

Identificación molecular de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia

Molecular identification of Calliphoridae (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance in Colombia

JAIBER J. SOLANO^{1,2}, MARTA WOLFF³ y LYDA R. CASTRO^{1,4}

Resumen: Reconociendo la importancia de la correcta identificación de los insectos asociados a los cuerpos cadavéricos para estimar el intervalo *postmortem* de una forma efectiva; teniendo en cuenta la incidencia de las moscas de la familia Calliphoridae en cadáveres y la dificultad existente para su determinación taxonómica de los estadios inmaduros, se evaluó la utilidad de la secuencia del gen mitocondrial COI como herramienta de diagnóstico molecular para la identificación de califóridos de importancia forense en Colombia. Se utilizaron secuencias de muestras colectadas en Colombia y otras tomadas de Genbank. Se realizaron análisis de divergencia de nucleótidos y análisis de “neighbour-joining”, con base en las distancias genéticas calculadas con el modelo K2P. Se realizaron análisis bayesianos y se desarrolló una representación gráfica de la variación del fragmento de COI para cada especie. Se obtuvieron fragmentos de 545 pb; los valores de distancia intra-específica, cuando se incluyen todas las especies secuenciadas, oscilaron entre 0% y 2,904% y los de distancia inter-específica entre 0,188% y 18,07%, observándose un solapamiento de distancias, ocasionado principalmente por la inclusión de especies con solo una secuencia. Al excluir las especies con una sola secuencia y tratar a *L. eximia* como dos subgrupos, se logró observar un gap de distancias de 2,292%, el cual es un valor óptimo para la validación de esta técnica. Se observaron monofilias recíprocamente específicas en la mayoría de las especies, concluyendo que el gen COI es un buen marcador para delinear especies de la familia Calliphoridae en Colombia.

Palabras clave: Citocromo oxidasa I. Intervalo *Postmortem*.

Abstract: Recognizing the importance of the correct identification of insects associated with deceased bodies for an effective estimation of time of death, and taking into account the incidence of flies of the family Calliphoridae in corpses and the difficulty of their taxonomic determination, we evaluated the usefulness of COI mitochondrial gene sequences as a molecular diagnostic tool for identifying forensically important calliphorids in Colombia. Sequences obtained from samples collected in different regions of Colombia and other sequences taken from Genbank were used. Based on the genetic distances calculated using the K2P model, nucleotide divergence and neighbour-joining analyses were performed. Bayesian analyses were also developed and a graphical representation of the variation of the COI fragments for each species. A total 545 pb fragments were obtained; the values of intraspecific distance when all sequenced were included, ranged between 0% and 2.904% and the interspecific distance ranged between 0.188% and 18.07%, with an overlapping distance, caused mostly by the inclusion of species with only one sequence. When we excluded species with a single sequence and *L. eximia* was analyzed as two subgroups, a distance gap of 2.292% was obtained, which is an optimal value for the validation of this technique. Reciprocal monophyly was observed in most species. We conclude that the COI gene is a good marker for delineating species of the family Calliphoridae in Colombia.

Key words: Cytochrome oxidase I. Postmortem interval.

Introducción

Los califóridos (Diptera: Calliphoridae) han sido objeto de estudios importantes en trabajos realizados en todo el mundo, gracias a su aparición en los cuerpos cadavéricos y su importancia como indicadores del tiempo de muerte y como herramienta para calcular el intervalo *post-mortem* (IPM) en casos legales (Wolff *et al.* 2001; Schroeder *et al.* 2003; Daw-nay *et al.* 2007; Harvey *et al.* 2008), de esta manera, juegan un papel fundamental en el estudio de la entomología forense como disciplina (Wolff *et al.* 2001).

Esta familia presenta alrededor de 1.000 especies en todo el mundo, pero en el Neotrópico sólo se encuentran aproximadamente unas 126 especies, distribuidas principalmente en cinco subfamilias: Calliphorinae, Luciliinae, Chrysomyinae, Melanomyinae y Mesembrinellinae (Pape *et al.* 2004). En Colombia se han registrado 12 géneros y 29 especies de califóridos, donde por lo menos 13 especies presentan importancia forense (Amat 2009; Flórez y Wolff 2009).

La identificación de la especie encontrada en asociación con un cadáver es uno de los primeros pasos utilizados en entomología forense para estimar el IPM (Wells y LaMotte 2001). Sin embargo, el uso de moscas carroñeras en la valoración de IPM ha sido obstaculizado por las dificultades asociadas con la correcta identificación de la especie en las diferentes etapas de desarrollo, huevos, larvas, puparium y adultos (Catts 1992), particularmente cuando sólo hay fragmentos del insecto (e.g. pupas, larvas o adultos muertos, descompuestos o partes de estos), disponibles para el análisis (Stevens y Wall 2001) o cuando se encuentra individuos en estadios larvales. Lo anterior conlleva a la cría en laboratorio a partir de larvas y/o pupas recolectadas, que se traduce a un gasto de tiempo y recursos, debido a que esta es una labor compleja (Catts 1992; Harvey *et al.* 2008).

Sin duda alguna, la identificación de moscas carroñeras requiere del conocimiento taxonómico del especialista, confiando a menudo en el reconocimiento de pequeñas variaciones en características morfológicas y en la disección e

¹ Universidad del Magdalena. Grupo de investigación de Evolución, Sistemática y Ecología Molecular Carrera 32 No. 22-08 Santa Marta, Colombia. ² Biólogo. jaiber.solano.i@gmail.com. ³ Ph. D. Directora de las Colecciones Entomológicas de la Universidad de Antioquia. calle 70 No. 52-21 Medellín, Colombia. marta_wolff@yahoo.com. ⁴ Ph. D. lcastro@unimagdalena.edu.co. lydaraquelcastro@hotmail.com. Autor para correspondencia.

inspección de los órganos genitales en los adultos (Wallman 2001). Sin embargo, la semejanza morfológica de las diferentes especies de califóridos, especialmente en sus estadios inmaduros, ocasiona que actualmente exista gran interés por el desarrollo de herramientas alternativas, que ayuden a resolver estos problemas taxonómicos (Schroeder *et al.* 2003; Ames *et al.* 2006; Nelson *et al.* 2007; Alessandrini *et al.* 2008).

Con el advenimiento de herramientas en biología molecular, se han desarrollado técnicas que facilitan la determinación de especies. Recientemente, la utilización de un sistema de códigos de barras genéticos, que ayuda a la identificación de especies problema, ha sido aplicada para muchos organismos (Catts 1992; Folmer *et al.* 1994; Herbert *et al.* 2003; Armstrong y Ball 2005; Ball *et al.* 2005; Hebert y Gregory 2005; Dawnay *et al.* 2007; Yadong *et al.* 2010; Guo *et al.* 2012; Boehme *et al.* 2012).

