 32: 21-26.
- Gunning KMC, McIntyre EE, Wike CM, Chansky KM, Johnston BF, Bourey JM, Wheaton AM & Brown CL. *ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer: Further Advances to Expand Productivity*. Applied Biosystems Document#105549. 2006.
- Gyllestein U, Wharton D, Josefsson A & Wilson AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 1991, 352: 255-257.
- Haag-Liautard C, Coffey N, Houle D, Lynch M, Charlesworth B & Keightley PD. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, 2008, 6: 204.
- Haas C, Klessner B, Maake C, Bär W & Kratzer A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and real-time PCR. *Forensic Science International: Genetics*, 2009, 3: 80-88.
- Hall DG. *The blowflies of North America*. Thomas Say Foundation. Lafayette. Indiana, 1948.
- Hall MJ. Traumatic myiasis of sheep in Europe: a review. *Parassitologia*, 1997, 39: 409-413.
- Hall MJ & Wall R. Myiasis of humans and domestic animals. *Advances in Parasitology*, 1995, 35: 257-334.
- Hall MJ, Wall R & Stevens J. Traumatic myiasis: a neglected disease in a changing world. *Annual Review of Entomology*, 2016, 61: 159-176.
- Hall MJ & Wyatt NP. Confirmation of the presence of *Lucilia cuprina* in the Zaragoza region of Spain and identification of other agents of wound myiasis. Report prepared for the Ministry of Education and Science, Spain and the British Council, UK, 1996.
- Hall RD. Medicocriminal entomology. Catts EP & Haskell NH (eds.). *Entomology and Death: a Procedural Guide*. Joyce's Print Shop, Clemson, 1990.
- Hall RD, Anderson PC & Clark DP. A case of human myiasis caused by *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) in Missouri, USA. *Journal of Medical Entomology*, 1986, 23:587-579.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98.
- Han HY & McPherson BA. Phylogenetic study of selected tephritid flies (Insecta: Diptera: Tephritidae) using partial sequences of the nuclear 18S ribosomal DNA. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1994, 22: 447-457.
- Hand HY & Ro KE. Molecular phylogeny of the superfamily Tephritoidea (Insecta: Diptera): new evidence from the mitochondrial 12S, 16S, and COII genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 34: 416-430.

IX. Bibliografía / References

- Harris DJ. Can you bank on GenBank? *Trends in Ecology & Evolution*, 2003, 18: 317-319.
- Harrison RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 1989, 4: 6-11.
- Hartl DL & Lozovskaya ER. Genome evolution: between the nucleosome and the chromosome. Schierwater B, Streit B, Wagner GP & DeSalle R (eds.). *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Birkhäuser Verlag, Basel, 1994.
- Hartl DL & Lozovskaya ER. *The Drosophila Genome Map: a Practical Guide*. RG Landes Company. Austin, 1995.
- Harvey ML, Dadour IR & Gaudieri S. 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*, 2003a, 131: 134-139.
- Harvey ML, Gaudieri S, Villet MH & Dadour IR. A global study of forensically significant calliphorids: implications for identification. *Forensic Science International*, 2008, 177: 66-76.
- Harvey ML, Mansell MW, Villet MH & Dadour IR. Molecular identification of some forensically important blowflies of Southern Africa and Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, 2003b, 17: 363-369.
- Haskell NH, Lord WD & Byrd JH. Collection of entomological evidence during death investigations. Byrd JH & Castner JL (eds.), *Forensic Entomology: the Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, 2001.
- Heath AC & Bishop DM. Flystrike in New Zealand: An overview based on 16-year study, following the introduction and dispersal of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae). *Veterinary Parasitology*, 2006, 137: 333-344.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL & deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences*, 2003, 270: 313-321.
- Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS & Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2004, 2: 1657-1663.
- Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT & Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clinical Chemistry*, 2007, 53: 1544-1548.
- Hershkovitz MA, Zimmer EA & Hahn WJ. Ribosomal DNA sequences and Angiosperm systematics. Hollingsworth PM, Bateman RM & Gornall RJ (eds.). *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, London, 1999.
- Hillis DM & Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 1991, 66: 411-453.
- Hoff-Olsen P, Jacobsen S, Mevag B & Olaisen B. Microsatellite stability in human *post-mortem* tissues. *Forensic Science International*, 2001, 119: 273-278.
- Holecova M, Rozek M, Maryanska-Nadachowska A & Jánosková V. Karyotype of the bird blowfly, *Protocalliphora falcozi* Séguy, 1928 (Diptera: Calliphoridae). *Folia Biologica*, 2012, 60: 129-133.
- Holloway BA. Morphological characters to identify adult *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) and *L. cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae). *New Zealand Journal of Zoology*, 1991, 18: 415-420.
- Horne GL & Priestman AA. The chemical characterization of the epicuticular hydrocarbons of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 2002, 92: 287-294.
- Hornok S, Földvari G, Elek V, Naranjo V, Farkas R & Fuente J. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 2008, 154: 354-359.
- Huijbregts H. Nederlandse bromvliegen (Diptera: Calliphoridae). *Entomologische Berichten*, 2002, 62: 82-89.
- Hunter RL & Markert CL. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 1957, 125: 1294-1295.

- Hwang C & Turner B. Spatial and temporal variability of necrophagous Diptera from urban to rural areas. *Medical and Veterinary Entomology*, 2005, 19: 379-391.
- Ibrayev B, Lider L & Bauer C. *Gasterophilus* spp. infections in horses from Northern and Central Kazakhstan. *Veterinary Parasitology*, 2015, 207: 94-98.
- IHGSC: International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409: 860-921.
- Introna F, Campobasso CP & Goff ML. Entomotoxicology. *Forensic Science International*, 2001, 120: 42-47.
- Ives AR. Aggregation and the coexistence of competitors. *Annales Zoologici Fennici*, 1988, 25: 75-88.
- Jaakola L, Suokas M & Häggman H. Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. *Food Chemistry*, 2010, 123: 494-500.
- Ji YJ, Zhang DX, Hewitt GM, Kang L & Li DM. Polymorphic microsatellite *loci* for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3: 102-104.
- Johnsen A, Rindal E, Ericson PGP, Zuccon D, Kerr KCR, Stoeckle MY & Lifjeld JT. DNA barcoding of Scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-Atlantic species. *Journal of Ornithology*, 2010, 151: 565-578.
- Johnson FM & Bealle S. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. V. Ejaculatory bulb esterases in *Drosophila* phylogeny. *Biochemical Genetics*, 1968, 2: 1-18.
- Joly S, McLenachan PA & Lockhart PJ. A statistical approach for distinguishing hybridization and incomplete lineage sorting. *The American Naturalist*, 2009, 174: 54-70.
- Jordaens K, Sonet G, Braet Y, De Meyer M, Backeljau T, Goovaerts F, Bourguignon L & Desmyter S. DNA barcoding and the differentiation between North American and West European *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae: Chrysomyinae). *Zookeys*, 2013a, 365: 149-174.
- Jordaens K, Sonet G, Richet R, Dupont E, Braet Y & Desmyter S. Identification of forensically important *Sarcophaga* species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene. *International Journal of Legal Medicine*. 2013b, 127: 491-504.
- Juusola J & Ballantyne J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Science International*, 2003, 135: 85-96.
- Juusola J & Ballantyne J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *Journal of Forensic Sciences*, 2007, 52: 1252-1262.
- Kaatsch HJ, Stadler M & Nietert M. Photometric measurement of color changes in livor mortis as a function of pressure and time. Development of a computer-aided system for measuring pressure-induced blanching of livor mortis to estimate time of death. *International Journal of Legal Medicine*, 1993, 106: 91-97.
- Kaliszan M. Studies on time of death estimation in the early *post-mortem* period: application of a method based on eyeball temperature measurement to human bodies. *Legal Medicine*, 2013, 15: 278-282.
- Kaneshrajah G & Turner B. *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. *International Journal of Legal Medicine*, 2004, 118: 242-244.
- Kang D & Sim C. Identification of *Culex* complex species using SNP markers based on high-resolution melting analysis. *Molecular Ecology Resources*, 2013, 13: 369-376.
- Keneuke W. Über die spermatogenese einiger Dipteren. *Z. Zellenlehre*, 1924, 1: 357-412.
- Kettle DS. *Medical and Veterinary Entomology*. CABI Publishing, Cambridge, 1995.
- Kirkpatrick NC, Blacker HP, Woods WG, Gasser RB & Noormohammadi AH. A polymerase chain reaction-coupled high-resolution melting curve analytical approach for the monitoring of monospecificity of avian *Eimeria* species. *Avian Pathology*, 2009, 38: 13-19.

IX. Bibliografía / References

- Klotzbach H, Krettek R, Bratzke H, Püschel K, Zehner R & Amendt J. The history of forensic entomology in German-speaking countries. *Forensic Science International*, 2004, 144: 259-263.
- Köhnemann S & Pfeiffer H. Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. *Forensic Science International: Genetics*, 2011, 5: 216-221.
- Kondakci GO, Bulbul O, Shahzad MS, Polat E, Cakan H, Altuncel H & Filoglu G. STR and SNP analysis of human DNA from *Lucilia sericata* larvae's gut contents. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2009, 2: 178-179.
- Kondo R, Satta Y, Matsuura ET, Ishiwa H, Takahata N & Chigusa SI. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics*, 1990, 126: 657-663.
- Koskela P, Itämies J & Pasanen S. *Lucilia bufonivora* Moniez (Diptera: Calliphoridae), a lethal parasite in *Rana temporaria* L. (Anura). *Annales Zoologici Fennici*, 1974, 11: 105-106.
- Kreike J & Kampfer S. Isolation and characterization of human DNA from mosquitoes (Culicidae). *International Journal of Legal Medicine*, 1999, 112: 380-382.
- Kumar S, Black WC & Rai KS. An estimate of phylogeny relationships among culicine mosquitoes using a restriction map of the rDNA cistron. *Insect Molecular Biology*, 1998, 7: 367-373.
- Kurahashi H & Ohtaki T. Geographic variation in the incidence of pupal diapauses in Asian and Oceanian species of flesh fly *Boettcherisca* (Diptera: Sarcophagidae). *Physiological Entomology*, 1989, 14: 291-298.
- Kutty SN, Pape T, Pont A, Wiegmann BM & Meier R. The Muscoidea (Diptera: Calyptratae) are paraphyletic: evidence from four mitochondrial and four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 49: 639-652.
- Kutty SN, Pape T, Wiegmann BM & Meier R. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Systematic Entomology*, 2010, 35: 614-635.
- Laird CD. DNA of *Drosophila* chromosomes. *Annual Review of Genetics*, 1973, 7: 177-204.
- LaRue B, Gaudreau C, Bagre HO & Charpentier G. Generalized structure and evolution of ITS1 and ITS2 rDNA in black flies (Diptera: Simuliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 53: 749-757.
- Leclercq M. *Entomologie et Médecine Légale. Datation de la Mort*. Masson. Paris, 1978.
- Levan A, Fredga K & Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52: 201-220.
- Levot GW. Resistance and the control of sheep ectoparasites. *International Journal for Parasitology*, 1995, 25: 1355-1362.
- Lewin B. *Genes VI*. Oxford University Press. Oxford, 1997.
- Li X, Cai JF, Guo YD, Xiong F, Zhang L, Feng H, Meng FM, Fu Y, Li JB & Chen YQ. Mitochondrial DNA and STR analyses for human DNA from maggots crop contents: a forensic entomology case from Central-Southern China. *Tropical Biomedicine*, 2011, 28: 333-338.
- Liang D & Silverman J. You are what you eat: diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften*, 2000, 87: 412-416.
- Lin CP & Danforth BN. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 30: 686-702.
- Lin JH, Tseng CP, Chen YJ, Lin CY, Chang SS, Wu HS & Cheng JC. Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic screening for virus variants by high-resolution melting analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46: 1090-1097.
- Linville JG, Hayes J & Wells JD. Mitochondrial DNA and STR analyses of maggot crop contents: effect of specimen preservation technique. *Journal of Forensic Sciences*, 2004, 49: 341-344.

