

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN/RESEARCH ARTICLE

ITS2 PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CALIFÓRIDOS (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) DE IMPORTANCIA FORENSE EN COLOMBIA

ITS2 for the Identification of Calliphoridae (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance in Colombia

Edison R. LEA-CHARRIS¹; Marta WOLFF²; Lyda R. CASTRO¹.

¹ Grupo de Investigación en Evolución, Sistemática y Ecología Molecular INTROPIC, Universidad del Magdalena. Carrera 32 n°. 20-08. Santa Marta, Colombia.

² Directora de las Colecciones Entomológicas, Universidad de Antioquia. Calle 70 n°. 52-21. Medellín, Colombia.

³ Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Magdalena. Carrera 32 n°. 20-08, Sector San Pedro Alejandrino. Santa Marta, Colombia.

For correspondence. encholea@gmail.com

Received: 13th January 2016, **Returned for revision:** 15th February 2016, **Accepted:** 21st March 2016.

Associate Editor: Geraldo Mäder.

Citation/Citar este artículo como: Lea-Charris ER., Wolff M, Castro LR. ITS2 para la identificación de Califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Acta biol. Colomb.* 2016;21(3):543-553. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n3.55085>

RESUMEN

La entomología forense es una disciplina que utiliza insectos para obtener información útil en la determinación del intervalo postmortem (IPM). Las moscas de la familia Calliphoridae son muy utilizadas en entomología forense, sin embargo, su identificación a nivel de especie puede dificultarse cuando el individuo se encuentra incompleto o en estadio inmaduro. En el presente trabajo, se evaluó el potencial de la región ITS2 del genoma nuclear para la identificación de especies de Calliphoridae en Colombia utilizando tres aproximaciones: comparando distancias genéticas utilizando la metodología de códigos de barra, haciendo una reconstrucción filogenética, y con enzimas de restricción (PCR-RFLPs). Se secuenciaron un total de 520 pb en 44 individuos pertenecientes a 16 especies. Se calcularon los valores de distancia intraespecífica e interespecíficas utilizando el modelo K2P. Los valores de distancia intraespecífica oscilaron entre 0 y 0,252 %, mientras que las distancias interespecíficas fluctuaron entre 3,6 y 18,9 %, evidenciándose que esta técnica puede ser utilizada como código de barras genético en la identificación de especies de la familia Calliphoridae. Tanto en los análisis de Neighbour-Joining como en los análisis bayesianos el 90 % de los géneros presentan una monofilia sustentada en probabilidad posterior de 0,89 a 1. En todos los casos la especie *Blepharicnema splendens* agrupa con el género *Lucilia*. Con base en las secuencias obtenidas se utilizó la aplicación NEBCutter para identificar cuatro enzimas de restricción las cuales se probaron en el laboratorio y se comprobó su utilidad para la identificación rápida de especies de Calliphoridae en Colombia.

Palabras clave: códigos de barra genéticos, enzimas de restricción, intervalo post-mortem, genoma nuclear.

ABSTRACT

Forensic entomology is a discipline that uses insects to obtain useful information for the determination of the postmortem interval (PMI). Flies of the family Calliphoridae are extensively used for this purpose, however, the identification of these flies can be difficult when the individual is not an adult or when it is incomplete. In the present work, we tested the utility of the ITS2 region of the nuclear genome for the identification of Calliphoridae species in Colombia using three approaches: comparing genetic distances using the barcoding methodology, with a phylogenetic reconstruction, and with PCR-RFLPs. We sequenced 520 bp in 44 individuals belonging to 16 species of califorids. Intraspecific and interspecific distance values were calculated using the K2P model. The intraspecific distance values ranged between 0 and 0.252 %, while the interspecific distance values ranged between 3.6 and 18.9 %, indicating that this gene can be used as a genetic barcode for the identification of species of the Calliphoridae family. Both the Neighbour-Joining and Bayesian analyses recovered 90 % of the genera as monophyletic, with pp values between 0.89 and 1. *Blepharicnema splendens* was always recovered within the *Lucilia* genera. Based on the obtained sequences we used the NEBCutter application to identify four restriction enzymes that cut in a differential way and generated useful patterns for the identification of the species. The enzymes were successfully tested and confirmed the utility of this technique as a fast way to identify species of Calliphoridae in Colombia.

Keywords: nuclear genome, phylogeny, post-mortem interval, restriction enzymes.



INTRODUCCIÓN

Los Díptera de las familias Calliphoridae, Sarcophagidae y Muscidae se asocian a los olores de la descomposición cadavérica, y debido a su capacidad de vuelo, a menudo se encuentran entre los primeros organismos en llegar a un cadáver, constituyéndose en el principal grupo de insectos hallados en escenas de crimen (Byrd y Castner, 2001). Su ciclo de vida y el ensamblaje de sus comunidades aportan datos valiosos para el esclarecimiento de los casos forenses, debido a que son utilizados como indicadores o herramientas al momento de determinar el intervalo postmortem (IPM) (Wolff *et al.*, 2001; Amat, 2009). Las moscas Calliphoridae pueden llegar en minutos a un cadáver e inmediatamente iniciar el proceso de ovoposición en orificios naturales, como la nariz, las orejas, la boca, los ojos, el ano, los genitales, y sitios de trauma (Kulshrestha y Chandra, 1987; Turner, 1987).

Esta familia está representada con alrededor de 1000 especies en el mundo, de las cuales aproximadamente 120 se encuentran en el Neotrópico, distribuidas en las cinco subfamilias: Calliphorinae, Lucilinae, Chrysomyinae, Melanomyiinae y Mesembrinellinae, cuatro de ellas presentes en Colombia (Pape *et al.*, 2004; Mavárez-Cardozo *et al.*, 2005) con cerca de 40 especies (Kosmann *et al.*, 2013), 15 con registros de interés forense (Yusseff, 2006; Amat, 2009; Flórez y Wolff, 2009).

Sin embargo, los califóridos se han estudiado poco en el país, muchos registros se restringen a las localidades tipo o a ejemplares recolectados y estudiados por especialistas extranjeros y depositados en sus colecciones (Amat, 2009). Pese a que la entomología forense ya es una herramienta legal en Colombia (Código de Procesamiento Penal, 2004), se presenta una gran dificultad en la identificación de las especies en sus estadios inmaduros, ya que aunque existen algunas claves, se requiere su cría hasta que son adultos para la confirmación de las especies, lo que implica mucho tiempo y además, se requiere que las larvas se colecten vivas y se mantengan en condiciones adecuadas para su desarrollo (Ames *et al.*, 2006).

Es por esto, que la utilización de las herramientas moleculares en casos forenses, ha tomado un gran impulso e importancia, ya que son un método efectivo para la identificación de especies a partir del uso de regiones nucleares como lo es la región ITS2 y regiones mitocondriales como el gen COI, así como también el gen citocromo B (Cytb) (Nelson *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2008; Giraldo *et al.*, 2011; GilArriorta *et al.*, 2013).

