

# CIENCIA FORENSE

Revista Aragonesa de Medicina Legal

Nº 12

Año

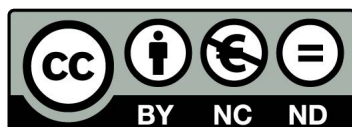
2015

Monográfico:  
Entomología Forense II

---

INSTITUCIÓN «FERNANDO EL CATÓLICO»  
*Excma. Diputación de Zaragoza*

La versión original y completa de esta obra debe consultarse en:  
<https://ifc.dpz.es/publicaciones/ebooks/id/3514>



Esta obra está sujeta a la licencia CC BY-NC-ND 4.0 Internacional de Creative Commons que determina lo siguiente:

- **BY (Reconocimiento):** Debe reconocer adecuadamente la autoría, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de una manera que sugiera que tiene el apoyo del licenciador o lo recibe por el uso que hace.
- **NC (No comercial):** La explotación de la obra queda limitada a usos no comerciales.
- **ND (Sin obras derivadas):** La autorización para explotar la obra no incluye la transformación para crear una obra derivada.

Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>.

# CIENCIA FORENSE

Revista Aragonesa  
de Medicina Legal

Núm. 12

# CIENCIA FORENSE

## Revista Aragonesa de Medicina Legal

NÚM. 12

Coordinador del Monográfico:

MARTA I. SALOÑA-BORDAS



INSTITUCIÓN «FERNANDO EL CATÓLICO» (C. S. I. C.)

*Excma. Diputación de Zaragoza*

Zaragoza, 2015

Publicación número 3436  
de la  
INSTITUCIÓN «FERNANDO EL CATÓLICO»  
(Excma. Diputación de Zaragoza)  
Plaza de España, 2  
50071 ZARAGOZA (España)  
Tff.: [34] 976 28 88 78/79 - Fax: [34] 976 28 88 69  
ifc@dpz.es  
<http://ifc.dpz.es>

#### FICHA CATALOGRÁFICA

*CIENCIA FORENSE. Revista Aragonesa de Medicina Legal.* N° 1  
(1999).- Zaragoza: Institución «Fernando el Católico»,  
1999.- 24 cm

Anual

ISSN: 1575-6793

I. Institución «Fernando el Católico», ed.

340.6(460.22)

Toda correspondencia, peticiones de envío, canje, etcétera, deben dirigirse a la Institución «Fernando el Católico». Las normas de presentación de originales se encuentran al final de la revista.

La Revista *CIENCIA FORENSE* no se identifica con las opiniones o juicios que los autores exponen en uso de la libertad intelectual que cordialmente se les brinda.



Diseño de cubierta: José Luis Cano.

© Los autores.

© De la presente edición: Institución «Fernando el Católico».

ISSN: 1575-6793

Depósito Legal: Z-879/99

Preimpresión

e impresión: ARPIrelieve, S. A.

CIENCIA FORENSE  
REVISTA ARAGONESA DE MEDICINA LEGAL

*Directora*

MARÍA BEGOÑA MARTÍNEZ-JARRETA  
Catedrática de Medicina Legal y Forense  
Universidad de Zaragoza (ESPAÑA)

*Coordinador del Monográfico*

MARTA I. SALOÑA-BORDAS  
Profesora Titular de Universidad,  
Departamento de Zoología y Biología Celular Animal  
en la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

*Consejo Asesor*

|  |   |
|--|---|
| DR. JOSÉ MARÍA ABENZA ROJO                       | PROF. MANUEL LÓPEZ RIVADULLA                    |
| DR. JOSÉ ASO ESCARIO                             | PROF. JOSÉ A. LORENTE ACOSTA                    |
| D. ARMANDO BARREDA HERNÁNDEZ                     | PROF. AURELIO LUNA MALDONADO                    |
| DR. BRUCE BUDOWLE                                | PROF. IGNACIO MUÑOZ BARÚS                       |
| PROF. ÁNGEL CARRACEDO ÁLVAREZ                    | PROF. EDUARDO OSUNA CARRILLO<br>DE ALBORNOZ     |
| PROF. <sup>a</sup> MARÍA CASTELLANO ARROYO       | D. LUIS PASTOR EIXARCH                          |
| DR. JUAN ANTONIO COBO PLANAS                     | PROF. <sup>a</sup> MARÍA DOLORES PÉREZ CÁRCELES |
| PROF. LUIS CONCHEIRO CARRO                       | PROF. <sup>a</sup> MARÍA SOL RODRÍGUEZ CALVO    |
| PROF. NUNO DUARTE VIEIRA                         | PROF. MANUEL RODRÍGUEZ PAZOS                    |
| DRA. ANA FERRER DUFOL                            | PROF. CARLOS ROMEO CASABONA                     |
| PROF. LUIS FRONTELA CARRERAS                     | DR. JAVIER SÁNCHEZ CARO                         |
| DR. SERGIO GALLEGO RIESTRA                       | DR. MANUEL SANCHO RUIZ                          |
| PROF. JOAQUÍN GAMERO LUCAS                       | PROF. <sup>a</sup> AURORA VALENZUELA GARACH     |
| PROF. MANUEL GENÉ BADÍA                          | PROF. JUAN LUIS VALVERDE VILLARREAL             |
| PROF. <sup>a</sup> MARINA GISBERT GRIFO          | PROF. JOSÉ DELFÍN VILLALAIN BLANCO              |
| PROF. CLAUDIO HERNÁNDEZ CUETO                    | PROF. ENRIQUE VILLANUEVA CAÑADAS                |
| PROF. RAFAEL HINOJAL FONSECA                     | PROF. FERNANDO BANDRÉS MOYA                     |
| PROF. EMILIO HUGUET RAMIA                        |   |
| PROF. <sup>a</sup> MARÍA VICTORIA LAREU HUIDOBRO |   |

## ÍNDICE

### ARTÍCULOS ORIGINALES

|   |     |
|---|-----|
| MAGAÑA LOARTE, C.: Problemas a resolver en la estimación de la data de la muerte mediante las evidencias entomológicas.....   | 11  |
| GILARRIORTUA, M.; SALOÑA BORDAS, M. I.; DE PANCORBO, M. M.: Uso de Vestigios Moleculares en Entomología Forense .....   | 29  |
| ARNALDOS, M.-I.; RUIZ, C.; TORRES, B.; BEGOÑA, I.; GARCÍA, M.-D.; GONZÁLEZ-MORA, D.; SERRANO, J.: DNA barcoding of two forensically important fleshfly species (Diptera: Sarcophagidae) from Spain and notes on barcoding success within genus <i>Sarcophaga</i> Meigen, 1826 ..... | 73  |
| SALOÑA-BORDAS, M. I.; PEROTTI, M. A.: Acarología Forense.....   | 91  |
| ETXEBERRIA-REKALDE, E.; GILARRIORTUA, M.; SALOÑA-BORDAS, M. I.; NÓ, M. L.: Developing and easy and efficient protocol for the study of different blowfly instars through scanning electron microscopy.  | 113 |
| MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; MAGAÑA, C.; TONIOLO, M.; GOBBI, P.; ROJO, S.: <i>Protophormia terraenovae</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera, Calliphoridae) a new forensic indicator to South-Western Europe   | 137 |
| ARNALDOS, M.-I.; LÓPEZ GALLEGO, E; GARCÍA, M.-D.: Datos preliminares sobre colonización temprana y actividad diaria de los principales dípteros sarcosaprófagos en el sureste peninsular .....  | 153 |
| URTIAGA VILLEGAS, A.; SALOÑA BORDAS, M. I.: Desarrollo a distintas temperaturas de <i>Nasonia vitripennis</i> (Hymenoptera: Pteromalidae) en <i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae) y su uso potencial en entomología forense .....                                      | 175 |
| VELÁSQUEZ, Y.; GOBBI, P.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; ROJO, S.: Contribución al conocimiento de los Calliphoridae y Sarcophagidae Sarcosaprófagos presentes en un agrosistema del sureste de la Península Ibérica .....   | 193 |

*Índice*

|   |     |
|---|-----|
| DÍAZ-MARTÍN, B.; SALOÑA-BORDAS, M. I.: Arthropods of forensic interest associated to pig carcasses in Aiako Harria Natural Park (Basque Country, Northern Spain)..... | 207 |
| <b>NORMAS DE PUBLICACIÓN</b> .....  | 229 |



## **ARTÍCULOS ORIGINALES**

## PROBLEMAS A RESOLVER EN LA ESTIMACIÓN DE LA DATA DE LA MUERTE MEDIANTE LAS EVIDENCIAS ENTOMOLÓGICAS

CONCEPCIÓN MAGAÑA LOARTE<sup>1</sup>

**Resumen:** La estimación de la data de la muerte en cadáveres no recientes, sigue siendo uno de los problemas más complejos que debe resolver el patólogo forense, pues aunque existen multitud de trabajos sobre el tema, el número de factores que afectan a la descomposición de un cuerpo es tan considerable que resulta imposible el conocimiento y control de todos ellos.

Uno de los métodos que se utilizan en la datación de este tipo de cadáveres es el estudio de los insectos asociados al cuerpo, así, como su tiempo de actividad en el cadáver.

Los problemas que surgen a la hora de realizar el estudio de las evidencias entomológicas nos ponen de manifiesto la necesidad de que la recogida de los datos necesarios para dicho estudio se lleve a cabo de una forma rigurosa y protocolizada.

**Palabras clave:** Entomología forense, Data de la muerte, recogida muestras, temperatura, procesos cadavéricos.

**Abstract:** Estimating the time of death in decomposed corpses is still one of the most complex problems to be solved by a forensic pathologist. Although there are many works on this subject, the number of factors affecting the decomposition of a body is so significant that it is impossible the knowledge and control of them all. One of the methods used to date such bodies is the study of insects associated to the corpse, as well as its developing time on the body. More problems arise during the study of entomological evidence and highlight the need of complete collection of data needed for the study that should be carried under a rigorous and protocolized ways.

---

<sup>1</sup> Laboratorio de Antropología, Instituto Anatómico Forense, Severo Ochoa s/n, 28040 Madrid.

**Key words:** Forensic Entomology, Time of death, sample collection, cadaveric process.

## 1. INTRODUCCIÓN

La datación de la muerte es el conjunto de observaciones y técnicas que permiten señalar dos momentos entre los que con mayor probabilidad se ha producido la muerte. Salvo la observación directa, no existen en la actualidad métodos que aislados o en conjunto permitan establecer con certeza y exactitud dicho momento (VERDÚ, 2003-2004).

La estimación de la data de la muerte, sigue siendo uno de los temas más complejos de la medicina legal, y los métodos utilizados para su estimación van a depender del tipo de cadáver que tengamos en estudio.

En los cadáveres recientes, en los cuales no se aprecia ningún signo de putrefacción, la data puede ser estimada por la observación de la evolución de fenómenos cadavéricos tales como:

*Enfriamiento del cadáver:* en términos generales, el enfriamiento cadavérico transcurre de forma gradual, disminuyendo la temperatura de modo progresivo hasta igualarse con el medio ambiente; comienza aproximadamente hacia las dos horas del fallecimiento, igualándose a la temperatura ambiente entre las 10-12 horas después de la muerte. La curva de dispersión térmica menciona un primer periodo de tres o cuatro horas, donde la temperatura disminuye medio grado por hora. El segundo periodo se presenta entre las 6 a las 10 horas donde disminuye un grado centígrado por hora. Durante el tercer periodo disminuye de tres cuartos a medio grado centígrado por hora hasta nivelarse con la temperatura ambiente. Este enfriamiento cadavérico se encuentra condicionado por diversos factores como: la causa de la muerte, edad, estado nutricional, el peso y factores ambientales.

*Livideces:* aparecen como una tinción de la piel, más o menos intensa y extensa, de color rojo violado que son debidas a la sedimentación gravitacional de la sangre una vez que la circulación ha cesado. Como regla general, las livideces se localizan en las regiones declives del cuerpo, indicando así la posición en la que ha permanecido el cadáver.

*Rigidez:* es la consecuencia de los cambios físico-químicos irreversibles y complejos que se producen en las proteínas del musculo después de la muerte, apareciendo primero en los músculos de fibra lisa, miocardio y diafragma, que se inicia ordinariamente 2 horas después de la muerte, siendo algo más tardía en los músculos estriados esqueléticos, que suele iniciarse hacia las 3 horas después de la muerte, comenzando de ordinario en los músculos de la mandíbula y orbiculares de los parpados; después afecta la cara y pasa al cuello, invadiendo sucesivamente el tórax, tronco, brazos y



**Figura 1.** Livideces.

por último las piernas. No obstante, este orden puede variar dependiendo de la posición del cadáver (GISBERT, 2004).

Otros métodos para establecer la data son el estudio de diferentes marcadores entre los que se encuentran: el líquido pericardio, la endolinfa, el humor vítreo, etc. Todos estos datos nos pueden proporcionar una estimación de la data que puede ser más o menos fiable en las primeras 72 horas, dado que a partir de este momento, las dificultades se incrementan exponencialmente debiendo recurrir a diferentes métodos complementarios, recurriendo a estudios como el estudio de la impedancia abdominal (QUERIDO Y PHILLIPS, 2001) o el estudio de la bioluminiscencia del ATP microbiano (LIU *et al.*, 2009).

Con respecto a los cadáveres no recientes, donde los fenómenos de putrefacción ya son evidentes, la estimación del intervalo postmortem se complica aún más; además del estudio de los cambios sufridos por el cadáver, tenemos que recurrir a estudios complementarios como pueden ser la fauna cadavérica, el deterioro de los objetos asociados al cadáver, que pueden ayudarnos a acotar este intervalo postmortem.

Todos los cadáveres van a pasar por un proceso de descomposición que comienza con el cuerpo fresco y pasa por una serie de etapas hasta la esquelización completa. Los estudios sobre la descomposición física se enfocan en los cambios postmortem como la decoloración de la piel, la hinchazón de las cavidades corporales, y el tiempo hasta que ocurren dichos fenómenos. Aunque el proceso de la descomposición es continuo, se establecen etapas caracterizadas por alteraciones identificables visualmente. Así, en la mayoría de los estudios sobre la descomposición de los cuerpos nos encontraremos los siguientes periodos:

1. *Periodo cromático.* Es el primer signo objetivo de la putrefacción que se caracteriza por la decoloración verde de la piel, dicha decoloración suele comenzar en la fosa iliaca derecha y se va extendiendo por todo el cuer-

po, este cambio de color, es debido a que la hemoglobina es descompuesta por bacterias del género *Clostridium* y del grupo coliforme en compuestos azufrados, estos compuestos al ser de color verde, van tiñendo progresivamente la piel.



**Figura 2.** Cadáver en estado cromático.

2. *Periodo enfisematoso.* La acción de las bacterias productoras de gases hace que el cadáver se abombe y desfigure. Esta infiltración gaseosa invade todo el tejido celular subcutáneo.

Otro fenómeno igualmente característico, es que la red venosa superficial se hace muy aparente en todas las regiones corporales, debido a que la sangre es empujada hacia la periferia por la circulación postmortem que se origina, de un lado por la contracción del ventrículo izquierdo, y de otro por la presión que los gases putrefactivos ejercen desde las cavidades esplácnicas.



**Figura 3.** Cadáver en estado enfisematoso.

3. *Periodo colicuativo*. En esta fase, la epidermis se despegue de la dermis formándose ampollas, de dimensiones variables llenas de un líquido de color pardo oscuro. La epidermis se desprende de la dermis con mucha facilidad apareciendo lo que se llama piel deslizante. Por otra parte la salida de los gases hace que el cuerpo pierda el aspecto macrosómico del estado anterior. Todos los órganos se encuentran reblandecidos dejando escapar un líquido de aspecto seroso.



**Figura 4.** Piel deslizante.



**Figura 5.** Cadáveres en estado colicuativo.

4. *Periodo de reducción esquelética*. Paulatinamente, durante este periodo, todas las partes blandas van desapareciendo a través de su licuefacción y transformación en putrúfago, quedando solo los tejidos más resistentes que

suele ser el tejido fibroso, ligamentos y cartílagos, por lo cual el esqueleto suele permanecer unido hasta muy avanzado dicho periodo (GISBERT CALABUIG, 2004).



**Figura 6.** Cadáver en fase de Reducción esquelética.

Desafortunadamente, existen múltiples factores que influyen en la tasa de pérdida de tejidos, como la temperatura, la humedad y la accesibilidad al cadáver. Lo que hace que los estudios realizados en determinadas condiciones no sean extrapolables y cada caso sea distinto, obligándonos a comenzar de cero.

Considerando todos estos factores, la tarea de la estimación del tiempo transcurrido desde la muerte incluye mucha variabilidad e imprevistos que hace que sea preciso como ya he mencionado anteriormente, recurrir a pruebas complementarias y al estudio de muestras biológicas como es la datación por evidencias entomológicas.

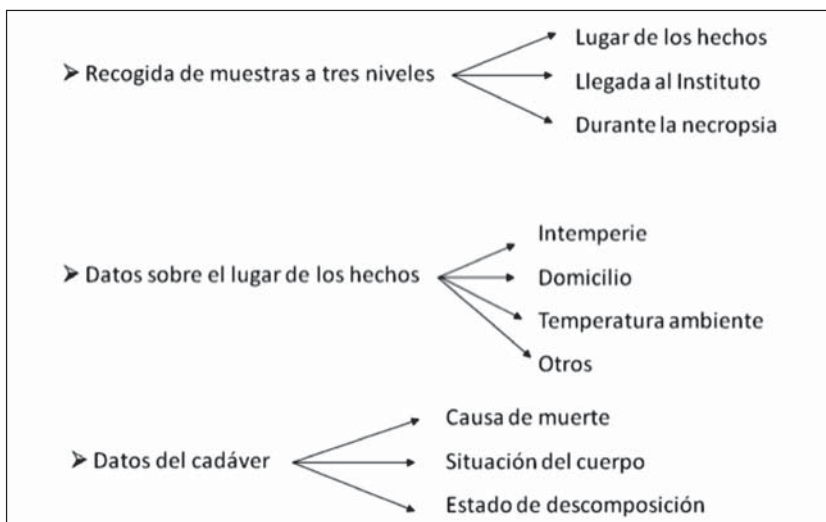
¿Por qué es importante establecer una data correcta?

- Se pueden centrar las investigaciones policiales
- Se puede aceptar o descartar una coartada
- Se derivan consecuencias económicas relativas a los testamentos y algunas relaciones comerciales
- Puede afectar al reconocimiento jurídico de una paternidad póstuma

Una vez establecida la importancia de la determinación de la data de la muerte, y lo complejo de su estimación, vamos a ver con que herramientas contamos en los cadáveres en los que han comenzado los fenómenos tardíos de descomposición, es decir la putrefacción propiamente dicha.

Una de las pruebas indirectas más utilizada, es el estudio de la fauna cadavérica, se llama indirecta, dado que lo que estudiamos es el tiempo de actividad de los insectos en el cadáver, y no el cadáver propiamente dicho.

Para una correcta estimación de la actividad de los insectos en el cadáver, es necesaria una información, para la obtención de la cual, es imprescindible, la colaboración de las personas que asisten al levantamiento:



**Figura 7.** Información necesaria para el correcto procesamiento de un caso.

- Empecemos por la recogida de muestras en el lugar de los hechos. Lo primero que deberíamos establecer, es qué tipo de muestras se consideran las evidencias entomológicas, es evidente que se trata de muestras biológicas, y también es evidente que su análisis puede contribuir al esclarecimiento de los hechos, concretamente cuando y en algunos casos donde se produjo el fallecimiento. Si acudimos a la nueva Ley de Enjuiciamiento Criminal, nos encontramos lo siguiente.

Según el artículo 326 del Capítulo I del Título V de la Ley de Enjuiciamiento Criminal «*Cuando se pusiera de manifiesto la existencia de huellas o vestigios cuyo análisis biológico pudiera contribuir al esclarecimiento del hecho investigado, el Juez de Instrucción adoptará u ordenará a la Policía Judicial o al médico forense que adopte las medidas necesarias para que la recogida, custodia y examen de aquellas muestras se verifique en condiciones que garanticen su autenticidad, sin perjuicio de lo establecido en el artículo 282.*» (MONTERO, 2004)

Queda claro que es el Juez de Instrucción el que ordenará que se recojan las muestras necesarias para el esclarecimiento de los hechos, y también



es indiscutible que la toma de dichas muestras la pueden realizar tanto la Policía Científica como el médico forense. Aquí es donde surge el problema, el médico forense necesita establecer la data de la muerte como parte importante del informe pericial, por lo cual de una u otra forma el informe de la data debe llegar a él, por lo tanto, y en el caso que la recogida de las muestras en el lugar de los hechos sea realizada por la Policía Científica, y la recogida en el Instituto la lleve a cabo la persona encargada de realizar los informes de entomología en dicho centro, parece obvio que debería existir una colaboración entre los laboratorios con el fin de realizar un informe completo y fidedigno de la data de la muerte.

En cualquier caso, a la hora de recoger las muestras en el lugar de los hechos se deben tener en cuenta circunstancias que pueden afectar a que esta recogida no se realice de la forma adecuada. La más importante es tener en cuenta que las larvas una vez terminado su estadio de larva III, antes de pupar se alejan del alimento (cadáver) para poder limpiar el intestino de todos los restos de alimento, y para ello recorren un espacio que en cada especie puede ser distinto; esto hace que en ocasiones las larvas pupen en lugares no visibles por el examinador y puedan no ser recogidas, lo que implicaría una reducción en la estimación del tiempo que lleva esta especie en el cadáver; por lo tanto, es importante cerciorarse de que se han recogido todas las evidencias entomológicas en el lugar de los hechos tanto si es en el interior de un edificio como si el cadáver ha estado a la intemperie.

De cualquier forma, siempre debemos asegurarnos que el estado de descomposición del cadáver y la fase en la que se encuentran los insectos presentes son coherentes; es decir, que el tiempo de actividad de los insectos y las especies presentes, son los adecuados teniendo en cuenta el grado de descomposición del cadáver. Para lo cual parece recomendable que en el levantamiento estuviese presente alguien que realizase la recogida de muestras siguiendo un determinado protocolo. De esto ya hablaremos más adelante.

Una vez el cadáver llega al Instituto Anatómico Forense o Instituto de Medicina Legal, es decir, al centro donde vaya a encontrarse el cadáver hasta el momento de la necropsia, debería hacerse una segunda recogida, puesto que a partir de ese momento el cadáver puede permanecer en cámaras, lo que paralizaría en parte el desarrollo de las especies, o en ocasiones puede permanecer a temperatura ambiente con lo cual los insectos seguirían su desarrollo.

Esta segunda recogida no siempre se realiza, puesto que muchos cadáveres llegan al centro durante la noche y las muestras no se recogen hasta la mañana siguiente; en este caso hay que tener en cuenta dónde se ha encontrado el cuerpo y cuánto tiempo ha pasado desde el momento del hallazgo.

Durante la necropsia siempre es importante que el entomólogo esté presente, pues por lo general además de hallar más ejemplares que no puedes ver hasta que se abre el cuerpo, el estudio de los órganos nos proporciona mucha información sobre el tiempo que puede llevar la persona fallecida,

sobre todo en los casos en los que los insectos no han tenido acceso al cuerpo en las primeras horas.

- Los datos sobre el lugar de los hechos son recogidos por el médico forense que realiza el levantamiento, por lo tanto, es él quien nos va a informar de las circunstancias en las que fue hallado el cuerpo. En este punto sería de gran importancia que el médico forense tomase la temperatura ambiente del lugar de los hechos, así como la de la masa larvaria si la hubiera, pues nos serviría para poder estimar la diferencia entre esta temperatura y la proporcionada por la estación meteorológica más cercana. En todos los estudios sobre datación por entomología se recomienda no solo tomar la temperatura ambiente en el momento del levantamiento, sino que sería preciso tomar la temperatura en dicho lugar durante los cinco días siguientes al hallazgo. Quiero suponer que en casos concretos en los cuales de la estimación exacta del intervalo postmortem dependa la culpabilidad o inocencia de una persona no se pondría ningún tipo de pega por parte del juez en que se llevase a cabo dicho estudio, pero en los casos en los que no existe ningún tipo de violencia y se considera una muerte natural, en la mayoría de los casos, los trastornos causados a la familia serían mayores que el establecimiento exacto del momento de la muerte.

- El siguiente punto, datos sobre el cadáver, causa de muerte, situación del cadáver y estado de descomposición, los dos primeros puntos nos los comunica el médico forense y el tercero es estimado por nosotros mediante el examen externo del cuerpo.

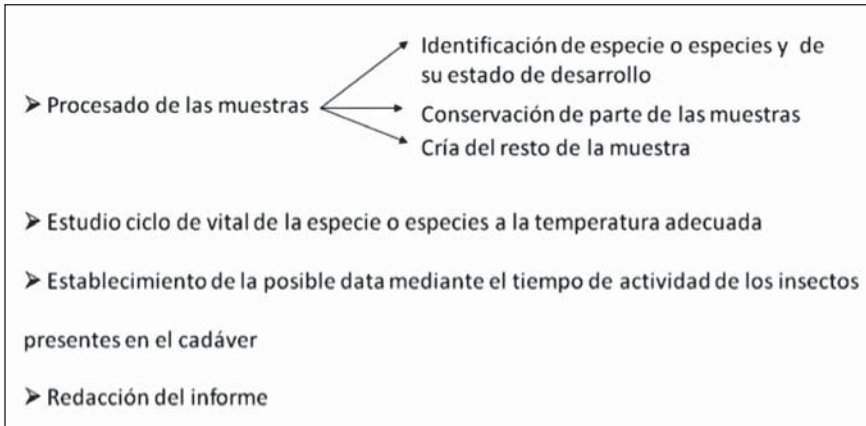
Una vez obtenida toda la información anterior, pasamos al procesado y estudio de las muestras recogidas del cadáver.

## 2. ENTOMOLOGÍA FORENSE

La entomología forense se responsabiliza de la identificación de la especie o especies de artrópodos asociados al cadáver y de su estado de desarrollo.

- El procesado de las muestras en el laboratorio, es un punto de extrema importancia pues de él va a depender el poder realizar un informe fiable.

La identificación de las especies, así, como su estado de desarrollo, la podemos realizar de varias formas, dependiendo del tipo de muestras que recojamos del cadáver y de nuestros conocimientos de entomología; si las muestras son inmaduros de dípteros su estadio de desarrollo lo identificaremos mediante los espiráculos posteriores en los que podremos ver si se trata de una larva en estadio I, II, o III, en este último podemos encontrarnos con la duda de si ya ha pasado a larva migratoria, por lo que lo más correcto sería que continuara su ciclo y ver el tiempo que tarda en pupar. La identificación de la especie en la mayoría de los casos se podrá realizar, mediante las claves para inmaduros que existen ya para la mayoría de las



**Figura 8.** Procedimiento a seguir durante una investigación forense.

especies que colonizan los cadáveres en las distintas regiones de España (VELÁSQUEZ *et al.*, 2010), en caso de que no sea posible se dejará que completen el ciclo y se identificarán los adultos.

Si las muestras son pupas, aunque también existen claves para algunas especies (AMORIN & RIBEIRO, 2001; SUKONTASON *et al.*, 2007) lo más conveniente es esperar a que eclosionen e identificar los adultos.

En el caso de que entre las muestras existan coleópteros, normalmente vamos a encontrar dos familias, Dermestidae y/o Cleridae, fáciles de identificar tanto unos como otros, dado que el número de especies es bastante acotado y existen claves para la determinación de dichas especies (DÍAZ *et al.*, 2008; PRATT & SCOTT, 2006).

La conservación de una parte de las muestras es importante que se realice, pues es imprescindible que siempre contemos con muestras en el estado en que se hallaban en el momento del hallazgo.

Cría del resto de la muestra, con respecto a este punto nos encontramos con el mismo problema que en la mayoría de los temas anteriores, y es a qué temperatura las criamos; en el caso de que el cuerpo se hallase a la intemperie, buscaríamos la estación meteorológica más cercana al lugar del hallazgo y estimaríamos si es factible utilizar las temperaturas dadas por dicha estación para el lugar de los hechos o sería necesario hallar un factor de corrección para dichas temperaturas. En los casos en los que no exista una estación lo suficientemente cerca deberíamos recurrir a poner en el lugar del hallazgo un data-logguer y recoger las temperaturas de dicho lugar para poderlas comparar con la estación más cercana, y ver si es posible, una estimación aproximada de la temperatura en los días anteriores al hallazgo.