- Linville JG & Wells JD. Surface sterilization of a maggot using bleach does not interfere with mitochondrial DNA analysis of crop contents. *Journal of Forensic Sciences*, 2002, 47: 1055-1059.
- Liu QL, Cai JF, Chang YF, Gu Y, Guo YD, Wang XH, Weng JF, Zhong M, Wang X, Yang L, Wu KL, Lan LM, Wang JF & Cheng YQ. Identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in China by mitochondrial cytochrome oxidase I gene differentiation. *Insect Science*, 2011, 18: 554-564.
- Loaiza JR, Scott ME, Bermingham E, Sanjur OI, Rovira JR, Dutari LC, Linton YM, Bickersmith S & Conn JE. Novel genetic diversity within *Anopheles punctimacula* s.l.: phylogenetic discrepancy between the barcode cytochrome c oxidase I (COI) gene and the rDNA second internal transcribed spacer (ITS2). *Acta Tropica*, 2013, 128: 61-69.
- Lord WD. Case histories of the use of insects in investigations. Catts EP & Haskell NH (eds.). *Entomology and Death: a Procedural Guide*. Joyce's Print Shop, Clemson, 1990.
- Lord WD & Burger JF. Collection and preservation of forensically important entomological materials. *Journal of Forensic Sciences*, 1983, 28: 936-944.
- Lord WD, DiZinno JA, Wilson MR, Budowle B, Taplin D & Meinking TL. Isolation, amplification, and sequencing of human mitochondrial DNA obtained from human crab louse, *Phthirus pubis* (L.), bloodmeals. *Journal of Forensic Sciences*, 1998, 43: 1097-1100.
- Lucientes J. Sobre *Lucilia cuprina* (Diptera) en Los Monegros (Zaragoza). *Sociedad Entomológica Aragonesa*, 1995, 11: 13-14.
- Lundbeck W. *Diptera Danica*. Part VII. Platypezidae, Tachinidae. GEC Gad. Copenhagen, 1927.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM & Hewitt GM. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 1996, 5: 153-165.
- M de Pancorbo M, Castro A, Fernández-Fernández I, Cuevas N, Castillo-Miralbés M & Saloña-Bordas MI. Molecular identification of arthropods by cytochrome b analysis. *International Congress Series*, 2004, 1261: 398-400.
- M de Pancorbo M, Ramos R, Saloña-Bordas MI & Sánchez P. Entomología molecular forense. *Ciencia Forense*, 2006, 8: 107-130.
- Mackerass MJ. Observations on the life-histories, nutritional requirements and fecundity of blowflies. *Bulletin of Entomological Research*, 1933, 24: 353-362.
- MacLeod J. A survey of British sheep blowflies. *Bulletin of Entomological Research*, 1943, 34: 65-88.
- Magaña C. La entomología forense y su aplicación a la medicina legal: data de la muerte. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 2001, 28: 49-79.
- Malewski T, Draber-Monko A, Pomorski J, Los M & Bogdanowicz W. Identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) by high-resolution melting PCR analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 2010, 124: 277-285.
- Malgorn Y & Coquoz R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. *Forensic Science International*, 1999, 102: 111-119.
- Manel S, Gaggiotti OE & Waples RS. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology & Evolution*, 2005, 20: 136-142.
- Manlove JD & Disney RH. The use of *Megaselia abdita* (Diptera: Phoridae) in forensic entomology. *Forensic Science International*, 2008, 175: 83-84.
- Marchetti D, Arena E, Boschi I & Vanin S. Human DNA extraction from empty puparia. *Forensic Science International*, 2013, 229: 26-29.
- Marihno MA, Junqueira AC, Paulo DF, Esposito MC, Villet MH & Azeredo-Espin AM. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2012, 65: 840-854.

IX. Bibliografía / References

- Martínez-Gómez F, Hernández S & Moreno T. Ectoparasitosis II. Hipodermosis. *Bovis (Tratado de medicina veterinaria)*, 1988, 25: 35-86.
- Martínez-Moreno FJ. Estudio inmunológico de la hipodermosis bovina. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba, 1992.
- Martínez-Moreno FJ, Becerra C, Jiménez V, Martínez-Moreno A, Martínez-Cruz S & Hernández S. Prevalencia de la hipodermosis bovina en el valle del Guadalquivir. *Medicina Veterinaria*, 1995, 12: 168-178.
- Martínez-Sánchez A, Magaña C, Toniolo M, Gobbi P & Rojo S. *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae) a new forensic indicator to South-Western Europe. *Ciencia Forense*, 2015, 12: 137-152.
- Martínez-Sánchez A, Rojo S & Marcos-García MA. Annual and spatial activity of dung lies and carrion in a Mediterranean holm-oak pasture ecosystem. *Medical and Veterinary Entomology*, 2000, 14: 56-63.
- Martínez-Sánchez A, Smith KE, Rojo S, Marcos-García MA & Wall R. Geographic origin affects larval competitive ability in European populations of the blowfly, *L. sericata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2007, 122: 93-98.
- Matthew DL & Dobson RC. *Musca autumnalis* (De Geer), a new livestock pest in Indiana. *Proceedings of the Indiana Academy of Science*, 1959, 69: 165-166.
- Mazzanti M, Alessandrini F, Tagliabracci A, Wells JD & Campobasso CP. DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: genetic identification limits in forensic entomology. *Forensic Science International*, 2010, 195: 99-102.
- McDonagh LM & Stevens J. The molecular systematics of blowflies and screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) using 28S rRNA, COI and EF1 α : insights into the evolution of dipteran parasitism. *Parasitology*, 2011, 138: 1760-1777.
- Mégnin P. *La Faune des Cadavres: Application de l'Entomologie à la Médecine Légale*. Encyclopédie scientifique des Aides-mémoires. Masson & Gauthier-Villars. Paris, 1894.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G & Ng PK. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intra-specific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 2006, 55: 715-728.
- Meiklejohn K, Wallman JF & Dowton M. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *International Journal of Legal Medicine*, 2011, 125: 27-32.
- Meiklejohn K, Wallman JF & Dowton M. DNA barcoding identifies all immature life stages of a forensically important flesh fly (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Forensic Sciences*, 2013, 58: 184-187.
- Melic A. Los artrópodos y el hombre. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 1997, 20: 1-468.
- Midgley JM & Villet MH. Effect of the killing method on *post-mortem* change in length of larvae of *Thanatophilus micans* (Fabricius 1794) (Coleoptera: Silphidae) stored in 70% ethanol. *International Journal of Legal Medicine*, 2009, 123: 103-108.
- Miller D. Sheep maggot-fly problem. New Zealand survey 1937-1938. *New Zealand Journal of Science and Technology*, 1939, 21: 240-244.
- Mitchell SL, Wolff BJ, Thacker WL, Ciembor PG, Gregory CR, Everett KD, Ritchie BW & Winchell JM. Genotyping of *Chlamydomphila psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47: 175-181.
- Mittal IC. Diversity and conservation status of dung beetles (Laparosticti: Scarabaeidae: Coleoptera) in North India. *Bulletin of the National Institute of Ecology*, 2005, 15: 43-51.
- Moneo J & Saloña-Bordas MI. Califóridos (Diptera: Calliphoridae) de interés forense recogidos en el entorno universitario del campus de Leioa (Vizcaya, España). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 2007, 40: 479-483.
- Monis PT, Giglio S, Keegan AR & Andrew-Thompson RC. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, 2005, 21: 340-346.

- Monteiro A & Pierce NE. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1alpha gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 18: 264-281.
- Moreno V, Romero-Fernández I, Marchal JA, Beltrán M, Granados JE, Habela MA, Tamadon A, Rakhshandehroo E, Sarasa M, Pérez JM & Sánchez A. Molecular characterization of botflies, *Oestrus* spp., (Diptera: Oestridae), from domestic and wild Bovidae hosts. *Veterinary Parasitology*, 2015, 212: 473-477.
- Moriyama EN & Powell JR. Synonymous substitution rates in *Drosophila*: mitochondrial versus nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution*, 1997, 45: 378-391.
- Morlais I & Severson DW. Complete mitochondrial DNA sequence and amino acid analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) from *Aedes aegypti*. *DNA sequence*, 2002, 13: 123-127.
- Morrondo P, Díez N, López C, Díez P & Panadero R. Estudio inmuno-epidemiológico de la hipodermosis bovina en Galicia. *Producción Animal*, 1999, 143: 31-43.
- Mukabana WR, Takken W, Seda P, Killeen GF, Hawley WA & Knols BG. Extent of digestion affects the success of amplifying human DNA from bloodmeals of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 2002, 92: 233-239.
- Müller T, Philipp N, Dandekar T, Schultz J & Wolf M. Distinguishing species. *RNA*, 2007, 13:1469-1472.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986, 51: 263-273.
- Mumcuoglu KY, Gallili N, Reshef A, Brauner P & Grant H. Use of human lice in forensic entomology. *Journal of Medical Entomology*, 2004, 41: 803-806.
- Nakano A & Honda J. Use of DNA sequences to identify forensically important fly species and their distribution in the coastal region of Central California. *Forensic Science International*, 2015, 253: 1-13.
- Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J & Boursot P. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with expensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity*, 1998, 80: 742-752.
- Nelson LA, Lambkin CL, Batterham P, Wallman JF, Dowton M, Whiting MF, Yeates DK & Cameron SL. Beyond barcoding: a mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Gene*, 2012, 511: 131-142.
- Nelson LA, Wallman JF & Dowton M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 2007, 21: 44-52.
- Nelson LA, Wallman JF & Dowton M. Identification of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). *Forensic Science International*, 2008, 177: 238-247.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH & Kõljalu U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS ONE*, 2006, 1: 59.
- Noreault-Conti TL & Buel E. The use of real-time PCR for forensic stain identification. *Profiles in DNA*, 2007, 10: 3-5.
- Norris KR. Evidence for the multiple exotic origin of Australian populations of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Australian Journal of Zoology*, 1990, 38: 635-648.
- Nuorteva P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. Tedeschi CG, Eckert WG & Tedeschi LG (eds.). *Forensic Medicine: a Study in Trauma and Environmental Hazards*. Saunders Company, Philadelphia, 1977.
- Oliveira AR, Farinha A, Rebelo MT & Dias D. Forensic entomology: molecular identification of blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in Portugal. *Forensic Science International: Genetic Supplement Series*, 2011, 3: 439-440.
- Oliveira MT, Barau JG, Junqueira AC, Feijao PC, Rosa AC, Abreu CF, Azeredo-Espin AM & Lessinger AC. Structure and evolution of the mitochondrial genomes of *Haematobia irritans* and *Stomoxys calcitrans*: the Muscidae (Diptera: Calyptratae) perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 48: 850-857.