La evidencia creciente sugiere que la región ITS2 rDNA es un buen marcador filogenético a nivel de especie y/o género, siendo una región relativamente corta, con alto contenido de información (Coleman, 2003). Además, esta región ya ha sido utilizada para la discriminación entre especies, siendo considerada una región potencial para ser usada como código de barra genético por sus características que incluyen, la disponibilidad de regiones conservadas para

diseñar primers específicos, su facilidad de amplificación y porque presenta variabilidad suficiente incluso para distinguir especies relacionadas o cercanas (Nelson *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008; Meiklejohn *et al.*, 2011).

Con base en lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el uso del biomarcador ITS2 para la identificación de Calliphoridae de importancia forense en Colombia utilizando la metodología de análisis propuesta para códigos de barra, a través de una aproximación filogenética y aplicando enzimas de restricción (PCR-RFLP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras utilizadas en este trabajo son descritas por Solano *et al.*, (2013) y fueron colectadas en diferentes altitudes en Colombia para abarcar idealmente la mayor diversidad de especies (Fig. 1).

Extracción de ADN

La extracción se realizó a partir de fragmentos de tejido muscular removido de la zona torácica de cada mosca (Stevens y Wall, 2001; Ball *et al.*, 2005). Se utilizó el kit QIAGEN (DNeasy Blood & Tissue Kit, 250), siguiendo el protocolo del fabricante (DNesay Bloody & Tissue Handbook de Qiagen). La verificación de la extracción de ADN y su calidad se comprobaron por medio de un gel de agarosa de 2 % con una tinción de GelRed (Biotium).

Amplificación y secuenciación

Para la amplificación del gen ITS2 del genoma nuclear se utilizaron los primers usados por Ratcliffe *et al.*, (2003) y Nelson *et al.*, (2008) cuya secuencia es 52R (5-GTTAACTTTCTTTTCCTCCCCT-3) y L1 (5-RRCGGTGGATCACTCGGCTC-3). Para las reacciones de PCR se utilizaron 2 µl de ADN extraído en reacciones de 25 µL, usando concentraciones finales de cada reactivo de la siguiente manera: 0,1 U/mL de Taq Polimerasa (0,5 µL de Taq Polimerasa 5U/mL; abm), 3,5 mM de MgCl₂ (3,5 µL de MgCl₂ a 25mM; abm), 1X de Buffer PCR (No MgCl₂; 2,5 µL de Buffer PCR a 10X; abm), 0,25mM de dNTP's (0,65µL de dNTP's a 10mM; Bioline), 0,4mM de cada primer (1µL de cada primer a 10mM) y se completó con agua destilada previamente autoclavada, hasta alcanzar 25 µL de reacción de PCR.

Los ciclos de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a lo sugerido por Nelson *et al.*, (2008) modificado, con una temperatura inicial de desnaturalización de 94 °C durante dos minutos, seguido de 30 ciclos con los siguientes parámetros: 30 segundos a 94 °C, 35 segundos a 56,1 °C y un minuto a 72 °C, seguido por un paso de extensión final a 72 °C por cinco minutos.

Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con GelRed (Biotium). Seguido de la amplificación se realizó la purificación de las muestras usando el kit de ácidos nucleicos

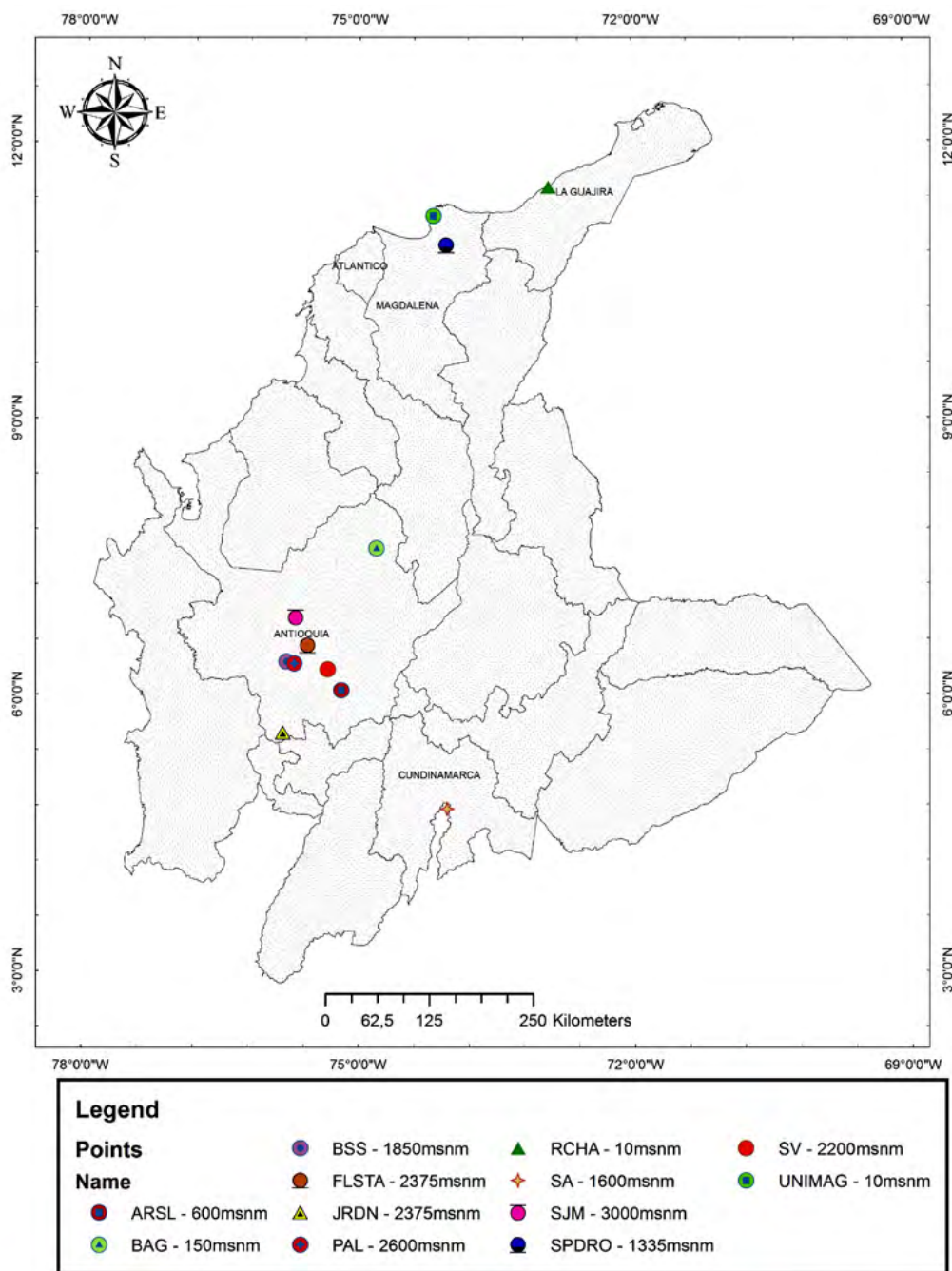


Figura 1. Diferentes puntos altitudinales de cada departamento donde fueron colectadas las muestras.

y proteínas MACHEREY-NAGEL (NucleoSpin® Extract II), aplicando el protocolo del proveedor. El producto purificado fue secuenciado en la empresa MACROGEN (Korea).

Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas, fueron verificadas mediante la herramienta BLAST de NCBI y posteriormente fueron editadas manualmente utilizando los programas BioEdit (v. 7.0.9.0) (Hall, 1999) y MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Se hicieron alineamientos utilizando el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), bajo los parámetros de 30 en la apertura de gaps al inicio, y 15 de extensión de los mismos. Para evaluar la utilidad de la región ITS2 en la identificación molecular de las muestras se hicieron tres análisis: un análisis de distancias genéticas como lo sugiere la metodología de código de barras (Hebert *et al.*, 2003), una aproximación filogenética utilizando métodos bayesianos y una digestión con enzimas de restricción (RFLPs).

Análisis de distancia

Los análisis de distancia genética entre las secuencias se realizaron a través del programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) a partir del modelo de distancia Kimura 2 parámetros (K2P) (Kimura, 1980), con un bootstrap de 1000 réplicas. Con base en esto, se realizó un análisis de distancia Neighbour-Joining (NJ), el cual representa gráficamente las relaciones y patrones de distancia genética entre las especies; se realizó el análisis polimórfico a través del programa DnaSP 5.0 (Librado y Rozas, 2009), donde se calculó la diversidad haplotípica nucleotídica y los sitios segregantes.

Reconstrucción filogenética

Se hicieron análisis bayesianos con MrBayes 3.2.3 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), a partir del modelo de sustitución de nucleótidos de tiempo generacional con distribución Gamma (GTR+G; InL=6303.610; K=9; AIC=12625.2217) que fue previamente provisionado por MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). Se designó a *Sarcophagidae* sp. como grupo externo en todos los análisis.

Digestión de las enzimas de restricción en ITS2

Usando el programa BioEdit (Hall, 1999), los datos de las secuencias de ITS2 fueron evaluados y analizados para encontrar la presencia de sitios de restricción únicos que fueron usados para el análisis de PCR-RFLP. Las enzimas de restricción aplicadas son las sugeridas por Nelson

(2008) y Roberts *et al.*, (2003), evaluadas por la aplicación NEBCutter.

Los productos de PCR de la región ITS2 fueron digeridos por separado con la enzima de restricción DraI (TTT|AAA), AseI (AT[^]TA₋AT), FaeI ([^]CATG₋), LpnPI (CCDGNNNNNNNNNN[^]NNNN₋) (New England Biolabs). Se usaron 15 µL de producto de PCR, el cual fue digerido por 1 - 1,5 h a una temperatura de 37° a 55 °C dependiendo de la enzima de restricción, con un total de 3µL de cada enzima. Los productos de la digestión fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con GelRed (Biotium).

RESULTADOS

Características de las secuencias

Las secuencias editadas presentaron un total de 520 nucleótidos, se obtuvieron 44 secuencias de las 16 especies de califóridos estudiados. Todas las secuencias se encuentran disponibles en la base del GenBank (con códigos de acceso KP723289–KP723332 (Tabla 1). Se encontró que la composición nucleotídica promedio fue de T= 36,3 %, C= 12,6 %, A=36,0 % y G=15,2 %. La frecuencia de las transiciones (31,29 %) fueron menores a las transversiones (68,72 %).

A través del programa Dna SP 5.0 (Librado y Rozas, 2009) se encontró que las 44 secuencias presentan un total de 208 sitios segregantes, haplotipos (h=25), diversidad haplotípica (h)=0,956 y nucleotídica (Pi)=0,23773.

Tabla 1. Relación de cada secuencia con su respectivo código del GenBank.

Especie y Localidad	Código GenBank
<i>Blepharicnema splendens</i> FSTA	KP723289
<i>Chloroprocta idiodea</i> ARSL 1	KP723290
<i>Chloroprocta idiodea</i> ARSL 2	KP723291
<i>Chloroprocta idiodea</i> SVCTE	KP723292
<i>Cochliomyia macellaria</i> BGRE	KP723293
<i>Cochliomyia macellaria</i> SPDRO	KP723294
<i>Compsomyiops verena</i> PAL	KP723295
<i>Compsomyiops verena</i> SJM	KP723296
<i>Calliphora nigribasis</i> PAL	KP723297
<i>Calliphora nigribasis</i> SJM 1	KP723298
<i>Calliphora nigribasis</i> SJM 2	KP723299
<i>Calliphora nigribasis</i> SJM 3	KP723300
<i>Calliphora nigribasis</i> SJM 4	KP723301
<i>Calliphora nigribasis</i> SJM 5	KP723302
<i>Calliphora nigribasis</i> SJM 6	KP723303
<i>Chrysomya albiceps</i> BGRE	KP723304
<i>Chrysomya albiceps</i> SMTA	KP723305
<i>Chrysomya albiceps</i> BGRE	KP723306
<i>Chrysomya albiceps</i> SPDRO	KP723307
<i>Chrysomya megacephala</i> SMTA 1	KP723308
<i>Chrysomya megacephala</i> SMTA 2	KP723309
<i>Cochliomyia hominivorax</i> SMTA	KP723310

Especie y Localidad	Código GenBank
<i>Hemilucilia semidiaphana</i> SPDRO	KP723311
<i>Hemilucilia semidiaphana</i> SVCTE	KP723312
<i>Huascaromusca</i> sp JRDN 1	KP723313
<i>Huascaromusca</i> sp JRDN 2	KP723314
<i>Huascaromusca</i> sp JRDN 3	KP723315
<i>Huascaromusca</i> sp JRDN 4	KP723316
<i>Lucilia purpurascens</i> SVCTE	KP723317
<i>Lucilia purpurascens</i> BSS	KP723318
<i>Lucilia purpurascens</i> SNVCTE	KP723319
<i>Lucilia cuprina</i> SANT 1	KP723320
<i>Lucilia cuprina</i> SANT 2	KP723321
<i>Lucilia eximia</i> BAG	KP723322
<i>Lucilia eximia</i> ARSL	KP723323
<i>Lucilia eximia</i> SMTA	KP723324
<i>Lucilia sericata</i> RCHA 1	KP723325
<i>Lucilia sericata</i> RCHA 2	KP723326
<i>Mesembrinella patriciae</i> JRDN 1	KP723327
<i>Mesembrinella patriciae</i> JRDN 2	KP723328
<i>Mesembrinella patriciae</i> JRDN 3	KP723329
<i>Mesembrinella patriciae</i> JARDN 4	KP723330
<i>Paralucilia fulvinota</i> SPDRO 1	KP723331
<i>Paralucilia fulvinota</i> SPDRO 2	KP723332

Distancias Genéticas

Los valores de distancia interespecíficas de ITS2 variaron de 3,6 % (*L. sericata* y *L. cuprina*), a 18,9 % entre (*L. cuprina* y *L. eximia*). Los valores de distancias entre géneros variaron entre 10,5 % entre (*L. purpurascens* y *B. splendens*) y 39,7 % entre (*L. eximia* y *M. patriciae*) (Tabla. 2).