En los cadáveres que son hallados en domicilio, aunque las temperaturas suelen ser más constantes, sería de gran utilidad que el médico forense

tomara la temperatura ambiente además de la del cadáver, pues esto nos daría una idea sobre la diferencia entre la temperatura de la calle y la del interior del domicilio.

#### ESTUDIO DEL CICLO VITAL DE LA ESPECIE O ESPECIES

Dado que la mayoría de las especies que colonizan los cadáveres en nuestro entorno son especies cosmopolitas, suele existir literatura suficiente como para conocer su ciclo vital a diferentes temperaturas, no obstante, si no fuese así debemos criar la especie a la temperatura en estudio, antes de determinar la data de la muerte.

Establecimiento de la data mediante el tiempo de actividad de los insectos presentes en el cadáver.

Dado que cuando llegamos a este punto ya debemos conocer la temperatura a la que se ha hallado el cadáver y, por supuesto, a la que hemos criado las muestras, debemos estimar mediante los diferentes métodos, y dependiendo de que el cadáver proceda de la intemperie o de un domicilio, el tiempo mínimo que necesita la especie en estudio para alcanzar el estadio en que se encontraban los ejemplares al ser hallado el cuerpo, y conforme a ello, estimar un rango posible de tiempo en el que se haya podido producir el fallecimiento.

En los cadáveres hallados a la intemperie, puesto que la temperatura es fluctuante, lo correcto sería trabajar con las temperaturas máximas y mínimas para calcular la acumulación de grados hora (día) en el lugar de los hechos.

En los cuerpos descubiertos en interior, donde la temperatura no es fluctuante, podemos utilizar la relación que existe entre la longitud de la larva y el tiempo que ha pasado desde el momento de la eclosión. Los gráficos son producidos bajo condiciones controladas en laboratorio. Estos gráficos son llamados *diagramas isomegalos* que han sido calculados para *Lucilia sericata* (MEIGEN, 1826), *Protophormia terranova* (ROBINEAU-DESVOIDY) y *Calliphora vicina* (ROBINEAU-DESVOIDY), (DÍAZ MARTÍN *et al.*, 2014), GRASSBERGER & REITER, 2001, 2002, REITER, 1984).

Otro tipo de gráficos son los *diagramas isomorfos* que están basados en el tiempo que tarda una determinada especie en pasar de un estadio al siguiente, a diferentes temperaturas, y han sido realizados para las mismas especies que los anteriores.

¿Qué datos generales debemos conocer de los insectos que colonizan los cadáveres?

- Son poiquiloterms, es decir su temperatura depende de la temperatura del medio.
- Son holometábolos o de desarrollo completo, pasan por una serie de cambios morfológicos desde que eclosionan del huevo hasta adultos.

- Su crecimiento y metamorfosis está regulado por hormonas.

Entre los diferentes métodos que utilizan los animales para estabilizar su temperatura están la ectotermia y la endotermia.

La ectotermia, es el proceso por el cual un grupo de animales regulan su temperatura a partir de la temperatura ambiental. La ectotermia conlleva ciertas pautas de comportamiento para aprovechar las fuentes de calor externas que pueden derivar en temperaturas corporales relativamente estables, siendo además un sistema de regulación del ritmo metabólico.

Por otro lado, los endotermos generan calor a partir de la energía química contenida en los alimentos, por lo que tienen que alimentarse a diario incluso varias veces al día, por el contrario los ectotermos no tienen que alimentarse a diario, incluso pueden pasar meses sin hacerlo.

Dentro de los animales que se clasifican como ectotermos, se diferencian en primer lugar en dos tipos de estrategias conductuales que no son mutuamente excluyentes, pudiendo un animal seguir una u otra dependiendo de su sistema de vida:

Conformistas o poiquilotermos, cuya temperatura corporal fluctúa en conjunto con la ambiental

Reguladores u homeotermos, su temperatura corporal es relativamente estable y se encuentra sobre o bajo la temperatura ambiente.

Tanto los dípteros necrófagos como los coleópteros necrófagos se encuentran entre los poiquilotermos, por lo que su temperatura fluctúa con la temperatura ambiente y su desarrollo se verá afectado por dicha fluctuación, tanto para acortar el tiempo como para alargarlo. Cada especie tiene una temperatura óptima a la cual el tiempo de desarrollo es el mínimo, una temperatura umbral por debajo de la cual no se desarrolla y una temperatura máxima por encima de la cual muere. Por lo tanto entre la temperatura umbral y la máxima hay un rango de temperaturas a las cuales la especie se desarrolla en un mayor o menor tiempo.

Un factor importante y de gran ayuda para nuestro propósito, es su desarrollo holometábolo, el conocer perfectamente el desarrollo de cada especie va a ser imprescindible a la hora de establecer con una simple lupa en qué estadio se encuentran las especies en el momento del hallazgo, y por lo tanto establecer un tiempo mínimo durante el cual se han hallado dichas especies en el cadáver.

Durante el desarrollo de los insectos podemos separar dos procesos, gobernados por una serie de sustancias hormonales. El primero de ellos, es el crecimiento en tamaño del insecto, es decir, la muda.

Las células neurosecretoras de una parte del cerebro son las que secretan la hormona denominada ecdisotropina o HPTT (hormona protoracicotrópica) en función de diversos estímulos medioambientales tales como

intensidad de luz, fotoperiodo, temperatura, disponibilidad de alimento, y tamaño poblacional.

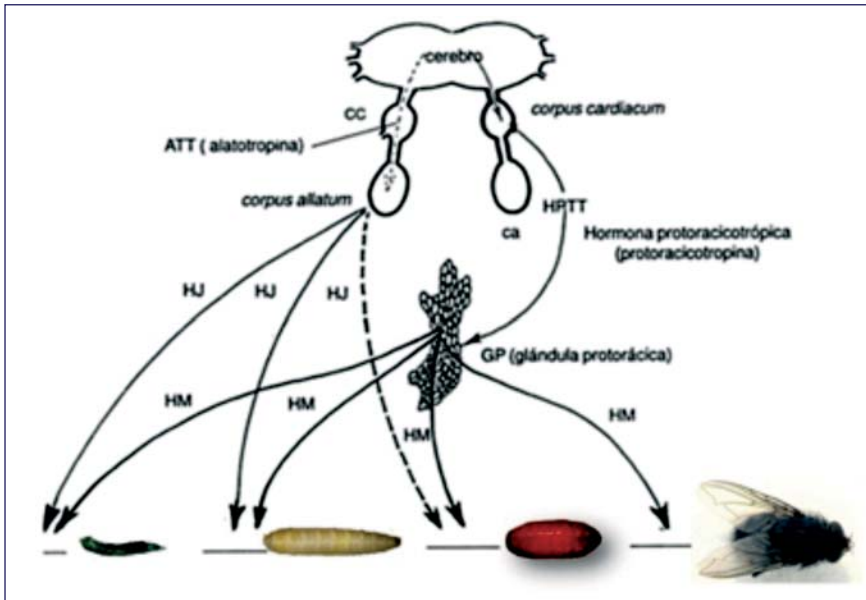
Esta hormona se almacena en los cuerpos cardiacos, pasando a través de los nervios que los unen al cerebro. De los cuerpos cardiacos se vierte directamente a la hemolinfa que la transporta a las glándulas protorácicas estimulando en ellas la producción de la hormona de la muda o ecdisona.

La ecdisona es activada a la forma 20-hidroxiecdisona, que es la que finalmente desencadena todo el proceso de la muda en las células epidérmicas.

En la muda se distinguen dos momentos clave: el primero es la apolisis, en el que se separa la vieja cutícula de la epidermis, dejando un espacio entre ellas que será rellenado por un fluido segregado por las células epidérmicas, llamado fluido de mudas. En este momento se empieza a formar la nueva cutícula, empezando por la deposición de la epicutícula sobre las células de la epidermis. La deposición de la nueva procutícula la realiza la epidermis aprovechando los componentes de la antigua endocutícula, que son disueltos por el fluido de mudas. Este fluido de mudas está compuesto por proteasas y quitinasas. El segundo momento clave en la muda se produce en el momento en que la procutícula está muy avanzada; se produce entonces la rotura por unas zonas específicas de lo que queda de la vieja cutícula y la larva en un nuevo estadio sale al exterior. A la rotura se le llama ecdisis y al resto de cutícula abandonada exuvia.

El segundo proceso, sería el cambio que debe sufrir todo insecto inmaduro para formar el insecto adulto. En este proceso interviene la hormona juvenil (HJ). Dicha hormona es producida en los cuerpos alados. La cantidad de hormona juvenil que se encuentra en la hemolinfa del insecto en cada fase del desarrollo está regulada por diversos factores neurohormonales producidos en el cerebro o en el ganglio subesofágico. Durante la fase inmadura los niveles en hemolinfa de la HJ son elevados, lo que está relacionado con el mantenimiento de los caracteres inmaduros o juveniles en el insecto. En los insectos de desarrollo hemimetábolo, la concentración de HJ en la hemolinfa disminuye de forma gradual con cada muda, lo que implica que van apareciendo las características definitivas del adulto de forma gradual, y en la última muda baja bruscamente su concentración apareciendo el adulto. En los insectos holometábolos, la concentración de la HJ es constante en cada muda en las fases inmaduras, disminuye mucho en el último estadio larvario, apareciendo entonces el estado de pupa, y desaparece completamente durante el estadio de pupa, permitiendo sólo entonces la aparición de los caracteres de adulto (ZAMORA *et al.*, 2008).

Estas hormonas están implicadas en otros procesos de la fisiología del insecto. Así, la ecdisona actúa directamente en la ruptura de la diapausa de larvas y pupas, y en la diferenciación de tejidos imaginales en la fase de pupa, aunque una vez que surge el insecto adulto las glándulas protorácicas degeneran y deja de producirse la ecdisona. Por su parte, la HJ una vez que ha aparecido el adulto, reanuda su secreción en los cuerpos alados, intervi-



**Figura 9.** Esquema clásico del control endocrino de la metamorfosis en un insecto. ATT, alotropina; HPTT, hormona protoracicotrópica; cc, cuerpos cardiacos; ca, cuerpos alados; HJ, hormona juvenil; HM, hormona de muda; GP, glándula protorácica (LIÑÁN, 1998), (Reformado de ZAMORA *et al.*, 2008).

niendo en la deposición de reservas en el huevo, en la producción de ciertas glándulas sexuales accesorias del macho y la hembra, en la regulación de la diapausa, y en otras funciones o procesos del insecto (ZAMORA *et al.*, 2008).

El estudio y conocimiento de los diferentes pasos tanto del desarrollo como de su carácter hormonal es de vital importancia, y nos proporciona un camino para futuros estudios, en los cuales, podríamos relacionar la cantidad de hormonas acumuladas en la hemolinfa con el proceso de muda y poder estimar cuánto tiempo lleva la larva en cada estadio.

Existen múltiples estudios sobre el control hormonal de la metamorfosis y últimamente, sobre la expresión génica durante el desarrollo larval (TARONE & FORAN, 2011, BOEHME *et al.*, 2013; BOEHME *et al.*, 2014), que también pueden abrir un camino para la determinación de la edad larvaria así como de la pupa.

Como podemos apreciar en lo anteriormente expuesto, el conocimiento de la biología de los insectos que colonizan los cadáveres, así, como la multitud de factores que afectan a su desarrollo es imprescindible a la hora

de poder determinar con absoluta certeza el tiempo de actividad de dichos insectos en el cadáver colonizado.

Como ya he mencionado anteriormente, sería de gran ayuda para el entomólogo encargado del estudio que en la recogida de muestras durante el levantamiento, se siguiera un protocolo de recogida, de los que existen ya publicados como (AMENDT *et al.*, 2007; ARNALDOS *et al.*, 2006; GIL *et al.*, 2014; MAGAÑA & PRIETO, 2009).

### 3. CASOS FORENSES

Dado que un ejemplo vale más que mil palabras expongo dos casos de data por evidencias entomológicas, uno de cadáver hallado en domicilio y otro en intemperie.

*Ejemplo 1.* Cadáver de mujer hallada en su domicilio el día 31 de octubre, colonizada por larvas, pupas y pupas vacías de la especie *Syntesiomyia nudiseta* (VAN DER WULP, 1883). Esta mujer vivía sola y no tenía ninguna relación con familiares ni amigos, por lo que nadie la ha echado de menos y nadie informa del tiempo que puede llevar muerta.

Primer problema ¿Qué temperatura estimamos que hacía en la casa? Sabemos por datos de estaciones meteorológicas cercanas a la casa que la media de la temperatura ambiente durante el mes anterior ha sido de 18,5°C ¿realizamos el estudio a esta temperatura? le sumamos 2-3-4°C es decir que tenemos un rango de incertidumbre que va desde 18,5 a 22,5°C según la literatura de esta especie a 20°C tarda en terminar su ciclo 26 días aproximadamente y a 22°C entre 22 y 23 días, por lo que la data estaría entre 22 y 26 días.

Por otra parte, dado que la acumulación de grados necesarios para completar su ciclo a 20°C es de 334,2°C hemos calculado el tiempo que tardaría la especie con las temperaturas diarias en completar su ciclo y nos proporciona una data de 30 días, lo que coincide más con el estado del cadáver.

Por otro lado, no sabemos cuánto tiempo llevan las pupas vacías, pero no podía ser mucho tiempo dado que solo hallamos una pupa vacía y la gran mayoría eran pupas en desarrollo, lo que nos indica que prácticamente acababa de eclosionar cuando se encontró el cadáver.

Resumiendo y teniendo en cuenta todos los factores la información que podemos dar sin miedo a equivocarnos es que esta persona llevaba muerta al menos 22 días, si a esta data le sumamos los días que puede tardar la especie en colonizar el cadáver, dado que se hallaba en el interior de un domicilio, podemos estimar que la data de la muerte podría estar entre 25 y 30 días.

Aquí es donde vemos que la entomología es una herramienta más que podemos utilizar para establecer un tiempo mínimo de muerte, que unido al estado del cuerpo nos puede aproximar bastante la data de la muerte.



*Ejemplo 2.* Cadáver de varón hallado a la intemperie el día 25 de julio de 2014 en la zona del Arroyo del Petril (Las Matas, Madrid) colonizado por larvas, y pupas recién formadas de *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1819). El cadáver se hallaba vestido y sin signos de violencia, por lo que se supone una muerte natural que se confirma durante la práctica de la autopsia.

En este caso tenemos una serie de ventajas con las que no contábamos en el caso anterior: primera, el cadáver se hallaba a 541,1 metros de la estación meteorológica de las Matas, con lo que teníamos los datos de  $t^{\text{a}}$  máx.,  $t^{\text{a}}$  mín., humedad máxima y mínima, y precipitaciones. Además al tratarse del mes de julio podemos suponer sin miedo de equivocarnos que el cadáver fue colonizado a las pocas horas de encontrarse expuesto. Y por último tenemos la ventaja de que el cadáver estaba completamente lleno de pupas aún sin oscurecerse.

Por lo tanto y una vez identificada la especie estimaríamos el tiempo que tarda la *C. albiceps* en pupar a la temperatura estimada que según la estación fue de 22,95°C de media durante el mes de julio.

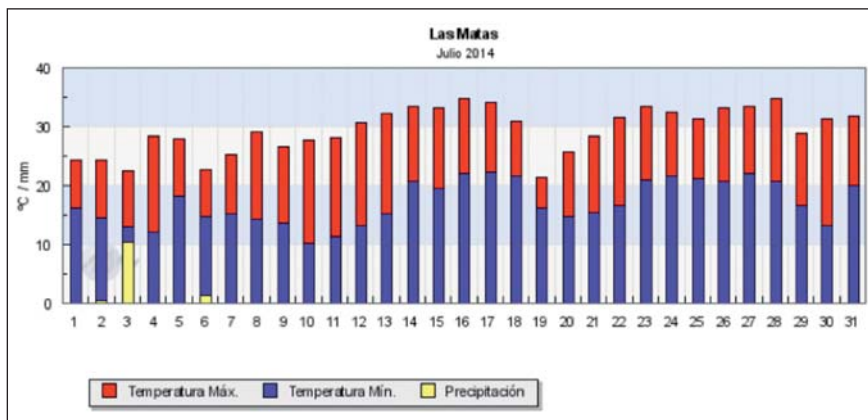


Figura 10. Datos estación Meteorológica de las Rozas.

Podemos establecer el tiempo de actividad de los insectos de dos formas:

Primera: mediante la literatura que establece que las larvas de *C. albiceps* a 22°C necesita 12,5 días para alcanzar el estadio de pupa.

Segunda: dado que a 22°C *C. albiceps* necesita 146,91 grados en alcanzar el estadio de pupa, calculamos los grados diarios acumulados por dicha especie a las  $t^{\text{a}}$  reales de la zona.

Dado que el cadáver fue hallado a las 20:15 horas, del día 25 de julio de 2014 e ingresó en el Instituto sobre las 10:30 del mismo día y conservado

en cámara de refrigeración a 5°C durante toda la noche hasta el momento de la autopsia. Por ello comenzamos a estimar los grados acumulados durante los días anteriores al hallazgo empezando por el día 25 de julio.

Los grados acumulados serían:

➔ 144,3°C desde el día 16 de julio.

➔ 161,1°C desde el día 15 de julio.

Puesto que la especie en estudio necesita para pupar 146,9°C podemos establecer que la data de la muerte sería compatible con un periodo de entre 10 y 11 días. Lo que es perfectamente compatible tanto con los datos de la literatura como con el estado del cadáver.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. ARNALDOS MI, LUNA A, PRESA JJ, LÓPEZ-GALLEGO L, GARCÍA MD. Entomología Forense en España: hacia una buena práctica profesional. *Ciencia Forense* 2006, 8:17-38.
2. AMENDT J, CAMPOBASSO CP, GAUDRY E, REITER C, LEBLANC HN, HALL MJR. Best practice in forensic entomology-standards and guidelines. *Journal of Legal Medicine* 2007, 121:90-104.
3. AMORIN JA, RIBEIRO OB, Distintion among the Puparia of Three Blowfly Species (Diptera: Calliphoridae) Frequently Found on Unburied Corpses. *Memórias de Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2001, 96:781-784.
4. BOEHME P, SPAHN P, AMENDT J, ZEHNER R. Differential gene expression during metamorphosis: a promising approach for age estimation of forensic important *Calliphora vicina* pupae (Diptera: Calliphoridae). *International Journal of Legal Medicine* 2013, 127(1):243-9.
5. BOEHME P, SPAHN P, AMENDT J, ZEHNER R. The analisis of temporal gene expression to estimate the age of forensically important blow fly pupae: results from three blind studies. *International Journal of Legal Medicine* 2014, 128 (3):565-573.
6. MAGAÑA LOARTE C, PRIETO CARRERO JL. Recogida de muestras para estudio entomológico forense. *Revista Española de Medicina Legal* 2009; 35 (1):39-43.
7. DÍAZ WC, ANTEPARRA ME, HERMANN A. Dermestidae (Coleoptera) en el Perú: revisión y nuevos registros. *Revista Peruana de Biología* 2008, 15(1):15-20.
8. DÍAZ MARTÍN B, LÓPEZ RODRÍGUEZ A, SALOÑA BORDAS MI. Primeros resultados sobre el desarrollo de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) bajo condiciones controladas de temperatura. *Ciencia Forense* 2014, 11:241-260.
9. GILARRIORTUA M, URTIAGA VILLEGAS A, MARTÍNEZ DE PANCORBO MA, SALOÑA-BORDAS MI. Protocolo de actuación para la recogida y registro de muestras entomológicas en una investigación pericial forense. *Eguzkilore: Cuaderno del Instituto Vasco de Criminología* 2014, 28:275-286.

10. GIBBERT CALABUIG JA. Medicina Legal y Toxicología (6ª Ed.), Ed. Masson, 2004.
11. GRASSBERGER M, REITER C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen and isomorphen diagram. Forensic Science International 2001, 120(1-2):22-6.
12. GRASSBERGER M, REITER C. Effect of temperature on development on the forensically important holartic blow fly *Protophormia terranovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). Forensic Science International 2002, 128(3):177-182.
13. LIÑÁN C. Entomología Agroforestal: insectos y ácaros que dañan montes, cultivos y jardines. Ediciones Agrotécnicas, D.L. Madrid. 1998.
14. LIU Q, SUN Q, LIU L, ZHENQ N, LIU L. Bioluminescent assay of microbial ATP in postmortem tissues for the estimation of postmortem interval. Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences 2009, 29: 679-683.
15. MONTERO J. Ley de Enjuiciamiento Criminal. 5ª ed. Valencia: Tirant lo Blanch, 2004.
16. PRATT HD, SCOTT G. A key some beetles commonly found in stored foods (Coleoptera). In Grain and mill insects and their control; A manual for operative millers. Department of flour and feed milling industries, KSU and Association of operative millers. Manhattan Kansas State University. 1966.
17. QUERIDO D, PHILLIPS MR. Estimation of postmortem interval. Temperature-correction of extracellular abdominal impedance during the first 21 days death. Forensic Science International 2001;116:133-8.
18. REITER C. Growth behavior of the blue blowfly *Calliphora vicina* maggots. Zeitschrift für Rechtsmedizin 1984, 91(4):295-308.
19. SUKONTASON KL, NGERN-KLUN R, SRIPAKDEE D, SUKONTASON K. Identifying fly puparia by clearing technique: application to forensic entomology. Parasitology Research. 2007, 101(5):1407-16.
20. TARONE AM, FOREN DR. Gene expression during blow fly development: improving the precision of age estimates in forensic entomology. Journal of Forensic Sciences 2011, 56 (1):112-22.
21. VELASQUEZ Y, MAGAÑA C, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROJO S. Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. Medical and Veterinary Entomology 2010(3)293-308.
22. VERDÚ FA. Data de la Muerte. Disponible en: <http://www.uv.es/fevepa/tercera/CRIMINOLOGIA>.
23. GONZÁLEZ ZAMORA JE, LÓPEZ MARTÍNEZ N, AVILÉS GUERRERO M, URBANO FUENTES-GUERRA JM, AVILLA HERNÁNDEZ C. Sanidad Vegetal. 2008, Disponible en: <http://ocwus.us.es/produccion-vegetal/sanidad-vegetal>.

## USO DE VESTIGIOS MOLECULARES EN ENTOMOLOGÍA FORENSE

MAITE GILARRIORTUA<sup>1,2</sup>  
MARTA I. SALOÑA-BORDAS<sup>1,2</sup>  
MARIAN M. DE PANCORBO<sup>1,2</sup>

**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.

---

<sup>1</sup> 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).

<sup>2</sup> 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

**Palabras clave:** Entomología forense, biología molecular, investigación criminal.

**Abstract:** This paper reviews the state of the forensic entomology from a molecular perspective, addressing essential aspects to consider in the medico-legal field. Usually, molecular techniques are used as a fast and reliable alternative to traditional morphological identification. However, applications such as the characterization of the genetic structure of populations, the study of the phylogenetic relationships of species, analysis of the digestive content of the insect or the study of gene expression during the development cycle, may be of great interest to forensic investigations. Moreover, one of the challenges of modern molecular biology is the development and introduction of new techniques such as pyrosequencing, high resolution melting analysis (HRM) or large-scale sequencing (NGM), which improve the performance of the conventional ones. In general, molecular entomological analyses are focused on the study of genetic material, mainly DNA. Moreover, the recent addition of technologies from other fields allows the analysis of cuticular hydrocarbons and volatile organic compounds, with application in specific identification and in the estimation of the period of insect activity (PIA), linked to the *post-mortem* interval (PMI). Thus, some of the issues raised here may serve to reflect and open new horizons still unexplored.

**Key words:** Forensic entomology, molecular biology, criminal investigation.

## 1. INTRODUCCIÓN

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 suele estar ligada a dichos ambientes (FLEISHMANN *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 sean civiles, principalmente económicos (infestaciones y plagas) (CATTS & GOFF, 1992, BYRD, 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, para 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, BENECKE *et al.*, 2004, 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                     |
|   |  |  |  |                          |                                   |                                     |
| Control de calidad                      |  |  |  | Homicidios<br>Asesinatos | Miasis en Individuos dependientes | Vehículos<br>Mercancías<br>Animales |

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 forense y veterinaria, que estudia los insectos necrófagos en estadios de desarrollo más avanzados o su diversidad específica y permite determinar el lugar, las circunstancias del suceso y el periodo de actividad de los insectos (PAI), que se aproxima 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.*, 2014). Estas miasis, o infestaciones de vertebrados vivos por larvas

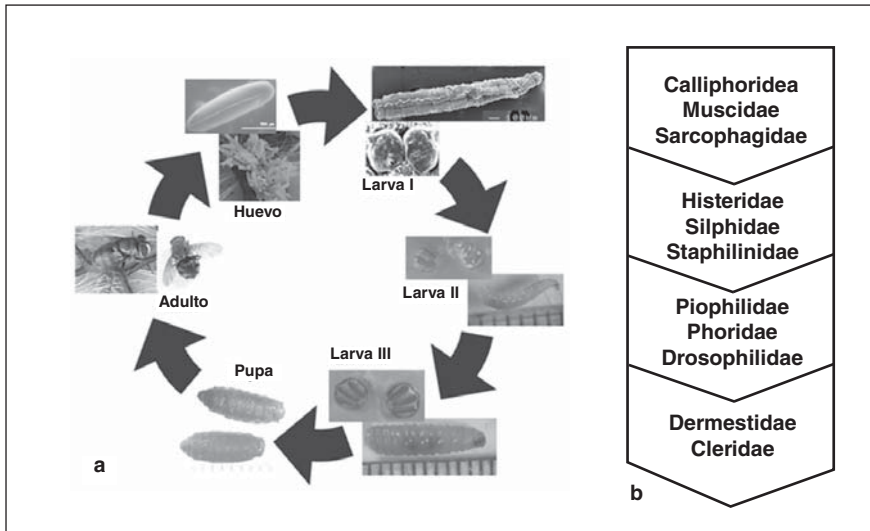
de dípteros, son frecuentes tanto en individuos dependientes (niños, enfermos o ancianos), como en animales (ganado, mascotas, etc.) (ZUMPT, 1965, STEVENS & WALL, 1997, SOLER-CRUZ, 2000, BENECKE & LESSIG, 2001, BENECKE *et al.*, 2004, AMENDT *et al.*, 2011). Asimismo, los estudios entomotoxicológicos 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*, en 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.).
- La alimentación, en la que algunos insectos son reconocidos como una fuente de materia prima de interés, por ejemplo en la elaboración de piensos para acuicultura, por su riqueza proteica y bajo contenido graso (RUMPOLD & SCHLÜTTER, 2013).

En los últimos años, la entomología forense se ha constituido como una herramienta fundamental para los equipos de investigación criminal de las principales potencias mundiales, 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.*, 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* (KATTSCH *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 patológicos 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 (Figura 1) (CATTS & GOFF, 1992, TURCHETTO *et al.*, 2001, AMENDT *et al.*, 2011).