IX. Bibliografía / References

- Osakabe M & Sakagami Y. RFLP analysis of ribosomal DNA in sibling species of spider mite, genus *Panonychus* (Acari: Tetranychidae). *Insect Molecular Biology*, 1994, 3: 63-66.
- Otranto D, Milillo P, Capelli G & Colwell DD. Species composition of *Gasterophilus* spp. (Diptera: Oestridae) causing equine gastric myiasis in Southern Italy: parasite biodiversity and risks for extinction. *Veterinary Parasitology*, 2005, 133: 111-118.
- Otranto D & Stevens J. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *International Journal for Parasitology*, 2002, 32: 1345-1360.
- Panadero R, Fernández M, Vázquez L, López C, Dacal V, Cienfuegos S, Díaz P, Morrondo P & Díez-Baños P. Occurrence and larval growth of *Hypoderma lineatum* in the oesophagi of cattle from Northwest Spain: influence of geographical and climatic conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, 2007, 21: 225-230.
- Panadero-Fontán R & Otranto D. Arthropods affecting the human eye. *Veterinary Parasitology*, 2015, 208: 84-93.
- Parise-Maltempi PP & Avancini RM. C-banding and FISH in chromosomes of blowflies *Chrysomya megacephala* and *Ch. putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Memories do Instituto Oswaldo Cruz*, 2001, 96: 371-377.
- Park SH, Zhang Y, Piao H, Yu DH, Jeong HJ, Yoo GY, Chung U, Jo TH & Hwang JJ. Use of cytochrome c oxidase subunit I (COI) nucleotide sequences for identification of the Korean Luciliinae fly species (Diptera: Calliphoridae) in forensic investigations. *Journal of Korean Medical Science*, 2009a, 24: 1058-1063.
- Park SH, Zhang Y, Piao H, Yu DH, Jeong HJ, Yoo GY, Jo TH & Hwang JJ. Sequences of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene are suitable for species identification of Korean Calliphorinae flies of forensic importance (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Forensic Sciences*, 2009b, 54: 1131-1134.
- Parnés A & Lagan KM. Larval therapy in wound management: a review. *International Journal of Clinical Practice*, 2007, 61: 488-493.
- Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M & Steinlechner M. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*, 2000, 114: 23-28.
- Paskewitz SM, Wesson DM & Collins FH. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Insect Molecular Biology*, 1993, 2: 247-257.
- Peña VH, Fernández GJ, Gómez-Palacio AM, Mejía-Jaramillo AM, Cantillo O & Triana-Chávez O. High-resolution melting (HRM) of the cytochrome b gene: a powerful approach to identify bloodmeal sources in chagas disease vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2012, 6: 1530.
- Peralta B, GilArriortua M & Saloña-Bordas MI. Variabilidad espacial y temporal de califóridos (Diptera) necrófagos de interés forense capturados en la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias (CAPA). Estudio preliminar. *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 2013, 37: 301-314.
- Pereira SL. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 2000, 23: 745-752.
- Peris SV & González-Mora D. Los Calliphoridae de España III: Luciliini (Diptera). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 1991, 87: 187-207.
- Petney TN. Ecological implications of control strategies: arthropods of domestic and production animals. *International Journal for Parasitology*, 1997, 27: 155-165.
- Pezzi M, Whitmore D, Chicca M, Lanfredi M & Leis M. Traumatic myiasis caused by association of *Sarcophaga tibialis* (Diptera: Sarcophagidae) and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in a domestic cat in Italy. *The Korean Journal of Parasitology*, 2015, 53: 471-475.
- Phillips A, Sabatini A, Milligan PJM, Boccolini D, Broomfield G & Molyneux DH. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae): comparison of the cuticular hydrocarbon profiles determined in adults of five Palearctic species. *Bulletin of Entomological Research*, 1990, 80: 459-464.
- Phillips C, Fernández-Formoso L, García-Magariños M, Porrás L, Tvedebrink T, Amigo J, Fondevila M, Gómez-Tato A, Álvarez-Dios J, Freire-Aradas A, Gómez-Carballa A, Mosquera-Miguel A, Carracedo A & Lareu MV. Analysis of

- global variability in 15 established and 5 new European standard set (ESS) STRs using the CEPH human genome diversity panel. *Forensic Science International: Genetics*, 2011, 5: 155-169.
- Picard CJ & Wells JD. The population genetic structure of North American *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), and the utility of genetic assignment methods for reconstruction of *post-mortem* corpse relocation. *Forensic Science International*, 2010, 195: 63-67.
- Pietzka AT, Indra A, Stöger A, Zeinzinger J, Konrad M, Hasenberger P, Allerberger F & Ruppitsch W. Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by *rpoB* gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 63: 1121-1127.
- Powell JR. *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: the Drosophila Model*. Oxford University Press. New York, 1997.
- Powell JR, Caccone A, Amato GD & Yoon C. Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83: 9090-9093.
- Prado e Castro C, Serrano A, Martins Da Silva P & García MD. Carrion flies of forensic interest: a study of seasonal community composition and succession in Lisbon, Portugal. *Medical and Veterinary Entomology*, 2012, 26: 417-431.
- Prado e Castro C, Sousa JP, Arnaldos MI, Gaspar J & García MD. Blowflies (Diptera: Calliphoridae) activity in sun exposed and shaded carrion in Portugal. *Annales de la Société entomologique de France*, 2011, 47: 128-139.
- Preativatanyou K, Sirisup N, Payungporn S, Poovorawan Y, Thavara U, Tawatsin A, Sungpradit S & Siriyasatien P. Mitochondrial DNA-based identification of some forensically important blowflies in Thailand. *Forensic Science International*, 2010, 202: 97-101.
- Prieto M, Espi M, García JA & Parra F. Effect of ivermectin treatment on anti-hypodermin c titers of asturiana cattle naturally infected with *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, 1990, 35: 211-218.
- Radvansky J, Bazsalovicsova E, Kralova-Hromadova I, Minarik G & Kadasi L. Development of high-resolution melting (HRM) analysis for population studies of *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), the giant liver fluke of ruminants. *Parasitology Research*, 2011, 108: 201-209.
- Radvansky J, Resko P, Surovy M, Minarik G, Ficek A & Kadasi L. High-resolution melting analysis for genotyping of the myotonic dystrophy type 1 associated Alu insertion/deletion polymorphism. *Analytical Biochemistry*, 2010, 398: 126-128.
- Ramos-Pastrana Y, Pujol-Luz JR & Wolff M. Técnicas para la recolección de evidencias entomológica de interés forense para la determinación del intervalo *post-mortem* (IPM). *Momentos de Ciencia*, 2012, 9: 38-45.
- Randall BB, Fierro MF & Froede RC. Practice guideline for forensic pathology. Members of the Forensic Pathology Committee, College of American Pathologists. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 1998, 122: 1056-1064.
- Ratnasingham S & Hebert PD. BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7: 355-364.
- Reed GH, Kent JO & Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 2007, 8: 597-608.
- Rees DJ, Dioli M & Kirkendall LR. Molecules and morphology: evidence for cryptic hybridization in African *Hyalomma* (Acari: Ixodidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 27: 131-142.
- Regier JC, Wilson HM & Schultz JW. Phylogenetic analysis of Myriapoda using three nuclear protein-coding genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 34: 147-158.
- Reibe S, Schmitz J & Madea B. Molecular identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) from Germany. *Parasitology Research*, 2009, 106: 257-261.
- Reina D, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Moreno A, Molina JM & Hernández-Rodríguez S. Present status of warble fly in Extremadura (Southwest Spain). Pfister K, Charbon JL, Tarry DW & Pithans K (eds.). *Improvements in the Control Methods for Warble-fly in Cattle and Goats*. Comisión Europea, Thun, 1994.

IX. Bibliografía / References

- Replogle J, Lord WD, Budowle B, Meinking TL & Taplin D. Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism analysis: preliminary analysis of human crab louse (Anoplura: Pediculidae) excreta. *Journal of Medical Entomology*, 1994, 31: 686-690.
- Rice WR. Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution*, 1984, 38: 735-742.
- Richards CS, Crous KL & Villet MH. Models of development for the blowfly sister species *Chrysomya chloropyga* and *Ch. putoria*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2009, 23: 56-61.
- Richards CS, Simonsen TJ, Abel RL, Hall MJ, Schwyn DA & Wicklein M. Virtual forensic entomology: improving estimates of minimum *post-mortem* interval with 3D micro-computed tomography. *Forensic Science International*, 2012, 220: 251-264.
- Ríos JM & Yuil de Ríos E. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de leishmaniasis cutánea. *Revista Médico Científica*, 2010, 23: 45-60.
- Ritz-Timme S, Rochholz G, Schütz HW, Collins MJ, Waite ER, Cattaneo C & Kaatsch HJ. Quality assurance in age estimation based on aspartic acid racemisation. *International Journal of Legal Medicine*, 2000, 114: 83-86.
- Robertson T, Bibby S, O'Rourke D, Belfiore T, Lambie H & Noormohammadi AH. Characterization of *Chlamydiaceae* species using PCR and high-resolution melt curve analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107: 2017-2028.
- Robin ED & Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondrial per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*, 1988, 136: 507-513.
- Roe AD & Sperling FA. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44: 325-345.
- Rognes K. Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica*, 1991, 24: 5-272.
- Rognes K. First record of the sheep greenbottle fly *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) from Europe (Diptera: Calliphoridae) with additional Spanish records of Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae. *EOS*, 1993, 69: 41-44.
- Rognes K. The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are not a monophyletic group. *Cladistics*, 1997, 13: 27-66.
- Rolo EA, Oliveira AR, Dourado CG, Farinha A, Rebelo MT & Dias D. Identification of sarcosaprophagous Diptera species through DNA barcoding in wildlife forensics. *Forensic Science International*, 2013, 228: 160-164.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1572-1574.
- Rouault J, Capy P & Jallon JM. Variations of male cuticular hydrocarbons with geoclimatic variables: an adaptative mechanism in *Drosophila melanogaster*? *Genetica*, 2000, 110: 117-130.
- Royce LA, Possignol PA, Kubitz ML & Burton FR. Recovery of a second instar *Gasterophilus* larva in a human infant: a case report. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999, 60: 403-404.
- Rubinoff D, Cameron S & Will K. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for barcoding identification. *The Journal of Heredity*, 2006, 97:581-594.
- Ruiz-Martínez I & Palomares F. Occurrence and overlapping of pharyngeal botflies *Pharyngomyia picta* and *Cephenemyia auribarbis* (Oestridae) in red deer of Southern Spain. *Veterinary Parasitology*, 1993, 47: 119-127.
- Ruiz-Martínez I, Soler-Cruz MD, Díaz-López M, Pérez-Jiménez JM & Cruz-Mira M. Clasificación de las wohlfartiosis que afectan a ovinos y caprinos del sur de España. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal*, 1992a, 7: 31-45.
- Ruiz-Martínez I, Soler-Cruz MD, Pérez-Jiménez JM & Díaz-López M. Biometría de algunas estructuras larvarias de *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner, 1862) (Diptera: Sarcophagidae). *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 1992b, 16: 19-29.

- Ryan AF. The sheep blowfly problem in Tasmania. *Australian Veterinary Journal*, 1954, 30: 109-113.
- Saigusa K, Takamiya M & Aoki Y. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. *Legal Medicine*, 2005, 7: 175-178.
- Salem AM, Adham FK & Picard CJ. Survey of the genetic diversity of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) from Egypt. *Journal of Medical Entomology*, 2015, 52: 320-328.
- Saloña-Bordas MI, Moneo J & Díaz B. Estudio sobre la distribución de califóridos (Diptera: Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco. *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 2009, 33: 63-89.
- Saloña-Bordas MI, Moneo J & Díaz B. Fenología de califóridos (Diptera: Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). *Ciencia Forense*, 2010, 9-10: 95-106.
- Salvetti M, Corbellini C, Aggiusti C, Agabiti-Rosei E & Muiasan ML. *Calliphora vicina* human myiasis: a case report. *Internal and Emergency Medicine*, 2012, 7 Suppl: 135-137.
- Sánchez JJ, Phillips C, Borsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A & Morling N. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*, 2006, 27: 1713-1724.
- Sanford MR. Forensic entomology of decomposing humans and their decomposing pets. *Forensic Science International*, 2015, 247: 11-17.
- Sante-Fernández L, Hernández-Porto M, Tinguaro V & Lecuona-Fernández M. Oftalmomiasis y miasis nasal por *Oestrus ovis* en paciente residente en las Islas Canarias con características epidemiológicas poco frecuentes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2015, in press.
- Satta Y, Ishiwa H & Chigusa SI. Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 638-650.
- Savage J & Vockeroth JR. Muscidae (house flies, stable flies). Brown BV, Borkent A, Cumming JM, Wood DM, Woodley NE & Zumbado M (eds.), *Manual of Central American Diptera*. NRC Research Press, vol. 2, Ottawa, 2010.
- Schilthuizen M, Scholte C, van Wijk RE, Dommershuijzen J, van der Horst D, Zu Schlochtern MM, Lievers R & Groenenberg DS. Using DNA-barcoding to make the necrobiont beetle family Cholevidae accessible for forensic entomology. *Forensic Science International*, 2011, 210: 91-95.
- Schneider S, Roessli D & Excoffier L. *Arlequin ver. 2000: a Software for Population Genetics Data Analysis*. University of Geneva. Switzerland, 2000.
- Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C & Püeschel K. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera: Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Science International*, 2003a, 132: 76-81.
- Schroeder H, Klotzbach H & Püeschel K. Insects' colonization of human corpses in warm and cold season. *Legal Medicine*, 2003b, 5 Suppl: 372-374.
- Schultz J & Wolf M. ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: a how-to manual for molecular systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 52: 520-523.
- Séguy E. Un parasite des batraciens, la lucilie bufonivore: *Lucilia bufonivora*. *Batraciens et Reptiles du Monde*, 2012. http://www.batraciens-reptiles.com/lucilia_bufonivora.htm
- Sharp PM & Li WH. On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, 1989, 28: 398-402.
- Shivekar S, Senthil K, Srinivasan R, Sureshbabu L, Chand P, Shanmugam J & Gopal R. Intestinal myiasis caused by *Muscina stabulans*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2008, 26: 83-85.
- Shufran KA & Payton TL. Limited genetic variation within and between Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae) biotypes in the United States. *Journal of Economic Entomology*, 2009, 102: 440-445.