La distancia intraespecífica se calculó partiendo de que las secuencias analizadas tienen más de un individuo por especie secuenciado ($n \geq 2$), dando como resultado un

promedio de 4,6 % (Tabla. 3), presentando variaciones entre 0 % (SE: 0; *C. nigribasis*, *L. cuprina*, *L. purpurascens*, *L. sericata*, *M. patriciae* y *P. fulvinota* donde la distancia intraespecífica es igual a 0) y un máximo de 11,1 % (*C. macellaria*).

Análisis de distancia Neighbour – Joining (NJ)

Se lograron evidenciar cuatro grupos correspondientes a las subfamilias Lucilinae, Chrysomyinae, Mesembrinellinae y Calliphorinae (Fig. 4). El primer grupo correspondió a la

Tabla 2. Tabla de distancias interespecíficas (en negrilla) de Califóridos de importancia forense a partir de las diferencias entre las secuencias de nucleótidos de ITS2. Los valores mínimos y máximos están subrayados. Resaltados valores min y max de distancias entre géneros.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Blepharicnema splendens</i>	-														
2 <i>Calliphora nigribasis</i>	0,167	-													
3 <i>Chloroprocta idiodea</i>	0,277	0,311	-												
4 <i>Chrysomya megacephala</i>	0,227	0,257	0,223	-											
5 <i>Chrysomya albiceps</i>	0,223	0,268	0,228	0,072	-										
6 <i>Cochliomyia hominivorax</i>	0,225	0,224	0,243	0,200	0,195	-									
7 <i>Cochliomyia macellaria</i>	0,277	0,283	0,204	0,250	0,241	0,187	-								
8 <i>Comptosomyiops verena</i>	0,303	0,323	0,290	0,241	0,252	0,263	0,240	-							
10 <i>Huascaromusca</i> sp	0,277	0,294	0,348	0,227	0,237	0,292	0,377	0,327	-						
11 <i>Lucilia cuprina</i>	0,106	0,180	0,312	0,195	0,212	0,233	0,319	0,339	0,259	-					
12 <i>Lucilia eximia</i>	0,181	0,188	0,340	0,250	0,292	0,268	0,329	0,309	0,327	0,189	-				
13 <i>Lucilia purpurascens</i>	0,162	0,187	0,299	0,228	0,250	0,242	0,313	0,302	0,300	0,175	0,044	-			
14 <i>Lucilia sericata</i>	0,105	0,182	0,308	0,199	0,216	0,229	0,315	0,335	0,265	0,036	0,186	0,173	-		
15 <i>Mesembrinella patriciae</i>	0,339	0,332	0,384	0,279	0,277	0,353	0,471	0,389	0,290	0,322	0,397	0,344	0,331	-	
16 <i>Paralucilia fulvinota</i>	0,189	0,186	0,225	0,183	0,192	0,145	0,235	0,210	0,238	0,206	0,201	0,186	0,205	0,293	-

Tabla 3. Tabla de distancias intraespecífica. El análisis se realizó usando el modelo de distancia Kimura 2 parámetros (K2P). Partiendo de que las secuencias analizadas tienen más de un individuo por especie secuenciado ($n \geq 2$).

Especie (n)	Distancia
<i>Calliphora nigribasis</i> (7) Macquart, 1851	0,000
<i>Lucilia cuprina</i> (2) (Wiedemann, 1830)	0,000
<i>Lucilia purpurascens</i> (3) (Walker, 1836)	0,000
<i>Lucilia sericata</i> (2) (Meigen, 1826)	0,000
<i>Mesembrinella patriciae</i> (4) Wolff, 2013	0,000
<i>Paralucilia fulvinota</i> (2) (Bigot, 1877)	0,000
<i>Chrysomya albiceps</i> (3) (Wiedemann, 1819)	0,005
<i>Chrysomya megacephala</i> (2) (Fabricius, 1794)	0,018
<i>Lucilia eximia</i> (2) (Wiedemann, 1819)	0,026
<i>Comptosyios verena</i> (2) (Walker, 1849)	0,066
<i>Chloroprocta idiodea</i> (3) (Robineau-Desvoidy, 1830)	0,069
<i>Huascaromusca</i> sp (4)	0,089
<i>Cochliomyia macellaria</i> (2) (Fabricius, 1775)	0,111
Promedio	0,029

agrupación de las especies del el género *Lucilia*, pertenecientes a la subfamilia Lucillinae, el primer grupo sustentado con niveles de bootstrap del 99 % comprende a las especies *L. eximia* y *L. purpurascens*, y el segundo grupo compuesto por las especies *L. cuprina* y *L. sericata* sustentado con niveles de bootstrap del 99 %, sin embargo este último se encuentra asociado a la especie *B. splendens* (perteneciente a la subfamilia Calliphorinae) respaldado en un 93 % de niveles de bootstrap.

Un segundo grupo estuvo compuesto por la subfamilia Chrysomyinae sustentada en niveles de bootstrap de la siguiente manera: *Chloroprocta* (73 %), *Hemilucilia* (99 %), *Paralucilia* (87 %), *Comptosyios* (99 %), *Cochliomyia* (98 %) y *Chrysomya* (98 %).

El tercer grupo compuesto por los géneros *Huascaromusca* (94 %) y *Mesembrinella* (99 %) los cuales pertenecen a la subfamilia Mesembrinellinae (Kosmann *et al.*, 2013; Solano *et al.* 2013).

El cuarto grupo conformado por el género *Calliphora* respaldado por niveles de bootstrap del 99 % y pertenecientes a la subfamilia Calliphorinae (Kosmann *et al.*, 2013).

Análisis Bayesiano

Se realizó un análisis bayesiano (Fig. 5), a partir del modelo GTR+G, el cual fue provisionado por MrModeltest 2.3. El análisis arroja una parafilia en la subfamilia Lucilinae, sustentada en 0,99 de probabilidad posterior (p.p.), nuevamente se observa la asociación de *B. splendens* a la subfamilia Lucilinae.

Para la subfamilia Chrysomyinae de carácter polifilético en este estudio, se observa la completa monofilia sustentada en la p.p. de los géneros *Chrysomya* (0,96), *Chloroprocta*

(1), *Compsomyiops* (0,98) *Paralucilia* (0,98) y *Hemilucilia* (1) (Nelson *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2008; Marinho *et al.*, 2012; Solano *et al.*, 2013), mientras que el género *Cochcliomyia* es de carácter parafilético con una p.p. de 0,81.

Por último tenemos a la subfamilia Mesembrinellinae de carácter monofilético (Marinho *et al.*, 2012) con una p.p. del 0,77; y al género *Calliphora* de carácter monofilético respaldado con una p.p. igual a 1 perteneciente a la subfamilia Calliphorinae.