Los proponentes de los “código de barra genéticos” visionan la construcción de una base de datos universal que incluya todas las secuencias de COI de animales, que además serviría como base para un sistema global de bioidentificación de animales (Hebert *et al.* 2003), debido a que es un gen que resulta de gran utilidad para la discriminación entre especies. Este gen ya ha sido utilizado en otras partes para la

identificación de metazoos (Folmer *et al.* 1994), gastrópodos (Remigio y Hebert 2003), colémbolos (Hogg y Hebert 2004), insectos como: efemerópteros (Ball *et al.* 2005), lepidópteros (Hebert *et al.* 2003), moscas de importancia forense (Meiklejohn *et al.* 2011; Boehme *et al.* 2012; Jordaens *et al.* 2013) además de trabajos relacionados con la identificación de califóridos (Stevens y Wall 2001; Nelson *et al.* 2007; Harvey *et al.* 2008).

Las ventajas de los códigos de barra genéticos para la identificación y el descubrimiento de especies ha sido bastante discutida (Hebert y Gregory 2005) y el concepto continúa siendo tema de debate. Sin embargo, se cree que la consolidación de un sistema estandarizado para la identificación de especies va a fortalecer esfuerzos de investigación globales y será beneficioso para la identificación de especies de importancia médica, económica o ambiental (Armstrong y Ball 2005).

En la estandarización y validación de esta técnica, es de vital importancia la realización de los análisis de divergencia genética dentro y entre las especies (distancias intra e inter-específicas, respectivamente), donde idealmente se espera la aparición de un gap o una zona donde el valor superior de las distancias intra-específicas se encuentre alejado del valor inferior de las distancias inter-específicas y, de esta manera,

Tabla 1. Lista de especies, localidades, altitud y región de colecta. ARSL: El Arsenal, SMTA: Universidad del Magdalena - Santa Marta, BGRE: Corregimiento El Bagre, SPDRO: Vereda San Pedro, FLSTA: Vereda la Floresta - El cañón - Finca los Robles, CONGO: San Jose de la Montaña - El Congo, PLMTAS: Corregimiento Las Palmitas, SANT: San Antonio De Prado, SSEB: Envidado Bosque San Sebastián, RCHA: Municipio de Riohacha - La Guajira, JARDIN: Co. Ant. Jardin, SVCTE: Co. Ant. San Vicente.

Especie	Subfamilia	Localidad	Altura (msnm)	Región
<i>Blepharicnema splendens</i> Macquart, 1843	Calliphorinae	FLSTA	2.375	Occidente antioqueño
<i>Calliphora nigribasis</i> Macquart, 1851	Calliphorinae	SJSE	3.000	San José de la Montaña
<i>Calliphora nigribasis</i> Macquart, 1851	Calliphorinae	CONGO	3.000	Páramo de Santa Inés
<i>Calliphora nigribasis</i> Macquart, 1851	Calliphorinae	PLMTAS	2.600	Corregimiento Medellín
<i>Chloroprocta idioidea</i> Robineau-Desvoidy, 1830	Chrysomyinae	ARSL	600	Costa Caribe
<i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann, 1819)	Chrysomyinae	BGRE	150	Cañón del río Cauca
<i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann, 1819)	Chrysomyinae	SPDRO	1.200	Maceo-Antioquia
<i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794)	Chrysomyinae	SMTA	10	Costa Caribe
<i>Cochliomyia hominivorax</i> (Coquerel, 1858)	Chrysomyinae	SMTA	10	Costa Caribe
<i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius, 1775)	Chrysomyinae	SMTA	10	Costa Caribe
<i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius, 1775)	Chrysomyinae	BGRE	150	Cañón del río Cauca
<i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius, 1775)	Chrysomyinae	SPDRO	1.200	Maceo-Antioquia
<i>Comptosomyia verena</i> Walker, 1849	Chrysomyinae	CONGO	3.000	Páramo de Santa Inés
<i>Comptosomyia verena</i> Walker, 1849	Chrysomyinae	PLMTAS	2.600	Corregimiento Medellín
<i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Rondani, 1850)	Chrysomyinae	SSEB	1.850	Sur Medellín
<i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Rondani, 1850)	Chrysomyinae	SVCTE	2.200	Oriente antioqueño
<i>Paralucilia fulvinota</i> (Bigot 1877)	Chrysomyinae	SPDRO	1.200	Maceo-Antioquia
<i>Lucilia eximia</i> (Wiedemann, 1819)	Luciliinae	ARSL	600	Costa Caribe
<i>Lucilia eximia</i> (Wiedemann, 1819)	Luciliinae	BGRE	150	Cañón del río Cauca
<i>Lucilia eximia</i> (Wiedemann, 1819)	Luciliinae	SMTA	10	Costa Caribe
<i>Lucilia peruviana</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)	Luciliinae	SSEB	1.850	Sur Medellín
<i>Lucilia peruviana</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)	Luciliinae	SVCTE	2.200	Oriente antioqueño
<i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann, 1830)	Luciliinae	SANT		Sur Medellín
<i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1826)	Luciliinae	RHA	10	Costa Caribe
<i>Huascaromusca</i> sp.	Mesembrinellinae	JARDIN	2.375	Occidente antioqueño

no exista un solapamiento entre estos dos parámetros (Meyer y Paulay 2005; Roe y Sperling 2007). Además de esto y de manera complementaria, se han utilizado métodos de agrupamiento (neighbour-joining) y de reconstrucción filogenética (Bayesiano y máxima verosimilitud, principalmente), para la validación de esta técnica, gracias a la evaluación de las monofilias recíprocamente específicas que se obtienen de forma clara con datos de esta naturaleza (Meyer y Paulay 2005; Nelson *et al.* 2007; Whitworth *et al.* 2007; Meiklejohn *et al.* 2011).

Aun no se ha estandarizado un valor de distancia intra e inter-específica para las especies de la familia Calliphoridae y para el gen COI, pero se han observado valores promedio mínimos de distancia inter-específica y máximos de intra-específica de 0,480% y 0,295% respectivamente (Nelson *et al.* 2007), siendo estos los únicos que hemos podido identificar, a pesar de que en esta familia se han desarrollado otros estudios de este tipo (Schroeder *et al.* 2003; Ames *et al.* 2006; Whitworth *et al.* 2007; Alessandrini *et al.* 2008; Giraldo *et al.* 2011). Además, de forma general, los defensores de esta herramienta, han propuesto valores estimativos entre 1-2% de variación intraespecífica y valores superiores a estos para separar especies (Lanteri 2007).