IX. Bibliografía / References

- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H & Flook P. 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*, 1994, 87: 651-701.
- Singh B, Kurahashi H & Wells JD. Molecular phylogeny of the blowfly genus *Chrysomya*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2011, 25: 126-134.
- Singh B & Wells JD. Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) is monophyletic: a molecular systematic analysis. *Systematic Entomology*, 2011, 36: 415-420.
- Singh B & Wells JD. Molecular systematics of the Calliphoridae (Diptera: Oestroidea): evidence from one mitochondrial and three nuclear genes. *Journal of Medical Entomology*, 2013, 50: 15-23.
- Skidmore P. The biology of the Muscidae of the world. *Series Entomologica*, 1985, 29: 1-550.
- Smith KGV. *A Manual of Forensic Entomology*. British Museum (Natural History) & Cornell University Press. Ithaca, New York, 1986.
- Soler-Cruz MD. El estudio de las miasis en España durante los últimos cien años. *Ars Pharmaceutica*, 2000, 41: 19-26.
- Solignac M, Monnerot M & Mounolou JC. Mitochondrial DNA evolution in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, 1986, 23: 31-40.
- Sonet G, Jordaens K, Braet Y, Bourguignon L, Dupont E, Backeljau T, De Meyer M & Desmyter S. Utility of GenBank and the Barcode of Life Data systems (BOLD) for the identification of forensically important Diptera from Belgium and France. *Zookeys*, 2013, 365: 307-328.
- Sonet G, Jordaens K, Braet Y & Desmyter S. Why is the molecular identification of the forensically important blowfly species *Lucilia caesar* and *L. illustris* (Calliphoridae) so problematic? *Forensic Science International*, 2012, 223: 153-159.
- Song S, Shao R, Atwell R, Barker S & Vankan D. Phylogenetic and phylogeographic relationships in *Ixodes holocyclus* and *I. cornuatus* (Acari: Ixodidae) inferred from COI and ITS2 sequences. *International Journal for Parasitology*, 2011, 41: 871-880.
- Song Z, Wang X & Liang G. Molecular evolution and phylogenetic utility of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) in Calyptratae (Diptera: Brachycera). *Journal of Molecular Evolution*, 2008a, 67: 448-464.
- Song Z, Wang X & Liang G. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, Southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Forensic Science International*, 2008b, 175: 17-22.
- Sotiraki S & Hall MJ. A review of comparative aspects of myiasis in goats and sheep in Europe. *Small Ruminants Research*, 2012, 103: 75-83.
- Sperling FA, Anderson GS & Hickey DA. A DNA-based approach to the identification of insect species used for *post-mortem* interval estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 1994, 39: 418-427.
- Sperling FA & Hickey DA. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). *Molecular Biology and Evolution*, 1994, 11: 656-665.
- Spickler AR. Screwworm myiasis. Foreign animal diseases. United States Animal Health Association. Richmond, 2012. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/screwworm_myiasis.pdf
- Ssymank A, Kearns CA, Pape T & Thompson FC. Pollinating flies (Diptera): a major contribution to plant diversity and agricultural production. *Biodiversity*, 2008, 9: 86-89.
- Stevens J. The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). *International Journal for Parasitology*, 2003, 33: 1105-1113.
- Stevens J & Wall R. Species, sub-species and hybrid populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *L. sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences*, 1996, 263: 1335-1341.

- Stevens J & Wall R. Genetic variation in populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *L. sericata* (Diptera: Calliphoridae): random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997a, 25: 81-97.
- Stevens J & Wall R. The evolution of ectoparasitism in the genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae). *International Journal for Parasitology*, 1997b, 27: 51-59.
- Stevens J & Wall R. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Science International*, 2001, 120: 116-123.
- Stevens J, Wall R & Wells JD. Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Molecular Biology*, 2002, 11: 141-148.
- Stevens J & Wallman JF. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part I): phylogenetic analyses. *Trends in Parasitology*, 2006, 22: 129-136.
- Stevens NM. A study of the germ cells of certain Diptera with special reference to the heterochromosomes and the phenomena of synapsis. *Journal of Experimental Zoology*, 1908, 5: 359-374.
- Sullivan KM, Hopgood R & Gill P. Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine*, 1992, 105: 83-86.
- Szpila K. Key for the identification of third instars of European blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. Amendt J, Goff ML, Campobasso CP & Grassberger M (eds.). *Current Concepts in Forensic Entomology*. Springer, London, 2010.
- Szpila K. Key for identification of European and Mediterranean blowflies (Diptera: Calliphoridae) of medical and veterinary importance: adult flies. Gennard D (ed.). *Forensic Entomology: an Introduction*. Wiley-Blackwell, Oxford, 2012.
- Szpila K, Matuszewski S, Bajerlein D & Konwerski S. *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), a forensically important blowfly (Diptera: Calliphoridae) new for the Polish fauna. *Polish Journal of Entomology*, 2008, 77: 351-355.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A & Kumar S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30: 2725-2729.
- Tan SH, Rizman-Idid M, Mohd-Aris E, Kurahashi H & Mohamed Z. DNA-based characterisation and classification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) in Malaysia. *Forensic Science International*, 2010, 199: 43-49.
- Tantawi TI & Greenberg B. The effect of killing and preservative solutions on estimates of maggot age in forensic cases. *Journal of Forensic Sciences*, 1993, 38: 702-707.
- Tantawi TI, Williams KA & Villet MH. An accidental but safe effective use of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in maggot debridement therapy in Alexandria, Egypt. *Journal of Medical Entomology*, 2010, 47: 491-494.
- Tarone AM, Jennings KC & Foran DR. Aging blowfly eggs using gene expression: a feasibility study. *Journal of Forensic Sciences*, 2007, 52: 1350-1354.
- Taylor AJ, Linforth R, Weir O, Hutton T & Green B. Potential of electrospray mass spectrometry for meat pigment identification. *Meat Science*, 1993, 33: 15-83.
- Tellam RL & Bowles VM. Control of blowfly strike in sheep: current strategies and future prospects. *International Journal for Parasitology*, 1997, 27: 261-273.
- Tenquist JD & Wright DF. The distribution, prevalence, and economic importance of blowfly strike in sheep. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 1976, 4: 291-295.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- Tobe SS, Kitchener AC & Linacre AM. Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PLoS ONE*, 2010, 5: 14156.

IX. Bibliografía / References

- Torres TT & Azeredo-Espin AML. Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5: 815-817.
- Torres TT, Brondani RPV, Garcia JE & Azeredo-Espin AML. Isolation and characterization of microsatellite markers in the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4: 182-184.
- Tourle R, Downie DA & Villet MH. Flies in the ointment: a morphological and molecular comparison of *Lucilia cuprina* and *L. sericata* (Diptera: Calliphoridae) in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 2009, 23: 6-14.
- Trizzino M, Audisio P, Antonini G, De Biase A & Mancini E. Comparative analysis of sequences and secondary structures of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in pollen beetles of the subfamily Meligethinae (Coleoptera: Nitidulidae): potential use of slippage-derived sequences in molecular systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 51: 215-226.
- Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA & Case TJ. Relationships among native and introduced populations of the Argentine ant (*Linepithema humile*) and the source of introduced populations. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 2151-5161.
- Tuccia F, Giordani G & Vanin S. A combined protocol for identification of maggots of forensic interest. *Science & Justice*, 2016, 56: 264-268.
- Turchetto M, Lafisca S & Constantini G. *Post-mortem* interval (PMI) determined by study sarcophagous biocenoses: three cases from the province of Venice (Italy). *Forensic Science International*, 2001, 120: 28-31.
- Turchetto M & Vanin S. Forensic entomology and climatic change. *Forensic Science International*, 2004, 146 Suppl: 207-209.
- Ullyett GC. Species of *Lucilia* attacking sheep in South Africa. *Nature*, 1945, 155: 636-637.
- Valbuena P & Saloña-Bordas MI. Primera cita de *Musca autumnalis* De Geer, 1776 (Diptera: Muscidae) en explotaciones ganaderas de Vizcaya (Comunidad Autónoma del País Vasco, España). *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 2011, 35: 489-491.
- Valkiunas G, Atkinson CT, Bensch S, Sehgal RN & Ricklefs RE. Parasite misidentification in GenBank: how to minimize their number? *Trends in parasitology*, 2008, 24: 247-248.
- Vallejo G & Alonso A. La identificación genética en grandes catástrofes: avances científicos y normativos en España. *Revista Española de Medicina Legal*, 2009, 35: 19-27.
- Vanin S, Tasinato P, Ducolin G, Terranova C, Zancaner S, Montisci M, Ferrara SD & Turchetto M. Use of *Lucilia* species for forensic investigations in Southern Europe. *Forensic Science International*, 2008, 177: 37-41.
- Vincent S, Vian JM & Carlotti MP. Partial sequencing of the cytochrome oxidase b subunit gene I: a tool for the identification of European species of blowflies for *post-mortem* interval estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 2000, 45: 820-823.
- Wall R. The reproductive output of the blowfly *Lucilia sericata*. *Journal of Insect Physiology*, 1993, 39: 743-750.
- Wall R. Ovine cutaneous myiasis: effect on production and control. *Veterinary Parasitology*, 2012, 189: 44-51.
- Wall R, Green CH, French N & Morgan KL. Development of an attractive target for the sheep blowfly *Lucilia sericata*. *Medical and Veterinary Entomology*, 1992, 6: 67-74.
- Wallman JF. A key to the adults of species of blowflies in Southern Australian known or suspected to breed in carrion. *Medical and Veterinary Entomology*, 2001a, 15: 433-437.
- Wallman JF. Third-instar larvae of common carrion-breeding blowflies of the genus *Calliphora* (Diptera: Calliphoridae) in South Australia. *Invertebrate Taxonomy*, 2001b, 15: 37-51.
- Wallman JF & Donnellan SC. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Southeastern Australia. *Forensic Science International*, 2001, 120: 60-67.

- Wallman JF, Leys R & Hogendoorn K. Molecular systematics of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. *Invertebrate Systematics*, 2005, 19:1-15.
- Walton C, Somboon P, Harbach RE, Zhang S, Weerasinghe I, O'Loughlin SM, Phompida S, Sochantha T, Tun-Lin W, Chen B & Butlin RK. Molecular identification of mosquito species in the *Anopheles annularis* group in Southern Asia. *Medical and Veterinary Entomology*, 2007a, 21: 30-35.
- Walton C, Somboon P, O'Loughlin SM, Zhang S, Harbach RE, Linton YM, Chen B, Nolan K, Duong S, Fong MY, Vythilingum I, Mohammed ZD, Trung HD & Butlin RK. Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2007b, 7: 93-102.
- Wanda S, Binggeli M, Hadorn D & Schuepbach G. An assessment on the risk of hypodermosis introduction into Switzerland via imported game. *Procedia Food Science*, 2015, 5: 320-323.
- Wang J, Yamada S & Ohashi E. Rapid identification of *Listeria* species and screening for variants by melting curve and high-resolution melting curve analyses of the intergenic spacer region of the rRNA gene. *Canadian Journal of Microbiology*, 2010, 56: 676-682.
- Waterhouse DF & Paramonov SJ. The status of the two species of *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae) attacking sheep in Australia. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1950, 3: 310-336.
- Weddeling K & Kordges T. *Lucilia bufonivora*-Befall (Myiasis) bei Amphibien in Nordrhein-Westfalen: Verbreitung, Wirtsarten, Ökologie und Phänologie. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 2008, 15: 183-202.
- Weigl S, Testini G, Parisi A, Dantas-Torres F, Traversa D, Colwell DD & Otranto D. The mitochondrial genome of the common cattle grub, *Hypoderma lineatum*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2010a, 24: 329-335.
- Weigl S, Traversa D, Testini G, Dantas-Torres F, Parisi A, Colwell DD & Otranto D. Analysis of a mitochondrial non-coding region for the identification of the most diffused *Hypoderma* species (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, 2010b, 173: 317-323.
- Weir BS. Intra-specific differentiation. Hillis DM, Moritz C & Mable BK (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associated, Sunderland, 1996.
- Wells JD, Goff ML, Tomberlin JK & Kurahashi H. Molecular systematics of the endemic Hawaiian blowfly genus *Dyscritomyia* Grimshaw (Diptera: Calliphoridae). *Medical Entomology and Zoology*, 2002, 53: 231-238.
- Wells JD, Introna F, Di Vella G, Campobasso CP, Hayes J & Sperling FA. Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. *Journal of Forensic Sciences*, 2001a, 46: 685-687.
- Wells JD & LaMotte LR. Estimating the *post-mortem* interval. Byrd JH & Castner JL (eds.). *Forensic Entomology: the Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, 2001.
- Wells JD, Lunt N & Villet MH. Recent African derivation of *Chrysomya putoria* from *Ch. chloropyga* and mitochondrial DNA paraphyly of cytochrome oxidase subunit I in blowflies of forensic importance. *Medical and Veterinary Entomology*, 2004, 18: 445-448.
- Wells JD, Pape T & Sperling FA. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences*, 2001b, 46: 1098-1102.
- Wells JD & Sperling FA. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *Ch. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 1999, 36: 222-226.
- Wells JD & Sperling FA. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 2001, 120: 110-115.
- Wells JD & Stevens J. Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology*, 2008, 53: 103-120.
- Wells JD & Stevens J. Molecular methods for forensic entomology. Byrd JH & Castner JL (eds.). *Forensic Entomology: the Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, 2010.