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

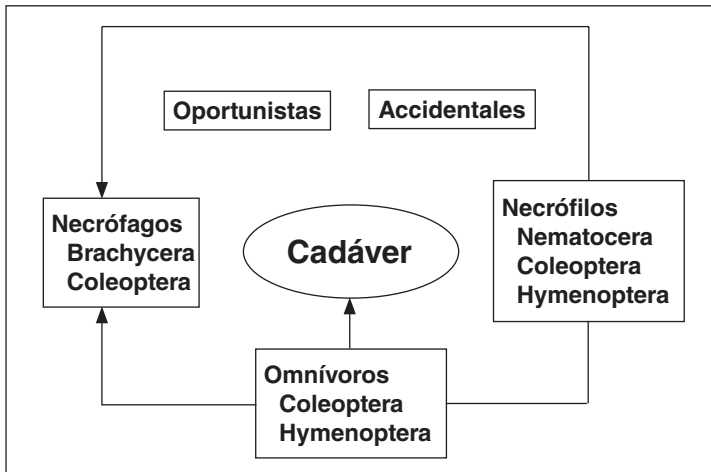
En este punto, es importante considerar que tras la muerte se producen una serie de cambios y transformaciones fisicoquímicas que convierten al cadáver en un biotopo único y dinámico, al que se asocian diferentes grupos ecológicos que se suceden según el estado de descomposición del mismo (Tabla 2) (MAGAÑA, 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 convención para animales, y asimilables a las descritas para cadáveres humanos (cromática, enfisematosa, coligulativa y esquelética) por GISBERT-CALABUIG, 1991.

| ESTADO                  | DURACIÓN (DÍAS) | DESCRIPCIÓN  |
|-------------------------|-----------------|--|
| Fresco                  | 0-2             | Desde la muerte hasta la hinchazón evidente        |
| Enfisematoso            | 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           | Deseccación 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 del cadáver), necrófilos (se alimentan 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) (Figura 2) (LECLERCQ, 1978, SMITH, 1986, BRAACK, 1987, AMENDT *et al.*, 2011).



**Figura 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 que los insectos aparecen en un cadáver siguiendo un patrón de sucesión característico (MÉGNIN, 1894), produciéndose secuen-

cialmente 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 orgánica en descomposición, está constituida 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 aporta 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 IPM, para lo cual el prerrequisito crítico es la correcta identificación de los especímenes recolectados (HARVEY *et al.*, 2003, REIBE *et al.*, 2009).

La identificación entomológica tradicional es una técnica comparativa basada en el reconocimiento de caracteres morfológicos diagnósticos (SMITH, 1986, GONZÁLEZ-MORA & PERIS, 1988, PERIS & GONZÁLEZ-MORA, 1991), que requiere 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.*, 2003, 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.*, 2003). Todas estas razones hacen que los métodos de identificación morfológica resulten complejos o incluso inviables, 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

### 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 & MARKET, 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 (HPLC o *high performance liquid chromatography*) 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 (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) (AVISE *et al.*, 1979, BROWN & WRINGHT, 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.*, 2003).

Posteriormente, en 1986, una nueva técnica descrita por Mullis *et al.*, 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 (MULLIS *et al.*, 1986). 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) (ALBERTS *et al.*, 1996). 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 por 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 (matrilineal) 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 & SACCONI, 1987, LUIZ, 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 (SATTI *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 (- datos no disponibles).

| CARACTERÍSTICAS  | ADNnu                 | ADNmt                      |
|------------------|-----------------------|----------------------------|
| Localización     | Núcleo                | Mitocondrias               |
| Forma            | Lineal                | Circular                   |
| Tamaño           | Grande (180 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                 |

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 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 (Figura 3) (LUIZ, 2000, OLIVEIRA *et al.*, 2008).



**Figura 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-MALTEMPI & 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  |    | II | III | IV | V  | VI | REFERENCIAS                       |
|----------------------|----|----|----|-----|----|----|----|-----------------------------------|
|                      | X  | Y  |    |     |    |    |    |                                   |
| <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 regiones no codificantes intergénicas conocidas como transcritos internos espaciadores (ITSs) (WELLS & STEVENS, 2010). Convencionalmente, el ITS del ADNr nuclear incluye la región ITS1, el gen 5.8S y la región ITS2 (Figura 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 aparece 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 homogeneiza las diferencias entre copias, lo que hace posible su tratamiento como un único gen (HERSHKOVITZ *et al.*, 1999).



**Figura 4.** Organización típica de las regiones codificantes y espaciadoras del ARN ribosómico nuclear de una célula eucariota. Adaptado de COLEMAN, 2003.

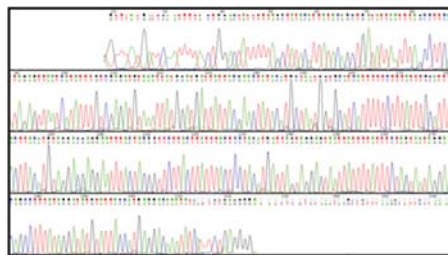
#### Estado Actual

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 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, los científicos forenses han 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 alta tasa de mutación respecto al ADN nuclear (ADN-nu), por lo que aumenta la posibilidad de hallar en él marcadores especie-específicos que proporcionan información taxonómica y filogenética (AVISE *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 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*) (HERBERT *et al.*, 2003). Otros *loci* mitocondriales menos frecuentes son las subunidades 4 y 4L de la nicotinamida deshidrogenasa (NAD4 y NAD4L) (NELSON *et al.*, 2012), la región no codificante situada entre el ARN transferente para la serina (ARNt<sup>ser</sup>) y la NAD1 (WEIGL *et al.*, 2010), 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, el transcrito interno espaciador (ITS) del ADN ribosómico nuclear (ADNr) es una herramienta habitual 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.*, 2008, 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 (Figura 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.*, 2003).



**Figura 5.** Electroferograma o cromatograma: 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 se encuentra 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) (AMENDT *et al.*, 2007, 2011). Habitualmente, se 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.** Método 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°C        | 30-60 s   | Etanol 80-95%*       |
|                 | -20°C (en seco)    | 30 min    | -20°C o -80°C        |
| Pupas           | Etanol 70%         | ∞         | Etanol 70%*          |
| Puparios        | -                  | -         | Etanol 70%*          |
| Adultos         | Etanol 70%         | ∞         | Etanol 70%*          |
|                 | -20°C (en seco)    | 30-60 min | T° ambiente          |

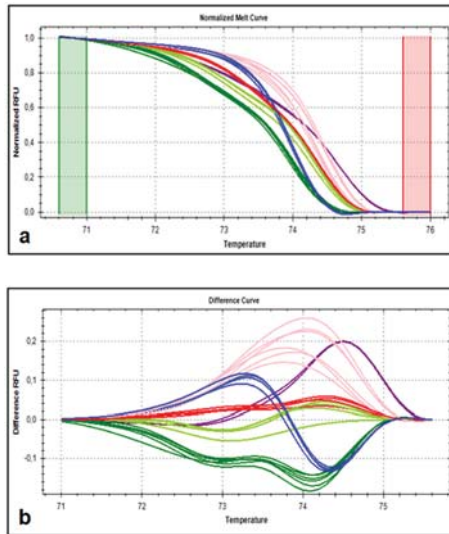
\* A su vez se pueden mantener a -20°C para mejorar la conservación.

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 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), comprometiéndose 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

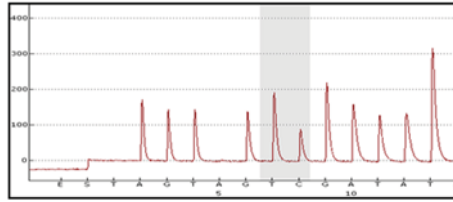


este sentido, la pirosecuenciación y las curvas de disociación de alta resolución de productos de PCR, o HRM (*high resolution melting*), son alternativas rentables y efectivas, al procesar un número de muestras elevado en un tiempo breve y tener protocolos más sencillos (WELLS & STEVENS, 2010, RADVANSKY *et al.*, 2011). El HRM permite trabajar sin manipulación post-PCR, ya que el análisis tiene lugar en un único tubo cerrado, reduciendo así el riesgo de contaminación (Figura 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 (BRAUDRY *et al.*, 2003, MALEWSKI *et al.*, 2010, RADVANSKY *et al.*, 2011).



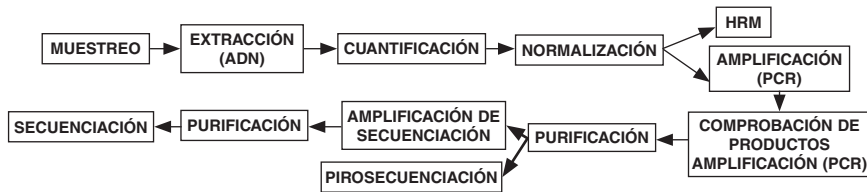
**Figura 6.** Análisis de HRM. a) Curva de disociación normalizada característica para cada especie; b) Gráfico de diferencias entre las curvas de disociación de diversas especies de califóridos. Cada color corresponde a una especie diferente.

Por otra parte, la pirosecuenciación proporciona una elevada fiabilidad y precisión, al identificarse cada nucleótido de forma independiente y registrarse en tiempo real (Figura 7) (AHMADIAN *et al.*, 2006, WELLS & STEVENS, 2010). Asimismo, permite analizar 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).



**Figura 7.** Pirograma: cada pico o máximo representa un nucleótido y su altura es indicativa del número de veces que se repite.

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 (Figura 8).

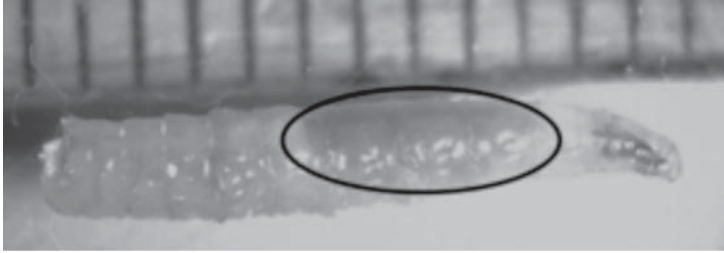


**Figura 8.** Diseño experimental para las siguientes técnicas analíticas: secuenciación convencional (Sanger), HRM y pirosecuenciación.

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 una forma relativamente más rápida y económica (NELSON *et al.*, 2012). Esta novedosa metodología está diseñada para el estudio de amplificadores 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 alimentación de los insectos contribuyendo a detectar ADN humano y de otras especies en el tracto digestivo de larvas necrófagas (Figura 9) o de hematófagos adultos (DI LUISE *et al.*, 2008, WELLS & STE-

VENS, 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).



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

## 2. APLICACIONES DE LA ENTOMOLOGÍA MOLECULAR

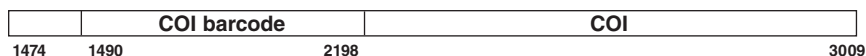
### 2.1. IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA

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 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 como recurso alternativo a la identificación tradicional (WELLS & STEVENS, 2010) 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 NAD deshidrogenasa (NAD4, NAD5) (CATERINO *et al.*, 2000, ZEHNER *et al.*, 2004, 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).

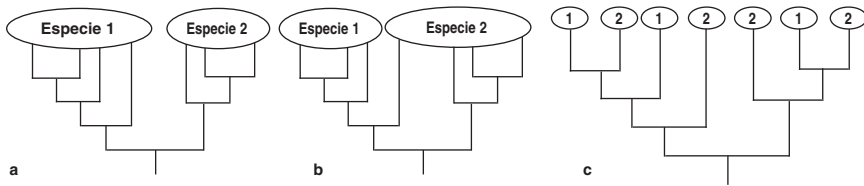
En insectos, la mayoría del ADNmt estudiado comprende alguna región de los genes que codifican para el COI o COII (SPERLING *et al.*, 1994, MALGORN & COQUOZ, 1999, WELLS *et al.*, 2001b, WELLS & STEVENS, 2010). Inicialmente, los investigadores eligieron el *locus* COI para la obtención de perfiles genéticos de insectos, por ser el gen que codifica para la subunidad de mayor tamaño de la citocromo oxidasa y combina regiones variables y altamente conservadas (CLARY & WOHLSTENHOLME, 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 (Figura 10) (HERBERT *et al.*, 2003, WILL & RUBINOFF, 2004, ERPENBECK *et al.*, 2005, NELSON *et al.*, 2007, MEIKLEJOHN *et al.*, 2009). Además, este proyecto ha creado la base de datos «The barcode of life database» (BOLD, [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)) donde se recogen miles de secuencias de la región «barcode» de una gran variedad de organismos (RATNASINGHAM & HERBERT, 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 «barcode gap», que es el hueco o espacio que queda entre la distancia máxima intra-específica y la mínima inter-específica (HERBERT *et al.*, 2004). Así, la detección 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).



**Figura 10.** El 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.

cos cuando se trata de diferenciar especies estrechamente relacionadas de algunos géneros de 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 (BOEHME *et al.*, 2010, WELLS & STEVENS, 2010, SCHILTHUIZEN *et al.*, 2011, 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, BENECHE & 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 a otras especies (Figura 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.



**Figura 11.** Capacidad discriminativa de un gen para dos especies: a) Especie 1 y 2 muestran un origen monofilético, el gen permite una identificación específica óptima, b) La especie 1 es monofilética, pero la especie 2 es parafilética, las dos especies pueden presentar secuencias homólogas, la identificación no es inequívoca y c) Las dos especies comparten la información genética, mostrando un origen polifilético, 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 a nivel morfológico 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 (*Ch. augur-Ch. dubia*, *Ch. stygia-Ch. albifrontalis* y *Ch. hilli-Ch. varifrontis*, *L. illustris-L. caesar* y *L. cuprina-L. sericata*) 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 ARN (18S y 28S), o el primer o segundo transcrito interno espaciador (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* (Hawái, 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).

En principio, los resultados obtenidos con el 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 Hawái) (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 (ULLYETT, 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 pobla-

ciones 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.*, 2003, 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           |
| Patrones de desarrollo                     | Modelos de sucesión   | Distribución       | Climatología | Estacionalidad | Desplazamiento           |
| Búsqueda de responsables                   |                       |                    |              |                |                          |

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

## 2.2. 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), del tráfico ilegal de vehículos o de otras mercancías, de personas, etc.

Comúnmente, el ADNmt se considera un buen candidato en los estudios filogenéticos por varias características de las que carecen los genes nucleares (LUIZ, 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, HERBERT *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 de información procedente de muchas fuentes diferentes, como morfología, etología, 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 ADNnu 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 enfermedades, 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, en el ámbito de la entomología forense este campo está aún sin desarrollar. 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 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, 2010). Así, aunque algunos autores dicen haber detectado, para el COI *barcode* y otros genes mitocondriales, una relación entre distancia geográfica y divergencia genética en algunas poblaciones, lo cierto es que habitualmente ésta no es significativa.

Comúnmente, los genotipos hipervariables, es decir, los que tienden a variar intra-específicamente, son los habitualmente 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 utilizados en genética de poblaciones para determinar el origen filogeográfico, teniendo en cuenta los linajes característicos definidos para cada región (LUIZ, 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), siendo su localización, 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, 2005). No obstante, requieren una adaptación regional y, de momento, no son aplicables de forma 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).

### 2.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DIGESTIVO DE INSECTOS

Desde una perspectiva forense, algunas de las estrategias de alimentación que los insectos han desarrollado 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 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.

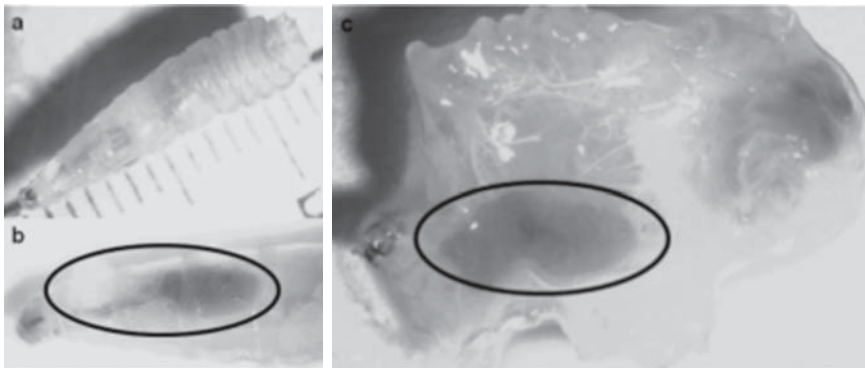
| IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL HUMANA                                     |   |                                    |   |
|--|---|------------------------------------|---|
| Muertes Violentas, Abusos o Negligencias asociadas a casos de miasis |   |                                    |   |
| Inmaduros necrófagos   |   | Adultos hematófagos                |   |
| En un lugar<br>(Coche, casa,<br>etc.)                                | En la víctima<br>( <i>Post-mortem</i> /<br><i>Ante-mortem</i> ) | En un lugar<br>(Habitación, etc.)  | En la víctima<br>( <i>Post-mortem</i> /<br><i>Ante-mortem</i> ) |
| Conexión con<br>Víctima/Cadáver                                      | Identificación<br>Víctima/Cadáver                               | Conexión con<br>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, GARIEPY *et al.*, 2012). En general, la tasa de digestión varía entre grupos de insectos, y depende de factores ambientales, fisiológicos y etológicos (GARIEPY *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 recomendado es sacrificar, lo antes posible, el espécimen mediante congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  (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       | $-20^{\circ}\text{C}$ (en seco) | $-20$ ó $-80^{\circ}\text{C}$ (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.*, 2004). 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 (Figura 12) (COULSON *et al.*,



**Figura 12.** Disección de inmaduros necrófagos para el aislamiento del buche. a) Inmaduro completo, b) Buche y c) Disección para extracción del buche.

1990, LINVILLE *et al.*, 2004). Conviene mencionar que las propiedades desnaturalizantes 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).

Actualmente, la identificación individual humana se realiza de forma rutinaria mediante el análisis de una batería de *loci* STRs establecidos. Los *loci* STR son secuencias cortas repetidas en tándem que se encuentran situadas 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 kits 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.

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, habitualmente, se analiza en los laboratorio forenses (PARSON *et al.*, 2000, WELLS & STEVENS, 2010). Sin embargo, hay que mencionar que la creciente avalancha de información generada para el marcador 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.

#### 2.4. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

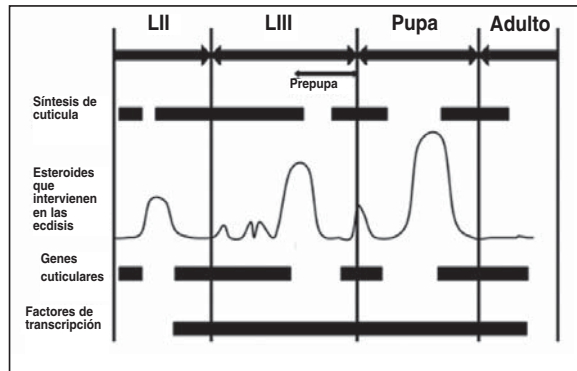
Casi la totalidad de la información expuesta hasta el momento, se ha referido al análisis de ADN (ADNnu y ADNmt), desde un enfoque principalmente de diagnóstico o de caracterización. Sin embargo, en la actualidad, el ácido ribonucleico (ARN) está siendo frecuentemente utilizado en estudios sobre expresión génica para revelar los genes activos en el momento de procesamiento 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-embriionario, 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 externos (AMENDT *et al.*, 2011). Otros criterios, como los cambios en sus órganos internos podrían ser de utilidad, pero todavía no están claramente establecidos (WELLS & STEVENS, 2010, GREENBERG & KUNICH, 2002).

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). 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, utilizando la variación en la expresión del ARNm (TARONE *et al.*, 2007). Asimismo, en otros insectos, estudios realizados sobre la regulación hormonal de los genes de las proteínas cuticulares revelaron

notables diferencias en la expresión génica según la etapa de desarrollo (Figura 13) (CHARLES, 2010).



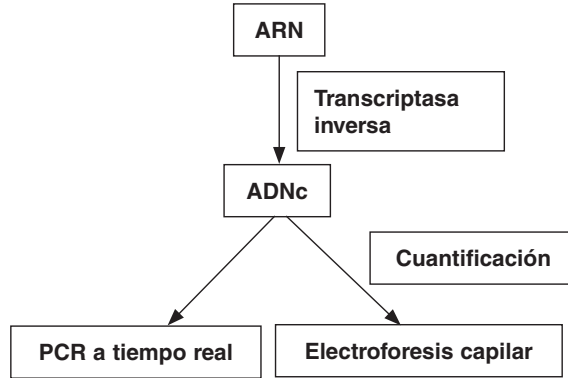
**Figura 13.** Representación simplificada de los períodos de síntesis de cutícula y de los esteroides que intervienen en la ecdisis, durante el desarrollo larvario y de la metamorfosis de *Drosophila*, y que se solapan con los períodos de expresión de los genes cuticulares y la activación de los factores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

Adaptado de CHARLES, 2010.

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 mínimo (WELLS & STEVENS, 2010).

Por último, hay que mencionar que la metodología de trabajo con ARN difiere notablemente de la aplicada tradicionalmente para el ADN (Figura 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, 2007). 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 cuanti-

fica por electroforesis (JUUSOLA & BALLANTYNE, 2007, FLEMING & HARBISON, 2010) o PCR a tiempo real (NOREAULT-CONTI & BUEL, 2007, HAAS *et al.*, 2009, AMENDT *et al.*, 2011).



**Figura 14.** Metodología de análisis de ARN. Adaptado de BUTLER, 2012.

### 3. 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 avanzados 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 mo-

delos matemáticos que agilicen y garanticen la calidad del peritaje. Complementariamente, la correcta identificación taxonómica de individuos, tanto adultos como larvas, encontrados en un cuerpo y/o en el lugar de un suceso es un paso crucial para que el curso de la investigación sea legítimo (MALGORN & COQUOZ, 1999). Así, resulta fundamental disponer de herramientas para la correcta identificación de las especies de insectos necrófagos más representativas, que hagan posible la estimación precisa del tiempo y lugar del 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 computerizada, 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 incorporando 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 hidrocarburos cuticulares han demostrado ser de interés para la discriminación de especies estrechamente relacionadas o poblaciones complejas en algunos insectos como cucarachas (CLARSON & BRENNER, 1988, EVERAERTS *et al.*, 1997), y mosquitos (PHILLIPS *et al.*, 1990, HORNE & PRIESTMANN, 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 nuevas 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.



## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Dr. Xabier Elcoroaristizabal y a las MSc. Estibaliz Cuesta y Estibaliz Etxeberría su colaboración con las figuras cedidas. Maite GilArriortua agradece haber sido financiada por la UPV/EHU dentro del programa de «Ayuda para la Formación de Personal Investigador».

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. ADAMS MD, CELNIKER SE, HOLT RA, EVANS CA. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 2000, 287:2185-2195.
3. AGRAWAL UR, BAJPAI N, KURAHASHI H, TEWARI RR. Metaphase karyotypes of four species of Calliphoridae (Diptera). Chromosome Science 2010, 13:49-52.
4. AHMADIAN A, EHN M, HOBBER S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. Clinica Chimica Acta 2006, 363:83-94.
5. ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Biología molecular de la célula. Omega. Barcelona, 1996, 1387 pp.
6. 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.
7. ÁLVAREZ M, JUUSOLA J, BALLANTYNE J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. Analytical Biochemistry 2004, 335:289-298.
8. ÁLVAREZ I, WENDEL JF. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution 2003, 29:417-434.
9. AMENDT J, CAMPOBASSO CP, GAUDRY E, REITER C, LEBLANC NH, HALL MJR. Best practice in forensic entomology: Standards and guidelines. International Journal of Legal Medicine 2007, 121:90-104.
10. AMENDT J, RICHARDS CS, CAMPOBASSO CP, ZEHNER R, HALL MJR. Forensic entomology: Applications and limitations. Forensic Science Medicine and Pathology 2011, 7:379-392.
11. ANDERSON GS. The use of insects to determine of decapitation: A case study from British Columbia. Journal of Forensic Sciences 1997, 42:947-950.
12. ANDREASSON H, ASP A, ALDERBORN A, GYLLENSTEN U, ALLEN M. Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology. Biotechniques 2002, 32:124-126.
13. ARBEITMAN MN, FURLONG EEM, 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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 Ecological Systems* 1987, 18:489-522.
17. 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.
18. BASTOS-SILVEIRA C, SANTOS S, MONARCA R, MATHIAS MDA L, HECKEL G. Deep mitochondrial introgression and hybridization among ecologically divergent vole species. *Molecular Ecology* 2012, 21:5309-5323.
19. BEDO DG. Cytological characterization of heterochromatin in mitotic and meiotic chromosomes of the old world screw worm fly *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *Genome* 1991, 34:631-637.
20. 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.
21. BENECKE M. A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International* 2001, 120:2-14.
22. BENECKE M, JOSEPHI E, ZWEIHOFF R. Neglect of the elderly: Forensic entomology cases and considerations. *Forensic Science International* 2004, 146:195-199.
23. BENECKE M, LESSIG R. Child neglect forensic entomology. *Forensic Science International* 2001, 120:155-159.
24. BENECKE M, WELLS JD. DNA techniques for forensic entomology analysis, pp. 341-352. Byrd JH, Castner JL (eds.). *Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press, Boca Raton, 2001.
25. BERNASCONI MV, PAWLOWSKI J, VALSANGIACOMO C, PIFFARETTI JC, WARD PI. Phylogeny of the Scathophagidae (Diptera: Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2000, 16:308-315.
26. BLAIR JE, HEDGES SB. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Molecular Biology and Evolution* 2005, 22:2275-2284.
27. BOEHME P, AMENDT J, DISNEY RHL, ZEHNER R. Molecular identification of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. *International Journal of Legal Medicine* 2010, 124:577-581.
28. 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.

29. BOYES JW, SHEWELL GE. Cytotaxonomy of Calliphoridae (Diptera). *Genetica* 1975, 45:435-488.
30. BOYES JW, WILKES A. Somatic chromosomes of higher Diptera I: Differentiation of tachinid parasites. *Canadian Journal of Zoology* 1953, 31:125-165.
31. BRAACK L. Community dynamics of carrion-attendant arthropods in tropical African woodland. *Oecologia* 1987, 72:402-409.
32. BRAGA MV, PINTO ZT, QUEIROZ MMC, MATSUMOTO N, BLOMQUIST GJ. Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: Pupal cases from Sarcophagidae. *Acta Tropica* 2013, 128:479-485.
33. BRANICKI W, KUPIEC T, PAWLOWSKI R. Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of Forensic Sciences* 2003, 48:1-5.
34. BRAUDRY 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.
35. 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.
36. 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.
37. BROWN WM, WRINGHT JW. Mitochondrial DNA analysis of the origin and relative age of partenogenic lizards (genus *Cnemidophorus*). *Science* 1979, 203:1247-1249.
38. BUCKLER ES, IPPOLITO A, HOLTSFORD TP. The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 1997, 145:821-832.
39. BUTLER JM. *Advances topics in forensic DNA typing: Methodology*. Elsevier Academic Press. San Diego, 2012, 704 pp.
40. BYRD JH. Laboratory rearing of forensic insects, pp. 127-128. Byrd JH, Castner JL (eds.). *Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press, New York, 2001.
41. CAMPOBASSO CP, INTRONA F. The forensic entomologist in the context of the forensic pathologists' role. *Forensic Science International* 2001, 120:132-139.
42. CANTATORE P, SACCONI C. Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. *International Review of Cytology* 1987, 108:149-208.
43. CARVALHO L, THYSSEN P, LINHARES A, PALHANES F. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in South-eastern Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2000, 95:135-138.
44. CATERINO MS, CHO S, SPERLING FAH. The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 2000, 45:1-54.
45. CATTS E, GOFF L. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology* 1992, 37:253-272.

46. CHARLES JP. The regulation of expression of insect cuticle protein genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2010, 40:205-213.
47. CHARLESWORTH B, CONYE JA, BARTON NH. The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *The American Naturalist* 1987, 130:113-146.
48. CHILDRESS D. Polytene chromosomes and linkage group-chromosome correlations in the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Chromosoma* 1969, 26:208-214.
49. 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.
50. CLARY DO, WOHLSTENHOLME DR. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and the genetic code. *Journal of Molecular Evolution* 1985, 22:252-271.
51. CLAYTON DA. Structure and function of the mitochondrial genome. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1992, 15:439-447.
52. COGNATO AI, SPERLING FAH. Phylogeny of *Ips* DeGeer species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2000, 14:445-460.
53. COLEMAN AW. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 2003, 19:370-375.
54. COULSON RM, CURTIS CF, READY PD, HILL N, SMITH DF. Amplification and analysis of human DNA present in mosquito blood meals. *Medical and Veterinary Entomology* 1990, 4:357-366.
55. 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.
56. DADOUR IR, COOK DF, FISSIOLI JN, BAILEY WJ. Forensic entomology: Application, education and research in Western Australia. *Forensic Science International* 2001, 120:48-52.
57. DAYRAT B. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 2005, 85:407-415.
58. DE LA RÚA P, GALIÁN J, SERRANO J, MORITZ RFA. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology* 2001, 10:1733-1742.
59. DEVOS KM, GALE MD. Genome relationships: The grass model in current research. *Plant Cell* 2000, 12:637-646.
60. 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* 2008, 1:591-592.
61. DRIFTHOUT FP. Cuticular hydrocarbons: A new tool in forensic entomology? pp. 179-203. Amendt J, Campobasso CP, Lee Goff M, Grassberger M (eds.). *Current concepts in forensic entomology*. Springer, New York, 2010.