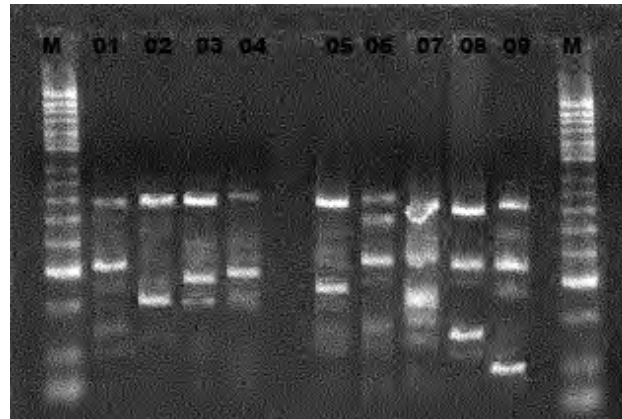


Figura 2. Gel de agarosa al 2 % donde se observan los PCR-RFLP obtenidos a partir de la digestión de ITS2 con *DraI*. En orden de izquierda a derecha con dos cortes, *C. albiceps* (1), *C. hominivorax* (2), *C. macellaria* (3) y *H. semidiaphana* (4); y con tres cortes *C. ideoida* (5), *L. purpurascens* (6), *L. cuprina* (7), *L. sericata* (8) y *P. fulvinota* (9). M= marcador molecular Hypperlader II (Bioline).

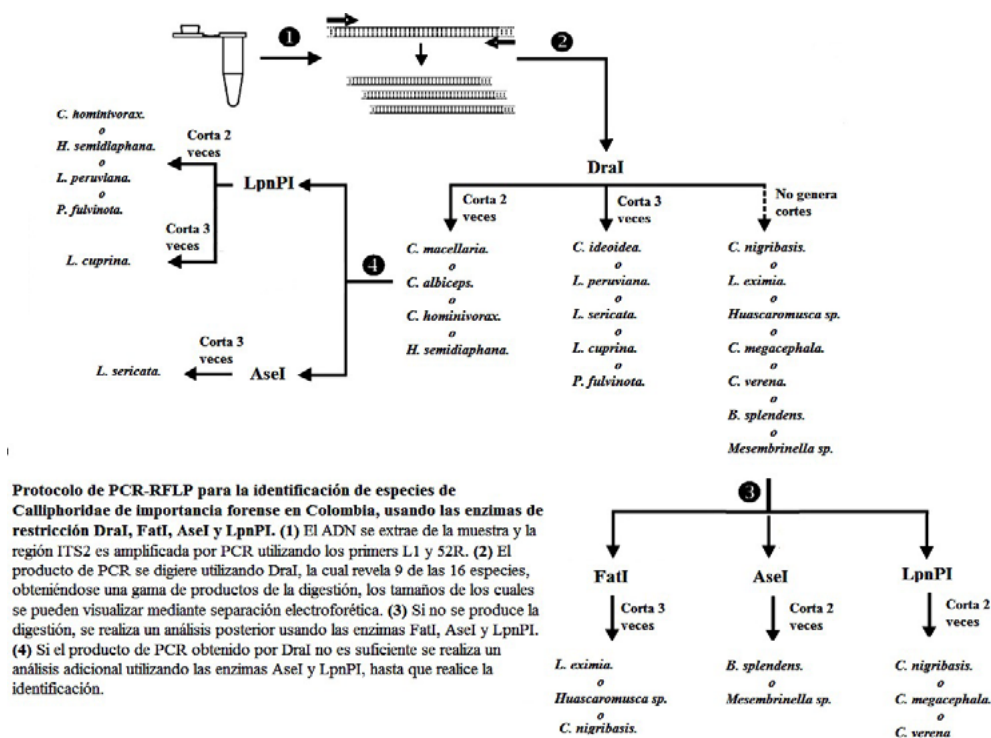


Figura 3. Protocolo de PCR-RFLP para la identificación de especies de Calliphoridae de importancia forense en Colombia, usando las enzimas de restricción *DraI*, *FatI*, *AseI* y *LpnPI*. Tomado y modificado de Nelson *et al.* (2008).

Análisis de restricción y digestión con la enzima DraI

Para las especies *C. idiodea*, *L. purpurascens*, *L. cuprina*, *L. sericata* y *P. fulvinota*, se obtuvieron tres sitios de restricción usando la enzima DraI, mientras que en *C. albiceps*, *C. hominivorax*, *C. macellaria* y *H. semidiaphana* se encontraron dos sitios de restricción (Fig. 2).

Digestión con las enzimas FatI, AseI y LpnPI

Al utilizar la enzima FatI se obtuvieron tres sitios de corte en las especies *C. nigribasis*, *L. eximia* y *Huascaromusca* sp. Utilizando la enzima AseI se identificaron tres sitios de corte para las especies *B. splendens*, *L. sericata*, *M. patriciae* y *L. cuprina*; por último tenemos a la enzima LpnPI, la cual presenta sitios de corte en las siguientes especies, dos cortes para *C. megacephala*, *C. hominivorax*, *C. nigribasis* y *C. verena*, y tres cortes para *L. sericata*, *L. purpurascens*, y *L. cuprina*. Hay que destacar que cada una de las enzimas anteriores no comparte el mismo sitio de restricción que la enzima DraI. A partir de estos resultados se propuso un protocolo rápido de identificación de especies de califóridos de importancia forense en Colombia utilizando la técnica PCR-RFLPs (Fig. 3).

DISCUSIÓN

La metodología de códigos de barra genéticos originalmente propuesta por Hebert *et al.*, (2003), emplea un fragmento del gen Citocromo Oxidasa I (COI) de aproximadamente 650 pb para discriminar entre especies. Este método ha sido aplicado exitosamente en varios estudios taxonómicos en diferentes grupos del orden Diptera (e.g. Renaud *et al.*, 2012; Conflitti *et al.* 2013; Chukwunonso *et al.*, 2013) y también ha sido utilizado para identificar especies de califóridos en diferentes países (e.g. Nelson *et al.*, 2007; Jordaens *et al.*, 2013) y en Colombia tanto con COI como con CytB (Giraldo *et al.*, 2011; Solano *et al.*, 2013).

Sin embargo algunos estudios sugieren que a pesar de que la región COI es sin duda de gran utilidad para la identificación de especies de importancia forense, no todas las especies se pueden identificar adecuadamente con este marcador (Wells y Williams, 2007; Harvey *et al.*, 2008; Boehme *et al.*, 2012). Por esta razón, otros genes (o fragmentos de genes), como la región ITS2, también han sido postulados como buenos marcadores (Nelson *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008).

En la aplicación de la herramienta de códigos de barra es necesario la implementación de los análisis de divergencia genética entre las especies, es decir, distancias intra e interespecíficas, en donde el valor inferior de la distancia interespecíficas se mantiene alejado del valor superior de la distancia intraespecífica, para evitar un solapamiento entre estos parámetros (Meyer y Paulay, 2005). Para la región ITS2 se ha reportado que la variación interespecíficas es considerablemente mayor que la intraespecífica (Navajas *et al.*, 1998; Roe y Sperling, 2007; Nelson *et al.*, 2008).