IX. Bibliografía / References

- Wells JD, Wall R & Stevens J. 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*, 2007, 121: 229-233.
- Wells JD & Williams DW. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. *International Journal of Legal Medicine*, 2007, 121: 1-8.
- Wetten A, Campbell C & Allainguillaume J. High-resolution melt and morphological analyses of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from cacao: tools for the control of *Cacao swollen shoot virus* spread. *Pest Management Science*, 2016, 72: 527-533.
- Whitworth TL, Dawson RD, Magalon H & Baudry E. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences*, 2007, 274: 1731-1739.
- Will KW & Rubinoff D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 2004, 20: 47-55.
- Williams KA, Cronje FJ, Avenant L & Villet MH. Identifying flies used from maggot debridement therapy. *South African Medical Journal*, 2008, 98: 196-197.
- Williams KA, Lamb J & Villet MH. Phylogenetic radiation of the greenbottle flies (Diptera: Calliphoridae: Luciliinae). *Zookeys*, 2016, 568: 59-86.
- Williams KA & Villet MH. Ancient and modern hybridization between *Lucilia sericata* and *L. cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *European Journal of Entomology*, 2013, 110: 187-196.
- Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation*, 2009, 30: 857-859.
- Wolff M & Pérez SP. Métodos para la recolección de insectos como evidencia entomológica en determinación del intervalo *post-mortem*. *Casos Forenses en Medicina Legal*, 2003, 16: 43-52.
- Wolff M, Uribe A, Ortiz A & Duque P. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. *Forensic Science International*, 2001, 120: 53-59.
- Wong MH, Henderson J & Drenth A. Identification and differentiation of *Phyllosticta* species causing freckle disease of banana using high-resolution melting (HRM) analysis. *Plant Pathology*, 2013, 62: 1285-1293.
- Xiong B & Kocher TD. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome*, 1991, 34: 306-311.
- Ye G, Li K, Zhu J, Zhu G & Hu C. Cuticular hydrocarbon composition in pupal exuviae for taxonomic differentiation of six necrophagous flies. *Journal of Medical Entomology*, 2007, 44: 450-456.
- Zaidi F, Wei SJ, Shi M & Chen XX. Utility of multi-gene *loci* for forensic species diagnosis of blowflies. *Journal of Insect Science*, 2011, 11: 59.
- Zajac BK, Martín-Vega D, Feddern N, Fremdt H, Prado e Castro C, Szpila K, Reckel F, Schütt S, Verhoff MA, Amendt J & Zehner R. Molecular identification and phylogenetic analysis of the forensically important family Piophilidae (Diptera) from different European locations. *Forensic Science International*, 2016, 259: 77-84.
- Zehner R, Amendt J & Krettek R. STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. *Journal of Forensic Sciences*, 2004a, 49: 337-340.
- Zehner R, Amendt J, Schütt S, Sauer J, Krettek R & Povolny D. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Legal Medicine*, 2004b, 118: 245-247.
- Zehner R, Zimmermann S & Mebs D. RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International Journal of Legal Medicine*, 1998, 111: 323-327.
- Zhang Y, Park SH, Yu DH, Yu GY, Jung HJ, Jo TH & Hwang JJ. Identification blowfly species in Korea by mitochondrial DNA barcodes. *Korean Journal of Legal Medicine*, 2007, 31: 51-58.

IX. Bibliografía / References

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L & Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 2000, 7: 203-214.

Zimmer C. *Wolbachia*: A tale of sex and survival. *Science*, 2001, 292: 1093-1095.

Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A & Kayser M. New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *International Journal of Legal Medicine*, 2009, 123: 71-74.

Zumpt F. *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. Butterworth. London, 1965.

ANEXO / ANEXE A

**Difusión de resultados /
Results dissemination**

PUBLICACIONES / CONTRIBUTIONS

INTRODUCCIÓN / INTRODUCTION

Maite GilArriortua, Marta I Saloña-Bordas, Marian M de Pancorbo, “*Uso de vestigios moleculares en entomología forense*”. *Ciencia Forense* (ISSN: 1575-6793), **2015**, 12: 35-78.

BLOQUE / BLOCK I

Aportación / Contribution I.I: **Maite GilArriortua**, Marta I Saloña-Bordas, Laura M Cainé, Fátima Pinheiro, Marian M de Pancorbo, “*Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera: Calliphoridae)*”. *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738), **2013**, 228: 132-136.

Aportación / Contribution I.II: **Maite GilArriortua**, Marta I Saloña-Bordas, Stephan Köhnemann, Heidi Pfeiffer, Marian M de Pancorbo, “*Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera: Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers*”. *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738), **2014**, 242: 274-282.

Aportación / Contribution I.III: **Maite GilArriortua**, Marta I Saloña-Bordas, Laura M Cainé, Fátima Pinheiro, Marian M de Pancorbo, “*Mitochondrial and nuclear DNA approaches for reliable identification of Lucilia (Diptera: Calliphoridae) species of forensic interest from Southern Europe*”. *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738), **2015**, 257: 393-397.

Aportación / Contribution I.IV: **Maite GilArriortua**, Marta I Saloña-Bordas, Marian M de Pancorbo, “*DNA-based identification of myiasis-causing Diptera species (Oestridae, Calliphoridae and Muscidae) in the North of the Iberian Peninsula*”. *Journal of Medical Entomology* (ISSN: 0022-2585), **2016** (enviada / submitted).

Aportación / Contribution I.V: Maite GilArriortua, Marta I Saloña-Bordas, Stephan Köhnemann, Heidi Pfeiffer, Marian M de Pancorbo, “*Genetic characterization and molecular differentiation of blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in Southern Europe (Basque Country)*”. *International Journal of Legal Medicine* (ISSN: 0937-9827), **2016** (enviada / submitted).

Aportación / Contribution I.VI: Maite GilArriortua, Marta I Saloña-Bordas, Marian M de Pancorbo, “*High-resolution melting (HRM) analysis assay of the ITS2 region: A powerful method to identify entomological evidence (Diptera: Calliphoridae)*”. *Forensic Science International* (ISSN: 0379-0738), **2016** (enviada / submitted).

BLOQUE / BLOCK II

Aportación / Contribution II.I: Maite GilArriortua, Marian M de Pancorbo, Marta I Saloña-Bordas, “*First record of *Musca autumnalis* De Geer, 1776 (Diptera: Muscidae) species involved in a myiasis case in the Basque Country cattle (Iberian Peninsula)*”. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* (ISSN: 1134-6094), **2014**, 55: 312-316.

Aportación / Contribution II.II: Maite GilArriortua, Marian M de Pancorbo, Marta I Saloña-Bordas, “*Confirmación de la presencia de *Lucilia bufonivora* (Diptera: Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco (norte de España)*”. *Boletín de la Asociación española de Entomología* (ISSN: 0210-8984), **2014**, 38: 25-31.

Aportación / Contribution II.III: Maite GilArriortua, Marta I Saloña-Bordas, Stephan Köhnemann, Heidi Pfeiffer, Marian M de Pancorbo, “*STR and mtDNA analyses of human DNA recovered from crops of blowfly maggots in forensic caseworks*”. *International Journal of Legal Medicine* (ISSN: 0937-9827), **2016**, (enviada / submitted).

Aportación / Contribution II.IV: Maite GilArriortua, Ailander Urtiaga, Marian M de Pancorbo, Marta I Saloña-Bordas, “*Protocolo de actuación para la recogida y registro de muestras entomológicas en una investigación pericial forense*”. *Eguzkilore (Cuaderno del Instituto Vasco de Criminología)* (ISSN: 0210-9700), **2014**, 28: 275-286.

OTRAS PUBLICACIONES / OTHER CONTRIBUTIONS

Beatriz Peralta, **Maite GilArriortua**, Marta I Saloña-Bordas, “*Variabilidad espacial y temporal de califóridos (Diptera) necrófagos de interés forense capturados en la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias (CAPA). Estudio preliminar*”, *Boletín de la Asociación española de Entomología* (ISSN: 0210-8984), **2013**, 37: 301-314.

Estibaliz Etxeberria-Rekalde, **Maite GilArriortua**, Marta I Saloña-Bordas, María Luisa Nó, “*Developing an easy and efficient protocol for the study of different blowfly instars through scanning electron microscopy*”, *Ciencia Forense* (ISSN: 1575-6793), **2015**, 12: 119-140.

COMUNICACIONES A CONGRESOS / CONGRESS PAPERS

Maite GilArriortua, Marta I Saloña-Bordas, Laura M Cainé, Fátima Pinheiro, Marian M de Pancorbo, “*Cytochrome b (Cyt-b) as a useful tool in the identification of blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic interest*”. VIII Meeting of the European Association for Forensic Entomology, Murcia (Spain), **2010**.

Maite GilArriortua, Petra Babucke, Marta I Saloña-Bordas, Stephan Köhnemann, Marian M de Pancorbo, Heidi Pfeiffer, “*Pilotstudie zur COI mtDNA variation von Calliphoridae spezies in Deutschland und Spanien*”. XXXII Spurenworkshop: Spurenkommission der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Hannover (Germany), **2012**.

Maite GilArriortua, Marta I Saloña-Bordas, Marian M de Pancorbo, “*DNA-based identification of forensically important blowflies of the Atlantic seaboard of the Iberian Peninsula by means of cytochrome b molecular marker*”. XI Annual Meeting of the North American Forensic Entomology Association (NAFEA), Ohio (USA), **2013**.

Maite GilArriortua, Marian M de Pancorbo, Marta I Saloña-Bordas, “*Fast and accurate diagnosis of Calliphoridae species using high-resolution melt (HRM) analysis of ITS2 rDNA region*”. Xth European Congress of Entomology (ECE), York (UK), **2014**.

Marta I Saloña-Bordas, **Maite GilArriortua**, Ailander Urtiaga Villejas, Marian M de Pancorbo, “*New advances on forensic entomology in the Basque Country (North of Spain)*”. The 2014 Scientific Conference in Criminal and Forensic Sciences, Porto (Portugal), **2014**.

Maite GilArriortua, “*Tipos de estudio en un laboratorio de biología forense*”. Ciencias Forenses Aplicadas a la Investigación, Alicante (España), **2014**.

Ciencia Forense, 12/2015: 35–78
ISSN: 1575-6793

USO DE VESTIGIOS MOLECULARES EN ENTOMOLOGÍA FORENSE

MAITE GILARRIORTUA^{1,2}
MARTA I. SALOÑA BORDAS^{1,2}
MARIAN M. DE PANCORBO^{1,2}

Resumen: El presente trabajo revisa el estado de la entomología forense desde un enfoque molecular, abordando aspectos fundamentales a considerar en el ámbito médico-legal. Habitualmente, las técnicas moleculares se utilizan como una alternativa rápida y fiable a la identificación morfológica tradicional. Sin embargo, aplicaciones como la caracterización de la estructura genética de las poblaciones, el estudio de las relaciones filogenéticas de las especies, el análisis del contenido digestivo del insecto o el estudio de la expresión génica a lo largo de su ciclo de desarrollo, pueden ser de gran interés en las investigaciones forenses. Además, uno de los retos de la biología molecular moderna es el desarrollo e incorporación de nuevas técnicas, como la pirosecuenciación, el análisis de las curvas de disociación de alta resolución (HRM) o la secuenciación a gran escala (NGS), que mejoren las prestaciones ofrecidas por las convencionales. En general, los análisis entomológicos moleculares están enfocados al estudio del material genético, principalmente ADN. Además, la reciente incorporación de tecnologías propias de otras disciplinas permite el análisis de hidrocarburos cuticulares y compuestos orgánicos volátiles, con aplicación en la identificación específica y en la estimación del periodo de actividad del insecto (PAI), ligado al intervalo *post-mortem* (IPM). Así, algunas de las cuestiones aquí planteadas pueden servir para reflexionar y abrir nuevos horizontes aún sin explorar.