62. DURANDO CM, BAKER RH, ETGES WJ, HEED WB, WASSWERMANN 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.
63. EBERHARDT T, ELLIOT DA. A preliminary investigation of insect colonisation and succession on remains in New Zealand. *Forensic Science International* 2008, 176:217-223.
64. 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, 1:1-4.
65. EVERAERTS C, FARINE JP, BROUSSOT 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.
66. FLEISCHMANN W, GRASSBERGER M, SHERMAN R. *Maggot therapy: A handbook of Maggot-Assisted Wound Healing*. Thieme. Stuttgart, 2004, 85 pp.
67. 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.
68. FLORIN AB, GYLLENSTRAND N. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the blowflies *Lucilia illustris* and *Lucilia sericata*. *Molecular Ecology Notes* 2002, 2:113-116.
69. FREDERICKX C, DEKEIRSSCHIEER J, BROSTAUX Y, WATHELET J-P, 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.
70. FUNK DJ, OMLAND KE. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecological Systems* 2003, 34:397-423.
71. GARCÍA CA, AHMADIAN A, GHARIZADEH B, LUNDEBERG J, RONAGHI M, NYREN P. Mutation detection by pyrosequencing: Sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene. *Gene* 2000, 253:249-257.
72. GARIÉPY TD, LINDSAY R, OGDEN N, GREGORY TR. Identifying the last supper: Utility of the DNA barcode library for blood meal identification in ticks. *Molecular Ecology Resources* 2012, 12:646-652.
73. GILARRIORTUA M, SALOÑA MI, CAINE 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.
74. GILARRIORTUA M, SALOÑA MI, KÖHNEMANN 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* 2014, 242:274-282.
75. GIBBERT-CALABUIG JA. *Medicina legal y toxicología*. Masson-Salvat Medicina. Barcelona, 1991, 870 pp.

76. GONZÁLEZ-MORA D, PERIS SV. Los Calliphoridae de España I: Rhiniinae y Chrysomyinae. *Eos* 1988, 64:91-139.
77. GOSSELIN M, DI FRAZIO V, WILLE SMR, RAMIREZ 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.
78. 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.
79. GRASSBERGER M, REITER C. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terranova* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International* 2002, 128:177-182.
80. GREENBERG B. Flies as forensic indicators. *Journal of Medicine Entomology* 1991, 28:565-577.
81. GREENBERG B, KUNICH JC. Problems estimating time of death, pp. 161-164. Greenber B, Kunich JC (eds.). *Entomology and the law: Flies as forensic Indicators*. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
82. GUNNING KM, McINTYRE E, BROWN C, CHANSKY K, BOUREY J, JOHNSON B, WHEATON A, WIKE C. ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer: Further advances to expand productivity. Applied Biosystems Document#105549. 2006.
83. GYLLESTEIN U, WHARTON D, JOSEFSSON A, WILSON AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 1991, 352:255-257.
84. HAAS C, KLESSER B, MAAKE C, BÄR W, KRATZER A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and time PCR. *Forensic Science International: Genetics* 2009, 3:80-88.
85. HALL RD. Medico-criminal entomology, pp. 1-8. Catts EP, Haskell NH (eds.). *Entomology and death: A procedural guide*. Joyce's Print Shop, Clemson, 1990.
86. HARTL DL, LOZOVSKAYA ER. Genome evolution between the nucleosome and the chromosome, pp. 579-592. Schierwater B, Streit B, Wagner GP, DeSalle R (eds.). *Molecular ecology and evolution: Approaches and applications*. Birkhäuser, Basel, 1994.
87. HARTL DL, LOZOVSKAYA ER. The *Drosophila* genome map: A practical guide. RG Landes Company. Austin, 1995, 240 pp.
88. HARVEY ML, DADOUR IR, GAUDIERI S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: Potential for distinction between stages of some forensically important fly species (Diptera) in Western Australia. *Forensic Science International* 2003, 131:134-139.
89. 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.
90. HERBERT PD, CYWINSKA A, BALL SL, DE WAARD JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences* 2003, 270:313-321.

91. HERBERT PD, STOECKLE MY, ZEMLAK TS, FRANCIS CM. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2004, 2:1657-1663.
92. HERSHKOVITZ MA, ZIMMER EA, HAHN WJ. Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematic, pp. 268-326. Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RL (eds.). *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor & Francis, London, 1999.
93. HOLECOVA M, ROZEK M, MARYANSKA-NADACHOWSKA A, JÁNOSKOVÁ V. Karyotype of the bird blowfly, *Protocalliphora falcozi* Séguy, 1928 (Diptera: Calliphoridae). *Folia Biologia* 2012, 60:129-133.
94. HORNE GL, PRIESTMANN AA. The chemical characterization of the epicuticular hydrocarbons of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research* 2002, 92:287-294.
95. 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, 154:3-4.
96. HUNTER RL, MARKET CL. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 1957, 125:1294-1295.
97. IHGSC: INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409:860-921.
98. INTRONA F, CAMPOBASSO CP, GOFF ML. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 2001, 120:42-47.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. JUUSOLA J, BALLANTYNE J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *Journal of Forensic Sciences* 2007, 52:152-162.
104. KAATSCH HJ, STADLER M, NIETERT M. Photometric measurement of color changes in *livor mortis* as a function of pressure and time. *International Journal of Legal Medicine* 1993, 106:91-97.
105. 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.

106. KENEUKE W. Über die Spermatogenese einiger Dipteren. Z. Zellenlehre 1924, 1:357-412.
107. KONDAKCI GO, BULBUL O, SHAHZAD MS, POLAT E, CAKAN H, ALTUNCUL H, FILOGLU G. STR and SNP analysis of human DNA from *Lucilia sericata* larvae's gut contents. Forensic Science International: Genetics 2009, 2:178-179.
108. KONDO R, SATTI Y, MATSUURA ET, ISHIWA H, TAKAHATA N, CHIGUSA SI. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. Genetics 1990, 126:657-663.
109. 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.
110. KURAHASHI H, OHTAKI T. Geographic variation in the incidence of pupal diapauses in Asian and Oceanic species of flesh fly *Boettcherisca* (Diptera: Sarcophagidae). Physiological Entomology 1989, 14:291-98.
111. LAIRD CD. DNA of *Drosophila* chromosome. Annual Review of Genetics 1973, 7:177-204.
112. 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.
113. LECLERCQ M. Entomologie et médecine légale: Datation de la mort. Masson. París, 1978, 100 pp.
114. LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 1964, 52:201-220.
115. 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.
116. LINVILLE JG, HAYES J, WELLS JD. Mitochondrial DNA and STR analyses of maggot crop contents: Effect of specimen preservation technique. Journal of Forensic Science 2004, 49:1-4.
117. LORD WD. Case histories of use of insects in investigations, pp. 9-37. Catts EP, Haskell NH (eds.) Entomology and death: A procedural guide. Joyce's Print Shop, South Carolina, 1990.
118. LORD WD, DiZINNO JA, WILSON MR, BUDLOWLE B, TAPLIN D, MEINKING TL. Isolation amplification and sequencing of human mitochondrial DNA obtained from human crab louse *Phthirus pubis* (L.) blood meals. Journal of Forensic Science 1998, 43:1097-1110.
119. LUIZ S. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. Genetics and Molecular Biology 2000, 23(4):745-752.
120. M DE PANCORBO M, CASTRO A, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ I, CUEVAS N, CASTILLO M, SALOÑA MI. Molecular identification of arthropods by cytochrome b analysis. International Congress Series 2004, 1261:398-400.
121. M DE PANCORBO M, RAMOS R, SALOÑA MI, SÁNCHEZ P. Entomología Molecular Forense. Ciencia Forense 2006, 8:107-130.



122. 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.
123. 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.
124. MALGORN Y, COQUOZ R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. Forensic Science International 1999, 2:111-119.
125. MANEL S, GAGGIOTTI EO, WAPLES RS. Assignment methods: Matching biological questions with appropriate techniques. Trends in Ecology & Evolution 2005, 20:136-42.
126. MAZZANTI M, ALESSANDRINI F, TAGLIABRACCI A, WELLS JD, CAMPOBASSO C. DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: Genetic identification limits in forensic entomology. Forensic Science International 2010, 195:99-102.
127. MÉGNIN P. La faune des cadavres: Application de l'entomologie à la médecine légale. Encyclopédie scientifique des Aides-Mémoire, Masson G. et Gautrier-Villars. Paris, 1894, 214 pp.
128. MEIKLEJOHN KA, WALLMAN JF, DOWTON M. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). International Journal of Legal Medicine 2009, 125:27-32.
129. MELIC A. Los artrópodos y el hombre. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa 1997, 20:1-468.
130. 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.
131. 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 (2):123-127.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. NELSON LA, WALLMAN JF, DOWTON M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. Medical and Veterinary Entomology 2007, 21:44-52.
136. 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.

137. NORAULT-CONTI TL, BUEL E. The use of Real-time PCR for forensic stain identification. *Promega Profiles in DNA* 2007, 10:3-5.
138. OLIVEIRA MT, BARAU JG, JUNQUERIA AC, FEIJA 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.
139. 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.
140. PARISE-MALTEMPI PP, AVANCINI RMP. C-banding and FISH in chromosomes of blow flies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Memories do Instituto Oswaldo Cruz* 2001, 96:371-377.
141. PARNÉS A, LAGAN K. Larval therapy in wound management: A review. *International Journal of Clinical Practice* 2007, 61:488-93.
142. PARSON W, PEGORARO K, NIEDERSTATTER H, FÖGER M, STEINLENCHNER M. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 2000, 114:23-28.
143. PERALTA B, GILARRIORTUA M, SALOÑA 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.
144. PERIS SV, GONZÁLEZ-MORA D. Los Calliphoridae de España, III Lucilini (Diptera). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* 1991, 87:187-207.
145. 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.
146. 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.
147. POWELL JR. Progress and prospects in evolutionary biology: The *Drosophila* model. Oxford University Press. New York, 1997, 355 pp.
148. 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.
149. PREATIVATANYOU K, SIRISUP N, PAYUNGORN 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.
150. RADVANSKY J, FICEK A, MINARIK G, PALFFY R, 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.
151. RATNASINGHAM S, HEBERT PDN. BOLD: The barcode of life data system. *Molecular Ecology Notes* 2007, 7:355-364 ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)).
  152. REGIER JC, WILSON HM, SCHULTZ JW. Phylogenetic analysis of Myriapoda using three nuclear protein-coding genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2005, 34:147-158.
  153. REIBE S, SCHMITZ J, MADEA B. Molecular identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) from Germany. *Parasitology Research* 2009, 106:257-261.
  154. RICE WR. Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution* 1984, 38: 35-742.
  155. RICHARDS CS, SIMONSEN TJ, ABEL RL, HALL MJR, 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.
  156. 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.
  157. 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.
  158. RUMPOLD BA, SCHLÜTER OK. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2013, 17:1-17.
  159. 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.
  160. SÁNCHEZ JJ, PHILLIPS C, BØRSTING 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.
  161. SATTÀ 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.
  162. SCHILTHUIZEN M, SCHOLTE C, VAN WIJK REJ, DOMMERSHUIJZEN J, VAN DER HORST D, MEIJER SU SCHLOCHTERN M, LIEVERS R, GROENENBERG DSJ. Using DNA-barcoding to make the necrobiont beetle family Cholevidae accessible for forensic entomology. *Forensic Science International* 2011, 210:91-95.
  163. 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 Science International* 2003, 132:76-81.
  164. SHARP PM, LI WH. On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution* 1989, 28:398-402.

165. SMITH KGV. A manual of forensic entomology. The British Museum (Natural History), London and Cornell University Press. London, 1986, 205 pp.
166. SOLER-CRUZ MD. Estudio de las miasis en España durante los últimos cien años. *Ars Pharmaceutica* 2000, 41:19-26.
167. SOLIGNAC M, MONNEROT M, MOUNOLOU JC. Mitochondrial DNA evolution in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution* 1986, 23:31-40.
168. 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.
169. SONG ZK, WANG XZ, LIANG GQ. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, Southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Forensic Science International* 2008, 175:17-22.
170. SPERLING FAH, ANDERSON GS, HICKEY DA. A DNA-bases approach to the identification of insect species used for *post-mortem* interval estimation. *Journal of Forensic Science* 1994, 39:418-427.
171. SPERLING FAH, HICKEY DA. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). *Molecular Biology and Evolution* 1994, 11:656-665.
172. SSYMANK A, KEARNS CA, PAPE, T, THOMPSON FC. Pollinating flies (Diptera): A major contribution to plant diversity and agricultural production. *Tropical Conservancy* 2008, 9:86-89.
173. STEVENS JR, WALL R. The evolution of ectoparasitism in the genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae). *International Journal for Parasitology* 1997, 27:51-59.
174. STEVENS JR, WALL R, WELLS JD. Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Molecular Biology* 2002, 11:141-148.
175. STEVENS NM. A study of the germ cells of certain Diptera with special reference to the heterochromosomes and the phenomenon of synapsis. *Journal of Experimental Zoology* 1908, 5:359-374.
176. TARONE AM, JENNINGS KC, FORAN DR. Aging blowfly eggs using gene expression: A feasibility study. *Journal of Forensic Sciences* 2007, 52:1350-1354.
177. TAYLOR AJ, WEIR RL, HUTTON T, GREEN B. Potential of electrospray mass spectrometry for meat pigment identification. *Meat Science* 1993, 33:15-83.
178. 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.
179. 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.

180. TURCHETTO M, LAFISCA S, CONSTANTINI G. *Post-mortem* interval (PMI) determined by study sarcophagus biocenoses: Three cases from the province of Venice (Italy). *Forensic Science International* 2001, 120:28-31.
181. ULLYETT GC. Species of *Lucilia* attacking sheep in South Africa. *Nature* 1945, 155:636-637.
182. 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.
183. WALL R. The reproductive output of the blowfly *Lucilia sericata*, *Journal of Insect Physiology* 1993, 39:743-750.
184. 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* 2010, 173:317-323.
185. WEIR BS. Intra-specific differentiation, pp. 385-405. Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds.). *Molecular systematics*. Sinauer Associated, Sunderland, 1996.
186. WELLS JD, INTRONA JR, DI VELLA G, CAMPOBASSO CP, HAYES J, SPERLING FAH. Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. *Journal of Forensic Science* 2001a, 46:685-687.
187. WELLS JD, PAPE T, SPERLING FAH. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences* 2001b, 46:1098-1102.
188. WELLS JD, SPERLING FAH. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 1999, 36:222-226.
189. WELLS JD, STEVENS JR. Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology* 2008, 53:103-120.
190. WELLS JD, STEVENS JR. Molecular methods for forensic entomology, pp. 437-452. Byrd JH, Castner JL (eds.). *Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press, Boca Raton, 2010.
191. WELLS JD, WALL R, STEVENS JR. 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.
192. 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.
193. WILL KW, RUBINOFF D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 2004, 20:47-55.
194. WOLFF M, URIBE A, ORTIZ A, DUQUE P. A Primary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. *Forensic Science International* 2001, 120:53-59.
195. 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.

196. ZEHNER R, AMENDT J, KRETTEK R. STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. *Journal of forensic Sciences* 2004, 49:1-4.
197. 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.
198. 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-years-old satins. *International Journal of Legal Medicine* 2009, 123:71-74.
199. ZUMPT F. *Myiasis in man and animals in the Old World*. Butterworth. London, 1965, 267 pp.

**DNA BARCODING OF TWO FORENSICALLY  
IMPORTANT FLESHFLY SPECIES  
(DIPTERA: SARCOPHAGIDAE) FROM SPAIN  
AND NOTES ON BARCODING SUCCESS WITHIN GENUS  
*SARCOPHAGA* MEIGEN, 1826**

MARÍA-ISABEL ARNALDOS<sup>1,4</sup>  
CARLOS RUIZ<sup>2</sup>  
BELÉN TORRES<sup>1</sup>  
ITSASO BEGOÑA<sup>1</sup>  
MARÍA-DOLORES GARCÍA<sup>1,4</sup>  
DOLORES GONZÁLEZ-MORA<sup>3</sup>  
JOSÉ SERRANO<sup>2</sup>

**Resumen:** Se presenta la secuenciación del gen de la citocromo oxidasa I (COI) de poblaciones españolas de *Sarcophaga tibialis* (MACQUART, 1850) y *Sarcophaga cultellata* Pandellé, 1896, dos especies con interés forense, que fueron previamente identificadas empleando otros criterios. *S. tibialis* está relacionada con *Sarcophaga dux* Thomson, 1869 dentro del subgénero *Lio-sarcophaga*, mientras que *S. cultellata* está relacionada con *Sarcophaga crassipalpis* MACQUART, 1839 dentro del subgénero *Liopygia*. Los resultados permiten identificar estados preimaginales, adultos y restos de ambas especies procedentes de casos forenses.

El análisis de nuestros resultados moleculares en relación a los datos de 61 especies del género *Sarcophaga* extraídos de las bases de datos GenBank y BOLD, mostró una correspondencia aceptable entre la identificación

---

<sup>1</sup> Forensic Entomology Laboratory. Faculty of Biology. University of Murcia. 30100 Murcia. Spain.

<sup>2</sup> Area of Animal Biology. Faculty of Veterinary. University of Murcia. 30100 Murcia. Spain.

<sup>3</sup> Department of Zoology and Physical Anthropology. Faculty of Biological Sciences. University Complutense of Madrid. 28040 Madrid. Spain.

<sup>4</sup> Unit of Service of Forensic Entomology and Microscopic Analysis of Evidence. Service of Forensic Sciences and Techniques. University of Murcia. Spain.

previa y la derivada del estudio molecular. La mayor correspondencia (99% de éxito) se obtuvo con umbrales elevados del parámetro Kp2 (10,55%), mientras que con umbrales inferiores (5,02%) la correspondencia descendió al 94%. Aunque se trata de un análisis preliminar, se advierte que la división actual de *Sarcophaga* en subgéneros tiene que ser revisada, ya que algunos de ellos parecen ser polifiléticos.

**Palabras clave:** Citocromo oxidasa I, ciencia forense, entomología forense, *Sarcophaga cultellata*, *Sarcophaga tibialis*, identificación específica.

**Abstract:** COI barcoding sequence of two species of forensic interest, *Sarcophaga tibialis* (MACQUART, 1850) and *Sarcophaga cultellata* Pandellé, 1896, from Spain has been determined. Both species were successfully identified under different criteria. *S. tibialis* was related to *Sarcophaga dux* Thomson, 1869, within the subgenus *Liosarcophaga*, whereas *S. cultellata* was related to *Sarcophaga crassipalpis* Macquart, 1839, within the subgenus *Liopygia*. This study provides a good tool to identify preimaginal stages, male and female adults, and the remnants of these two species for forensic purposes.

A first analysis of 61 species of the genus *Sarcophaga* with all available information obtained from GenBank and BOLD databases, showed that success in correct identification raised up to 94 and 99% under different threshold values of the Kp2 parameter. This analysis also showed that current division of *Sarcophaga* into subgenera is worth to be revised as many of these subgenera might be polyphyletic.

**Key words:** Cytochrome oxidase I, forensic science, forensic entomology, *Sarcophaga cultellata*, *Sarcophaga tibialis*, species identification.

## 1. INTRODUCTION

Forensic entomology deals with entomological evidence that is relevant in legal cases, particularly those related to corpses. Proper identification of evidence is crucial as a misidentification may lead to inaccurate and erroneous conclusions of potentially dramatic consequences. Identification is usually made on the basis of morphological characters observed on adults and compiled in identification keys. However, morphological characters are sometimes difficult to be observed or do not provide a good discrimination among related taxa (SMITH, 1986, GENNARD, 2007, WELLS & STEVENS, 2010).

To the difficulty of identifying entomological evidence it should be added that when dealing with a cadaver, usually preimaginal insect stages are involved making the species identification more difficult due to the lack of adequate keys based on larval characters; in some instances these preimaginal stages are yet unknown (GREENBERG & KUNICH, 2002, GENNARD, 2007, BYRD & CASTNER, 2010). A major advance for solving this problem



has been the publication of identification keys based on larval morphology (VELÁSQUEZ *et al.*, 2010), although these are only valid for few species.

To solve this problem some molecular techniques have been developed to provide an alternative to morphological identification. DNA barcoding, as proposed by HEBERT *et al.* (2003), uses DNA to identify unknown sample in terms of a known classification (KRESS *et al.*, 2005). Dipterists were among the first systematists to extensively use DNA sequences for species identification and delimitation, as the order Diptera contains a large number of economically and forensically important species, of which many are difficult to identify using traditional methods (MEIER & ZHANG, 2009).

A wide variety of molecular markers has been used in Diptera (WELLS & STEVENS 2008), but the best taxon coverage is available for the mitochondrial COI gene, which is the standard for DNA barcoding (MEIER *et al.*, 2009). Despite opinions, such as that of WILL & RUBINOFF (2004) disagreeing with using this analytical method, and some failures in preliminary studies on Dipteran taxa (MEIER *et al.*, 2006), recent research has shown that DNA barcoding is an effective tool to correctly assign DNA sequences to described species (e.g. VINCENT *et al.*, 2000, WELLS *et al.*, 2001, HARVEY 2003, ZEHNER, 2004, AMES *et al.*, 2006a, b, SMITH *et al.*, 2006, 2007, NELSON *et al.*, 2007, MEIER & ZHANG, 2009, CYWINSKA *et al.*, 2010, GUO *et al.*, 2010b, TAN, 2010, ALFRED, 2011, DALTON & KOTZE, 2011, JINBO *et al.*, 2011, MEIKLEJOHN *et al.*, 2012). Following DAWNAY *et al.* (2007), COI gene has sufficiently discrimination and consistently identifies species where authenticated reference sequence data exist.

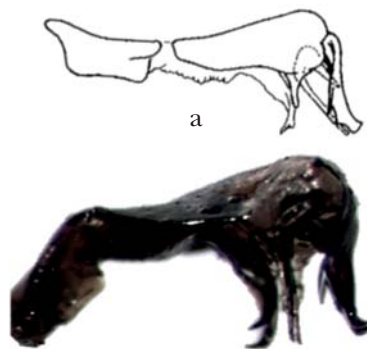
Sarcophagidae is a worldwide distributed dipteran family which includes common members of the sarcosaprophagous fauna, as many of their species develop in excrement, carrion and other media related to forensic issues (SMITH, 1986, POVOLNÝ & VERVES, 1997). These flies can be found associated with carcasses throughout both the early and late stages of decomposition (BYRD & CASTNER, 2010) and therefore have characteristics that make them ideal forensic indicators. However, their utility is severely hampered due to their complex taxonomic framework, the difficulties met in species identification and the lack of enough trained taxonomists (i.e. the taxonomic impediment) (WELLS *et al.*, 2001). In fact, Sarcophagidae flies are notoriously difficult to identify because of their highly similar morphological appearance and that task often requires the study of male genitalia; for many sarcophagid species only adult males can be certainly identified (GUO *et al.*, 2011). However, female genitalia do not include valuable taxonomic characters and thus females are frequently identified in relation to co-occurring males (PRADO E CASTRO *et al.*, 2010).

To date, there are not many DNA barcoding studies related to sarcophagid flies (e.g. DRABER-MONKO *et al.*, 2009, ALFRED, 2011, MEIKLEJOHN *et al.*, 2011, STAMPER *et al.*, 2013) although several studies have dealt with DNA based identification (e.g. KIYOSHI *et al.*, 2005, CAINÉ *et al.*, 2009, HALL *et al.*, 2009, GUO *et al.*, 2010a, b, TAN *et al.*, 2010) or phylogenetic relationships

among lineages of this family based on molecular data (WELLS *et al.*, 2001, ZEHNER *et al.*, 2004, BAJPAI & TEWARI, 2010, KUTTY *et al.*, 2010).

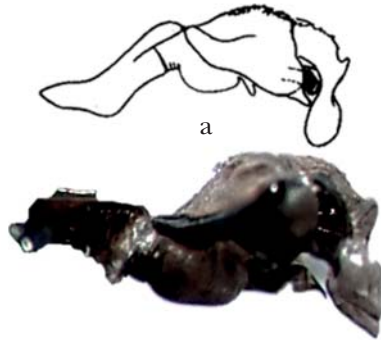
The knowledge of local fauna is very useful in forensic investigations because data from other regions, which may have both different environmental and fauna characteristics, may not provide a sufficient degree of accuracy (ARNALDOS *et al.*, 2004). Although the faunistic knowledge is increasing in the Iberian Peninsula (e.g. ARNALDOS *et al.*, 2001, ARNALDOS *et al.*, 2004, ARNALDOS *et al.*, 2005, PRADO E CASTRO, 2009, PRADO E CASTRO *et al.*, 2010, PRADO E CASTRO *et al.*, 2011a,b) molecular data available with respect to the sarcophagid flies are very limited. In fact there are no records for analysing sequences of the COI gene of flesh flies from Spain. In the Iberian Peninsula sarcophagid species are commonly related to corpses (CASTILLO MIRALBÉS, 2002, ROMERA *et al.*, 2003, CAINÉ *et al.*, 2009, PRADO E CASTRO *et al.*, 2010). Some of their species have been referred from human cadavers (VELÁSQUEZ *et al.*, 2010) and are taxa of forensic interest. Among them there are *Sarcophaga tibialis* (MACQUART, 1851) and *S. cultellata* (Pandellé, 1896). Males of both species are easily recognizable on the basis of their genitalia characters (see below Figures 1 and 2).

*Sarcophaga tibialis* is widely distributed in the Palaearctic, Afrotropical, Oriental, Australasian and Oceanian regions (PAPE, 1996, RICHET *et al.*, 2011) while *S. cultellata* is mainly restricted to Mediterranean areas from France, Italy and Spain (PAPE, 1996, RICHET *et al.*, 2011). The biology of *Sarcophaga cultellata* is almost unknown (ROMERA *et al.*, 2003, ARNALDOS *et al.*, 2013), *Sarcophaga tibialis* tends towards synanthropy (POVOLNÝ & VERVES, 1997), its larvae develop in carcasses and faeces (ASPOAS 1991) and cause traumatic dermal myiasis (ZUMPT, 1965). This species has potentially significance in forensic investigation and as vector of disease (ZUMPT & PATTERSON, 1952). It has already been sequenced (ZEHNER *et al.*, 2004) but



**Figura 1.** Genitalia de los ejemplares macho de *Sarcophaga tibialis* utilizados en este trabajo; a: distifalo según PERIS *et al.* (1999).

**Figure 1.** Male genitalia of *Sarcophaga tibialis* from a specimen used in this study; a: distiphallus from PERIS *et al.* (1999).



**Figura 2.** Genitalia de los ejemplares macho de *Sarcophaga cultellata* utilizados en este trabajo; a: distifalo según PERIS *et al.* (1999).

**Figure 2.** Male genitalia of *Sarcophaga cultellata* from a specimen used in this study; a: distiphallus from PERIS *et al.* (1999).

the fragment analyzed does not correspond to the part of the COI gene usually considered for DNA barcoding.