Con base en lo anterior, este trabajo tiene como objetivo desarrollar herramientas de diagnóstico molecular para la identificación de Calliphoridae de importancia forense en Colombia, mediante la amplificación y secuenciación del código de barra –gen COI–.

Materiales y métodos

Muestras estudiadas. Las muestras, colectadas en diferentes pisos altitudinales representativos del país, se identificaron en el laboratorio de Colecciones Entomológicas de la Universidad de Antioquia y fueron enviadas al laboratorio de Evolución y Sistemática Molecular de la Universidad del Magdalena, para el desarrollo de las pruebas de diagnóstico molecular, donde están disponibles y preservadas en alcohol al 95%. Los sitios de colecta de las muestras están detallados en la tabla 1. Además, se utilizaron secuencias descargadas de la base de datos de Genbank (Tabla 2).

Extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó a partir la disección de la zona torácica de adultos previamente identificados y se utilizó el kit de extracción de ADN de QIAGEN (DNeasy Blood & Tissue Kit, 250), siguiendo el protocolo del fabricante (DNeasy Bloody & Tissue Handbook de Qiagen). La extracción del ADN y su calidad se confirmaron por medio de electroforesis en gel de agarosa y con tinción con GelRed (Biotium).

Amplificación y secuenciación de COI. La amplificación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por medio de un termociclador (Eppendorf Mastercycler® pro); utilizando los cebadores universales para insectos que amplifican este gen, diseñados por Folmer *et al.* (1994) y modificados por Nelson *et al.* (2007). La secuencia de los ce-

Tabla 2 Secuencias descargadas de GenBank.

Especie	Subfamilia	Código GenBank
<i>Calliphora vicina</i> BRA	Calliphorinae	JQ246672
<i>Calliphora vicina</i> KR	Calliphorinae	EU880189
<i>Chrysomya albiceps</i> BRA	Chrysomyinae	JQ246659
<i>Chrysomya albiceps</i> GER	Chrysomyinae	HE814059
<i>Chrysomya megacephala</i> BRA	Chrysomyinae	JQ246662
<i>Cochliomyia hominivorax</i> BRA	Chrysomyinae	HM185561
<i>Cochliomyia hominivorax</i> JAM	Chrysomyinae	HM185528
<i>Cochliomyia macellaria</i> BRA	Chrysomyinae	JQ246666
<i>Cochliomyia macellaria</i> EEUU	Chrysomyinae	AF295555
<i>Comptosyiops callipes</i> EEUU	Chrysomyinae	AF295549
<i>Comptosyiops fulvicrura</i>	Chrysomyinae	FJ025607
<i>Haematobia irritans</i> (Out group)	Muscoidea	JQ246702
<i>Glossina morsitans</i> (Out group)	Hippoboscoidea	JQ246706
<i>Lucilia eximia</i> BRA	Lucillinae	JQ246678
<i>Lucilia eximia</i> BRA2	Lucillinae	JF928490
<i>Lucilia eximia</i> BRA3	Lucillinae	JF928488
<i>Lucilia eximia</i> BRA4	Lucillinae	DQ453491
<i>Lucilia sericata</i> BEL	Lucillinae	JX295738
<i>Lucilia sericata</i> BRA	Lucillinae	JQ246679
<i>Mesembrinella bellardiana</i> BRA	Mesembrinellinae	JQ246688
<i>Mesembrinella bicolor</i> BRA	Mesembrinellinae	JQ246689
<i>Mesembrinella peregrina</i> BRA	Mesembrinellinae	JQ246690
<i>Musca domestica</i> (Out group)	Muscoidea	JQ246703
<i>Paralucilia paraensis</i> BRA	Chrysomyinae	HM639978

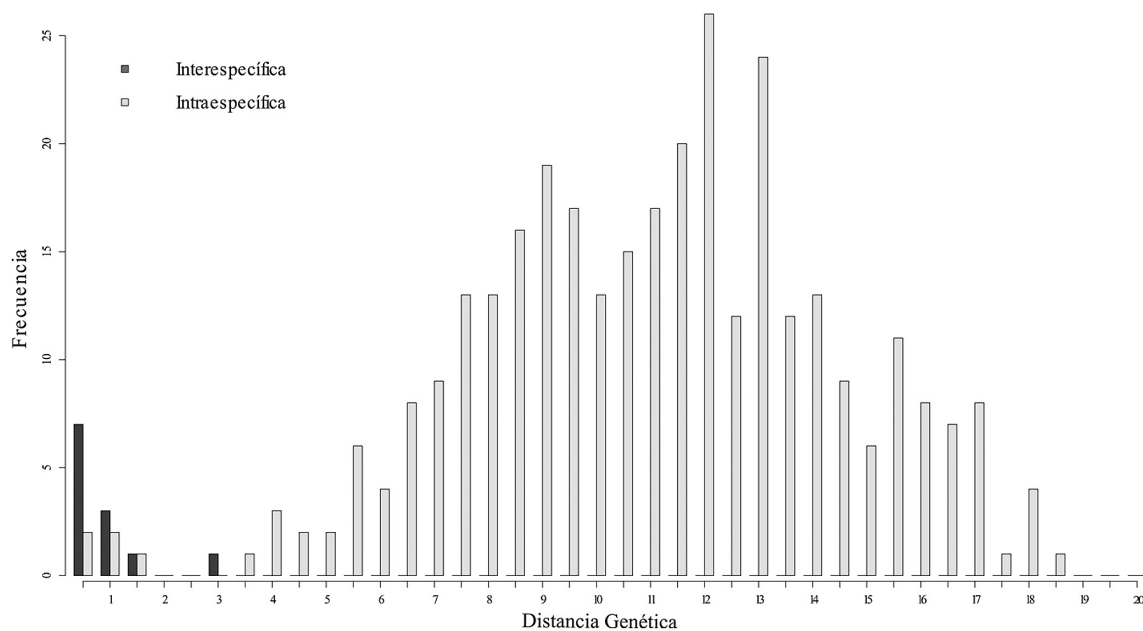


Figura 1. Histograma de distancias interespecíficas vs distancias intraespecíficas.

badores utilizados fue: LCO1490-L (5'-GTCWACWAATCA-TAAAGATATTGG-3') y HCO2198-L (5'-TAAACTTCWG-GRTGWCCAAARAATCA-3').