¹ Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa (España).

² BIOMICs Research Group, Centro de Investigación «Lascaray» Ikergeunea, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Avda. Miguel de Unamuno 3, 01006 Vitoria-Gasteiz (España).

maite.gilarrortua@gmail.com, m.salona@ehu.es, marianpancorbo@gmail.com



Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae)

Maite GilArriortua^{a,b}, Marta I. Salona Bordas^a, Laura M. Cainé^{c,d}, Fátima Pinheiro^c, Marian M. de Pancorbo^{b,*}

^a Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Barrio Sarriena, 48940 Bilbao, Spain

^b BIODIMICS Research Group, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Centro de Investigación Lascañay Ikerkunea, Avda. Miguel de Unamuno 3, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain

^c Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, Jardim Carrilho Videira, 4050-167 Porto, Portugal

^d Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-316 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 July 2012
Received in revised form 20 February 2013
Accepted 23 February 2013
Available online 27 March 2013

Keywords:
Forensic Entomology
Diptera
Calliphoridae
Mitochondrial DNA
cyt b

ABSTRACT

In Forensic Entomology the fast and accurate identification of insects collected at the scene of events is essential if errors are to be avoided in estimating infestation times of interest and determining the post-mortem interval (PMI). Traditional identification based on morphological characteristics can be complicated due to physical similarities between different species, especially at immature stages. Genetic analysis provides a fast and reliable identification method. In this paper, molecular analysis is focused on a fragment of 307 bp of the mitochondrial DNA region that codes for cytochrome b (cyt b). Six species belonging three genera of Calliphoridae of forensic interest (*Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata*, *Lucilia caesar*, *Lucilia ampullacea*, *Chrysomya albiceps*) were collected and identified. These are the most common species of cadaveric entomofauna on the Atlantic seaboard of the Iberian Peninsula. The results show the robustness of the cyt b locus as a diagnostic tool, since its nucleotide variability enables reliable distinctions to be drawn between species. This study also contributes new consensus sequences which may be of interest for correct species identification.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Forensic Entomology studies the structure and dynamics of the populations of insects and other communities of arthropods to assist in legal problems of a judicial nature (abuse, mistreatment in dependent persons, murders, etc.) and in financial matters, associated with infestations and plagues affecting stored by-products, furniture and buildings [1,2]. The most significant application of this area of forensic science is in criminal investigations, where it is used to estimate the post-mortem interval (PMI) [3,4]. In that sense, the critical prerequisite for the accurate practice of Forensic Entomology is the proper identification of the collected specimens. Moreover, we have to consider that blowflies can provide information not only about the circumstances of events but also on the seasonal and environmental conditions [5,6], since

specific composition vary according to the biogeographical characteristics of each habitat [7,8].

Conventional entomological identification is based on external morphological features, based on a comparative technique that requires the selection and preservation of reference specimens and complex taxonomic keys. This task can sometimes be highly difficult, time-consuming and may even prove impossible due to the loss of morphological features in damaged specimens or to physical similarities that make difficult to identify taxonomic features. In particular, immature specimens may need to be raised until the emergence of the adult before they can be correctly identified which takes time and entails no guarantees unless the specimens are alive when they reach the specialist [9,10].

When morphological methods are uncertain and judicial errors may result, species have to be identified by alternative procedures, among which molecular techniques play a significant role [11]. Mitochondrial DNA (mtDNA) is most widely used, since it provides the largest number of copies [12] and has a higher mutation rate than nuclear DNA. These features facilitate the analysis of specimens in poor conditions, increase the possibility of generating species-specific markers, provide information for taxonomic and phylogenetic investigations [13] and even permit the rapid

* Corresponding author at: University of the Basque Country (UPV/EHU), "Lascañay" Research Center, Avda. Miguel de Unamuno, 3, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain. Tel.: +34 945 01 4528; fax: +34 945 01 4458.

E-mail addresses: marianpancorbo@gmail.com, marian.mdepancorbo@ehu.es (M.M. de Pancorbo).



Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera, Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers



Maite GilArriortua^{a,b}, Marta I. Saloña Bordas^{a,b}, Stephan Köhnemann^c, Heidi Pfeiffer^c, Marian M. de Pancorbo^{b,*}

^a Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Sarrrena s/n, 48940 Leioa, Spain

^b BIODIMCs Research Group, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Centro de Investigación "Lascany" Ikerunea, Avda. Miguel de Unamuno 3, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain

^c Institute of Legal Medicine, Münster University, Röntgenstrasse 23, 48129 Münster, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 March 2014
Received in revised form 12 June 2014
Accepted 16 July 2014
Available online 27 July 2014

Keywords:
Forensic entomology
DNA
Diptera
Calliphoridae

ABSTRACT

A challenging step in medical, veterinary and forensic entomology casework is the rapid and accurate identification of insects to estimate the period of insect activity (PIA), which usually approximates the post-mortem interval (PMI). The morphological identification of insect evidence is hampered by species similarities, especially at the early larval stages. However, DNA-based species identification is more accurate and reliable. In this study, we improved the suitability and efficacy of the standard mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) barcode region of 658 bp combined with an additional region of 616 bp of the same gene. We also tested the usefulness of other mitochondrial and nuclear loci, such as the non-coding region included in mitochondrial Cyt-b-tRNA^{ser}-ND1 (495–496 bp) and the second internal transcribed spacer (ITS2) region of nuclear ribosomal DNA (rDNA) (310–337 bp). We classified a total of 54 specimens from five blowfly species belonging to three Calliphoridae genera commonly found in Central Europe: *Phormia* (*P. regina*), *Calliphora* (*C. vicina*) and *Lucilia* (*L. sericata*, *L. ampullacea* and *L. caesar*). Additionally included were the Cyt-b (307 bp) sequences for *P. regina* species and GenBank recorded information about the studied loci for select species. The results revealed the robustness of COI (616 bp) and ITS2 (310–337 bp) as diagnostic tools to be added to the widely established COI barcode (658 bp). Their higher discriminatory power allows for more precise and reliable identifications, even within more complex genera (*Lucilia*). This work also contributes new nucleotide sequences that are useful for accurate species diagnosis and new sequence data of Calliphoridae interspecific variability in the European Westphalia region (Germany).

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Calliphoridae family is considered an important source of information involved in medical, veterinary and forensic investigations [1,2]. It may be used to detect abuses, abandonment or neglect in addition to its usefulness in murder caseworks [3–5]. Blowfly species are commonly associated with carcass decomposition, necrotic tissues in wounds (superficial myiasis) and the presence of feces or urine in skin (rectal or urogenital myiasis) [6]. The current aging population and the global economic crisis may result in a change in the scope of forensic entomology, with an

increasing number of deaths in which the period of insect activity (PIA) exceeds the post-mortem interval (PMI) [3,7], which may indicate the involvement of neglect or abandonment previous to the death [4,8]. Critical to properly estimating larval age is the identification of the collected specimens because each species has a unique habitat, growth rate and geographical distribution [9,10]. However, morphological differences are subtle, especially in the immature stages and between closely related species [11,12]. These characteristics may be absent in damaged specimens [13,14], though DNA-based identification provides rapid and unambiguous identification in all cases.

Initially, the cytochrome c oxidase subunits I and II (COI and COII) were by far the most studied mitochondrial genes for invertebrate analysis [15], followed by nicotinamide dehydrogenase subunits 4 and 4L (NAD4 and NAD4L) and the large ribosomal subunit (rRNA) [15]. In the last few years, molecular diagnosis has

* Corresponding author. Tel.: +34 945 01 4528; fax: +34 945 01 4458.
E-mail addresses: marianpancorbo@gmail.com, marian.mdepancorbo@ehu.es (M.M. de Pancorbo).



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensiint



Technical Note

Technical Note: “Mitochondrial and nuclear DNA approaches for reliable identification of *Lucilia* (Diptera, Calliphoridae) species of forensic interest from Southern Europe”



Maite GilArriortua^{a,b}, Marta I. Saloña-Bordas^{a,b}, Laura M. Cainé^{c,d}, Fátima Pinheiro^c, Marian M. de Pancorbo^{a,b,*}

^a Dpto de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Barrio Sarrriena s/n, 48940 Leioa, Spain

^b BIOMICs Research Group, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Centro de Investigación “Lascaray” Ikerunea, Avda. Miguel de Unamuno 3, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain

^c Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, Jardim Carrilho Videira, 4050-167 Porto, Portugal

^d Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-316 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2015

Received in revised form 1 September 2015

Accepted 15 October 2015

Available online 23 October 2015

Keywords:

Forensic entomology

Human corpses

DNA

Diptera

Calliphoridae

Lucilia

ABSTRACT

In forensic entomology, rapid and unambiguous identification of blowfly species is a critical prerequisite for accurately estimating the post-mortem interval (PMI). The conventional diagnosis of cadaveric entomofauna based on external characters is hampered by the morphological similarities between species, especially in immature stages. Genetic analysis has been shown to allow precise and reliable diagnosis and delimitation of insect species. Nevertheless, the taxonomy of some species remains unresolved. This study was focused on improving the effectiveness and accuracy of analysis based on the widely used cytochrome c oxidase subunit I barcode region (COI barcode, 658 bp), complemented by other mitochondrial and nuclear regions, such as cytochrome b (Cyt-b, 307 bp) and the second internal transcribed spacer (ITS2, 310–331 bp), for the identification of Southern European blowflies. We analyzed a total of 209 specimens, collected from 38 human corpses, belonging to three Calliphoridae genera and seven species: *Chrysomya* (*Ch. albiceps*), *Calliphora* (*C. vicina* and *C. vomitoria*), and *Lucilia* (*L. sericata*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris*). These species are the most common PMI indicators in Portugal. The results revealed that unambiguous separation of species of the *Lucilia* genus requires different loci from the barcode region. Furthermore, we conclude that the ITS2 (310–331 bp) molecular marker is a promising diagnostic tool because its inter-specific discriminatory power enables unequivocal and consistent distinctions to be made, even between closely related species (*L. caesar*–*L. illustris*). This work also contributes new genetic data that may be of interest in performing species diagnosis for Southern European blowflies. Notably, to the best of our knowledge, we provide the first records of the Cyt-b (307 bp) locus for *L. illustris* and the ITS2 (310–331 bp) region for Iberian Peninsula *Lucilia* species.

© 2015 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

The critical prerequisite for the accurate practice of forensic entomology is unequivocal identification of collected insects in

criminal casework because the most significant application is estimation of the oviposition date, which is linked to the post-mortem interval (PMI) [1,2]. Moreover, each bio-geographical region exhibits a distinctive specific composition, adapted to the environmental conditions and seasonality, with a developmental rate that is characteristic of the species [3–5]. Morphological diagnosis based on external features may be very difficult due to physical similarities, particularly in immature stages, which must often be reared until the adult emerges to allow accurate diagnosis [6,7]. This task is time-consuming and entails no guarantees unless the specimens arrive alive to the specialist [8]. Furthermore,

* Corresponding author at: BIOMICs Research Group Centro de Investigación “Lascaray” Ikerunea Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Avda. Miguel de Unamuno 3, 01006 Vitoria-Gasteiz (Spain). Tel.: +34 945 01 4528; fax: +34 945 01 4458.

E-mail address: marianpancorbo@gmail.com (M. M. de Pancorbo).

GilArriortua *et al.*: DNA-based identification of myiasic species.