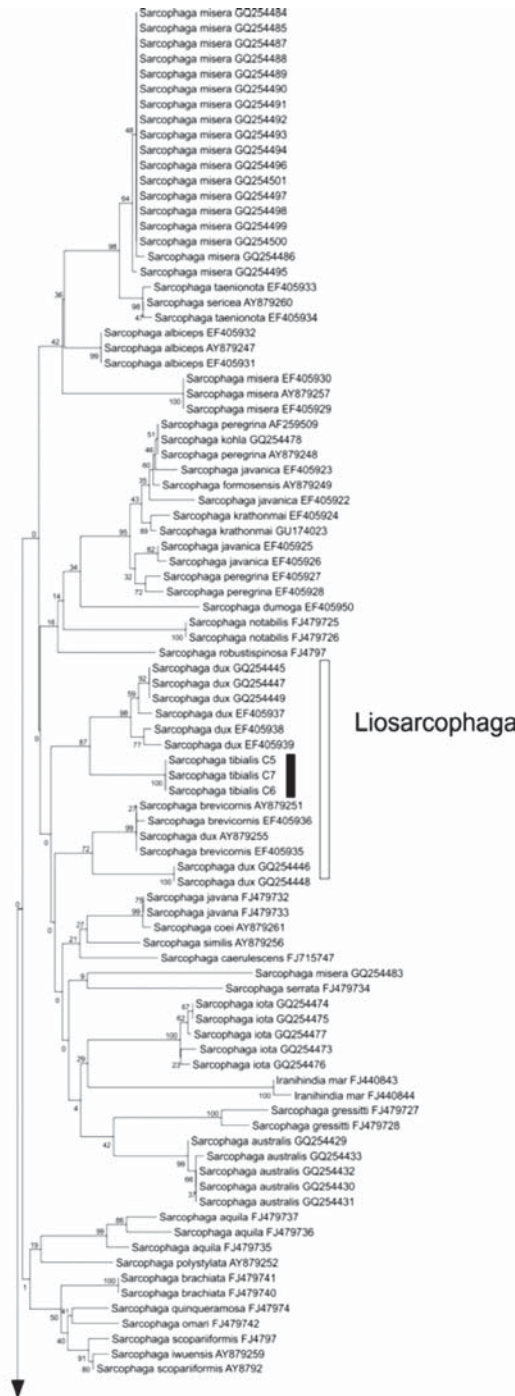
Here we present barcoding data of *S. cultellata* and *S. tibialis*, as part of a study aimed to develop a library of barcodes of sarcophagid flies inhabiting Southeast Spain, which can be used for forensic purposes. DNA barcodes of the two species are provided to enable accurate identification of their larval stages, as well as the females. These data are useful as the major limitation to species identification is the lack of authenticated reference DNA sequence data (DAWNAY *et al.*, 2007).

## 2. MATERIALS AND METHODS

Specimens were obtained from laboratory breeding colonies maintained at a temperature of 25 °C and relative humidity of 50%. These colonies were established from wild specimens of *S. cultellata* captured in Sierra Espuña (Murcia, SE Spain) and *S. tibialis* captured in the University Campus of Murcia (SE Spain). Samples were frozen and conserved in absolute ethanol. DNA data of related taxa *Sarcophaga crassipalpis* Macquart, 1839, *S. ruficornis* (FABRICIUS, 1794), *S. argyrostoma* (ROBINEAU-DESVOIDY, 1830), *S. princeps* WIEDEMANN, 1830, *S. portschinskyi* (ROHDENDORF, 1937), *S. dux* THOMSON, 1869 and *S. misera* WALKER, 1849 (= *S. orchidea* BÖTTCHER, 1913), and of other members of this genus were obtained from BOLD and Genbank databases and used to interpreting barcode results of the studied species. Accession numbers of these sequences are indicated besides the species name in Figure 3.

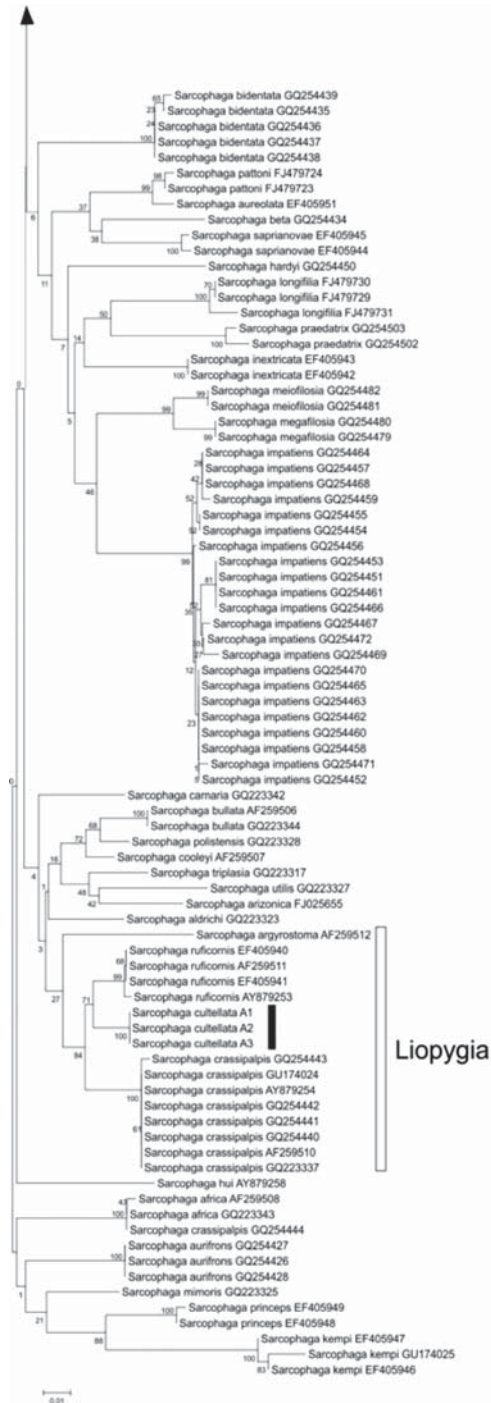
**Figura 3.** Árbol de consenso del 50% derivado del análisis de Neighbor-Joining (NJ) aplicado a las secuencias del gen COI en el género *Sarcophaga*.

**Figure 3.** 50% of the majority consensus tree resulting from the NJ analysis of COI sequence of taxa of the genus *Sarcophaga*.



**Figura 3.** (continuación) Árbol de consenso del 50% derivado del análisis de Neighbor-Joining (NJ) aplicado a las secuencias del gen COI en el género *Sarcophaga*.

**Figure 3.** (continued) 50% of the majority consensus tree resulting from the NJ analysis of COI sequence of taxa of the genus *Sarcophaga*.



Genomic DNA from 4 adult specimens of these two species was extracted using the thorax and legs tissues with Invisorb spin tissue mini kit (Berlin, Germany).

A barcoding COI region was amplified with primers LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAA ATCA-3') (FOLMER *et al.*, 1994) using standard PCR conditions as described in RUIZ, SERRANO (2006): 40 cycles at 94°C for 1 min, annealing at 47 °C for 1min and extension of 72°C for 2 min. An amplicon of about 650 bp was obtained and purified with isopropanol and 5M ammonium acetate. Sequencing was performed in both directions using standard protocol for the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Sequences were edited and unambiguously aligned using the software MEGA v4.0 (TAMURA *et al.*, 2007). A first dataset was built up using all sequences of the genus *Sarcophaga* available from GenBank and BOLD databases (the FULL dataset). As sequences from GenBank are known to include misidentified species (e.g. HARRIS, 2003, HEBERT, 2003, VILGALYS, 2003), a second data set was built up using only BOLD sequences (BOLD dataset). We also considered species with at least 2 or 3 specimens and reanalyzed the data using a subset of original datasets (FULL2, FULL3, BOLD2 and BOLD3) (Table I).

The proportion of correct matches followed the three distance-based identification criteria described by MEIER *et al.* (2004). These were the Best Match (BM), Best Close Match (BCM) and All Species Barcodes (ASB). The distance below which 95% of all intraspecific distances are found was used as cut-off. These parameters were calculated using TaxonDNA v1.7 (MEIER *et al.*, 2004).

A NJ tree was calculated with MEGA 4.0 (2000 bootstrap) using the model of Kimura 2-parameter (K2P) that has become the metric most widely used in barcoding studies (CBOL, <http://www.barcoding.si.edu/protocols.html>). A bayesian analysis was carried out to infer the phylogenetic relationships between taxa with MrBayes v.3.1. (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003). Searches were performed with 6,000,000 generations, sampling trees every 100 generations under the GTR + I +  $\Gamma$  model. Likelihood values were observed with Tracer v1.4 (RAMBAUT & DRUMMOND, 2005), discarding all the trees before stability in likelihood values as a «burnin». Stationarity was also reassessed using the convergence diagnostic: the average standard deviation of split frequencies and the potential scale reduction factor (PSRF).

Voucher specimens are kept at Forensic Entomology Laboratory, Zoology and Physical Antropology Department from the University of Murcia.

**Table I.** Rates of successful species identification in the genus *Sarcophaga* using all COI sequences from GenBank and BOLD (FULL), from solely BOLD (BOLD), and from BOLD database with at least 2 or 3 conspecific per species (FULL2, FULL3, BOLD2, BOLD3) under different identification criteria: Best Match (BM), Best Close Match (BCM), and All Species Barcodes (ASB). Cut-off threshold was set to 10.55% (see text). N, number of specimens; sp, number of species.

**Tabla I.** Niveles de éxito en la identificación en el género *Sarcophaga* utilizando todas las secuencias COI de GenBank y BOLD (FULL), únicamente BOLD (BOLD) y BOLD con al menos 2 o 3 coespecíficos por e-specie (FULL2, FULL3, BOLD2, BOLD3) bajo criterios de identificación diferentes: correspondencia correcta (BM), correspondencia más aproximada (BCM) y considerando todos los datos de barcoding (ASB). El umbral de corte se estableció en 10,55 (ver texto). N, número de ejemplares; sp, número de especies.

| DATABASE | N<br>SP | CRITERION | CORRECT<br>ID. % | AMBIGUOUS<br>ID. % | INCORRECT<br>ID. % | WITHOUT<br>ANY<br>MATCH<br>THR. |
|----------|---------|-----------|------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|
| FULL     | 184     | BM        | 76.6             | 5.43               | 17.9               |                                 |
|          | 61      | BCM       | 76.6             | 5.43               | 17.9               | 0.54                            |
|          |         | ASB       | 10.86            | 84.78              | 3.8                | 0.54                            |
| FULL2    | 153     | BM        | 93.54            | 1.29               | 5.16               |                                 |
|          | 32      | BCM       | 93.54            | 1.29               | 4.51               | 0.64                            |
|          |         | ASB       | 14.19            | 83.22              | 1.93               | 0.64                            |
| FULL3    | 126     | BM        | 94.44            | 1.58               | 3.96               |                                 |
|          | 19      | BCM       | 94.44            | 1.58               | 3.17               | 0.79                            |
|          |         | ASB       | 17.46            | 80.95              | 0.79               | 0.79                            |
| BOLD     | 85      | BM        | 95.29            | 0                  | 4.7                |                                 |
|          | 16      | BCM       | 95.29            | 0                  | 4.7                | 0                               |
|          |         | ASB       | 17.6             | 82.35              | 0                  | 0                               |
| BOLD2    | 82      | BM        | 98.78            | 0                  | 1.2                |                                 |
|          | 13      | BCM       | 98.78            | 0                  | 1.2                | 0                               |
|          |         | ASB       | 18.29            | 81.7               | 0                  | 0                               |
| BOLD3    | 48      | BM        | 98.66            | 0                  | 1.33               |                                 |
|          | 10      | BCM       | 98.66            | 0                  | 1.33               | 0                               |
|          |         | ASB       | 20.00            | 80.00              | 0                  | 1.4                             |

### 3. RESULTS

#### MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION OF STUDIED TAXA

The structure and form of male terminalia is important for both taxonomical and phylogenetical purposes (POVOLNÝ & VERVES, 1997). In our case, the sequences proceed from vouchers whose male genitalia match those described in PERIS *et al.* (1999), LEHRER (2006) and RICHET *et al.* (2011) (Figures 1 and 2), so we are confident of having correctly identified these vouchers.

#### BARCODING ANALYSIS

A fragment of 658 bp of the COI barcoding region was obtained from three specimens of each species. This sequence lack insertions, deletions or codon stops, and revealed 53 positions that are phylogenetically informative. No intraspecific variation was found, a result that should be corroborated with the study of specimens from more localities. The sequence of both species has been submitted to GenBank, with accession numbers JX987058 (*S. tibialis*) and JX987057 (*S. cultellata*).

Interspecific K2P distance between *S. tibialis* and *S. cultellata* was 5.04%.

Both NJ and Bayesian analyses of COI sequences of the genus *Sarcophaga* showed the same main relationships between taxa and thus only the NJ cladogram is shown (Figure 3). Clades including the two species investigated had high bootstrap support (100%) (Figure 3). *Sarcophaga tibialis* is related to *S. dux*, and *S. cultellata* to *S. ruficornis* and *S. crassipalpis*. Both species were successfully identified under Best Match (BM), Best Close Match (BCM) and All Species Barcode (ASB) criteria.

A first analysis with all available information of the genus *Sarcophaga* obtained from GenBank and BOLD databases (FULL dataset) comprised 184 specimens representing 61 species. Of these, 47% have more than one individual per species. Intraspecific distance was usually lower than 1% but in some cases raised up to 10%; interspecific distance varied between 8% and 17%. The cut-off value that comprises the 95% of the intraspecific distances was 10.55%. When using this threshold the correct identification under the ASB criterion was 10.86%, and ambiguous 85%. Under the BM criterion, the correct identification was 76.6% while ambiguous identification corresponded to 5.4% and the remaining specimens (17.9%) were incorrectly identified (Table I). The total overlap between intraspecific and interspecific distances was 10.7% (from 0 to 10.7%, 82% of the pairwise comparisons. This overlap was still high, 4.12% (from 6.42 to 10.55%, 74% of the pairwise comparisons), when the 5% of extreme intra and interspecific divergences was removed. These values are in accordance with previous barcoding Dipteran studies (MEIER *et al.*, 2006), in which it resulted in a success rate in species identification lower than 70%.



When considering only BOLD database (85 sequences representing 16 species with 82% of them with a valid conspecific) the proportion of correct identifications increased to 84.9% using BM and BCM, and to 17.6% using ASB (Table I).

If only sequences with at least 2 conspecific are considered (FULL2 and BOLD2) the proportion of correct identification by BM and BCM criteria increased substantially to 94 and 99% respectively (although the ASB criterion remained low: 14 and 18% respectively; Table I). The proportion of correct identification when considering at least 3 conspecific (FULL3 and BOLD3) remained almost the same (94 and 99%) using BM and BCM although it increased using ASB (17 and 20% respectively). Additionally, when the 5% extreme distances were removed the overlap remained the same in FULL2 and 3 (4.1%), or slightly decreased to 3.9% in BOLD 2 and 3.

#### 4. DISCUSSION

The main goal of the genetic species identification is to match the sequence of the evidence item to an authenticated reference DNA sequence. In our case, the two investigated species, *Sarcophaga tibialis* and *S. cultellata* were shown to be unequivocally identified by the COI barcoding sequence with regard to related taxa, as *S. tibialis* was included in one of the clades of the possibly polyphyletic subgenus *Liosarcophaga*, whereas *S. cultellata* was included within the clade corresponding to the subgenus *Liopygia* (Figure 3). Analyses of samples of these two species from other localities are needed to determine whether there exists intraspecific variation.

Among the genus *Sarcophaga* barcoding of species has an identification success up to 99% using BM and BCM criteria, that is, when misidentifications from GenBank data and the absence of conspecific sequences are considered. This resolution is comparable to that found in other barcoding studies (NELSON *et al.*, 2007, MEIKLEJOHN *et al.*, 2011), and in studies based on other fragments of COI (TAN *et al.*, 2010). GenBank sequences are known to include misidentified sequences (e.g. HARRIS, 2003, HEBERT *et al.*, 2003, VILGALYS, 2003), what explains that identification success increases to 95% when these wrong sequences are removed (BOLD, Table I).

Additionally, species represented by a single DNA barcode (53% in FULL and 18% in BOLD) substantially affect the results of BM and BCM criteria. The presence of single sequences may generate incorrect identification because there are no other conspecific reference sequences in the dataset to which they can be matched (Ross *et al.*, 2008). This caution was not taken into account by MEIER *et al.* (2006), who underestimated the proportion of correct species identification for Diptera (<70%) (Ross *et al.*,

2008, VIRGILIO *et al.*, 2010). The lower identification success of the ASB criterion is clearly related to a more stringent «decision rules» (VIRGILIO *et al.*, 2010).

A broad overlap was observed between intra- and interspecific distances, as noted in previous studies on *Sarcophaga* (MEIER *et al.*, 2006) and instances of similar results have been reported in other insect orders (VIRGILIO *et al.*, 2010). These findings show that the extent of barcoding overlap does not necessarily predict the identification success (ROSS *et al.*, 2008, VIRGILIO *et al.*, 2010).

Although the amplicon size and sample size were both small, these data provide an opportunity to evaluate the value of COI for basic biological studies of both sarcophagid species. These data (COI gene) can be used as a supplemental means of morphological method in identification of sarcophagid species, as the technology is easier to perform and saves more time for forensic scientist (GUO *et al.*, 2011).

In addition to the increase of biological knowledge of these species, our contribution provides new data to identify populations from Iberian Peninsula increasing the current knowledge worldwide (PIWCZNSKY, 2014). This will enable a correct identification even when inadequate morphological information (larvae, females and fragments of specimens) is the only available evidence.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

This research has been partly supported by the projects 00848/CV/01 of Fundación Séneca of the Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, CGL2005-04668/BOS of Ministerio de Educación y Ciencia and CGL2009-10906 of the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish Government.

## 6. REFERENCES

1. ALFRED JT. Morphological and molecular techniques for the differentiation of myiasis-causing Sarcophagidae. Theses and Dissertations. Paper 10390. 2011. Available from: <http://lib.dr.iastate.edu/etd/10390>.
2. AMES C, TURNER B, DANIEL B. Estimating the postmortem interval (I): The use of genetic markers to aid in identification of Dipteran species and subpopulations. International Congress series 2006a, 1288:795-797.
3. AMES C, TURNER B, DANIEL B. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species – *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*. Forensic Science International 2006b, 164:179-182.

4. ARNALDOS I, ROMERA E, GARCÍA MD, LUNA A. Initial Study on Sarcosaprophagous Diptera (Insecta) succession on carrion in southeastern Iberian Peninsula. *International Journal of Legal Medicine* 2001, 114:156-162.
5. ARNALDOS MI, ROMERA E, PRESA J, LUNA A, GARCÍA MD. Studies on seasonal arthropods succession on carrion in the southeastern Iberian peninsula. *International Journal of Legal Medicine* 2004, 118: 197-205. ARNALDOS MI, GARCÍA MD, ROMERA E, LUNA A. Estimation of postmortem interval in real cases on the basis of experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Science International* 2005, 149:57-65.
6. ARNALDOS SANABRIA MI, TORRES TOMÁS B, GARCÍA GARCÍA MD. Primeros datos sobre el desarrollo del ciclo de vida del díptero de importancia forense *Sarcophaga cultellata* Pandellé, 1896 (Sarcophagidae). *Cuadernos de Medicina Forense* 2013, 19(1):118-124.
7. ASPOAS BR. Comparative micromorphology of third instar larvae and breeding biology of some Afrotropical *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae). *Medical and Veterinary Entomology* 1991. 5:437-445.
8. BAJPAI N, TEWARI RR. Mitochondrial DNA sequence-based phylogenetic relationship among flesh flies of the genus *Sarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). *Journal of Genetics* 2010, 89: 51-54. BYRD JH, CASTNER JL. Insects of forensic importance. In: JH Byrd JH, Castner JL (eds) *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations* 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, 2010. pp. 39-126.
9. CAINÉ LM, CORTE REAL F, SALOÑA-BORDAS MI, MARTÍNEZ DE PANCORBO M, LIMA G, MAGALHAES T, PINHEIRO F. DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. *Forensic Science International* 2009, 184:e21-e23.
10. CASTILLO MIRALBES M. Estudio de la entomofauna asociada a cadáveres en el Alto Aragón (España). *Monografías SEA* 6, Zaragoza, 2002.
11. CYWINSKA A, HANNAN MA, KEVAN PG, ROUGHLEY RE, IRANPOUR M, HUNTER FF. Evaluation of DNA barcoding and identification of new haplomorphs in Canadian deerflies and horseflies. *Medical and Veterinary Entomology* 2010, 24:382-410.
12. DALTON DL, KOTZE A. DNA barcoding as a tool for species identification in three forensic wildlife cases in South Africa. *Forensic Science International* 2011, 207:51-54.
13. DAWNAY 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.
14. DRABER-MOŃKO A, MALEWSKI T, POMORSKI J, ŁOŚ M, ŚLIPIŃSKI P. On the morphology and mitochondrial DNA barcoding of the flesh fly *Sarcophaga (Liohypgia) argyrostoma* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Sarcophagidae). An important species in forensic entomology. *Annales Zoologici* 2009, 59:465-493.
15. 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.

16. GENNARD D. Forensic Entomology. An Introduction. John Wiley, Sons Ltd, England. 2007.
17. GREENBER B, KUNICH JC. Entomology and the law. Flies as forensic indicators. Cambridge University Press. 2002.
18. GUO YD, CAI JF, CHANG Y, LI X, LIU Q, WANG X, WANG X, ZHONG M, WEN JF, WANG J. Identification of forensically Important Sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) in China, based on COI and 16sDNA gene sequences. Journal of Forensic Sciences 2011, 56(6):1534-1540.
19. GUO YD, CAI JF, LI X, XIONG F, SU RN, CHEN FL, LIU QL, WANG XH, CHANG YF, ZHONG M, WANG X, WEN JF. Identification of the forensically important sarcophagid flies *Boettcherisca peregrina*, *Parasarcophaga albiceps* and *Parasarcophaga dux* (Diptera: Sarcophagidae) based on COII gene in China. Tropical Biomedicine 2010a, 27:451-460.
20. GUO YD, CAI JF, LI X, XIONG F, SU RN, CHEN FL, LIU QL, WANG XH, CHANG YF, ZHONG M, WANG X., WEN JF. Identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) based on COI gene in China. Romanian Journal of Legal Medicine 2010b, 18:217-224.
21. HALL MJR, ADAMS ZJOR, WYATT NP, TESTA JM, EDGE W, NOCOLAUSZ M, FARKAS R 6 READY PD. Morphological and mitochondrial DNA characters for identification and phylogenetic analysis of the myiasis causing flesh fly *Wohlfahrtia magnifica* and its relatives, with a description of a *Wohlfahrtia monegroensis* sp. n. Wyatt, Hall. Medical and Veterinary Entomology 2009, 23 (Suppl.), 59-71.
22. HARRIS DJ. Can you bank on GenBank? Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18, 317-319.
23. HARVEY ML, MANSEL MWL, VILLET MH. Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. Medical and Veterinary Entomology 2003, 17:363-369.
24. HEBERT PDN, CYWINSKA A, BALL SL, DEWAARD JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B 2003, 270:313-321.
25. HEBERT PDN, RATNASINGHAM S, DEWAARD JR. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London B 2003, 270:96-99.
26. JINBO U, KATO T, ITO M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. Entomological Science 2011, 14:107-124.
27. KIYOSHI S, MASATAKA T, YASUHIRO A. Species identification of forensically important families in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. Legal Medicine 2005, 7:175-178.
28. KRESS WJ, WURDACK KJ, ZIMMER EA, WEIGT LA, JANZEN DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 2005, 102:8369-8374.
29. KUTTY SN, PAPE T, WIEGMANN BM, MEIER R. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorhapha) with an emphasis on the superfamily Oes-

- troidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's Fly. *Systematic Entomology* 2010, 35:614-635.
30. LEHRER AZ. *Sarcophaginae et Paramacronychiinae de Proche Orient (Insecta, Diptera, Sarcophagidae)*. Pensoft Sofia-Moscow. 2006.
  31. MEIER R, ZHANG G. DNA barcoding and DNA taxonomy in Diptera: an assessment based on 4,261 COI sequences for 1,001 species. In: *Diptera diversity. Status, challenges and tools* (Pape T, Bickel D, Meier R eds). Koninklijke Brill N.V., Leiden. 2009, pp. 349-380.
  32. MEIER R, SHIYANG K, VAIDYA G, PETER NG. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 2006, 55:715-728.
  33. MEIKLEJOHN KA, WALLMAN JF & DOWTON M. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *International Journal of Legal Medicine* 2011, 125:27-32.
  34. MEIKLEJOHN KA, WALLMAN JF, DOWNTON M. DNA Barcoding Identifies all Immature life stages of a Forensically important flesh fly (Diptera: Sarcophagidae). *Forensic Science International*, 2012. Published on line: July 201; DOI:10.1111/j.1556-4029.2012.02220.x.
  35. NELSON LA, WALLMAN JF, DOWTON M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology* 2007, 21:44-52.
  36. PAPE T. *Catalogue of the Sarcophagidae of the World (Insecta: Diptera)*. *Memoirs on Entomology International* 1996, 8:1-558.
  37. PERIS SV, GONZÁLEZ-MORA D, MINGO E. Los Parasarcophagina (Diptera, Sarcophagidae) de la Península Ibérica. *Boletín de la Real sociedad española de Historia Natural (Sec. Biol.)* 1999, 95:115-134.
  38. PIWCZYNSKY M, SZPILA K, GRZYWACZ A, PAPE T. A large-scale molecular Phylogeny of Flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Systematic Entomology* 2014, DOI:10.1111/syen.12086.
  39. POVOLNÝ D, VERVES Y. The flesh-flies of Central Europe (Insecta, Diptera, Sarcophagidae). *Spixiana*, 1997, Supplement 24, 1-260.
  40. PRADO E CASTRO C, ARNALDOS MI, GARCÍA MD. Additions to the Calliphoridae (Diptera) fauna from Portugal, with description of new records. *Boletín de la Asociación española de Entomología* 2009, 33(3-4):425-437.
  41. PRADO E CASTRO C, GARCÍA MD, ARNALDOS MI, GONZÁLEZ-MORA D. Sarcophagidae (Diptera) attracted to piglet carcasses including new records for Portuguese fauna. *Graellsia* 2010, 66: 285-294.
  42. PRADO E CASTRO C, ARNALDOS MI, SOUSA JP, GARCÍA MD. Preliminary study on sarcosaprophagous Diptera community and succession patterns in central Portugal. *Entomologia Generalis* 2011a, 33(3):183-198.
  43. PRADO E CASTRO C, SOUSA JP, ARNALDOS MI, GASPAR J, GARCÍA MD. Blow flies (Diptera: Calliphoridae) activity in sun exposed and shaded carrion in Portugal. *Annales de la Société Entomologique de France* 2011b, 47(1-2):128-139.

44. RAMBAUT A, DRUMMOND A. Tracer. MCMC trace file analyser. version 1.3. 2005.
45. RICHTER R, BLACKITH RM, PAPE T. Sarcophaga of France (Diptera: Sarcophagidae). Pensoft Sofia-Moscow. 2011.
46. ROMERA E, ARNALDOS MI, GARCÍA MD, GONZÁLEZ-MORA D. Los Sarcophagidae (Insecta, Diptera) de un ecosistema cadavérico en el sureste de la Península Ibérica. *Anales de Biología* 2003, 25:49-63.
47. RONQUIST F, HUELSENBECK JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003, 19:1572-1574.
48. ROSS HA, MURUGAN S, SIBON LI WL. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology* 2008, 57:216-230.
49. RUÍZ C, SERRANO J. Molecular phylogeny and systematics of *Calathus* Bonelli (Coleoptera: Carabidae: Sphodrini) based on mitochondrial *cox1-cox2* sequences. *Entomologica Fennica* 2006, 17:214-220.
50. SMITH KGV. A Manual of Forensic Entomology. Trustees of the British Museum (natural history). London. 1986.
51. SMITH MA, WOODLEY NE, JANZEN DH, HALLWACHS W, HEBERT PDN. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2006, 103:3657-3662.
52. SMITH MA, WOOD DM, JANZEN DH, HALLWACHS W, HEBERT PDN. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2007, 104:4967-4972.
53. STAMPER T, DAHLEM GA, COOKMAN C, DEBRY RW. Phylogenetic relationships of the flesh flies in the subfamily Sarcophaginae based on three mtDNA fragments (Diptera: Sarcophagidae). *Systematic Entomology* 2013, 38:35-44.
54. TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007, 24:1596-1599.
55. 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.
56. VELÁSQUEZ Y, MAGAÑA C, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROJO S. Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. *Medical and Veterinary Entomology* 2010, 24:293-308.
57. VILGALYS R. Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytologist* 2003, 160:45.
58. VINCENT S, VIAN JM, CARLOTTI MP. Partial sequencing of the cytochrome oxidase b Unit gene I: A tool for the identification of European species of blow flies for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences* 2000, 45:820-823.