Para las reacciones de PCR se utilizaron 2 μ L de ADN extraído en reacciones de 25 μ L, usando concentraciones finales de cada reactivo, de la siguiente manera: 0,1 U/mL de Taq Polimerase (0,5 μ L de Taq Polimerasa 5U/mL; abm), 3,5 mM de MgCl₂ (3,5 μ L de MgCl₂ a 25mM; abm), 1X de Buffer PCR (No MgCl₂; 2,5 μ L de Buffer PCR a 10X; abm), 0,2 mM de dNTP's (0,5 μ L de dNTP's a 10mM; Bioline), 0,4 mM de cada primer (1 μ L de cada primer a 10mM) y se completa con agua destilada y autoclavada (14 μ L de agua), hasta alcanzar 25 μ L de reacción de PCR.

Los ciclos de PCR se realizaron de acuerdo con lo sugerido por Nelson *et al.* (2007) modificado, con una temperatura inicial de desnaturalización de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos con los siguientes parámetros: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 54 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido por un paso de extensión final a 72 °C por 5 minutos.

La cuantificación de los productos de amplificación se realizó por corrimientos en gel de electroforesis de agarosa 2% y teñido con GelRed (Biotium).

Los productos obtenidos de la amplificación de COI se purificaron con el kit de purificación de ácidos nucleicos y proteínas de MACHEREY-NAGEL (NucleoSpin® Extract II), de acuerdo con el protocolo del proveedor y estos pro-

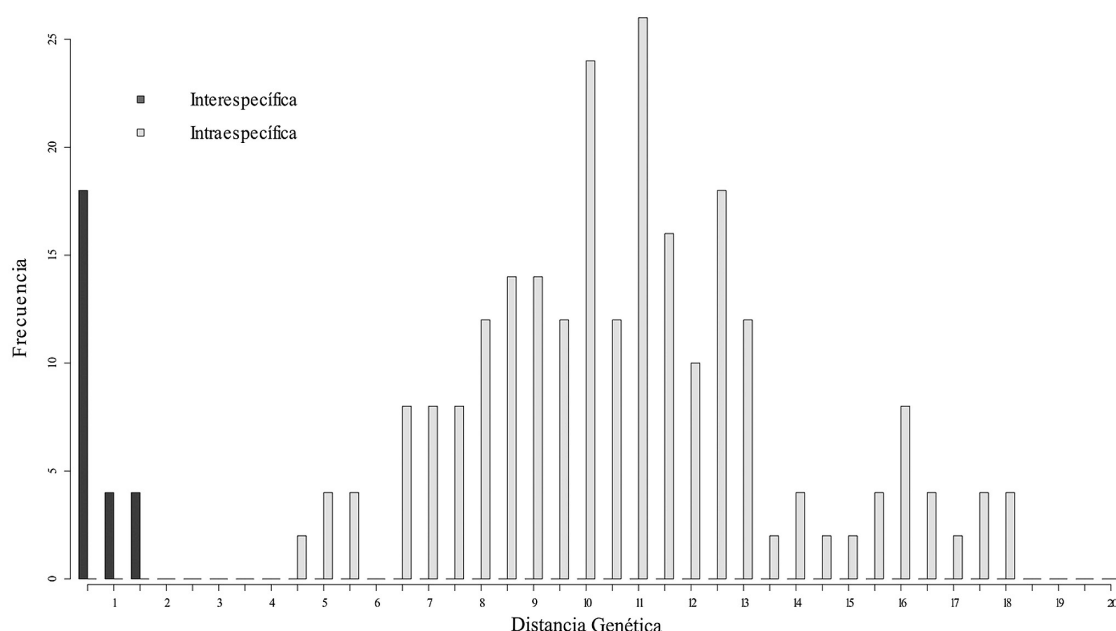


Figura 2. Histograma de distancias interespecíficas vs distancias intraespecíficas, excluyendo las especies que solo presentan una secuencia en los análisis.

Tabla 3. Especies de Calliphoridae analizadas en laboratorio y códigos de registro de Genbank y BoldSystems.

Especie	Genbank	BOLD
<i>Blepharicnema splendens</i> FLSTA	KC568246	SWCCO001-13
<i>Calliphora nigribasis</i> CONGO	KC568247	SWCCO002-13
<i>Calliphora nigribasis</i> PLMTAS	KC568248	SWCCO003-13
<i>Calliphora nigribasis</i> SJSE	KC568249	SWCCO004-13
<i>Calliphora nigribasis</i> SJSE2	KC568250	SWCCO005-13
<i>Calliphora nigribasis</i> SJSE3	KC568251	SWCCO006-13
<i>Chloroprocta idioidea</i> ARSL	KC568252	SWCCO007-13
<i>Chloroprocta idioidea</i> ARSL2	KC568253	SWCCO008-13
<i>Chloroprocta idioidea</i> ARSL3	KC568254	SWCCO009-13
<i>Chloroprocta idioidea</i> ARSL4	KC568255	SWCCO010-13
<i>Chrysomya albiceps</i> BGRE	KC568256	SWCCO011-13
<i>Chrysomya albiceps</i> BGRE2	KC568257	SWCCO012-13
<i>Chrysomya albiceps</i> SPDRO	KC568258	SWCCO013-13
<i>Chrysomya megacephala</i> SMTA	KC568259	SWCCO014-13
<i>Chrysomya megacephala</i> SMTA	KC568260	SWCCO015-13
<i>Cochliomyia hominivorax</i> SMTA	KC568261	SWCCO016-13
<i>Cochliomyia macellaria</i> BGRE	KC568262	SWCCO017-13
<i>Cochliomyia macellaria</i> SMTA	KC568263	SWCCO019-13
<i>Cochliomyia macellaria</i> SPDRO	KC568264	SWCCO018-13
<i>Comptosyriops verena</i> CONGO	KC568265	SWCCO020-13
<i>Comptosyriops verena</i> PLMTAS	KC568266	SWCCO021-13
<i>Hemilucilia semidiaphana</i> SSEB	KC568267	SWCCO022-13
<i>Hemilucilia semidiaphana</i> SVCTE	KC568268	SWCCO023-13
<i>Huascaromusca</i> sp. JARDIN	KC568269	SWCCO024-13
<i>Lucilia eximia</i> ARSL	KC568270	SWCCO025-13
<i>Lucilia eximia</i> BGRE	KC568271	SWCCO026-13
<i>Lucilia eximia</i> SMTA	KC568272	SWCCO027-13
<i>Lucilia peruviana</i> SSEB	KC568273	SWCCO028-13
<i>Lucilia peruviana</i> SVCTE	KC568274	SWCCO029-13
<i>Lucilia cuprina</i> SANT	KC568275	SWCCO030-13
<i>Lucilia sericata</i> RHA	KC568276	SWCCO031-13
<i>Mesembrinella</i> sp. JARDIN	KC568277	SWCCO032-13
<i>Paralucilia fulvinota</i> SPDRO	KC568278	SWCCO033-13

Tabla 4. Distancia intra-específica. Análisis se realizó usando el modelo de distancia Kimura 2 parámetros (K2P). Todas las secuencias analizadas tienen más de un individuo de cada especie secuenciado ($n \geq 2$).