Journal of Medical Entomology

Prof. Dr. Marian M de Pancorbo
BIOMICs Research Group
Centro de Investigación “Lascaaray” Ikerunea
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)
Avda. Miguel de Unamuno 3
01006 Vitoria-Gasteiz (Spain)
Tel: +34 945014528
Fax: +34 945014458
E-mail address: marianpancorbo@gmail.com

“DNA-based identification of myiasis-causing Diptera species (Oestridae, Calliphoridae and Muscidae) in the North of the Iberian Peninsula”.

Maite GilArriortua^{1,2}, Marta I Salona-Bordas¹, Marian M de Pancorbo^{1,2}.

1 Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain.

2 BIOMICs Research Group, Centro de Investigación “Lascaaray” Ikerunea, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Avda. Miguel de Unamuno 3, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain.

Abstract

Myiasis infestation is mainly connected to tropical and subtropical areas, and is usually associated with marginal communities with poor hygienic habits. This insect disease can be unpleasant and stressful for infested organisms, causing serious economic and healthy damages. Sometimes, it can be related to neglect. Thus, a challenging step in medico-legal and veterinary entomology is the rapid and accurate taxonomic diagnostic of collected evidence. Traditional identification based on external characters is hampered by similarities between species, especially at immature stages that it is usually delayed by the need to wait for adult emergence. This is especially difficult in species whose development is host-dependent. Genetic approach provides a more straight and reliable species diagnosis. However, the taxonomy and phylogeny of some species is still unclear. In this work was characterized and evaluated the efficacy of mitochondrial and nuclear DNA (mtDNA and nuDNA) markers for unambiguous identification of myiasis-causing species. To this end, we examined the widely used cytochrome c oxidase subunit I barcode (COI barcode, 658 bp) region, an additional fragment of 616 bp of the same gene (COI, 616 bp) and the cytochrome c oxidase subunit II (COII, 725-731 bp) locus of mtDNA. We also studied the second internal transcribed spacer (ITS2, 322-352 bp) region and a fragment which includes first and second internal transcribed spacer (ITS12, 1081-1083 bp) of nuDNA. A total of 155 specimens, collected from myiasis cases in the North of Spain, belonging to three families and six species: Oestridae (*Hypoderma bovis*), Muscidae (*Musca autumnalis*) and Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *Lucilia caesar* and *L. illustris*), were morphologically classified. Among them, a representative sample of 60 specimens was selected for molecular analysis, which corroborated the identifications. The results demonstrated the robustness of COI (616 bp) and ITS2 (322-352 bp) markers as a diagnostic tool to unequivocal differentiation of myiasic species. However, only nuDNA region enables to draw consistent distinctions, even to resolve closely related species as monophyletics. This research also contributes new genetic data that are of interest for species identification and phylogenetic inference of myiasic Diptera from Southern Europe (North of Spain).

International Journal of Legal Medicine

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Full Title: “Genetic characterization and molecular differentiation of blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in Southern Europe (Basque Country)”.

Article Type: Original Article.

Corresponding Author: Prof. Dr. Marian M de Pancorbo
BIOMICs Research Group
Centro de Investigación “Lascaray” Ikergunea
Avda. Miguel de Unamuno 3
01006 Vitoria-Gasteiz
Spain

Corresponding Author's Institution: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).

First Author: Maite GilArriortua.

Order of Authors: Maite GilArriortua; Marta I Saloña-Bordas; Stephan Köhnemann; Heidi Pfeiffer; Marian M de Pancorbo.

Abstract:

In medico-legal and veterinary entomology the fast and accurate identification of necrophagous entomofauna is a challenging step to estimate the period of insect activity (PIA). The traditional diagnosis is hampered by the physical similarities between species, especially at immature stages and sister species. DNA-based approach allows performing more precise and reliable diagnostics of insect species. This study was focused on characterizing some mitochondrial (COI barcode 658 bp, COI 616 bp and Cyt-b 307 bp) and nuclear (ITS2 310-343 bp) regions to improve the DNA resources available for Southern European Diptera identification. We analyzed a total of 449 specimens belonging to three genera and ten species of Calliphoridae (*Chrysomya*: *Ch. albiceps*; *Calliphora*: *C. vicina* and *C. vomitoria*; and *Lucilia*: *L. sericata*, *L. richardsi*, *L. ampullacea*, *L. silvarum*, *L. caesar*, *L. illustris* and *L. bufonivora*). The majority of these species are of great medico-legal and veterinary importance in the Iberian Peninsula. The results revealed that, while, overall, the COI barcode (658 bp) *locus* showed the maximum nucleotide variability, within *Lucilia* genus, COI (616 bp) and Cyt-b (307 bp) were ones that revealed the highest nucleotide diversity. However, the ITS2 (310-343 bp) nuclear marker highlighted for its greater resolution above any other mitochondrial *locus*, being the most consistent at species differentiation.

Notably, we have provided the first characterization of the Cyt-b (307 bp) and ITS2 (310-343 bp) marker for *L. richardsi*, *L. silvarum* and *L. bufonivora*. Moreover, the ITS2 (310-343 bp) region for *C. vomitoria* have not been previously recorded from the Iberian Peninsula. This work also contributes new nucleotide sequences of the *loci* COI barcode (658 bp) for *L. richardsi* and *L. silvarum*, and of COI (616 bp) for *L. richardsi*.

Elsevier Editorial System(tm) for Forensic Science International

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Technical Note: “High-resolution melting (HRM) analysis assay of the ITS2 region: A powerful method to identify entomological evidence (Diptera: Calliphoridae)”.

Article Type: Technical Note.

Keywords: Forensic entomology, Diptera, Calliphoridae, HRM, ITS2.

Corresponding Author: Prof. Dr. Marian M de Pancorbo.

Corresponding Author's Institution: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).

First Author: Maite GilArriortua.

Order of Authors: Maite GilArriortua; Marta I Saloña-Bordas; Marian M de Pancorbo.

Abstract:

The critical prerequisite for the accurate practice of forensic entomology is the rapid and unambiguous identification of entomological evidence to estimate the period of insect activity (PIA), which approximates to the *post-mortem* interval (PMI). The traditional diagnosis based on physical characters is hampered by the anatomical similarities between species, even for adults of closely related species. Thus, DNA-based identification has been shown to be a reliable alternative and less ambiguous than interpretation of morphological characters in which traditional taxonomy is based. One of the challenges of molecular biology is to develop effective and accurate techniques for fast and unequivocal insect identification. High-resolution melting (HRM) analysis is a feasible and powerful technique for nucleotide variability detection, which offers considerable time and cost-saving, compared to other conventional methods. In this work it is described and validated an assay based on HRM analysis of the second internal transcribed spacer (ITS2, 310-343 bp) region, as a diagnostic tool for distinguishing dipterans. A total of 295 specimens, previously characterized through nucleotide sequencing as belonging to seven Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Lucilia sericata*, *L. richardsi*, *L. silvarum*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris*), were used in this HRM analysis. Selected species are, usually, involved in Southern European forensic caseworks and have more complex morphological diagnosis. The melting profiles generated enabled the clear differentiation of the seven species, matching the sequencing results and/or the specimens used as reference samples for each species. This HRM-ITS2 analysis offers a simple, rapid and cost-effective method for blowfly identification, using a single primer pair in a one-step close-tube reaction and without needing fluorescence-labelled oligonucleotide probes.

FIRST RECORD OF *MUSCA AUTUMNALIS* DE GEER, 1776 (DIPTERA, MUSCIDAE) SPECIES INVOLVED IN A MYIASIS CASE IN THE BASQUE COUNTRY CATTLE (IBERIAN PENINSULA)

Maite GilArriortua^{1,2}, Marian M. de Pancorbo² & Marta Saloña Bordas^{1,2}

¹Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n 48940 Leioa, Spain

²BIOMICS Research Group, Centro de Investigación Lascaray Ikerkunea, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Avda. Miguel de Unamuno 3, Vitoria-Gasteiz, Spain

Corresponding author: Dr. Marta Saloña Bordas. Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU); Barrio Sarriena s/n 48940 Leioa, Spain. Tel: +34 946015543 — m.salona@ehu.es

First record of *Musca autumnalis* De Geer, 1776 (Diptera, Muscidae) species involved in a myiasis case in the Basque Country cattle (Iberian Peninsula)

Myiasis, understood as the infestation of living vertebrate tissues by dipterans larvae, is considered to be normally linked with tropical and subtropical areas. Nevertheless, it may occur all over the world, causing serious damage to the welfare and the economy of livestock and wildlife fauna. In Europe it is commonly caused by species of the families Oestridae, Sarcophagidae, Calliphoridae and Muscidae (Diptera), among others. This is the first record where *Musca autumnalis* De Geer, 1776 species has been associated with an accidental myiasis occurred in a cow of the north of the Iberian Peninsula. An immature specimen was extracted and identified at species level, using the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I barcode region (COI, 658 bp), as *M. autumnalis*. Additionally, this work confirms the presence of this species in the south of the Basque Country, expanding the known distribution area from the atlantic watershed, of oceanic climate, to the transition zone, of sub-mediterranean climate.

Keywords: Diptera, Muscidae, DNA, COI barcode, Myiasis, Iberian Peninsula.

Primer registro de la especie *Musca autumnalis* De Geer, 1776 (Diptera, Muscidae) asociada a un caso de miiasis en ganado del País Vasco (Península Ibérica)

Las miiasis, consideradas como infestaciones por larvas de dípteros de tejidos vivos de animales vertebrados, se asocian comúnmente a áreas tropicales y subtropicales. No obstante, pueden estar presentes en todo el mundo provocando serios daños económicos y veterinarios en el ganado y fauna salvaje. En Europa, generalmente, son causadas por las familias Oestridae, Sarcophagidae, Calliphoridae y Muscidae (Diptera), entre otras. Este es el primer registro de *Musca autumnalis* De Geer, 1776 en una miiasis accidental detectada en una vaca en el norte de la Península Ibérica. Un espécimen inmaduro fue extraído e identificado a nivel de especie, utilizando la región *barcode* del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI, 658 pb). Adicionalmente, este trabajo confirma la presencia de esta especie en el sur del País Vasco, ampliándose el área de distribución conocido desde la costa atlántica, de clima oceánico, a la zona de transición, de clima sub-mediterráneo.

Palabras clave: Diptera, Muscidae, DNA, COI barcode, Miiasis, Península Ibérica.

Introduction

Myiasis refers to vertebrate infestation by dipterans larvae, which feed, at least for a period of time, on the necrotic or alive tissues, liquids or foods ingested by the host (Zumpt, 1965). This serious pest causes a considerable impact on production economy, principally, of the livestock industry all over the world, causing serious health and welfare problems (Petney, 1997; Cats & Mullen, 2002). However, it may affect not only to animals (domestic or wild) but also to humans (children and elderly), being the period of insect activity (PIA) an important estimation to detect mistreatments situations and occupational risks (Benecke & Lessing, 2001; Amendt *et al.*, 2007; Charabidze, 2013).

In the Palaearctic region, obligate myiasis species are mainly related to four genera of Oestridae family, *Oestrus* (*O. ovis* and *O. picta*), commonly found in *Ovis*, *Capreolus* and *Cervus*, *Hypoderma* (*H. bovis* and *H. lineatum*), that primary affect to bovids, *Gasterophilus* (*G. intestinalis* and *G. nasalis*), which mostly infest equids, and *Cephenemyia* (*C. stimulator*), that is frequently found in wild cervids; one of Sarcop-

hagidae (*Wohlfahrtia*: *W. magnifica*), that may infest a great number of mammals (bovids, ovids, equids, etc); and one of Calliphoridae (*Lucilia*: *L. bufonivora*), specialized in amphibians (Ruiz-Martinez *et al.*, 1992a-b; Ruiz-Martinez & Palomares, 1993; Soler-Cruz, 2000; Alcáide *et al.*, 2003; Anderson, 2005; Otranto *et al.*, 2005; Gosá *et al.*, 2009; Weigl *et al.*, 2010; Giangaspero *et al.*, 2011; Calero-Bernal & Habela, 2013; GilArriortua *et al.*, 2014). Meanwhile, the facultative or accidental myiasis in Europe, may affect to a wide range of vertebrates and is commonly caused by species of the Calliphoridae (*Calliphora*: *C. vicina* and *C. vomitoria*; *Lucilia*: *L. sericata*, *L. cuprina*, *L. ampullacea*, *L. caesar* and *L. illustris*; *Chrysomya*: *C. albiceps*; *Phormia*: *P. regina*), Sarcophagidae (*Sarcophaga*: *S. carnaria* and *S. haemorrhoidalis*) or Muscidae (*Musca*: *M. domestica* and *M. sorbens*; and *Muscina*: *M. stabulans*) families (Rognes, 1994; Hall & Wall, 1995; Stevens & Wall, 1997; Soler-Cruz 2000; Bolek & Coggins, 2002; Stevens, 2003; Shivekar *et al.*, 2008; Derraik *et al.*, 2010; Salvetti *et al.*, 2012; Clarke, 2013).