59. VIRGILIO M, BACKELJAU T, NEVADO B, DE MEYER M. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics* 2010, 11:206.
60. WELLS JD, STEVENS JR. Application of DNA-Based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology* 2008, 53:103-120.
61. WELLS JD, STEVENS JR. Molecular methods for Forensic Entomology. In: *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations* 2nd edition (JH Byrd JH, Castner JL, eds.) CRC Press, Boca Raton. 2010. pp. 437-452.
62. WELLS JD, PAPE T, SPERLING FA. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences* 2001, 46:1098-1102.
63. WILL KW, RUBINOFF D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 2004, 20:47-55.
64. ZEHNER R, AMENDT J, SCHÜTT S, SAUER J, KRETTEK R, POVOLNÝ D. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Legal Medicine* 2004, 118:245-247.
65. ZUMPT F. *Myiasis in man and animals in the old world*. Butterworth, Co. (Publishers) Ltd. 1965. 54.
66. ZUMPT F, PATTERSON PM. Flies visiting human faeces and carcasses in Johannesburg Transvaal. S.A. *Journal of Clinical Science* 1952, 3(2):92-106.

## ACAROLOGÍA FORENSE

MARTA INÉS SALOÑA-BORDAS<sup>1</sup>  
MARÍA ALEJANDRA PEROTTI<sup>2</sup>

**Resumen:** Los ácaros son artrópodos quelicerados muy diversos, adaptados a un amplio espectro de hábitats y dietas pero con una elevada especificidad. Son considerados importantes indicadores de condiciones ambientales y de impactos producidos por el ser humano por lo que nos pueden aportar información valiosa sobre el entorno donde se ha encontrado un cadáver, la ruta por la que haya podido discurrir una mercancía y otros aspectos aplicados de la ciencia forense. Por ello, no es de extrañar la presencia de especies adaptadas a entornos cadavéricos y otros restos orgánicos. El propio Jean Pierre Mégnin, veterinario forense considerado pionero en el desarrollo de la entomología forense, fue consciente de su valor como indicadores forenses y dedicó una de las fases de descomposición cadavérica a estos pequeños organismos. Dado el creciente interés del colectivo forense en incluirlos en los informes periciales, presentamos un protocolo de actuación para la recolección, conservación y custodia de los ácaros de interés forense.

**Palabras clave:** Ácaros, bioindicación, metodología, protocolo, conservación.

**Abstract:** Mites are a highly diversified group of chelicerates (arthropods) adapted to a broad spectrum of habitats and diets, presenting extreme specificity to habitats. They are considered to be important indicators of environmental conditions including those modified by human beings. Therefore, they can inform about the environment where a corpse has been exposed to, about the route of specific merchandises, as well as about other

---

<sup>1</sup> 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.

m.salona@ehu.es

<sup>2</sup> Ecology and Evolutionary Research Group, School of Biological Sciences, University of Reading, Whiteknight campus, Reading RG6 6AH, UK.

m.a.perotti@reading.ac.uk



applied aspects of forensic entomology. It is not rare the presence of species adapted to cadaveric environments. Jean Pierre Mégnin, forensic veterinarian considered pioneer in the development of forensic entomology, conscious about the importance of mites as forensic indicators, was the first including mites in the decomposition process. For Mégnin, wave six was formed by mites only. Due to the increasing interest of forensic experts in including these organisms in their analysis of trace evidence, as mites are one of the most ubiquitous organisms, we have developed standards for the sampling, conservation and custody of mite evidence of forensic interest.

**Key words:** Mites, Acari, bioindicator, trace, methodology, protocol, conservation.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los ácaros son artrópodos de reducido tamaño que pasan desapercibidos a los ojos profanos. Por ello, a pesar de que MÉGNIN (1894, 1895) ya destacara su presencia en las fases más tempranas de la descomposición cadavérica, e incluyera una escuadra (fase de la sucesión de fauna cadavérica) especialmente dedicada a ellos, su presencia en informes forenses sigue siendo escasa e imprecisa. Es más, en un segundo caso descrito en Francia a finales del siglo XIX se emplean ácaros como indicadores forenses (BROUARDEL, 1879, PEROTTI, 2009). Aun así, éstos seguirán siendo obviados en las inspecciones oculares rutinarias a lo largo del siglo XX salvo contadas excepciones. Bien por la dificultad de diferenciarlos entre los restos cadavéricos bien por la complicación que supone recolectarlos e identificarlos, el registro y uso de ácaros sigue siendo escaso en trabajos periciales; pocos son los investigadores que incluyen citas de ácaros en sus informes forenses (DE JONG & HOBACK, 2006, LECLERQ & VAILLANT, 1992, SALOÑA *et al.*, 2010, SALOÑA BORDAS & PEROTTI, 2014). Con frecuencia, expertos forenses sin experiencia en acarología aportan identificaciones de dudosa fiabilidad, o imprecisas a nivel de Familia, Orden o simplemente de Clase (*cf.* ARNALDOS *et al.*, 2005, CASTILLO MIRALBÉS, 2002, MERRITT *et al.*, 2007). Sin embargo, es sabido que los ácaros se encuentran relacionados con diferentes fases de reducción cadavérica, incluidos estados frescos, tanto en seres humanos como en otros seres vivos (BRAIG & PEROTTI, 2009, GOFF, 1989) y que aportan información relevante sobre la conexión entre un sospechoso y un crimen (PEROTTI & BRAIG, 2010).

OCONNOR (2009) destaca como principales causas derivadas de esta falta de atención no sólo el microscópico tamaño de los ácaros, sino también la dificultad de separar adecuadamente los principales taxones antes de solicitar el debido asesoramiento a un experto para su correcta identificación específica. Es más, muchas especies de interés forense permanecen sin ser descritas debido precisamente a estas dificultades taxonómicas. De

hecho, sin la colaboración directa de uno o más expertos en taxonomía de ácaros, la mayoría de las citas periciales a nivel de especie son poco fiables. Una revisión de más de 100 años de publicaciones que incluyen especies de ácaros asociadas a cadáveres detecta errores y detalla imprecisiones en aquellos trabajos forenses que han citado ácaros sin haber sido identificados por ningún acarólogo (BRAIG & PEROTTI, 2009). Como ejemplo de la complejidad que supone abordar toda la diversidad de ácaros que existe en nuestros suelos, podemos mencionar la revisión que fue preciso realizar de una especie que había sido recogida en un bosque de Vizcaya (SALOÑA *et al.*, 2010) y que tras una profunda revisión bibliográfica fue finalmente asignada a una especie descrita en las Islas Galápagos y que no había vuelto a ser citada desde entonces (MAŠAN *et al.*, 2013). Lamentablemente, la falta de atención hacia evidencias entomológicas una vez que prescribieron otros casos donde se citó el ácaro *Proctolaelaps* asociado a cadáveres hizo que no se conservaran ejemplares de casos forenses previos descritos en diferentes regiones biogeográficas y que bien podrían haber pertenecido a esta misma especie, la cual ha sido catalogada como el primer ácaro indicador forense (MAŠAN *et al.*, 2013). Sólo tras la debida revisión de las especies asociadas a restos cadavéricos en diferentes continentes podremos iniciar el registro de los principales indicadores forenses dentro de la Acarología. Por ello, en 2008 se inició la primera colección de referencia de ácaros asociados a restos cadavéricos que queda bajo la custodia del laboratorio de Acarología de la Universidad de Reading (Acarology Lab, School of Biological Sciences).

No obstante, para contribuir a incorporar la Acarología dentro de las técnicas de investigación forense, es fundamental establecer un protocolo de actuación ante evidencias acarológicas, tal y como se ha establecido ya para los insectos (AMENDT *et al.*, 2007, 2015, ARNALDOS *et al.*, 2006). Debemos tener en cuenta que encontramos especies de ácaros en casi todos los medios terrestres), dada su ubicuidad, pero con especificidad respecto a sus micro-hábitats. Al pasar desapercibidos por su pequeño tamaño, su valiosa contribución como prueba pericial se pierde. Los ácaros presentan elevada especificidad de hábitat por lo que pueden explicar, por ejemplo, movimientos de cadáveres, o contaminaciones cruzadas que invaliden las pruebas periciales si no son debidamente analizadas por un experto, etc. Por ello, la necesidad de extremar las medidas de prevención y protección de muestras recogidas durante una inspección pericial forense debe ser máxima, y la higiene del puesto de trabajo debe cuidarse esmeradamente durante todo el proceso, incluida la conservación posterior de las muestras.

Si la necesidad de llevar vestimenta adecuada durante la inspección de un entorno es importante en entomología forense, en el caso de la acarología estas medidas deben ser extremadas, dado que se trabaja con material microscópico, poco evidente a nuestros ojos, y los riesgos de contaminación cruzada son elevados. Hay especies que causan reacciones alérgicas en la piel y vías respiratorias de determinadas personas conectando a un individuo con un lugar específico. Dado que las picaduras de determinadas espe-

cies de artrópodos son altamente alergénicas y pueden transmitir enfermedades infecciosas, las normativas de prevención laboral obligan a protegerse adecuadamente durante la recolección de las pruebas. PRICHARD *et al.*, 1986 conectan a un sospechoso con el lugar de un crimen gracias a las marcas de picaduras producidas por una especie de Trombicúlido que había sido recolectado en el lugar de los hechos y había producido lesiones similares al inspector del caso.

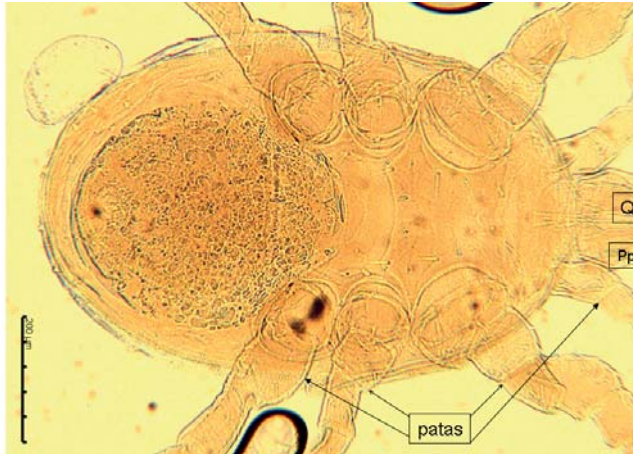
## 2. ANATOMÍA DE UN ÁCARO

De cara a facilitar la comprensión de la identidad de los ácaros como artrópodos diferentes de los insectos, realizaremos una breve descripción de sus principales características. No obstante, debemos destacar que han sido descritas más de 30.000 especies agrupadas en 6 órdenes diferentes pertenecientes a 2 superórdenes (KRANTZ & WALTER, 2009). De ellas, más de 100 especies han sido citadas de restos cadavéricos (Tabla 1). No sólo su observación es compleja, del mismo modo su correcta identificación puede resultar conflictiva y existen diversas propuestas para su clasificación basada en modificaciones de su modelo corporal. Por ello, tan sólo realizaremos una breve descripción de los principales caracteres diagnósticos que nos permiten reconocer y diferenciar a los ácaros de otros artrópodos como los insectos.

Como el resto de los artrópodos, los ácaros presentan el cuerpo dividido en regiones corporales o tagmas. Estas regiones son diferentes de las que observamos en un insecto, no existiendo una cabeza como tal ni antenas. Igualmente carecen de mandíbulas, presentando un par de apéndices preorales quelados, los quelíceros. Es más, la división corporal en regiones puede ser diferente si observamos al animal en vista dorsal o en vista ventral (Figura 1). Estas diferencias unidas a su pequeño tamaño, les hacen especialmente difíciles de ver y de romper, haciendo gala a su nombre (gr. Ακαρής, Ακαρι, diminuto, que no se corta). Las técnicas de microdissección de sus apéndices y otras regiones de interés taxonómico requieren de una pericia especial y del apoyo de lentes de gran aumento.

Las dos regiones principales, prosoma o parte anterior del cuerpo donde encontramos los quelíceros y palpos, y opistosoma o parte posterior del cuerpo donde desembocan las aberturas genital y anal están protegidas por sus correspondientes placas y pueden verse fuertemente modificadas en los diferentes grupos de ácaros. La base de las patas suele fusionarse en una placa podosomal apreciable ventralmente (Figura 1), que puede articularse en la zona media para dar cierta flexibilidad al cuerpo del animal.

WALTER, 2005 aporta un glosario ilustrado que nos permite introducirnos en la compleja nomenclatura de este grupo tan diverso.



**Figura 1:** *Macrocheles* sp. Ácaro mesostigmata en vista ventral. Apreciándose la apertura del estigma traqueal entre el tercer y cuarto par de patas. Q: quelícero, Pp: pedipalpo.

### 3. LOS ÁCAROS COMO INDICADORES FORENSES

Por su pequeño tamaño y su ubicuidad, es muy fácil que las muestras recolectadas puedan verse contaminadas por la fauna circundante, por lo que la necesidad de tomar medidas preventivas debe ser máxima cuando se realiza la recolección de muestras, en especial si se espera extraer información útil a partir de la fauna de ácaros asociada a los restos cadavéricos. En estos casos, es especialmente conveniente tomar muestras de blanco referentes a la fauna natural del entorno que permitan contrastar con las muestras del cadáver y seleccionar aquellas especies que nos aportarán información relevante sobre el lugar donde se hallaron los restos y otros aspectos derivados de la investigación forense.

En relación a la especificidad de hábitat, su nicho puede ser tan específico que una determinada especie puede relacionar a un sospechoso con un lugar concreto y conectarle de forma indubitada con una víctima o con el lugar de un crimen (WEBB *et al.*, 1983, GOFF 1991, PEROTTI *et al.*, 2009, PEROTTI, 2009, MEGNIN, 1894, LECLERQ & VERSTRAETEN, 1988a,b). Así, determinadas especies de ácaros pueden ser excelentes indicadoras de ambientes cerrados (SOLARZ, 2009), cuevas (SUBÍAS & PÉREZ, 2013), entornos degradados (SOCARRÁS, 2013), etc., llegando a estar asociados a hábitats

muy específicos como nuestras camas, la cocina, la vestimenta, etc. (FROST *et al.*, 2010; PEROTTI & BRAIG, 2010). Sólo a partir de adecuados estudios de sus poblaciones y de sus requerimientos ambientales podremos avanzar en su correcto uso como indicadores forenses.

Los ciclos biológicos de los ácaros son breves y permiten realizar estimaciones precisas de su llegada al entorno cadavérico. Es más, la adecuada identificación de su fase de desarrollo, así como del sexo en caso de los adultos, es fundamental para realizar una estimación precisa del tiempo que dicho ácaro lleva en el entorno donde ha sido capturado (OCONNOR, 2009, PEROTTI *et al.*, 2009, PEROTTI *et al.*, 2010, SALOÑA BORDAS & PEROTTI, 2014).

#### ¿CÓMO PUEDE UN ANIMAL INCAPAZ DE VOLAR LLEGAR TAN RÁPIDO A UN CADÁVER EN ESTADO FRESCO DE DESCOMPOSICIÓN?

Sabemos que los ácaros no tienen estructuras aptas para el vuelo y carecen de patas adaptadas al salto, por lo que utilizan vectores que los desplazan rápido a nuevos hábitats, como un cadáver poco después de su fallecimiento. Podríamos inducir que ya se encontraban allí, pero nada hay más lejos de la realidad. Los fluidos de descomposición cadavérica producen cambios tan drásticos en el suelo que la fauna que naturalmente habita allí huye o muere, y nos encontramos ante un modelo de sucesión faunística, aspecto bien descrito para insectos pero prácticamente desconocido para otros representantes de la fauna edáfica de la cual apenas hay estudios realizados de forma controlada (BORNEMISSZA, 1957, SZELE CZ *et al.*, 2014).

Gracias a su pequeño tamaño, el mismo aire puede llevarles, en ocasiones suspendidos por hilos de seda que ellos secretan. Una vez aterrizan en un entorno adecuado proliferan rápidamente. No obstante, teniendo aliados como los insectos bien adaptados al vuelo, ¿por qué no aprovecharse de su pequeño tamaño para viajar como polizones a bordo? La relación se conoce como foresis, no debe confundirse con parasitismo, dado que no hay daño alguno al insecto que lo transporta, y permite a muchas especies de ácaros colonizar y expandirse por amplias áreas geográficas.

La foresis consiste en el uso de un animal por otro, en este caso ácaros, para transportarse a un entorno nuevo y más óptimo para su desarrollo, alimentación y reproducción (CAMERICK, 2010). La mayoría de las especies de ácaros asociados a cadáveres presentan asociación forética con insectos (GOFF, 1991, PEROTTI Y BRAIG, 2009, PEROTTI *et al.*, 2010, SALOÑA BORDAS & PEROTTI, 2014, SALOÑA-BORDAS *et al.*, 2015). Esta interacción suele ocurrir en fases concretas de su vida, variando de unas especies a otras. Sólo determinados estadios de desarrollo están especializados en foresis por lo que su presencia en el entorno cadavérico es indicadora no sólo de la presencia del insecto hospedador, aunque éste no se encuentre durante la recolección de muestras, sino que nos permite conocer el estado de desarrollo y estimar con precisión el momento en que la especie de ácaro colonizó el entorno cadavérico.

Más de 200 especies de ácaros foréticos se han citado asociadas a cadáveres (PEROTTI & BRAIG, 2009). En muchos casos se trata de asociaciones que evolucionaron hasta alcanzar un grado simbiótico de interacción debido a años de co-evolución (SCHWARZ *et al.*, 1992). Determinadas especies de insectos han sabido sacar beneficio del carácter depredador del ácaro que transportan y que les limpia el entorno de competidores, alcanzando una interacción mutualista entre ambas especies (BLACKMAN, 1997, FILIPPONI, 1955, WILSON, 1983). En consecuencia, la presencia de determinadas especies de ácaros nos indica la llegada de su hospedador, aunque no lo encontremos en el área explorada, y pueden limpiar el entorno de los huevos de los primeros insectos que colonizaron el cadáver, introduciendo errores en la estimación del intervalo postmortem si se desconoce u obvia su presencia (PEROTTI Y BRAIG, 2009).

Por todo lo anteriormente expuesto, consideramos importante realizar en este trabajo una revisión de los principales entornos donde pueden encontrarse ácaros, y de los métodos más apropiados de recolección y conservación, que permitan ser empleados como pruebas periciales ante una investigación forense.

#### 4. MODELO DE SUCESIÓN

Al igual que los insectos, los ácaros presentan preferencias marcadas por determinadas condiciones ambientales por lo que distintas especies estarán asociadas a determinados momentos de la descomposición cadavérica. Es por ello fundamental realizar una correcta identificación, no solo de las especies recolectadas sino de su estado de desarrollo, dado que pueden estar dando claves temporales como, por ejemplo, sobre el estado de descomposición del cadáver, el momento de su colonización, etc., siendo especialmente importantes en ausencia de insectos y de otras pruebas periciales (PEROTTI *et al.*, 2009)

MEGNIN (1895) no sólo dedicó una fase de su modelo de sucesión a diferentes especies de ácaros en exclusiva (6.<sup>a</sup> oleada), sino que mencionó su presencia durante el estado fresco de descomposición cadavérica (1.<sup>a</sup> oleada). BRAIG & PEROTTI (2009) realizan la primera recopilación de todos los registros publicados, detallando la presencia de ácaros en diferentes casos forenses y en las distintas fases de descomposición de varios modelos animales empleados en los estudios sobre reducción cadavérica (mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, moluscos). En su revisión, recopilan centenares de especies de ácaros asignados a 66 familias diferentes de todos los órdenes conocidos y que detallamos a modo de resumen en la tabla 1 junto a las fases de descomposición cadavérica en que fueron citados. Las cuadrículas grises claras indican falta de detalle respecto a la fase de descomposición cadavérica en que se encontró el ácaro por parte del/a autor/a de la cita.

**Tabla 1:** Primeros resultados de las principales familias de ácaros asociadas a las fases de descomposición y descritas para entomología forense hasta 2009 (cf. BRAIG Y PEROTTI, 2009); en negro, presencia de especies de dicha familia en la fase de descomposición cadavérica correspondiente; en gris, imprecisión respecto a la fase de descomposición cadavérica en la que se encontraron representantes de dicha familia de ácaros.

| ESTADO<br>FAMILIA | FRESCO | HINCHADO | DESCOMPOSICIÓN<br>ACTIVA | DESCOMPOSICIÓN<br>AVANZADA | ESQUELÉTICO |
|-------------------|--------|----------|--------------------------|----------------------------|-------------|
| Achipteriidae     |        |          |                          |                            |             |
| Anystidae         |        |          |                          |                            |             |
| Aphelacaridae     |        |          |                          |                            |             |
| Ascaidae          |        |          |                          |                            |             |
| Ascidae           |        |          |                          |                            |             |
| Acaridae          |        |          |                          |                            |             |
| Anystidae         |        |          |                          |                            |             |
| Bdellidae         |        |          |                          |                            |             |
| Celaenopsidae     |        |          |                          |                            |             |
| Camerobiidae      |        |          |                          |                            |             |
| Camisiidae        |        |          |                          |                            |             |
| Ceratoppiidae     |        |          |                          |                            |             |
| Ceratozetidae     |        |          |                          |                            |             |
| Cheyletidae       |        |          |                          |                            |             |
| Cunaxidae         |        |          |                          |                            |             |
| Demodecidae       |        |          |                          |                            |             |
| Digamasellidae    |        |          |                          |                            |             |
| Dinychidae        |        |          |                          |                            |             |
| Diplogyniidae     |        |          |                          |                            |             |
| Discourellidae    |        |          |                          |                            |             |
| Epicriidae        |        |          |                          |                            |             |
| Eremaeidae        |        |          |                          |                            |             |
| Ereynetidae       |        |          |                          |                            |             |
| Erythraeidae      |        |          |                          |                            |             |
| Eupodidae         |        |          |                          |                            |             |
| Euphthiracaridae  |        |          |                          |                            |             |
| Euzetidae         |        |          |                          |                            |             |
| Eviphidae         |        |          |                          |                            |             |
| Galumnidae        |        |          |                          |                            |             |
| Glycyphagidae     |        |          |                          |                            |             |

*Acarología forense*

| ESTADO FAMILIA    | FRESCO | HINCHADO | DESCOMPOSICIÓN ACTIVA | DESCOMPOSICIÓN AVANZADA | ESQUELÉTICO |
|-------------------|--------|----------|-----------------------|-------------------------|-------------|
| Haplozetidae      |        |          |                       |                         |             |
| Hemogamasidae     |        |          |                       |                         |             |
| Histiostomatidae  |        |          |                       |                         |             |
| Hypochthoniidae   |        |          |                       |                         |             |
| Ixodidae          |        |          |                       |                         |             |
| Laelapidae        |        |          |                       |                         |             |
| Lardoglyphidae    |        |          |                       |                         |             |
| Liacaridae        |        |          |                       |                         |             |
| Macrochelidae     |        |          |                       |                         |             |
| Malaconothridae   |        |          |                       |                         |             |
| Mycobatidae       |        |          |                       |                         |             |
| Nothridae         |        |          |                       |                         |             |
| Ologamasidae      |        |          |                       |                         |             |
| Oppiidae          |        |          |                       |                         |             |
| Oribatulidae      |        |          |                       |                         |             |
| Pachylaelapidae   |        |          |                       |                         |             |
| Paraholaspidae    |        |          |                       |                         |             |
| Parasitidae       |        |          |                       |                         |             |
| Phytoseiidae      |        |          |                       |                         |             |
| Podapolipidae     |        |          |                       |                         |             |
| Podocinidae       |        |          |                       |                         |             |
| Pygmephoridae     |        |          |                       |                         |             |
| Rhagidiidae       |        |          |                       |                         |             |
| Rhodacaridae      |        |          |                       |                         |             |
| Scutacaridae      |        |          |                       |                         |             |
| Tarsonemoidea     |        |          |                       |                         |             |
| Terphacaridae     |        |          |                       |                         |             |
| Trachytidae       |        |          |                       |                         |             |
| Trombidiidae      |        |          |                       |                         |             |
| Tyroglyphidae     |        |          |                       |                         |             |
| Urodynichidae     |        |          |                       |                         |             |
| Uropodidae        |        |          |                       |                         |             |
| Veigaiidae        |        |          |                       |                         |             |
| Winterschmidtidae |        |          |                       |                         |             |
| Zerconidae        |        |          |                       |                         |             |



Estos datos deben ser tomados con la debida precaución dado que son recopilaciones bibliográficas y la falta de información no significa necesariamente ausencia de dicha familia en dicha fase de descomposición; simplemente indica que no hay citas publicadas hasta la fecha. Por otra parte, es sabido que determinadas familias de ácaros, como las correspondientes a los oribátidos, se encuentran en condiciones naturales en el suelo por lo que su cita asociada a fases avanzadas de descomposición no significa necesariamente que sean propios de dicha fase, tan solo que se encontraron junto a restos cadavéricos en dichas fases de descomposición y que muy probablemente permanecieron en el suelo durante toda la descomposición previa. De hecho, los ácaros oribátidos son los principales representantes de la mesofauna edáfica pero no sobreviven en el suelo ante el acúmulo de los fluidos de descomposición, los cuales producen drásticos cambios en las condiciones ambientales del suelo, dando lugar a la desaparición de una cantidad importante de estas especies y permaneciendo solo las más resistentes. Así, especies de familias como Nothridae, Camisiidae u Oppiidae entre otras, son modelos clásicos de experimentación empleados en estudios sobre suelos contaminados (BEHAN PELLETIER, 1999, KHALIL *et al.*, 2009, LINDEN *et al.*, 1994, PARMELEE *et al.*, 1993, VAN GESTEL, 2012, entre otros).

## 5. PROPUESTA DE METODOLOGÍAS PARA LA RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE ÁCAROS DE INTERÉS FORENSE

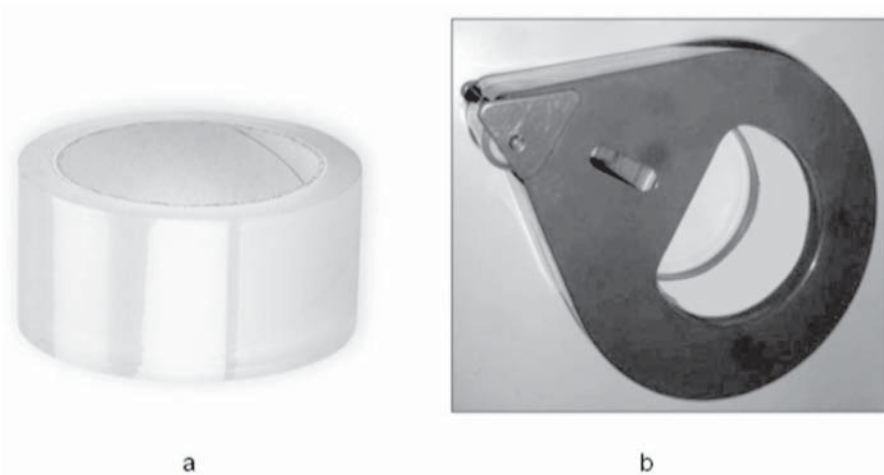
Por su pequeño tamaño, los ácaros no pueden recolectarse por métodos tradicionales diseñados para recolección de insectos. Así, un pincel humedecido en alcohol puede ser suficiente para atrapar entre sus cerdas a los ácaros más minúsculos con un poco de pericia y de paciencia. Sin embargo, por la dificultad que tienen para ser reconocidas a simple vista las fases más pequeñas y juveniles, conviene ayudarse de herramientas asequibles que nos permitirán comprobar posteriormente bajo un microscopio si están o no presentes en el entorno que estamos investigando.