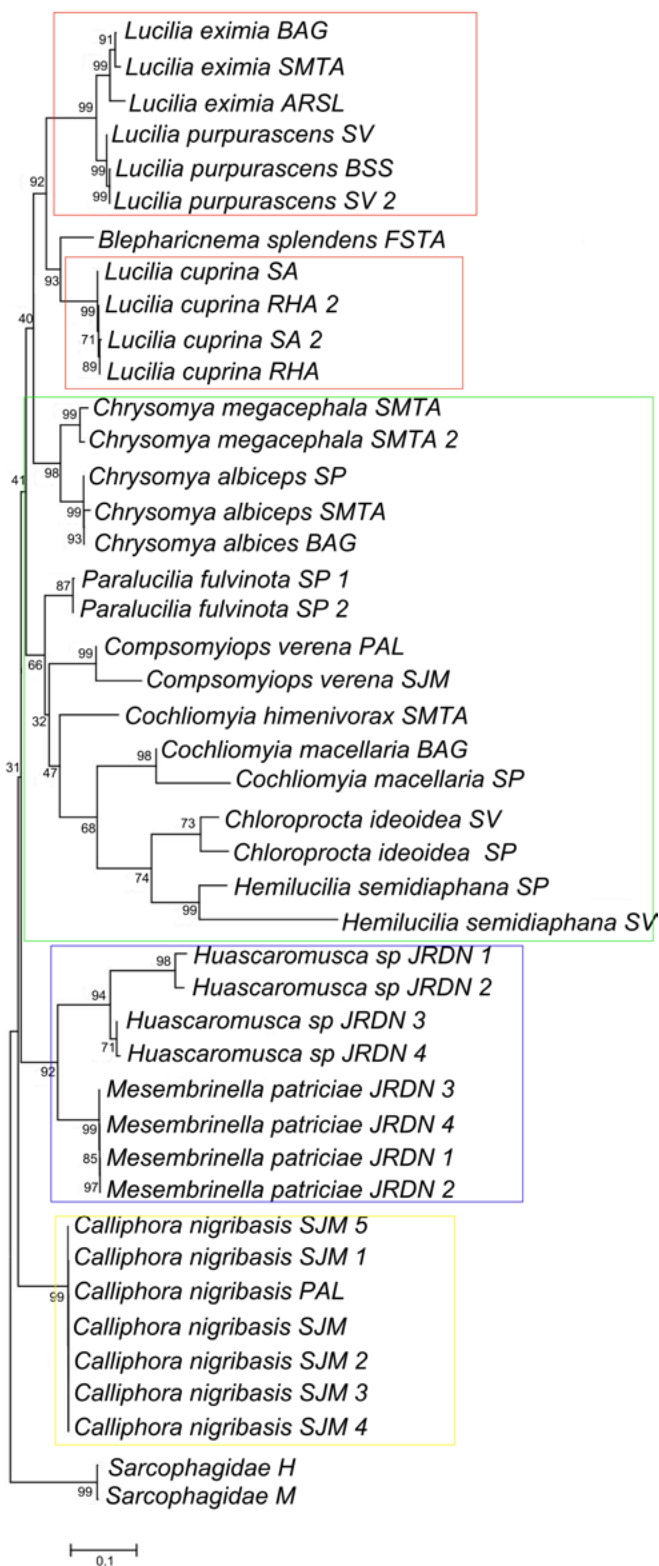


Figura 4. Análisis basado en la reconstrucción de distancias (NJ), a partir del modelo de distancia Kimura 2 Parámetros (K2P); subfamilia Lucilinae (Rojo), Chrysomyinae (Verde), Mesembrinellinae (Azul) y Calliphorinae (Amarillo).

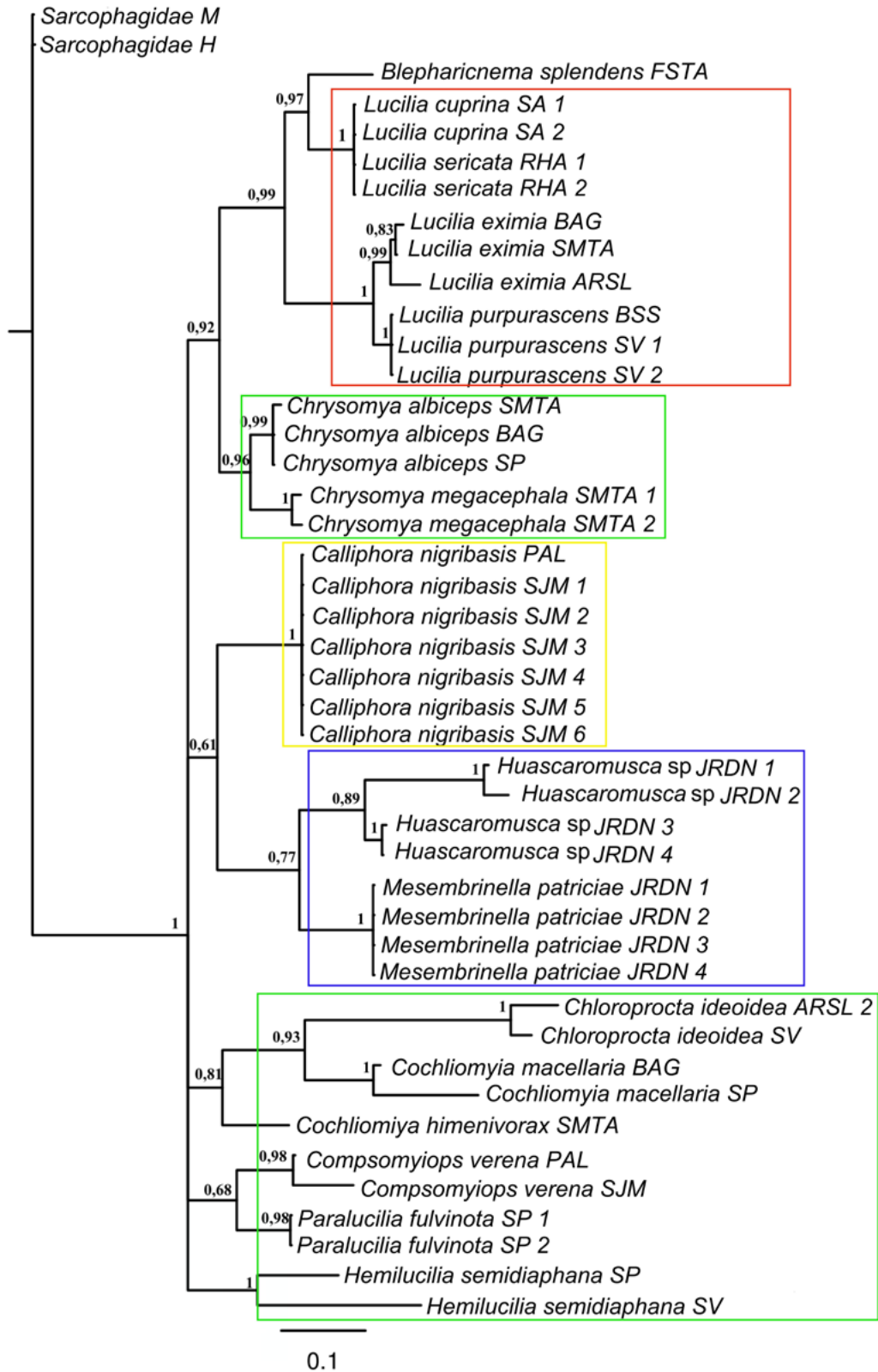


Figura 5. Reconstrucción filogenética a partir del Análisis Bayesiano, con el modelo GTR+G; subfamilia Lucilinae (Rojo), Chrysomyinae (Verde), Mesembrinellinae (Azul) y Calliphorinae (Amarillo).