Confirmación de la presencia de *Lucilia bufonivora* (Diptera, Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco (Norte de España)

MAITE GILARRIORTUA^{1,2}, MARIAN MARTÍNEZ DE PANCORBO² Y MARTA I. SALOÑA BORDAS^{1,2*}

1. Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Barrio Sarriena, s/n, 48940 Leioa, España.

2. Grupo de Investigación BIOMICS, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Centro de Investigación Lasaray Ikergunea, Avda. Miguel de Unamuno, 3, 01006 Vitoria-Gasteiz, España.*e-mail: m.salona@ehu.es

Recibido: 18-11-2013. Aceptado: 15-12-2013.
ISSN: 0210-8984

Publicado online 19-05-2014

RESUMEN

El presente trabajo corrobora la presencia de *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876 en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). En él se subraya la necesidad y utilidad de las técnicas moleculares, más objetivas y precisas, no solo como complemento a los métodos de identificación tradicional, basados en la detección de caracteres taxonómicos externos, sino también para el control de calidad de dichos diagnósticos morfológicos. Adicionalmente, se contribuye con nuevas secuencias nucleotídicas que son de interés para la correcta identificación específica.

Palabras clave: Diptera, Calliphoridae, Miasis, Identificación, ADN, COI *barcode*.

Presence of *Lucilia bufonivora* (Diptera, Calliphoridae) confirmed in the Basque Country (northern Spain).

ABSTRACT

The present work corroborates the presence of *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876 in the Basque Country Autonomous Community. Therefore, it evidences the necessity and utility of molecular techniques, more objective and accurate, not only as a complement to traditional identification based on external taxonomic features, but also as a quality control of these diagnostics. Additionally, this study also contributes with new nucleotide sequences which may be of interest for correct species identification.

Key words: Diptera, Calliphoridae, Myiasis, Identification, DNA, COI *barcode*.

Boln. Asoc. esp. Ent., 38 (1-2): 25-31, 2014

International Journal of Legal Medicine

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Full Title: “STR and mtDNA analyses of human DNA recovered from crops of blowfly maggots in forensic casework”.

Article Type: Technical note

Corresponding Author: Prof. Dr. Marian M de Pancorbo
BIOMICs Research Group
Centro de Investigación “Lascaray” Ikergetea
Avda. Miguel de Unamuno 3, 01006 Vitoria-Gasteiz
Spain

Corresponding Author's Institution: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).

First Author: Maite GilArriortua.

Order of Authors: Maite GilArriortua; Marta I Saloña-Bordas; Stephan Köhnemann; Heidi Pfeiffer; Marian M de Pancorbo.

Abstract:

Blowfly larvae recovered from dead bodies are frequently used, in forensic context, to estimate *post-mortem* interval (PMI). However, the gut-content of maggots, with host DNA, may also be decisive to determine the species or, even, identity of the corpse. This study aims to recover and analysis of human DNA contained in the larva, in a suitable and efficient way, which may help in criminal investigations. To this end, insect larvae with different crop physical appearance were collected from cadavers in different decomposition stages. Human DNA was quantified by means of real time PCR (Quantifiler) and short tandem repeats (STRs) used for individual identification were amplified with different forensic commercial systems (Mentype® NonaplexQS, AmpF ℓ STR® NGM™ and AmpF ℓ STR® MiniFiler™). Moreover, the cytochrome b (Cyt-b, 307 bp) gene of mitochondrial DNA (mtDNA) was analyzed to determine the food source at specific level. Our results demonstrated the influence of crops appearance and size in the quality and quantity of the DNA extracted from the host. STR profiles obtained matched with reference ones. The Cyt-b (307 bp) gene achieved satisfactory results, even in highly degraded samples when STR *loci* genotyping failed. All these findings have applicability for establishing connections in complicated situations, either by cadaver absence, by the existence of more than one food source or by the doubtful origin of insect.

EGUZKILORE

Número 28.
San Sebastián
2014
275-286

**PROTOCOLO DE ACTUACIÓN PARA LA
RECOGIDA Y REGISTRO DE MUESTRAS
ENTOMOLÓGICAS EN UNA INVESTIGACIÓN
PERICIAL FORENSE**

Maite GIL ARRIORTUA*,
Ailander URTIAGA VILLEGAS**,
M^a Ángeles MARTÍNEZ DE PANCORBO*,
Marta I. SALOÑA BORDAS**

*Grupo Consolidado BIOMICS
Universidad del País Vasco UPV/EHU
Dpto de Zoología y Biología Celular Animal
* Centro de Investigación Lascaray Ikergunaea,
Vitoria-Gasteiz
** Facultad de Ciencia y Tecnología,*

Resumen: Los artrópodos asociados a restos cadavéricos pueden aportar información fundamental que permita una estimación muy precisa del intervalo postmortem de un individuo (IPM). Por ello, su recolección puede ser fundamental durante una investigación pericial. Se presentan unas pautas sobre los procedimientos a seguir durante la inspección y recogida de evidencias de origen entomológico tanto el lugar de los hechos como durante la autopsia que aseguren la fiabilidad y validez de dichas evidencias ante un Tribunal de Justicia. Por último, se adjunta una ficha de registro que permita la recogida sencilla de información complementaria fundamental para la adecuada interpretación de dichas evidencias entomológicas.

Laburpena: Gorpuzkinei lotutako artropodoek funtsezko informazioa eman diezagukete, pertsona bat hil denetik igarotako denbora-tartea zehaztasunez kalkulatzeko. Hori dela eta, horiek biltzea funtsezkoa izan daiteke adituen ikerketa batean. Gertaerak jazo diren tokian eta autopsian jatorri entomologikoko ebidentziak biltzeko eta aztertzeko erabili behar diren prozedurei buruzko jarraibide batzuk aurkezten dira, bermatu egingo dutenak ebidentzia horiek justizia-azitegi batek fidagarritzat eta onargarritzat hartzea. Azkenik, erregistro-fitxa bat erantsi da, aukera ematen duena oso erraz biltzeko ebidentzia entomologikoak behar bezala interpretatzeko informazio osagarria.

Résumé : Arthropodes associés avec des restes de cadavres peuvent fournir des informations essentielles permettant une estimation très précise de l'intervalle post-mortem d'un individu (IPM). C'est ainsi que sa collection peut donc s'avérer critique lors d'une enquête judiciaire. Des directives sont données sur les procédures à suivre pendant l'inspection et la collecte de preuves d'origine entomologique tantôt sur scène

Variabilidad espacial y temporal de Califóridos (Diptera) necrófagos de interés forense capturados en la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias (CAPA). Estudio preliminar

BEATRIZ PERALTA ÁLVAREZ¹, MAITE GILARRIORTUA^{1,2} y MARTA INÉS SALOÑA BORDAS^{1,2}

1. Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Barrio Sarriena, 48940 Bilbao (Spain).

2. BIOMiCs Research Group. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Centro de Investigación CIEA Lucio Lascaray, Avda. Miguel de Unamuno, 3, 01006 Vitoria-Gasteiz (Spain).

Recibido: 23-10-12. Aceptado: 20-10-13.
ISSN: 0210-8984

Publicado online 23-12-2013

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la variabilidad espacio-temporal, distribución y diversidad de dípteros necrófagos de la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias (CAPA), en dos ambientes con diferente grado de antropización y climatología (urbano prelitoral: Oviedo, y rural litoral: Luarca). Se realizaron muestreos mensuales a lo largo de un año, utilizando trampas de atracción selectiva cebadas con hígado de cerdo. En total se han capturado e identificado 338 individuos pertenecientes a 6 familias de dípteros (Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, Anisopodidae, Fanniidae y Ephydriidae) y 4 himenópteros parasitoides. La familia más representativa es Calliphoridae (290 individuos), representada por 6 especies pertenecientes a 3 géneros de interés forense (*Calliphora vicina* y *Calliphora vomitoria*; *Lucilia sericata*, *Lucilia caesar* y *Lucilia cuprina*; y *Chrysomya albiceps*). Se aprecia la posible influencia del grado de antropización en la distribución específica, con diferencias significativas en la diversidad de especies características de cada época del año.

Palabras clave: Artrópodos, dípteros necrófagos, Calliphoridae, Entomología Forense, Comunidad Autónoma del Principado de Asturias.

Ciencia Forense, 12/2015: 119–140
ISSN: 1575-6793

**DEVELOPING AND EASY AND EFFICIENT PROTOCOL
FOR THE STUDY OF DIFFERENT BLOWFLY INSTARS
THROUGH SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**

ESTIBALIZ ETXEBERRIA-REKALDE¹
MAITE GILARRIORTUA¹
MARTA I. SALOÑA-BORDAS¹
MARÍA LUISA NÓ²

Key words: *Calliphora vicina*, SEM, egg, maggot, pupa, puparium, adult, ultrastructural microscopy optimization.

Abstract: Forensic entomology studies the arthropods to provide useful information in judicial proceedings, being the *postmortem* interval (PMI) estimation one of its most important contribution. Scanning electron microscopy (SEM) has been broadly used for the accurate identification of blowflies of forensic interest, but usually the sample preparation lasts too long and/or can produce the introduction of artefacts to the image. In that sense, the development of a reliable protocol for insect sample examinations through SEM is needed. The blue bottle fly *Calliphora vicina* ROBINEAU-DESVOIDY, 1830 is a blowfly related to decomposing remains, commonly reported worldwide in forensic caseworks and easy to be identified with basic blowfly knowledge. Therefore, the present work uses *C. vicina* as a model to design and develop an adequate, fast and simple protocol for the proper observation of blowflies through SEM. During the optimization of the protocol, the perfect combination of good image contrast, not too much artefact introduction and quick sample preparation were obtained using a mean time of glutaraldehyde treatment and no osmium tetroxide.

¹ Departamento de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Bizkaia, Spain.

² Departamento de Física Aplicada II, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Bizkaia, Spain.

ANEXO / ANEXE B

Perspectivas futuras /

Future perspectives

Durante el desarrollo de esta investigación han surgido nuevas cuestiones de interés que complementarán este estudio en un trabajo futuro, detallando entre otras:

- El examen exhaustivo de las poblaciones Europeas de *Ch. albiceps* (Wiedemann, 1819) que mejore la comprensión de la limitada diversidad genética frente a la considerable variabilidad morfológica que presentan.
- El análisis de marcadores mitocondriales y nucleares adicionales para resolver la historia del flujo génico entre las especies hermanas *L. caesar* (Linnaeus, 1758)-*L. illustris* (Meigen, 1826).
- La caracterización molecular de dípteros de relevancia médico-legal y veterinaria de otras regiones de la Península Ibérica, para conocer la variabilidad genética a una escala más global.
- La aplicación de la nueva herramienta HRM-ITS2 en la identificación de otras especies de interés médico-legal y veterinario.
- La utilización de SNPs hipervariables nucleares y mitocondriales, y de otras tecnologías (NGS o MPS), en la identificación individual humana mediante el análisis del contenido digestivo de insectos necrófagos inmaduros.

Future perspectives

During the development of this research have emerged new issues of interest to complement this study in future work, specifying among others:

- The exhaustive exam of *Ch. albiceps* (Wiedemann, 1819) European populations to improve the understanding of the scarce genetic diversity against the considerable morphological variability that they exhibit.
- The analysis of mitochondrial and nuclear additional markers to resolve the history of gene flow between the sister species *L. caesar* (Linnaeus, 1758)-*L. illustris* (Meigen, 1826).
- The molecular characterization of Diptera of medico-legal and veterinary relevance from other regions of the Iberian Peninsula, to know the genetic variability to a more global scale.
- The application of the new tool HRM-ITS2 in identifying other species of medico-legal and veterinary interest.
- The use of nuclear and mitochondrial hypervariable SNPs, and other technologies (NGS or MPS), in human individual identification by analyzing the digestive content of immature necrophagous insects.