Especie	Dist.
<i>Calliphora vicina</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)	0,000
<i>Comptosyriops verena</i> Walker, 1849	0,000
<i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Rondani, 1850)	0,000
<i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794)	0,125
<i>Chloroprocta idioidea</i> Robineau-Desvoidy, 1830	0,188
<i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius, 1775)	0,226
<i>Calliphora nigribasis</i> Macquart, 1851	0,453
<i>Cochliomyia hominivorax</i> (Coquerel, 1858)	0,503
<i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1826)	0,503
<i>Lucilia peruviana</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)	0,946
<i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann, 1819)	1,240
<i>Lucilia eximia</i> (Wiedemann, 1819)	2,904
Promedio	0,591

más de una secuencia), las cuales se calcularon con el modelo de distancia de Kimura 2 parámetros “K2P” (Kimura 1980). También con MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011) se realizó el análisis Neighbour-Joining (NJ), utilizando el modelo de evolución molecular de Kimura 2 parámetros, el cual nos provee una representación gráfica de los patrones de divergencia entre especies. En ambos casos se hizo un análisis de bootstrap con 1000 réplicas.

Se realizaron análisis bayesianos de forma particionada con MrBayes 3.1.2. (Huelsenbeck y Ronquist 2001), donde se utilizó un modelo diferente para cada posición del codón de la secuencia de COI, de esta manera, se empleó el modelo GTR+I+G para la primera posición, F81 para la segunda posición, y el modelo GTR+G, para la tercera posición. La selección del mejor modelo para cada posición en este análisis se realizó con el programa jModelTest 0.1 (Posada 2008), utilizando el criterio del mínimo valor de AIC (Criterio de Información de Acaike), como principal parámetro para la elección del modelo.

En todos los análisis se designó a *Musca domestica* Linnaeus, 1758, *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) y *Glossina moritans* Westwood, 1851 como grupos externos.

Debido a que otros estudios sugieren la importancia de agregar varias secuencias por especies para no generar errores por insuficiencia de muestreo (Lanteri 2007), los análisis de distancia interespecífica se desarrollaron nuevamente excluyendo las especies que presentaron solo una secuencia en los análisis anteriores (excepto los grupos externos). Adicionalmente, se hicieron análisis en donde la especie *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819), fue dividida en dos subgrupos o clados, donde el clado 1 está conformado por *L. eximia* BRA2, BRA3, BRA4 y SMTA; y el clado 2 por *L. eximia* ARSL, BGRE y BRA.

A través del programa en línea Fingerprint. <http://evol.mc-master.ca/fingerprint> (Lou y Golding 2007), se realizó una representación compuesta de la variación del fragmento de COI para cada una de las especies aquí evaluadas, esta representación ilustra la heterogeneidad en un sitio específico dentro de la región de código de barras, como un porcentaje de la línea vertical trazada para representar la heterogeneidad en cada par de bases en sitios específicos (Fisher y Smith 2008).

ductos de purificación se enviaron a MACROGEN (Korea) donde se secuenciaron.

Análisis de secuencias. Las secuencias obtenidas, se verificaron mediante la herramienta BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y Barcoding of life Data (BOLD) System (www.barcodinglife.org; Ratnasingham y Hebert 2007). Posteriormente se editaron manualmente utilizando los programas BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.9.0; Hall 1999) y se alinearon con el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.* 1994), en el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011), teniendo en cuenta la corrección de los marcos de lectura, para evitar que dentro de la secuencia se encuentren codones de parada, debido a que estas secuencias son codificantes.

Con MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011), se realizaron los análisis de divergencia de secuencias de nucleótidos con distancias genéticas inter e intra-específicas (las intra específicas solamente se realizaron con las especies que se contaban con

Figura 3. Árbol de “neighbour-joining” con el modelo de distancia Kimura 2 parámetros (K2P), a partir de secuencias de COI de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense y tres secuencias pertenecientes a dípteros no califóridos.