Uno de los aspectos más importantes a la hora de decidir la técnica de muestreo es el estado del entorno donde se va a proceder a su recolección. Ninguna de las técnicas que describimos asegura la recolección de todos los ácaros y, con frecuencia, deberemos recurrir a una combinación de ellas. Los criterios para elegir el método más adecuado se desarrollan con la experiencia y es importante especificar en el informe pericial el método empleado, dado que una elección inadecuada puede hacer que determinadas evidencias se pierdan para siempre, o que se haya producido un sesgo de muestreo.

### 1. CINTA ADHESIVA

Están diseñadas para levantar huellas dactilares y todo tipo de microtrazos. Las cintas usadas para la captura de huellas digitales, tipo J-Lar, per-

miten atrapar sin dificultad los ácaros que pasean por una superficie. Es un método eficaz para la superficie de cadáveres frescos con poco pelo y que aún no han empezado a liberar efluvios derivados de la descomposición. Se aplican directamente sobre piel o sobre la vestimenta. Sin embargo, no son convenientes para superficies húmedas asociadas a cadáveres en avanzado estado de descomposición o que se encuentren en entornos sumergidos, o para recolección de pruebas bajo la lluvia. Dado el elevado riesgo de contaminación cruzada, es conveniente que la cinta a emplear esté debidamente aislada del medio circundante hasta el momento mismo de su uso. Existen contenedores específicos que aseguran el aislamiento de la cinta del medio circundante hasta el mismo momento de su uso (Figura 2).



**Figura 2:** Cinta para recolección de ácaros (a) sobre superficies lisas libres de fluidos, junto con portarrollos hermético (b) que evita contaminaciones cruzadas de la muestra a tomar.

Encontramos cintas adhesivas transparentes en el mercado que son un apoyo extraordinario para atrapar a minúsculos ácaros que se encuentren sobre superficies lisas, como puede ser la mesa donde se está realizando la autopsia. Una vez pegados a la cinta, ésta debe adherirse con cuidado sobre una superficie transparente rígida (porta) o sobre una lámina semirrígida (particularmente útil es la hoja de acetato para transparencias) que permitan la observación directa de estos microartrópodos y otros restos adheridos, al microscopio, sin necesidad de levantar la cinta de nuevo, evitando al máximo toda posible contaminación con el entorno. No obstante, si se introducen inmediatamente en un tubo con alcohol, los ácaros pueden desprenderse de la cola y podrán ser debidamente conservados o procesados para su posterior estudio. En caso de almacenar la muestra en un tubo con alcohol, este deberá ser debidamente precintado y rotulado para asegurar

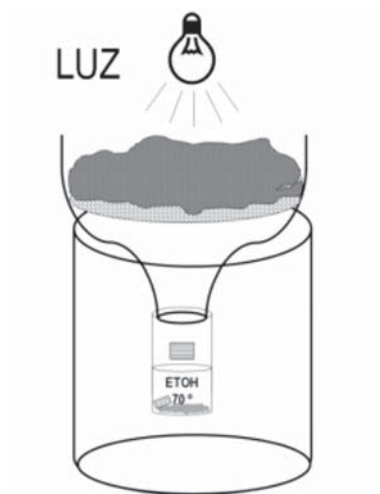
la cadena de custodia desde su recogida hasta la llegada al especialista. La cinta adhesiva también debe ser debidamente rotulada y almacenada en bolsas precintadas, en caso de preservar la muestra en la cinta, y debe mantenerse refrigerada en nevera para su correcta conservación.

## 2. LEVANTADORES DE GEL

Están diseñados para levantar huellas de más profundidad, como las ofrecidas por la suela de calzado, rodadas de vehículos y otras marcas dejadas sobre un terreno. Al gel puede adherirse cualquier estructura que haya sobre una superficie lisa, incluidos los ácaros y otros microartrópodos. No es válido para superficies húmedas asociadas a cadáveres en avanzado estado de descomposición o que se encuentren en entornos sumergidos. Permite conservar en perfecto estado a los ácaros y preservarlos de contaminaciones externas una vez se cubre la superficie de gel con la lámina protectora. Aquellos ácaros que se encuentren total o parcialmente fuera del perímetro de la superficie podrían proceder del exterior e introducir artefactos procedentes de contaminaciones externas. Sólo aquellos ácaros que estén absolutamente cubiertos por la banda protectora deberán ser tenidos en cuenta.

## 3. EMBUDOS BERLESE-TULLGREN

El método Berlese es un sistema de extracción por embudo para separar los pequeños artrópodos del suelo. Fue desarrollado por el acarólogo italiano Antonio Berlese (1863-1927) a finales del siglo XIX. En el sistema diseñado por Berlese circula agua caliente entre las paredes dobles de latón de un embudo (o embudos) donde se ha depositado la muestra de la que se quieren extraer los organismos, de manera que la muestra se seca lentamente. En 1918, Albert Tullgren (1874-1958) modificó el método, reemplazando la envoltura de agua por un foco de luz eléctrica colocado a unos centímetros de la muestra (Figura 3). En consecuencia, el método habitualmente empleado consiste en un embudo sobre el que se coloca la muestra de la que se desea extraer la fauna; en el caso que nos ocupa, una muestra del suelo sobre el que se encontró el cadáver o restos de este. Sobre el embudo, una luz irá calentando el entorno provocando una reacción de huida en la fauna que se encuentra en dicho entorno, la cual irá hacia la parte inferior donde un tubo colector con alcohol irá atrapando a todos los habitantes de dicho suelo (MARCOS GARCÍA, 2004). Estos métodos permiten extraer a los organismos con capacidad de desplazarse. En caso de querer criar la fauna extraída, bastará con poner agua en lugar de alcohol en el colector y retirar los individuos a diario para trasladarlos al recipiente de cría. Por precaución, es conveniente que el tubo recolector y el extremo del embudo encajen perfectamente. De esta manera evitaremos contaminaciones cruzadas por ácaros que se encuentren en el entorno donde se ubica la trampa.



**Figura 3:** Diseño del método de extracción de fauna edáfica por un embudo diseñado por Berlese y modificado por Tullgren.

#### 4. FLOTACIÓN

Es un método eficiente para extraer fauna en suelos con elevado drenaje, especialmente en suelos arenosos. No obstante, el método puede emplearse para separar a los seres vivos de otros restos que caen de la parte superior del embudo durante la extracción por el método Berlese-Tullgren. STRICKLAND (1945) emplea una solución saturada de agua con sal común (ClNa). La muestra debe permanecer durante 20-24h para asegurarse que todos los organismos suban a la superficie, pudiendo retirar el sobrenadante con la fauna que queda separada de los restos inertes de la muestra. LADELL (1936) y SALT & HOLLICK (1944) emplean una solución de sulfato de magnesio; GEURS (1991), ANDRE & NOTI (1993) y DUCARME *et al.* (1999), basados en la afinidad que presenta la cutícula de los artrópodos hacia los derivados del petróleo, proponen el empleo de heptano o 1,2 dibromoetano en lugar de la solución salina (SANDLER *et al.*, 2010), si bien puede reventar los ácaros más delicados por lo que debe manipularse con cuidado y sólo con las fases más esclerosadas de algunas especies como, por ejemplo, algunos Oribátidos.

#### 5. CUCHARAS Y ESPÁTULAS O PINCELES

Bien sobre superficies bien para penetrar dentro de pequeños orificios, se puede raspar la superficie de microorganismos que la tapiza (biofilm) y de la cual se están alimentando algunas especies de ácaros, como los Histiotomatidae (OCONNOR, 2009, SALOÑA & PEROTTI, 2014). Para estos ácaros basta con raspar con espátulas o barrer la superficie húmeda con un

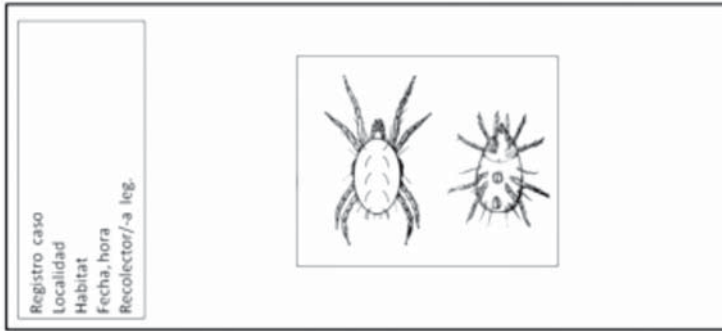
pincel fino y sumergir la muestra en alcohol. Debemos insistir que aunque no se vean los ácaros éstos pueden estar presentes en todas las superficies y no deben obviarse.

En determinados estados de descomposición cadavérica el número de ácaros puede alcanzar dimensiones espectaculares. En determinadas condiciones ambientales puede suceder que el cadáver esté absolutamente cubierto de una masa de ácaros alimentándose de sus restos, hongos, etc.; particularmente en el estadio avanzado (OCONNOR, 2009). Por ello, en ocasiones, un raspado de la superficie del cadáver con una espátula o una recolección de la muestra con una cucharilla desechable puede aportar información adecuada de la diversidad de ácaros asociados a esa parte del cadáver (PASQUERAULT *et al.*, 2006). Una vez recolectados, bastará con agitar suavemente la espátula o la cucharilla dentro de un recipiente con etanol al 70% para que todos los ácaros se suelten y queden debidamente conservados hasta su observación al microscopio. Igualmente deben tomarse las medidas preventivas adecuadas que eviten la contaminación cruzada con otras especies de ácaros que haya en el entorno y que no correspondan a la fauna de ácaros asociada al cadáver. Debe procederse a abrir el recipiente justo antes de introducir la muestra y efectuar el precintado de seguridad inmediatamente después de dicha toma de muestra. Toda negligencia durante el proceso invalidará el valor de la prueba.

## 6. INSECTOS PORTADORES

Por último, es importante la colaboración entre entomólogos y acarólogos. Dado que determinadas especies utilizan a los insectos como portadores para llegar fácilmente al cadáver, es conveniente separar debidamente todos los adultos de los insectos en tubos independientes. Dado que cada espécimen de insecto puede estar transportando especies diferentes de ácaros, también es conveniente separarlos por sexo dentro de cada especie. Por ejemplo, en un tubo guardaremos hembras y en otro machos de *C. vicina*; del mismo modo procederemos para *C. vomitoria* etc. Tanto la especie de ácaro como su fase de desarrollo pueden indicarnos si el insecto acaba de llegar al entorno cadavérico o está disponiéndose a partir, información altamente valiosa para realizar una estimación más precisa del intervalo *postmortem*. Los especímenes pueden conservarse en posición dorsal y ventral en un porta (Figura 4), debidamente etiquetados, lo que agilizará el proceso de identificación por parte del especialista.

Finalmente, al margen de la(s) técnica(s) empleadas para la recolección de los ácaros de interés forense, estos deberán ser debidamente conservados, precintados y etiquetados siguiendo las normas internacionales ya desarrolladas para los insectos (AMENDT *et al.*, 2007; ARNALDOS *et al.*, 2006). En la ficha de registro de las muestras se especificará la técnica empleada para la extracción de los ácaros junto con la región de donde se ha extraído la muestra. En el Anexo presentamos una adaptación de la ficha de registro



**Figura 4:** Disposición de ácaros en un porta, en posición tanto dorsal como ventral, para envío a un especialista.

propuesta por la Asociación Europea para la Entomología Forense EAFE (AMENDT *et al.*, 2007) que permite registrar información procedente de otros entornos y de otros grupo de artrópodos.

La identificación de los ácaros requiere de una pericia y entrenamiento especiales por la elevada diversidad y complejidad de observación de las estructuras con valor taxonómico. La asociación europea de Acarología (EURAAC) es una vía adecuada para contactar con expertos en la taxonomía de los principales ordenes, familias, géneros y especies.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. 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 (2):90-104.
2. AMENDT J, ANDERSON G, CAMPOBASSO CP, DADOUR I, GAUDRY E, HALL MJR, MORETTI TC, SUKONTASON KL, VILLET MH. Standard Practices. En TOMBERLIN JK, BENBOW ME. *Forensic Entomology. International Dimensions and Frontiers*, pp. 381-398. CRC Press, 2015.
3. ANDRÉ HM, NOTI MI. Extracting sand microarthropods a carbon-tetrachloride flotation method. *European Journal of Soil Biology* 1993, 29:91-96.
4. 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.
5. 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.

6. BEHAN-PELLETIER VM. Oribatid mite biodiversity in agroecosystems: role for bioindication Agriculture, Ecosystems & Environment 1999, 7:411-423.
7. BORNEMISSZA GF. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. Australian Journal of Zoology 1957, 5:1-12.
8. BLACKMANN SW. Experimental evidence that the mite *Poecilochirus davydovae*. (Mesostigmata: Parasitidae) eats the eggs of its beetle host. Journal of Zoology 1997, 242:63-67.
9. BRAIG HR, PEROTTI, MA. Carcasses and mites. Experimental and Applied Acarology 2009, 49:45-84.
10. BROUARDEL P. De la détermination de l'époque de la naissance et de la mort d'un nouveau-née, faite à l'aide de la présence des acares et des chenilles d'aglosses dans cadavre momifié. Ann. Hyg. Publ. Méd. Lég. Série 3, 1879, 2: 153-158.
11. CAMERICK AM. Phoresy revisited. En SABELIS MW, BRUIN J. Trends in Acarology: Proceedings of the 12th International Congress of Acarology, pp. 333-336, Amsterdam: Springer. 2010.
12. DE JONG GD, HOBACK WW. Effect of investigator disturbance in experimental forensic entomology: succession and community composition. Medical and Veterinary Entomology 2006, 20:248-58.
13. DUCARME X, ANDRÉ HM, LEBRUN P. Extracting endogenous microarthropods: a new flotation method using 1,2-dibro-moethane. European Journal of Soil Biology 1999, 34:143-150.
14. FILIPPONI A. Sulla natura dell'associazione tra *Macrocheles muscadomesticae* et *Musca domestica*. Rivista di Parassitologia 1955, 16:83-102.
15. FROST CL, BRAIG HR, AMENDT J, PEROTTI MA. Indoor Arthropods of Forensic Importance: Insects Associated with Indoor Decomposition and Mites Markers. En Amendt J, Campobasso CP, Goff ML, Grassberger M. Current Concepts in Forensic Entomology, 6:93-108, Springer, 2010.
16. GEURS M, BONGERS J, BRUSSARD L. Improvements to the heptane flotation method for collecting microarthropods from silt loam soil. Agriculture Ecosystems and Environment 1991, 34:213-221.
17. GOFF ML. Gamasid mites as potential indicators of postmortem interval. En Viraktamath CA, Channabasavana GP. Progress in Acarology, 1989, 6:443-450.
18. GOFF ML. Use of acari in establishing a postmortem interval in a homicide case on the island of Ohau, Hawaii. En DUSBÁBEK E, BUKVA V (eds) Modern Acarology, vol 1. pp. 439-442. The Hague: SPB Academic Publishing, 1991.
19. KHALIL MA, JANSSENS TKS, BERG MPB, VAN STRAALEN NM. Identification of metal-responsive oribatid mites in a comparative survey of polluted soils Pedobiologia 2009, 52:207-221.
20. KRANTZ GW. Form and Function en KRANTZ GW, WALTER E. A manual of Acarology, pp. 5-53. Texas Tech University Press 2009.
21. LADELL WRS. A new apparatus for separating insects and other arthropods from the soil. Annals of Applied Biology 1936, 23:862-79.

22. LECLERCQ M, VAILLANT F. Entomologie et médecine légale: une observation inédite. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)* 1992, 28:3-8.
23. LECLERCQ M, VERSTRAETEN C. Entomologie et médecine légale. Datation de la mort. Acariens trouvés sur des cadavres humains. *Bulletin Annales de la Société Belge d'Entomologie* 1988a, 124:195-200.
24. LECLERCQ M, VERSTRAETEN C. Entomologie et médecine légale. Datation de la mort: insectes et autres arthropodes trouvés sur les cadavres humains. *Bulletin Annales de la Société Belge d'Entomologie* 1988b, 124:311-317.
25. LINDEN, DR, HENDRIX PF, COLEMAN DC, VAN VLIET PCJ, en DORAN, JW, COLEMAN DC, BEZDICEK DF, STEWART BA (Eds.) *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Special Publication 1994, 35:91-106.
26. MARCOS GARCÍA MA. Métodos de captura. En BARRIENTOS JA, coord. *Bases para un curso práctico de Entomología*. pp, 27-45. Ed. Asociación española de Entomología 2004.
27. MAŠÁN P, PEROTTI MA, SALOÑA-BORDAS MI, BRAIG HR. *Proctolaelaps euserratus*, an ecologically unusual melicharid mite (Acari, Mesostigmata) associated with animal and human decomposition. *Experimental and Applied Acarology* 2013, 61:415-429.
28. MÉGNIN JP. *La faune des cadavres. Application de l'entomologie à la médecine légale*. Masson Ed, Paris, 1894.
29. MERRITT RW, SNIDER R, DE JONG JL, BENBOW ME, KIMBIRASKAS RK, KOLAR RE. Collembola of the grave: a cold case history involving arthropods 28 years after death. *Journal of Forensic Sciences* 2007, 52:1359-1361.
30. OCONNOR BM. Astigmatid mites (Acari: Sarcoptiformes) of forensic interest. *Experimental and Applied Acarology* 2009, 49:125-33.
31. PARMELEE RW, WENTSEL RS, PHILLIPS CT, CHECKAI RT, SIMINI M. Soil microcosm for testing the effects of chemical pollutants on soil fauna communities and trophic structure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1993, 12:1477-1486.
32. PASQUERAULT T, VINCENT B, DOUREL L, CHAUVET B, GAUDRY E. Los muestreos entomológicos: de la escena del crimen a la peritación. *Ciencia Forense* 2006, 8:39-56.
33. PEROTTI MA. 2009. Mégnin re-analysed: the case of the newborn baby girl. Paris, 1878. *Experimental and Applied Acarology* 2009, 49:37-44.
34. PEROTTI MA, BRAIG HR. Phoretic mites associated with animal and human decomposition. *Experimental and Applied Acarology* 2009, 49:85-124.
35. PEROTTI MA, BRAIG HR. *Acarology in Criminological Investigations. The Human Acarofauna during Life and Death*. En BYRD JH, CASTNER JL. *Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, pp: 637-649. CRC Press, 2010.
36. PEROTTI MA, BRAIG HR, GOFF ML. Phoretic Mites and Carcasses: Acari Transported by Organisms Associated with Animal and Human Decomposition. En Amendt J, Campobasso CP, Goff ML, Grassberger M. *Current Concepts in Forensic Entomology*, pp. 69-91, Springer, 2010.



37. PEROTTI MA, GOFF ML, BAKER AS, TURNER BD, BRAIG HR. Forensic acarology: an introduction. *Experimental and Applied Acarology* 2009, 49:3-13.
38. PRICHARD JG, KOSSORIS PD, LEIBOVITCH RA, ROBERTSON LD, LOVELL FW. Implications of Trombiculid Mite Bites: Report of a Case and Submission of Evidence in a Murder Trial. *Journal of Forensic Sciences* 1986, 31:301-306.
39. SALOÑA MI, MORAZA ML, CARLES-TOLRÁ M, IRAOLA V, BAHILLO P, YÉLAMOS T, OUTERELO R, ALCARAZ R. Searching the soil: forensic importance of edaphic fauna after the removal of a corpse. *Journal of Forensic Sciences* 2010, 55: 1652-1655.
40. SALOÑA BORDAS MI, BAHILLO DE LA PUEBLA P, DÍAZ MARTÍN B, SUMNER J, PEROTTI MA. *Ixodes ricinus* (Ixodidae), an occasional phoront on necrophagous and coprophagous beetles in Europe. *Experimental and Applied Acarology* 2015, 65:243-248.
41. SALOÑA BORDAS MI, PEROTTI MA. First contribution of mites (Acari) to the forensic analysis of hanged corpses: a case study from Spain. *Forensic Science International* 2014, 244:e6-e11.
42. SALT G, HOLLICK FSJ. Studies of wireworm populations. I. A census of wireworms in pasture. *Ann. Appl. Biol.* 1944, 31:52-64.
43. SANDLER RV, FALCO LB, DI GIOCCO C, DE LUCA R, COVIELLA CE. Eficiencia del embudo Berlese-Tullgren para extracción de artrópodos edáficos en suelos argiudoles típicos de la provincia de Buenos Aires. *Ciencia del suelo* 2010, 28(1):1-7.
44. SCHWARZ HH, MÜLLER JK. The dispersal behaviour of the phoretic mite *Poecilochirus carabi* (Mesostigmata, Parasitidae): adaptation to the breeding biology of its carrier *Necrophorus vespilloides* (Coleoptera, Silphidae). *Oecologia* 1992, 89:487-493.
45. SOCARRÁS A. Mesofauna edáfica: indicador biológico de la calidad del suelo. *Pastos y Forrajes* 2013, 36:5-13.
46. SOLARZ K. 2009. Indoor mites and forensic acarology. *Experimental and Applied Acarology* 2009, 49:135-42.
47. STREIT B. Effects of high copper concentrations on soil invertebrates (earthworms and oribatid mites): Experimental results and a model. *Oecologia* 1984, 64:381-388.
48. STRICKLAND, AH. A survey of the arthropod soil and litter fauna of some forest reserves and cacao estates in Trinidad, British West Indies. *Journal of Animal Ecology* 1945,14:1-11.
49. SUBÍAS L, PÉREZ T. Oribátidos (Acari, Oribatida) cavernícolas de España. *Gota a gota* 2013, 1:37-43.
50. SZELECZ I, FOURNIER B, SEPPEY C, AMENDT J, MITCHELL E. Can soil testate amoebae be used for estimating the time since death? A field experiment in a deciduous forest. *Forensic Science International* 2014, 236:90-98.
51. VAN GESTEL CAM. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. *ZooKeys* 2012, 176:275-296.

52. WALTER DE. Glossary of Acarine Terms. A work in progress 2005 [en línea] [http://itp.lucidcentral.org/id/mites/invasive\\_mite/Invasive\\_Mite\\_Identification/key/0\\_Glossary/Mite\\_Glossary.htm#whorl](http://itp.lucidcentral.org/id/mites/invasive_mite/Invasive_Mite_Identification/key/0_Glossary/Mite_Glossary.htm#whorl)
53. WEBB JP, LOOMIS RB, MADON MB, BENNET SG, GREENE GE. The chigger species *Eutrombicula belkini* Gould (Acari: Trombiculidae) as a forensic tool in a homicide investigation in Ventura County, California. Bulletin of the Society of Vector Ecologists 1983, 8:142-146.

## ANEXO

Siguiendo el modelo consensuado por la Asociación europea para la Entomología Forense (AMENDT *et al.*, 2006) adaptamos la ficha técnica, incluyendo la relación de muestras, al formato adjunto en el presente anexo de forma tal que una misma ficha de registro de entrada pueda ser empleada para ambos tipos de muestras.

**Protocolo para el registro de muestras acarológicas para investigación pericial forense (página 1/3)**

Recolector/a \_\_\_\_\_ fecha/hora \_\_\_\_\_ Caso n° \_\_\_\_\_

| <b>ESPECIFICACIONES</b>         |                 |                       |                         |
|---------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|
| Edad                            | Sexo            | Altura                | Peso                    |
| Posición                        | Enterrado       | Profundidad estimada  | Sobre tierra            |
| Tumbado sumergido               |                 |                       |                         |
| Observaciones _____             |                 |                       |                         |
| <b>Vestimenta</b>               | total           | parcial               | ausente                 |
|                                 | Cuerpo cubierto | con                   |                         |
| Observaciones _____             |                 |                       |                         |
| <b>Estado de descomposición</b> |                 | fresco                | hinchado                |
|                                 |                 | descomposición activa | descomposición avanzada |
|                                 |                 | esquelético           |                         |
| Observaciones _____             |                 |                       |                         |
| Otros daños *                   |                 |                       |                         |
| Carroñeros, señales             |                 |                       |                         |
| Heridas                         |                 |                       |                         |

| <b>LUGAR DE LOS HECHOS</b>                       |                |                 |                     |               |
|--|----------------|-----------------|---------------------|---------------|
| Exterior   | Bosque         | Cultivo         | Pastizal / Pradera  | arbustos      |
|  | Parque público |                 | sobre hierba, suelo | sobre asfalto |
| Interior   | Garaje/almacén | Granero/establo | Piso                | Casa de campo |
| Sobre el suelo (moqueta, alfombra, etc)          |                |                 |                     |               |
| Habitación (especificar) _____ calefacción Si/No |                |                 |                     |               |
| Ventana abierta                                  |                |                 |                     |               |
| Otros: vehículo, etc. _____                      |                |                 |                     |               |
| Observaciones _____                              |                |                 |                     |               |

| <b>TEMPERATURA</b>        |                            |                              |                  |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------|
| ambiente (2m sobre suelo) |                            | ambiente 2 (5 m sobre suelo) |                  |
| Superficie del cuerpo     | Masa larvaria 1*           | Masa larvaria 2*             | Masa larvaria 3* |
| Interfaz suelo/cadáver    | Suelo (20 cm bajo cadáver) |                              | Agua             |

**Registrar la temperatura ambiente en los 5-10 días posteriores al descubrimiento del cadáver**

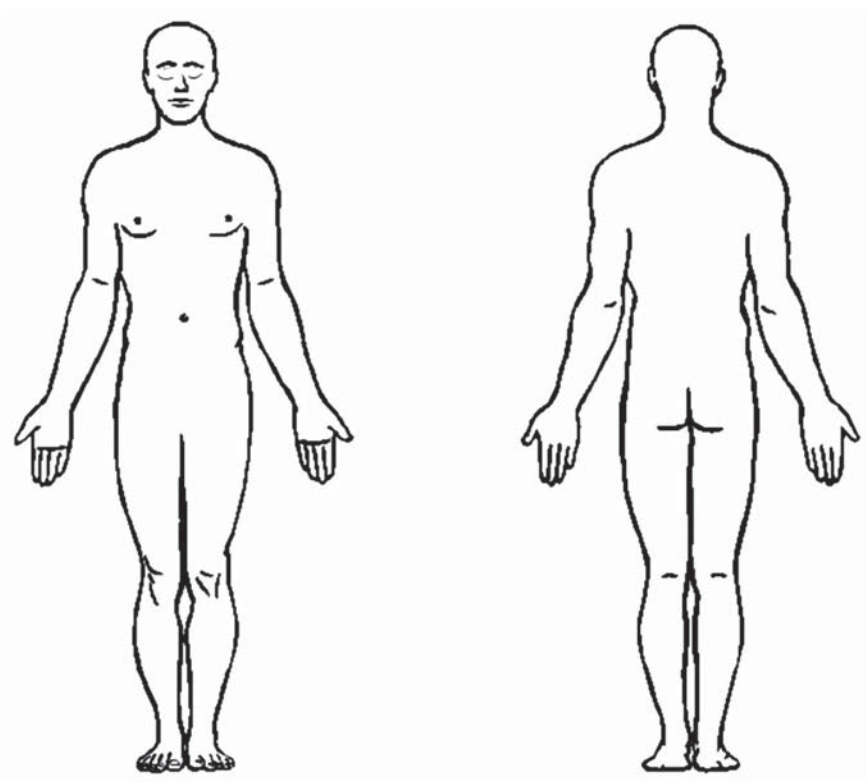
\* indicar, por favor su ubicación en el esquema de las figuras adjuntas

**Registro de muestras de artrópodos recolectadas para su análisis forense (pag. 2/3)**

Recolector/a \_\_\_\_\_ fecha/hora \_\_\_\_\_ Caso n° \_\_\_\_\_

Indicar, por favor las siguientes observaciones:

- áreas con vestimenta
- trazas de carroñeros (SC->)
- heridas (W->)
- masa larvaria (LM1, LM2... ->)
- muestras, procedencia (1, 2, 3, ...)