En este trabajo, el valor promedio de las distancias intraespecífica reportadas fue de 2,9 %, y el valor promedio de las distancias interespecíficas fue de 12,5 %. Estos valores corresponden a los valores reportados para califóridos por Harvey *et al.*, (2008), para *Chrysomya* por Nelson *et al.*, (2007), al igual que para *Protocalliphora* por Whitworth *et al.*, (2007) y para *Comptosomyops* y *Chloroprocta* por Solano *et al.*, (2013). Desafortunadamente, sólo se calcularon las distancias interespecíficas para los géneros *Chrysomya*, y *Lucilia*, pues son los únicos géneros para los que tenemos más de una especie. Cuando se calculan las distancias entre géneros los valores, como es de esperarse, son altos (entre 10 % y 39,7 %). Para los análisis de distancia genética utilizando NJ-K2P se excluyeron las muestras de *Hemilucilia semidiaphana* pues en las comparaciones incluyendo esta especie se obtenían unas distancias genéticas muy grandes, que estaban muy lejos del promedio obtenido al excluirla.

Para el género *Chrysomya* en particular el promedio de las distancias interespecíficas fue de 0,076 y el promedio de las distancias intraespecífica de 0,0115; sin que se haya presentado solapamiento entre las distancias intra e interespecíficas, validando así, el uso de este gen como código de barra para el género *Chrysomya*. Lo mismo sucede en el género *Lucilia*, en donde se observó un promedio de distancias interespecíficas de 0,175 y de distancias intraespecífica de 0,00065, sin superposición entre los valores de distancias inter e intraespecífica, mostrando cierta afinidad a lo expresado por Giraldo *et al.*, (2011) con CytB aplicada a tres especies de este mismo género donde se encontraron con distancias interespecíficas de máximo 0,116.

Con respecto a la reconstrucción filogenética, el 90 % de todos los géneros presentan una monofilia marcada sustentada en p.p. de 0,89 a 1, destacándose el género *Chrysomya* el cual ya ha sido reportado como monofilético anteriormente (Wallman *et al.*, 2005; Wells y William, 2005; Nelson *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2008; Singh y Wells, 2011; Marinho *et al.*, 2012; Solano *et al.*, 2013). El otro 10 % son de carácter parafilético y corresponde a los géneros *Lucilia* y *Cochliomyia* respaldadas por una p.p. de 0,81 a 0,99. La especie *Blepharicnema splendens* se encuentra asociada a especies del género *Lucilia* respaldada por niveles de bootstrap de 93 % (Fig. 3) y con valores de p.p. de 0,97 (Fig. 4), esto corresponde a lo encontrado por Solano *et al.*, (2013), y asociado a los valores de distancia obtenidos en el análisis de códigos de barra genéticos sugiere que esta especie realmente pertenezca al género *Lucilia*. Es necesario que se realicen más análisis con otros marcadores respecto a esta especie, debido a que no hay trabajos de identificación en los que se tenga presente esta especie o género.

Este trabajo validó la aplicabilidad del uso de PCR-RFLP para la identificación de especies de la familia Calliphoridae en Colombia utilizando en gen ITS2. En relación con esta prueba, se modificó el protocolo en el tiempo de incubación de las enzimas de restricción (en su última fase) debido a

que los fragmentos sin digerir de ITS2 no fueron muy visibles en algunas digestiones. Schroeder *et al.*, (2003) registra aplicabilidad de las enzimas de restricción con fragmentos de hasta 1326pb, mientras que Sperling *et al.*, (1994) reportan efectividad de las enzimas en fragmentos digeridos de tan solo 349pb, ambos para COI. En el caso de ITS2, Nelson *et al.*, (2008) reporta el uso de la técnica en regiones amplificadas de 1300 y 960pb. En este trabajo se registró efectividad de la técnica en fragmentos de 800pb.

La utilidad y aplicación de la región ITS2 para la identificación de especies de califóridos, ya ha sido reportada por otros autores para otras regiones (Coleman, 2003; Armstrong y Ball, 2005; Nelson *et al.*, 2008; Marinho *et al.*, 2012), sin embargo este es el primer estudio en Colombia e incluye especies no incluidas en los análisis anteriores.

CONCLUSIONES

En este estudio se valida la utilidad de la región ITS2 como código de barras para la identificación de géneros de la familia Calliphoridae en Colombia y para la identificación de especies del género *Chrysomya* y del género *Lucilia*. Adicionalmente se valida la utilidad de la técnica PCR-RFLP para la identificación rápida de especies.

A pesar de que la región ITS2 es un biomarcador genético informativo para establecer y demostrar las relaciones filogenéticas de un género o subfamilia, se recomienda la inclusión de otros genes o regiones para reforzar las probabilidades y esclarecer dudas sobre las relaciones evolutivas que pueden presentarse en las subfamilias Lucilinae y Calliphorinae, en especial con respecto a la especie *Blepharicnema splendens*.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Grupo de investigación de Evolución, Sistemática y Ecología Molecular, al igual que a los integrantes del Grupo de investigación MIKU de la Universidad del Magdalena por su colaboración en el laboratorio y procesamiento de las muestras.

REFERENCIAS

- Amat E. Contribución al conocimiento de las Chrysomyinae y Toxotarsinae (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Rev Mex Biodivers.* 2009;80:693-708.
- Ames C, Turner B, Barbara D. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species – *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*. *Forensic Sci Int.* 2006;164:179-182. Doi:10.1016/j.forsciint.2006.01.005
- Armstrong K, Ball S. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360:1813-1823. Doi:10.1098/rstb.2005.1713
- Ball S, Hebert P, Burian S, Webb J. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *J N Am Benthol Soc.* 2005;24(3):508-524. Doi:10.1899/0887-3593