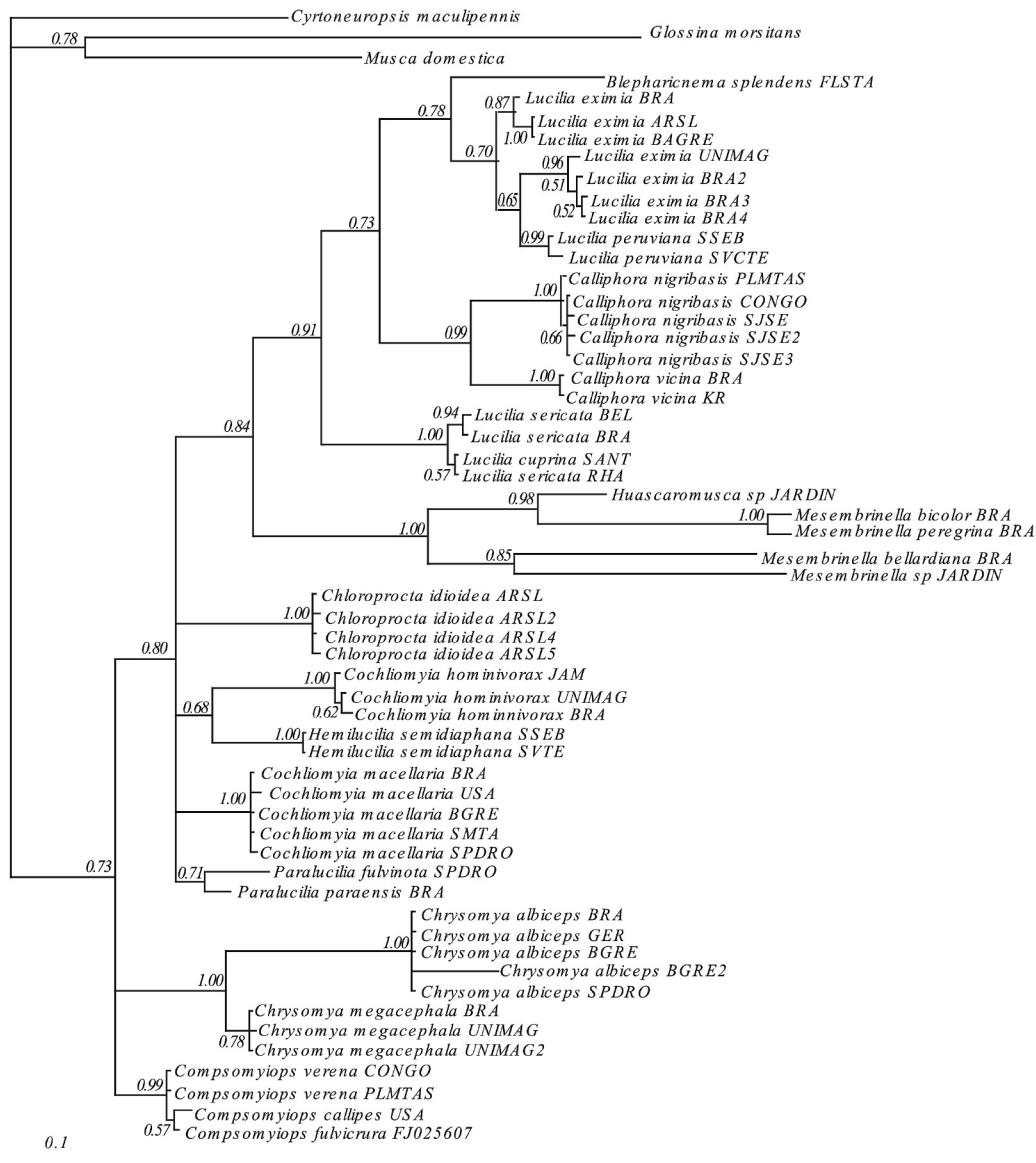


Figura 4. Análisis bayesiano particionado. Modelo GTR+I+G para la primera posición, F81 para la segunda posición y emodelo GTR+G, para la tercera posición. La selección del mejor modelo para cada posición en este análisis se realizó con el programa JmodelTest 0.1 (Posada 2008).

grupo de *L. eximia*, donde uno de los subgrupos (BAGRE, ARSL, BRA) está más relacionado con *L. peruviana*, que con el segundo subgrupo de *L. eximia* (UNIMAG, USA, BRA2, BRA3), es de gran importancia reconocer que se presentan altos valores de soporte en la definición de este grupo representado por *L. eximia* (UNIMAG, USA, BRA2, BRA3) y *L. peruviana*.

Análisis bayesiano (BA). En el análisis bayesiano aparece una distribución diferente, pero a su vez, puede ser dividida en tres grupos fácilmente reconocibles (Fig. 4). Un primer grupo, donde se encuentran representantes de los géneros *Chrysomya* y *Comptosomyiops*, conservándose un clado dentro del género *Chrysomya* con un valor de probabilidad posterior de 1.00. Un segundo grupo conformado por los géneros *Lucilia*, *Calliphora*, *Blepharicnema*, *Huascaromusca* y *Mesembrinella*; se mantiene una asociación igual a la observada en el análisis NJ, donde un subgrupo de *L. eximia* (SMTA, USA,

BRA2, BRA3), se encuentra más cercanamente relacionado con *L. peruviana*, que al otro subgrupo de *L. eximia* (BRA, ARSL, BAGRE). El tercer grupo está conformado por una politomía entre los géneros *Chloroprocta*, *Cochliomyia*, *Hemilucilia* y *Paralucilia*.

Ilustración de heterogeneidad de COI por especies. Gracias a las ilustraciones obtenidas mediante la herramienta FINGERPRINT (Lou y Golding 2007), podemos observar gráficamente las características de las secuencias, donde se observa, para cada especie, una mayor frecuencia de Adeninas y Timinas (Fig. 5).

Discusión y conclusiones

Es importante destacar que en este trabajo, el valor promedio de la distancia intra-específica, estuvo por encima de los valores registrados para Lepidópteros por Hebert *et al.*

(2003), *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) por Nelson *et al.* (2007) y para *Protophormia* (Diptera: Calliphoridae) por Whitworth *et al.* (2007), quienes registran valores promedio inferiores a 1%; aunque en los trabajos realizados en colémbolos (Hexapoda: Collembola) por Hogg y Hebert (2004) y en *Utracoelostoma* spp. (Hemiptera: Margarodidae) por Ball *et al.* (2005), estos valores llegan a ser superiores a los aquí registrados, presentando valores promedio de distancia intra-específica, superiores a 7,5%.

Así mismo, se sigue dando una gran discusión sobre la importancia de la aparición del gap entre las distancias intra e inter-específicas, para evaluar de esta manera la utilidad del gen COI para la delimitación de especies (Meyer y Paulay 2005). En nuestro análisis de distancias, donde se incluyen todas las especies (inclusive las que solo presentan una secuencia), no es posible la aparición de este gap debido al solapamiento que se observa entre las distancias intra e inter-específicas (Fig. 1), este solapamiento se da principal-

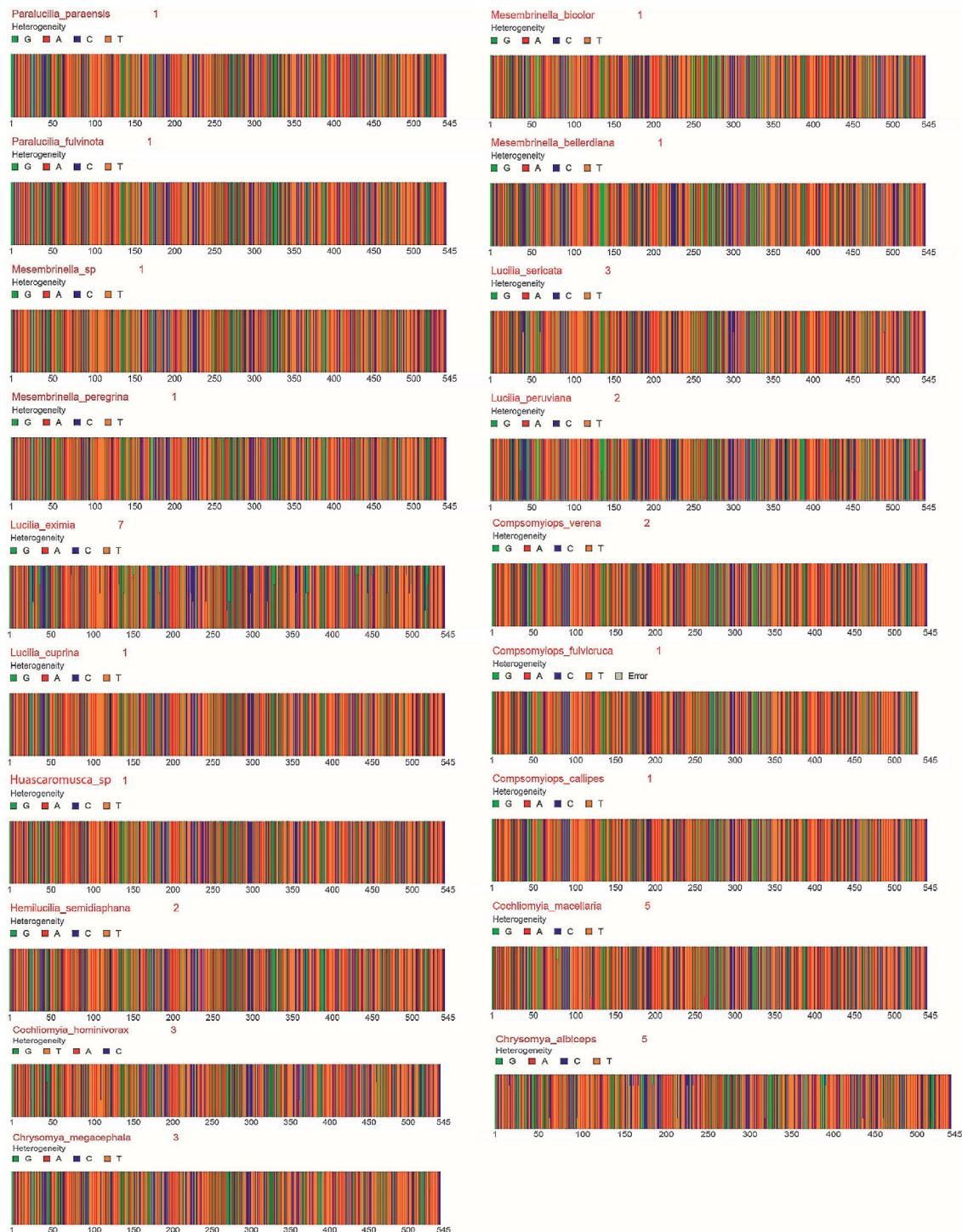


Figura 5. Códigos de barras generados través de la herramienta en línea FINGERPRINT (Lou y Golding 2007). El número al lado del nombre de la especie, representa el número de secuencias utilizadas para la generación del código de barras.

mente por los valores de distancias inter-específicas entre especies del género *Comptosmyiops* (*C. callipes* (Bigot, 1877) x *C. fulvicruca*; *C. callipes* x *C. verena*; *C. fulvicruca* x *C. verena*); además de las comparaciones entre *Mesembrinella bicolor* (Fabricius 1805) x *Mesembrinella peregrina* Aldrich, 1922 y *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) x *Lucilia sericata* (Meigen, 1826). Cabe resaltar, que en las especies que causan este solapamiento de distancias, solo hay disponible una secuencia, excepto *L. cuprina* (n = 2) y *C. vicina* (n = 2), de esta manera, este solapamiento es causado seguramente por el sesgo existente en el número de muestras utilizadas en este análisis (Meyer y Paulay 2005), por lo que se hace importante la realización de análisis que incluyan un mayor número de secuencias por cada especie y que representen en gran medida la variación geográfica de las especies estudiadas (Lanteri 2007).

Ha sido documentado, que especies con recientes procesos de especiación o posibles problemas en la taxonomía, han mostrado problemas en la aplicación de códigos de barras, lo que ocasiona que las distancias inter-específicas sean bajas causando el solapamiento de las distancias (Roe y Sperling 2007). En nuestro análisis, *L. eximia* presenta valores de distancia intraespecífica relativamente altos en comparación con otros grupos, además de que los análisis de NJ y Bayesianos la dividen en dos subgrupos, uno de ellos más relacionado con la especie *L. peruviana* que con el segundo subgrupo de *L. eximia*. De esta manera, al desarrollar el análisis excluyendo las especies con una sola secuencia y al separar a *L. eximia* en dos subgrupos, se logra observar un gap de distancias de 2,292% (Fig. 2), el cual es un valor óptimo para la validación de esta técnica (Meyer y Paulay 2005).

La monofilia del género *Chrysomya* ha sido registrada en varias oportunidades (Nelson *et al.* 2007; Singh y Wells 2011), lo cual es bien observado en todos los análisis aquí realizados, lo que nos garantiza la gran efectividad de este método en especies pertenecientes a este género.

Dentro de los análisis realizados, *Huascaromusca* sp., siempre se muestra cercanamente relacionada con el grupo [*M. bicolor*-*M. peregrina*], lo que nos muestra al género *Mesembrinella* como un grupo parafilético, pero se conserva la monofilia dentro de esta subfamilia. Una desventaja que se presenta, es que la especie *Huascaromusca* sp. y los demás integrantes de la subfamilia Mesembrinellinae, no han sido muy estudiados y presentan escasos registros en las bases de datos de ADN.

Es importante rescatar, que en todos los casos los valores de probabilidad posterior, como los soportes de bootstrap, en los análisis bayesianos y NJ respectivamente, fueron cercanos a 1 (100%) en los grupos que delinean especies, lo cual es de gran importancia en la validación de la técnica de códigos de barras, porque demuestra su eficiencia en la discriminación entre especies.

¿*Lucilia eximia* especie críptica? Los análisis de distancias, dentro de la técnica de códigos de barras genéticos, han sido muy aplicados en la detección de especies crípticas (Hebert *et al.* 2003; De Salle *et al.* 2005; Ball y Armstrong 2007; Roe y Sperling 2007), así pues, teniendo en cuenta que *L. eximia* muestra un alto valor de distancia intraespecífica, lo cual también se manifiesta en los análisis de NJ y bayesiano realizados, donde *L. eximia* no es monofilética, se presentan la hipótesis de que exista un proceso de especiación críptica

para esta especie y por ende se presentan de forma consistente estos dos grupos de *L. eximia*. Se hace necesario realizar estudios posteriores que incluyan secuencias que representen los rangos geográficos de distribución de esta especie.

De esta manera, podemos concluir que el gen COI es un buen marcador para delinear especies de la familia Calliphoridae en Colombia, excepto aquellas de la subfamilia Mesembrinellinae, debido a que no se obtuvo evidencia para comprobar la aplicabilidad de esta técnica en estas especies. Se recomienda utilizar un mayor número de secuencias por especie, quienes busquen representar las variaciones geográficas presentes por especie.

Agradecimientos

Al Fondo de Investigaciones de la Universidad del Magdalena (FONCIENCIAS), por la financiación del proyecto. A los miembros del Grupo de investigación de Evolución, Sistemática y Ecología Molecular de la Universidad del Magdalena. A la Bióloga Carolina Vélez del Grupo de Entomología de la Universidad de Antioquia por identificación taxonómica de los especímenes.