- Byrd H, Castner J. Insects of Forensic Importance. In: Forensic entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. CRC Press LLC, N.W. Corporate Blvd.: Boca Raton, Florida.; 2001. p. 43-79.
- Boehme P, Amendt J, Zehner R. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. *J Parasitol Res.* 2012;110:2325-2335. Doi:10.1007/s00436-011-2767-8
- Bonatto S, Marioni L. Gêneros e espécies novos de *Mesembrinellidae* (Diptera, Calliphoridae) da Costa Rica e Venezuela. *Rev Bra Zool.* 2006;22(4):883-890. Doi:10.1590/s0101-81752005000400012
- Chukwunonso ON, Cáceres AG, Arrunátegui-Jiménez MJ, Lañas-Rosas MF, Yañez-Trujillano HH, Luna-Caipio DV, Holguín-Mauricci CE, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H. DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru. *Acta Tropica.* 2012;145:45-51. Doi:10.1016/j.actatropica.2015.02.003
- Coleman A. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet.* 2003;19(7):370-375. Doi:10.1016/s0168-9525(03)00118-5
- Conflitti, IM, Pruess KP, Cywinska A, Powers TO, Currie DC. DNA Barcoding Distinguishes Pest Species of the Black Fly Genus *Cnephia* (Diptera: Simuliidae). *J Med Entomol.* 2013;50(6):1250-1260. Doi:10.1603/ME13063
- Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho G, Thorpe R. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci Int.* 2007;173:1-6. Doi:10.1016/j.forsciint.2006.09.013
- Flórez E, Wolff M. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Díptera) de importancia forense en Colombia. *Neotrop Entomol.* 2009;38(3):418-429. Doi:10.1590/s1519-566x2009000300019
- GilArriortua M, Salona M, Cainé L, Pinheiro F, de Pancorbo M. Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae). *Forensic Sci Int.* 2013;228(1-3):132-136. Doi:10.1016/j.forsciint.2013.02.037
- Giraldo P, Uribe S, López R. Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae). *Rev Colomb Entomol.* 2011;37(2):273-278.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S.* 1999;41:95-98.
- Harvey M, Gaudieri S, Villet M, Dadour I. A global study of forensically significant calliphorids: Implications for identification. *Forensic Sci Int.* 2008;177:66-76. Doi:10.1016/j.forsciint.2007.10.009
- Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci.* 2003;270(Suppl 1):S96-99. Doi: 10.1098/rsbl.2003.0025
- Huelsenbeck J, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics.* 2001;17:754-755.
- Kosmann C, Pinto de Mello R, Sevilha E, Pujol-Luz R. A list of current valid blow fly names (Diptera: Calliphoridae) in the Americas South of Mexico with key to the Brazilian species. *Entomo Brasilis.* 2013;6(1):74-85. Doi:10.12741/ebrasilis.v6i1.266
- Kimura M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16:111-120. Doi:10.1007/bf01731581
- Kulshrestha P, Chandra H. Time since death. *Am J Forensic Med Pathol* 1987;8(3):233-238.
- Mavárez-Cardozo M, Espina De Ferreira A, Barrios-Ferrer F, Ferreira-Paz J. La Entomología Forense y el Neotrópico. *Cuad Med Forense* 2005;11(39):23-33. Doi:10.4321/s1135-76062005000100003
- Marihno M, Junqueira A, Paulo D, Esposito M, Villet M, Azeredo-Espin A. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: Insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Mol Phylogenet Evol.* 2012;65:840-854. Doi:10.1016/j.ympev.2012.08.007
- Meiklejohn K, Wallman J, Downton M. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *Int J Legal Med.* 2009;125:27-32. Doi:10.1007/s00414-009-0395-y
- Meyer P, Paulay G. DNA Barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biol.* 2005;3(12):E422. Doi:10.1371/journal.pbio.0030422
- Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J, Boursots P. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity.* 1998;80:742-752. Doi:10.1046/j.1365-2540.1998.00349.x
- Nelson L, Wallman J, Downton M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med Vet Entomol.* 2007;21:44-52. Doi:10.1111/j.1365-2915.2007.00664.x
- Nelson L, Wallman J, Downton M. Identification of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). *Forensic Sci Int.* 2008;177(2-3):238-247. Doi:10.1016/j.forsciint.2008.01.009
- Nylander J. MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evol Biol.* Uppsala University. 2004.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009;25:1451-1452. Doi:10.1093/bioinformatics/btp187
- Pape T, Wolff M, Amat E. Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófágidos (Díptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana.* 2004;5 (2):201-208.

- Ratcliffe S, Webb D, Weinzievr R, Robertson H. PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae) a generally applicable method. *J Forensic Sci.* 2003;48:783-785.
- Renaud AK, Savage J, Sarah J. DNA barcoding of Northern Nearctic Muscidae (Diptera) reveals high correspondence between morphological and molecular species limits. *BMC Ecology.* 2012;12:24. Doi:10.1186/1472-6785-12-24
- Roberts R, Belfort. M, Bestor T. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:1805-1812. Doi:10.1093/nar/gkg274
- Roe A, Sperling F. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Mol Phylogenet Evol.* 2007;44(1):325-345. Doi:10.1016/j.ympev.2006.12.005
- Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, Pueschel K. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Sci Int.* 2003;132:76-81. Doi:10.1016/s0379-0738(02)00457-7
- Singh B, Wells J. Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) is monophyletic a molecular systematic analysis. *Syst Entomol.* 2011;36:415-420. Doi:10.1111/j.1365-3113.2011.00568.x
- 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 Sci Int.* 2008;175(1):17-22. Doi:10.1016/j.forsciint.2007.04.227
- Solano J, Wolff M, Castro L. Identificación molecular de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Rev Colomb Entomol.* 2013;39(2):281-290.
- 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 Sci Int.* 2008;175(1):17-22. Doi:10.1016/j.forsciint.2007.04.227
- Sperling F, Anderson G, Hickey D. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J Forensic Sci.* 1994;39(2):418-427.
- Stevens J, Wall R. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Sci Int.* 2001;120(1-2):116-123. Doi:10.1016/s0379-0738(01)00417-0
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-2729. Doi:10.1093/molbev/mst197
- Tavare S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lect Math Life Sci.* 1986;17:57-86.
- Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of the progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673-4680. Doi:10.1007/978-1-4020-6754-9_3188
- Turner B. Forensic entomology: insects against crime. *Scientific Progress Oxford.* 1987;71:133-144.
- Wells JD, Williams DW. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. *Int J Legal Med.* 2007;121:1-8. Doi:10.1007/s00414-005-0056-8
- Wallman L, Leys R, Hogendoorn K. Molecular systematics of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. *Invertebr Syst.* 2005;19:1-15. Doi:10.1071/is04023
- Wells J, Williams D. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. Springer-Verlag. *Int J Legal Med.* 2005;121:1-8. Doi:10.1007/s00414-005-0056-8
- Whitworth T, Dawson R, Magalon H, Baudry E. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protophthora* (Diptera: Calliphoridae). *Proc R Soc Lond [Biol].* 2007;274:1731-1739. Doi:10.1098/rspb.2007.0062
- Wolff M, Uribe A, Ortiz A, Duque P. A preliminary study of forensic entomology in Medellin, Colombia. *Forensic Sci Int.* 2001;120:53-59. Doi:10.1016/s0379-0738(01)00422-4
- Wolff M. A new species of *Mesembrinella* (Diptera: Calliphoridae: Mesembrinellinae) from Colombia. *Rev Colomb Entomol.* 2013;39(1):120-124.
- Yang Z. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J Mol Evol.* 1994;39:306-314. Doi:10.1007/bf00160154
- Yusseff S. Entomología forense: Los insectos en la escena del crimen. *Revista Luna Azul.* 2006;23:5-12.