Literatura citada

- ALESSANDRINI, F.; MAZZANTI, M.; ONOFRI, V.; TURCHI, C.; TAGLIABRACCI, A. 2008. mtDNA analysis for genetic identification of forensically important insects. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1 (1): 584-585.
- AMAT, E. 2009. Contribución al conocimiento de las Chrysomyinae y Toxotarsinae (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 693-708.
- AMAT, E.; WOLFF, M. 2007. New records of *Blepharicnema splendens* (Calliphoridae: Calliphorinae, Luciliini) from Colombia. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 66 (1-2): 187-190.
- AMES, C.; TURNER, B.; DANIEL, B. 2006. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species – *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*. *Forensic Science International* 164: 179-182.
- ARMSTRONG, K. F.; BALL, S. L. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biology Sciences* 360: 1813-1823.
- BALL, S. L.; ARMSTRONG, K. F. 2007. Using DNA barcodes to investigate the taxonomy of the New Zealand sooty beech scale insect. *DOC Research & Development Series* 287. Department of Conservation, Wellington. 14 p.
- BALL, S. L.; HEBERT, P. D.; BURIAN, S. K.; WEBB, J. M. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society* 24: 508-524.
- BOEHME, P.; AMENDT, J.; ZEHNER, R. 2012. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. *Parasitology Research* 110: 2325-2332.
- BONATTO, S. B.; MARIONI, L. 2005. Gêneros e espécies novos de Mesembrinellinae (Diptera, Calliphoridae) da Costa Rica e Venezuela. *Revista Brasileira de Zoologia* 22 (4): 883-890.
- CATTS, E. P. 1992. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. *Journal of Agricultural Entomology* 9: 245-255.
- DAWNAY, N.; OGDEN, R.; MCEWING, R.; CARVALHO, G. R.; THORPE, R. S. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173: 1-6.

- DE SALLE, R.; EGAN, M.G.; SIDDALL, M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA Barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1905-1916.
- FISHER, B. L.; SMITH, M. A. 2008. A revision of Malagasy species of *Anochetus* Mayr and *Odontomachus* Latreille (Hymenoptera: Formicidae). *PLoS ONE* 3(5): e1787.
- FLÓREZ, E.; WOLFF, M. 2009. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. *Neotropical Entomology* 38 (3): 418-429.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- GIRALDO, P. A.; URIBE, S. I.; LÓPEZ, A. 2011. Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Colombiana de Entomología* 37 (2): 273-278.
- GUO, Y. D.; CAI, J. F.; XIONG, F.; WANG, H. J.; WEN, J. F.; LI, J. B.; CHEN, Y. Q. 2012. The utility of mitochondrial DNA fragments for genetic identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) in China. *Tropical Biomedicine* 29 (1): 51-60.
- GUIMARÃES, J. H. 1977. A systematic revision of the Mesembriellidae, stat. nov. (Diptera, Cyclorrhapha). *Arquivos de Zoologia* 29: 1-109.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- HARVEY, M. L.; GAUDIERI, S.; VILLET, M. H.; DADOUR, I. R. 2008. A global study of forensically significant calliphorids: Implications for identification. *Forensic Science International* 177: 66-76.
- HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54: 852-859.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DE WAARD, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 270: 313-322.
- HOGG, I. D.; HEBERT, P. D. 2004. Biological identifications of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 82: 749-754.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Biometrics* 17: 754.
- JORDAENS, K.; SONET, G.; RICHET, R.; DUPONT, E.; BRAET, Y.; DESMYTER, S. 2013. Identification of forensically important *Sarcophaga* species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene. *International Journal of Legal Medicine* 127: 491-504.
- KIMURA, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- LANTERI, A. A. 2007. Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 66 (3-4): 15-25.
- LOU, M.; GOLDING, G. B. 2007. Fingerprint: visual depiction of variation in multiple sequence alignments. *Molecular Ecology Notes* 7: 908-914.
- MARINHO, M. A. T.; JUNQUEIRA, A. C. M.; PAULO, D. F.; ESPOSITO, M. C.; VILLET, M. H.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. 2012. 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*. 65: 840-854.
- MEIKLEJOHN, K. A.; WALLMAN, J. F.; DOWTON, M. 2011. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *International Journal of Legal Medicine* 125: 27-32.
- MEYER, C. P.; PAULAY, G. 2005. DNA Barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biology* 3 (12): E422.
- NELSON, L. A.; WALLMAN, J. F.; DOWTON, M. 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology* 21: 44-52.
- PAPE, T.; WOLFF, M.; AMAT, E. C. 2004. Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófágidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana* 5 (2): 201-208.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.
- REMIGIO, E. A.; HEBERT, P. D. 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 (3): 641-647.
- ROE, A. D.; SPERLING, F. A. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44 (1): 325-345.
- SCHROEDER, H.; KLOTZBACH, H.; ELIAS, S.; AUGUSTIN, C.; PUESCHEL, K. 2003. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Science International* 132: 76-81.
- SINGH, B.; WELLS, J. D. 2011. Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) is monophyletic: a molecular systematic analysis. *Systematic Entomology* 36 (3): 415-420.
- STEVENS, J.; WALL, R. 2001. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Science International* 120: 116-123.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2731-2739.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of the progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- WALLMAN, J. F. 2001. A key to the adults of species of blowflies in southern Australia known or suspected to breed in carrion. *Medical and Veterinary Entomology* 15: 433-437.
- WELLS, J. F.; LAMOTTE, L. 2001. Estimating the postmortem interval. pp. 367-384. En: Jason, H.; Byrd; Castner, J. *Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations*, Second edition. CRC Press. 440 p.
- WHITWORTH, T. L.; DAWSON, R. D.; MAGALON, H.; BAUDRY, E. 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 274: 1731-1739.
- WOLFF, M.; URIBE, A.; ORTIZ, A.; DUQUE, P. 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. *Forensic Science International* 120: 53-59.
- YADONG, G.; JIFENG, C.; XINGHUA, W.; LINGMEI, L.; QIN-LAI, L.; XIANG, L.; YUNFENG, C.; ZHONG, M.; XIANG, W.; JIFANG, W. 2010. Identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) based on COI gene in China. *Romanian Journal of Legal Medicine* 18 (3): 217-224.

Recibido: 15-mar-2013 • Aceptado: 23-oct-2013

Citación sugerida:

SOLANO, JAIBER J.; MARTA WOLFF y LYDA R. CASTRO. 2013. Identificación molecular de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (2): 281-290.