**Registro de muestras de artrópodos recolectadas para su análisis forense (pag. 3/3)**

Recolector/a \_\_\_\_\_ fecha/hora \_\_\_\_\_ Caso n° \_\_\_\_\_

| MUESTRA   |        | TIPO  | CONSERVADOS/VIVOS* | LOCALIZACIÓN** |
|---|--------|---|--------------------|----------------|
| <b>INSECTO, DI: DÍPTERO, CO: COLEÓPTERO; AC: ÁCARO;<br/>                     CR: CRUSTÁCEO;<br/>                     O: OTROS (ESPECIFICAR)<br/>                     FASE : H: HUEVO, L: LARVA, N: NINFA, P: PUPA,<br/>                     AD: ADULTO<br/>                     E: EXUVIA O MUDA, P0: PUPARIO VACIO</b> |        |   |                    |                |
| N° reg.   | Abund. | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |
|   |        | H <input type="checkbox"/> L/N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ad <input type="checkbox"/> Di <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Ac <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> |                    |                |

H: huevos, L: larvas, N: ninfas, P: pupas, Ad: Adultos.

\* indicar si se fijan en alcohol o se conservan vivos para cría, por ejemplo.

\*\* Especificar la procedencia, zona del cuerpo, suelo, etc. y referir al esquema de la figura.

## DEVELOPING AN EASY AND EFFICIENT PROTOCOL FOR THE STUDY OF DIFFERENT BLOWFLY INSTARS THROUGH SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

ESTIBALIZ ETXEBERRIA-REKALDE<sup>1</sup>  
MAITE GILARRIORTUA<sup>1</sup>  
MARTA I. SALOÑA-BORDAS<sup>1</sup>  
MARÍA LUISA NÓ<sup>2</sup>

**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 contributions. 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* RO-BINEAU-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.

---

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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.

It was also observed that the use of critical point drying or hexamethyldisilazane to dry samples is not necessary, as air drying at room temperature on a blotting paper is safe, faster, cheaper and gives good results. In this way, and focused on *C. vicina*, the most adequate protocol to each developmental stage of blowflies (eggs, larvae, pupae, puparia and adult genitalia) was achieved.

**Resumen:** La Entomología forense estudia los artrópodos que aportan información útil en procesos judiciales, siendo la estimación del intervalo *postmortem* (IPM) una de sus contribuciones más importantes. La microscopia electrónica de barrido (MEB) ha sido ampliamente utilizada para una identificación precisa de moscardas de interés forense pero, frecuentemente, el procedimiento seguido es muy largo o puede introducir artefactos en la imagen. Por ello, se precisa desarrollar una técnica fiable para el estudio de insectos por medio del MEB. El moscardón azul *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 es una especie asociada a restos en descomposición ampliamente citada en casos forenses y fácil de identificar con unos conocimientos básicos sobre las moscardas. Por ello, el presente trabajo ha empleado *C. vicina* como modelo para diseñar y desarrollar un protocolo sencillo, rápido y adecuado para la observación de moscardas por MEB. Durante la optimización del protocolo se logró la mejor combinación de eficiencia en el tiempo empleado para obtener un buen contraste de imagen sin introducir demasiados artefactos con el empleo de glutaraldehído y sin el uso de tetraóxido de osmio. También se observó que no es preciso el secado de las muestras por punto crítico o por el uso de hexametildisilazano dado que el secado al aire a temperatura ambiente sobre un papel presenta menos problemas, es más seguro, rápido, barato y da buenos resultados. Así, centradas en el moscardón azul *C. vicina*, se detalla el protocolo más apropiado para cada fase de desarrollo (huevos, larvas, pupas, pupas, pupario y genitales de los adultos genitalia).

**Palabras clave:** *Calliphora vicina*, MEB, huevo, larva, pupa, pupario, adulto, optimización microscópica ultraestructural.

## INTRODUCTION

Forensic entomology studies the arthropods to provide useful information in police investigations or judicial proceedings, being the *postmortem* interval (PMI) estimation one of its most important contribution (ARNALDOS *et al.*, 2005, GÓMEZ-GÓMEZ *et al.*, 2007, LORD 1990, WELLS & LAMOTTE, 2001). Medico legal issues in particular, need accurate identification of insect specimens (immature stages and adults) as a critical prerequisite to conduct correct analyses, since the developmental rate of each species differ with the temperature.

Many entomological studies (CHAIWONG *et al.*, 2008, MARTINS MENDONÇA *et al.*, 2008, 2010, SUKONTASON *et al.*, 2004, 2006a, 2006b, 2006c, 2006d, 2008a, 2008b, SZPILA & VILLET, 2011, UBERO-PASCUAL, 2005, 2012) have used scanning electron microscopy (SEM) through different techniques, to describe fine morphological details of different structures in different phases of the blowfly cycle (eggs, larvae, puparia, adults), which may be useful in forensic investigations. The procedure for preparing biological samples for SEM analysis involves several progressive stages such as cleaning, fixation, dehydration or drying. To obtain good results, careful manipulation of specimens from the moment of the collection is required. A deficient treatment in any of these stages may produce distortions in the shape, general appearance or specific features of samples, as well as introduction of artefacts to the image or produce the shrinking of samples. Such deformations can lead to incorrect interpretations.

In that sense, the development of an appropriate and simple protocol for insect sample examination through SEM is the first step to provide correct diagnostic characterizations. Taking into account that in forensic laboratories the quickness in giving a result is maybe as important as the result itself, the development of an easy, fast and reliable protocol would be of a great interest.

*Calliphora vicina* (ROBINEAU-DESVOIDY, 1830) (Diptera: Calliphoridae), is a synanthropic fly often associated with decomposing remains (BONACCI *et al.*, 2009, GARCÍA-ROJO, 2004, REIBE & MADEA, 2010). Due to its cosmopolitan distribution, this blowfly is reported worldwide in forensic investigations. Besides, having a preference for urban environments it is associated to public health problems, as carrier of pathogenic microorganisms (GREENBERG, 1971). Furthermore, it has medical and veterinary importance as it can cause accidental myiasis (SOLER CRUZ, 2000). Its life cycle is holometabolous and this necrophagous species feeds on dead bodies, being extremely common on human corpses in temperate regions throughout the United States and Europe (BYRD & CASTNER, 2010).

Popularly known as blue bottle fly, *C. vicina* adults can easily be recognized by the metallic blue colour of the abdomen, the yellow basicosta in the upper border of the wing and the yellowish anterior spiracle (ROGNES, 1991). These flies lay a large amount of white elongated egg masses. The eggs contain a furrow that runs almost the entire length of the egg, called median area (MENDONÇA *et al.*, 2008). The larvae that hatch from these eggs are soft-bodied and are commonly known as maggots due to the wormlike appearance/aspect of the body, they can be recognized due to the presence of an additional sclerite pigmented between the mouthparts. The posterior spiracles are surrounded by a complete peritreme and at a distance between each other similar to their diameter. The openings of the anterior spiracles are disposed in a single row of 5-7-openings. The body segments are delimited by few rows of thin spines arranged in groups (SZPILA, 2010). *C. vicina* moves into three instars before hardening the cuticle during pupariation. Pupae are



cylindrical in shape and composed of the hardened larval integument of the last larval instar (SUKONTASON *et al.*, 2006d). Empty puparia have a smooth surface and preserve the remains of the mouthparts in the anterior part, allowing us to a quick confirmation of its identity.

As *C. vicina* is a common species, easy to be identified with a basic knowledge on blowfly diversity, we decided to use it as model to find an adequate protocol to be applied to future studies of blowflies through SEM. Therefore, the present work analyzes previous research published on scanning electron microscopy applied to insects, to develop an appropriate and simple protocol for the observation of the developmental stages of blowflies through SEM, focused on *C. vicina*.

## MATERIALS AND METHODS

All the instars of *C. vicina* examined in this study were obtained from a colony maintained at the Forensic Entomology laboratory of the Department of Zoology and Animal Cell Biology, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Biscay, Spain. Adults were captured using a selective attraction trap placed in a window of the laboratory, with animal viscera as bait, following a double funnel model (HWANG & TURNER, 2005). They were then morphologically identified using taxonomic keys (CARLES-TOLRÁ HJORTH-ANDERSEN, 2004, GONZÁLEZ-MORA, 1989, PERIS, 2004) before being transferred to breeding cages. Breeding conditions of laboratory colonies were room temperature and natural light/darkness photoperiod. Maggots were supplied with pork kidney and adults with water and sugar as culture substrates (IRELAND & TURNER, 2006, KANESHRAJAH & TURNER, 2004).

After reviewing literature sources, different protocols to prepare samples for SEM were designed, all of them summarised on Table 1. The first two protocols are mainly based on previous studies by SUKONTASON *et al.*, 2003 and SZPILA & PAPE, 2008, with little changes (ANDRADE, per. com). Remaining protocols were designed after observing the results from first assays. Changes consisted on the variation in treatment time with glutaraldehyde/ethanol and the use of different ways of drying, such as air drying on blotting paper. In the tested protocols, samples were boiled (in the case of eggs and maggots only) for a minute and washed by ultrasounds and saline solution (not protocol version 1) to prevent artefacts and dirty surfaces. They were later fixed (not protocol version 1) with a 2,5% glutaraldehyde mixture in phosphate buffer solution (PBS) with a pH of 7,4 at 4°C, for different time periods depending on the protocol version. After fixation, samples were rinsed twice with PBS (not protocol version 1) and dehydrated through increasing ethanol concentrations. Some protocols also included treatment in acetone, the time lengths of both steps being

different depending on the protocol. Finally, samples were dried with hexamethyldisilazane or left to air dry on a blotting paper at room temperature and protected against any contamination, depending on the protocol version.

The samples, once treated, were stuck using double-sided conductor tape in cylindrical brass structures. They were then metalized by gold-palladium sputtering (ASPOAS, 1991) in a BalTec SCD 004 coater. The metalization was done at about 50 mm in height, to avoid overheating of the sample (GOLDSTEIN *et al.*, 2003). The gas used to ionize the gold-palladium tablet was Argon, which was kept at a pressure of  $5 \cdot 10^{-2}$  mbar. Samples were coated with a layer of about 10 nm thick with a current of 15 mA acting for 120 seconds. The micrographs were taken in a SEM JEOL 6400 actually at the UPV/EHU «Electronic Microscopy and Material Microanalysis service» installed in the Faculty of Science and Technology. Working conditions were: 15 keV beam energy, a beam current of less than  $10^{-10}$  A, high vacuum and a working distance between 5 and 38 mm.

Complementarily, one sample was examined through low vacuum at UPV/EHU «Analytical and High resolution Microscopy in Biomedicine service», installed in the Faculty of Medicine. This sample did not undergo any prior treatment or metalization, and was seen by low vacuum SEM HITACHI S-3400N. Micrographs were taken under working conditions of 15 keV beam energy, 60 and 200 Pa pressure depending on the case, and at a working distance between 9.6 and 10 mm.

The terminology used in describing the morphology of the eggs in this paper followed MARTINS MENDONÇA *et al.*, 2008. Larval terminology follows SZPILA, 2010. Pupae and empty puparia terminology follows SUKONTASON *et al.*, 2006d. Terminology used for adult genitalia follows ROGNES, 1991 and CHAIWONG *et al.*, 2008.

## RESULTS

As cuticular hardness varies from one instar to another, it was unnecessary to test all protocols at all stages, because the information obtained from micrographs of a specific protocol for one stage allowed us to discard this protocol for other instars. In first assays, samples were treated in 1.5ml vials, but it was found that samples were usually deformed and it was not easy to manipulate them properly when changing reactive. Therefore, it was decided to use flat surface containers in following procedures.

### EGGS

When trying to differentiate blowfly eggs, the aspect of the median area, how this ends in the anterior and posterior pole or the appearance of the

micropyle are details to focus on. The appearance of the islands inside this median area are also important as diagnostic characteristics, and an appropriate protocol for the observation of this samples through SEM should allow us to see them indubitably.

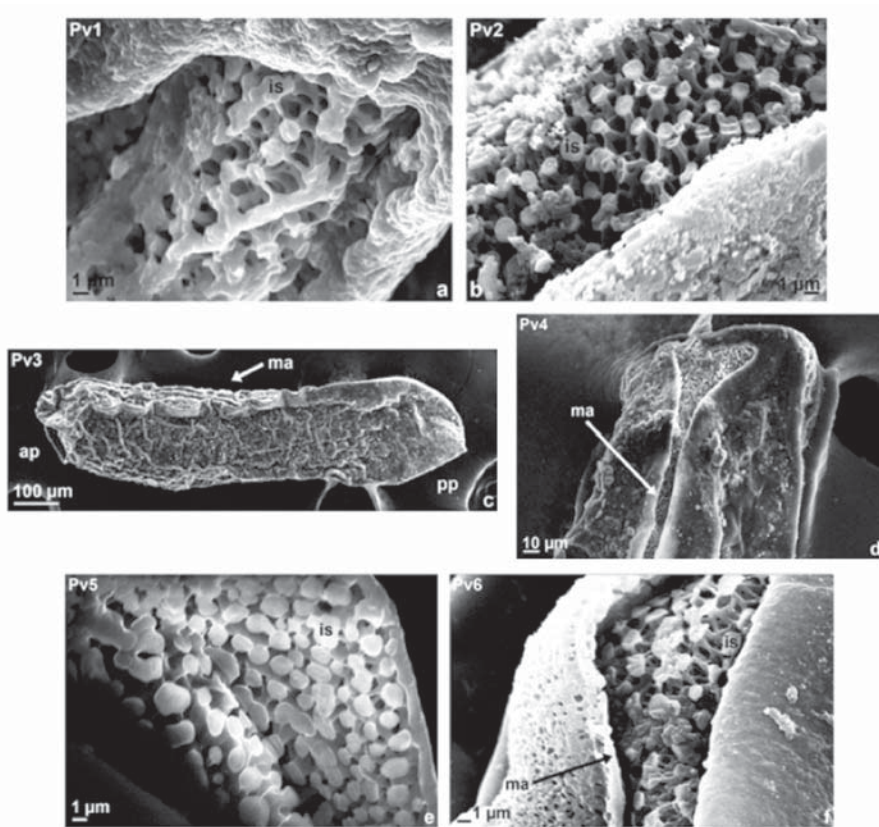
In the first protocol (Pv1), it was tested what happens when there is no glutaraldehyde fixation. Egg samples were just dehydrated in an ascending series of ethanol, starting from their ethanol concentration of conservation, 70% (ADAMS & HALL, 2003, AMENDT *et al.*, 2007). Structures do not crystallize (Fig. 1A), but due to the lack of glutaraldehyde a loss of contrast in the image was observed, which makes more difficult a proper focus of the sample and the observation on detail of the islands.

A massive crystallization of the structure of the egg samples is produced when fixing them through 24 hours (Pv2) in glutaraldehyde (Fig. 1B). These artefacts produce distortions on the general appearance of the egg. However, this fixation period gives to the sample good contrast and focuses easily.

Three protocols (Pv3, Pv4 and Pv5) with mean times of fixation with glutaraldehyde/ dehydration through ethanol were designed, to test if fixation was unnecessary or glutaraldehyde treatment time should be near 24 hours, as previous protocols produced a lack of contrast (Pv1) or an excessive crystallization (Pv2). When immersing egg samples for 12 hours in glutaraldehyde and 6 hours of dehydrations, (Pv3) a good contrast was obtained but crystallization is still produced, some crystals still appear on the surface of the egg, not allowing us to see details in its surface structure (Fig. 1C). 6 hours/3 hours in glutaraldehyde/ethanol (Pv4) produced even less crystallization, while an acceptable contrast was maintained (Fig. 1D). The immersion in only 10 minutes of glutaraldehyde, followed by 10 minute dehydration lots in ethanol (Pv5), produced no crystallization of the structure but there was a high loss of contrast (Fig. 1E).

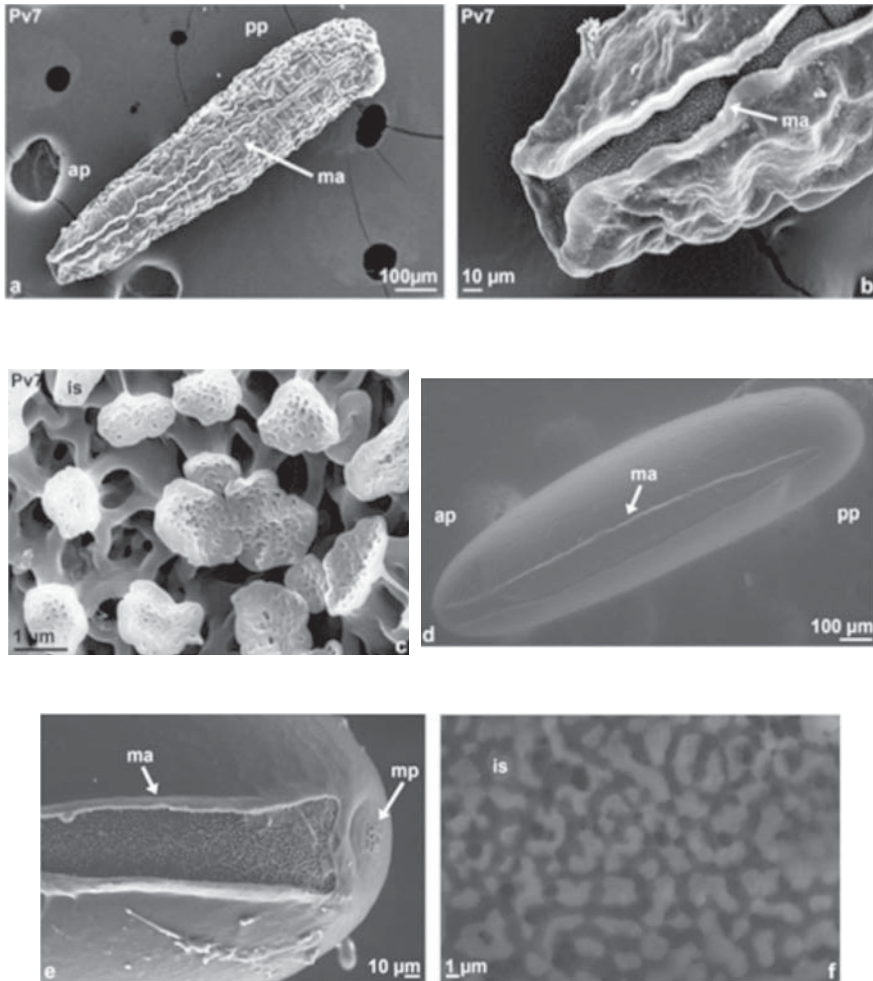
When lowering the glutaraldehyde treatment time down to 4 hours, and ethanol dehydration steps to 2 hours (Pv6) it was observed nearly no crystallization of the egg structures maintaining a good image contrast (Fig. 1F). But the appearance of the islands in the median area was not good enough. As in previous protocols the use of hexamethyldisilazane produced a strong drying of the samples and this wrinkle too much, it was decided to let them dry at room temperature on a blotting paper and protected against contamination. Thus, it was seen that samples wrinkle less, although an optimal result was still not achieved.

In the last proposed protocol (Pv7) the glutaraldehyde treatment lasted 2 hours, ethanol dehydrations 1 hour and the drying process was done on a blotting paper, at room temperature and protected against contamination. With this protocol (Figs. 2A-C) egg samples wrinkle less and enough image contrast is achieved without excessive crystallization of the structures, allowing us to see the appearance of the median area (Figs. 2A-B) or even the holes in the islands (Fig. 2C).



**Figure 1.** SEM micrographs of *C. vicina* eggs. (a) detail of the anterior pole of egg treated with Pv1. (b) detail of the anterior pole of egg treated with Pv2. (c) general lateral view of egg treated with Pv3. (d) dorsal view of the anterior pole of egg treated with Pv4. (e) detail of the anterior pole of egg treated with Pv5. (f) detail of the anterior pole of egg treated with Pv6. Abbreviations: (ap) anterior pole, (is) islands, (ma) median area and (pp) posterior pole

As eggs were one of the most problematic samples to prepare, for obtaining good results a complementary sample was tested in low vacuum microscope with no chemical treatment. The structure of the egg did not wrinkle, allowing us to see the general aspect and the appearance of the median area, but the lack of contrast when working under these pressures is very high, and it is very difficult to focus the image or see specific details

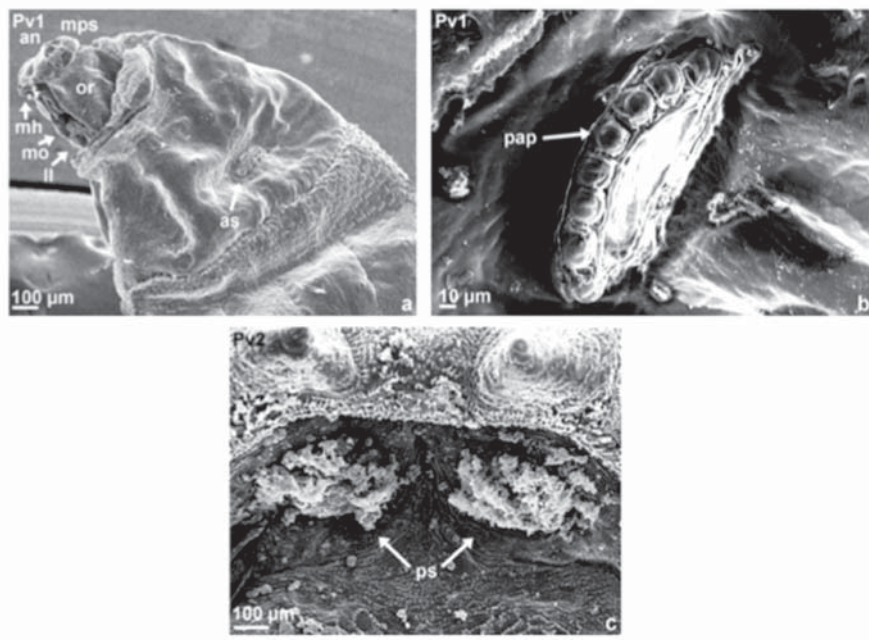


**Figure 2.** SEM micrographs of *C. vicina* eggs. (a) general dorsal view of egg treated with Pv7, with the median area extending almost through the entire length of the egg. (b) dorsal view of the anterior pole of egg treated with Pv7. (c) detail of the islands with holes in the median area of egg treated with Pv7. (d) general dorsal view of egg under low vacuum microscope, with the median area extending almost through the entire length of the egg. (e) dorsal view of the anterior pole of egg under low vacuum microscope with the micropyle differentiated near to the median area. (f) detail of the islands in the median area of egg under low vacuum microscope. Abbreviations: (ap) anterior pole, (is) islands, (ma) median area, (mp) micropyle and (pp) posterior pole.

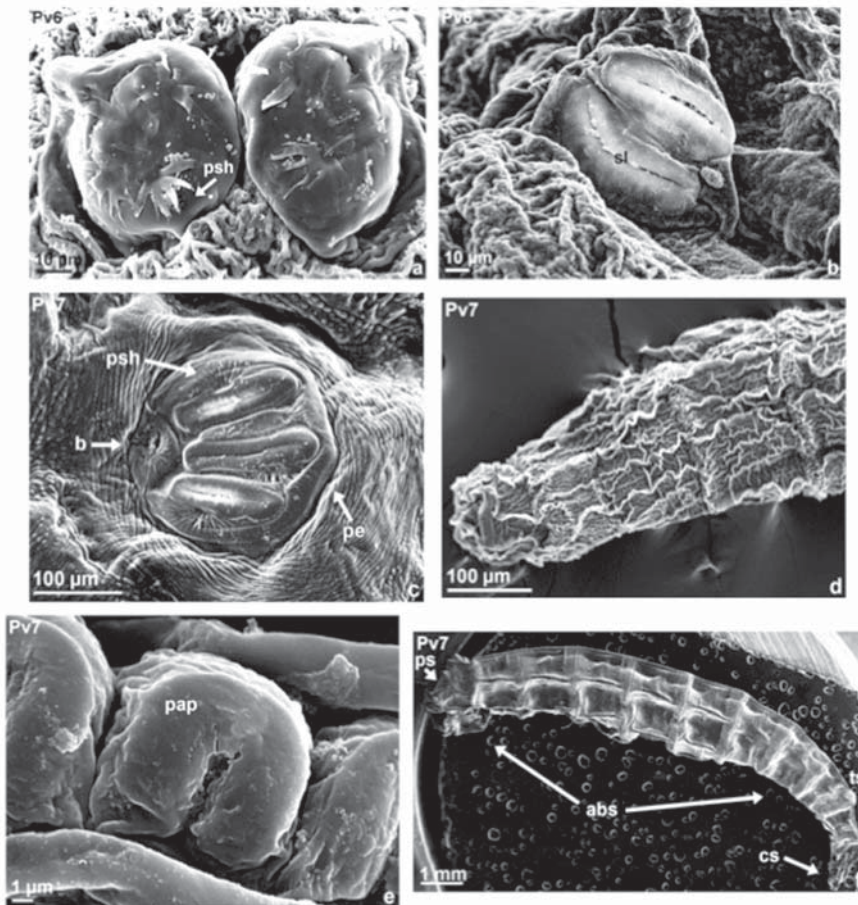
of the islands in the median area (Figs. 2D-F). Furthermore, after some time the samples began to deform as a result of the near environmental vacuum low pressure.

## MAGGOTS

Although maggots look very similar to untrained eyes, they have many structures of diagnostic value. On the anterior spiracles, it is important to observe how many papillae there are. On posterior spiracles we should check if the peritreme is complete, focus on the shape of the bottom, how the spiracular discs are located one to each other, how the spiracular hairs



**Figure 3.** SEM micrographs of *C. vicina* maggots. (a) lateral view of the cephalic segment of a third instar maggot treated with Pv1. (b) anterior spiracle of a third instar maggot treated with Pv1, showing a single row of 8 papillae. (c) posterior spiracles of a third instar maggot treated with Pv2, completely crystallized. Abbreviations: (an) antenna, (as) anterior spiracle, (ll) labial lobe, (mh) mouthhook, (mo) mouth opening, (mps) maxillary palpus, (or) oral ridges, (pap) papillae and (ps) posterior spiracles.



**Figure 4:** SEM micrographs of *C. vicina* maggots. (a) posterior spiracles of a first instar maggot treated with Pv6, bearing 1 spiracular slit. (b) posterior spiracle of a second instar maggot treated with Pv6, with the characteristic 2 separated and practically straight spiracular slits. (c) posterior spiracle of a third instar maggot treated with Pv7, with the characteristic 3 linear and separated spiracular slits. (d) detail of the cephalic and thoracic segments of a first instar maggot treated with Pv7 seen laterally, with the absence of the anterior spiracle. (e) detail of an anterior spiracle of a second instar maggot treated with Pv7. (f) lateral view of the entire body of a third instar maggot treated with Pv7. Abbreviations: (abs) abdominal segments, (b) button, (cs) cephalic segment, (pe) peritreme, (pap) papillae, (ps) posterior spiracles, (psh) posterior spiracular hairs (sl) spiracular slits and (ts) thoracic segments.

look like in each disc, or how many slits have the spiracular discs, together with their shape and position. The shape and disposition of the intersegmental spines have also taxonomic value.

Based on previous appreciations done on egg micrographs, maggots were not observed with protocols Pv3, Pv4, and Pv5. It was noticed that larvae reacted similarly to eggs to the use of different protocols, but they wrinkle less. When not using glutaraldehyde for the fixation (Pv1), a lack of contrast is observed but the structures are not crystallized at all (Figs. 3A-B). When using 24 hours of glutaraldehyde immersion and hexamethyldisilazane drying (Pv2), structures get completely crystallized and wrinkle a lot (Fig. 3C), not allowing us the observation of taxonomic details as the slits in the spiracular discs.

Using either glutaraldehyde immersions of 4 hours (Pv6) or 2 hours (Pv7), almost the same crystallization of structures is produced (Fig. 4). The contrast is good in both cases, but 2 hours of glutaraldehyde immersion give the right combination of little crystallization and enough contrast with shorter preparation time, useful in forensic investigations. The shape of the spiracular slits, or the details of the spiracular hairs in all the tree instars (Figs. 4A-C), the absence of anterior spiracle in the first instar (Fig. 4D), details of the papillae of anterior spiracles (Fig. 4E) or the general appearance of the maggot (Fig. 4F) are clearly seen with these protocols.

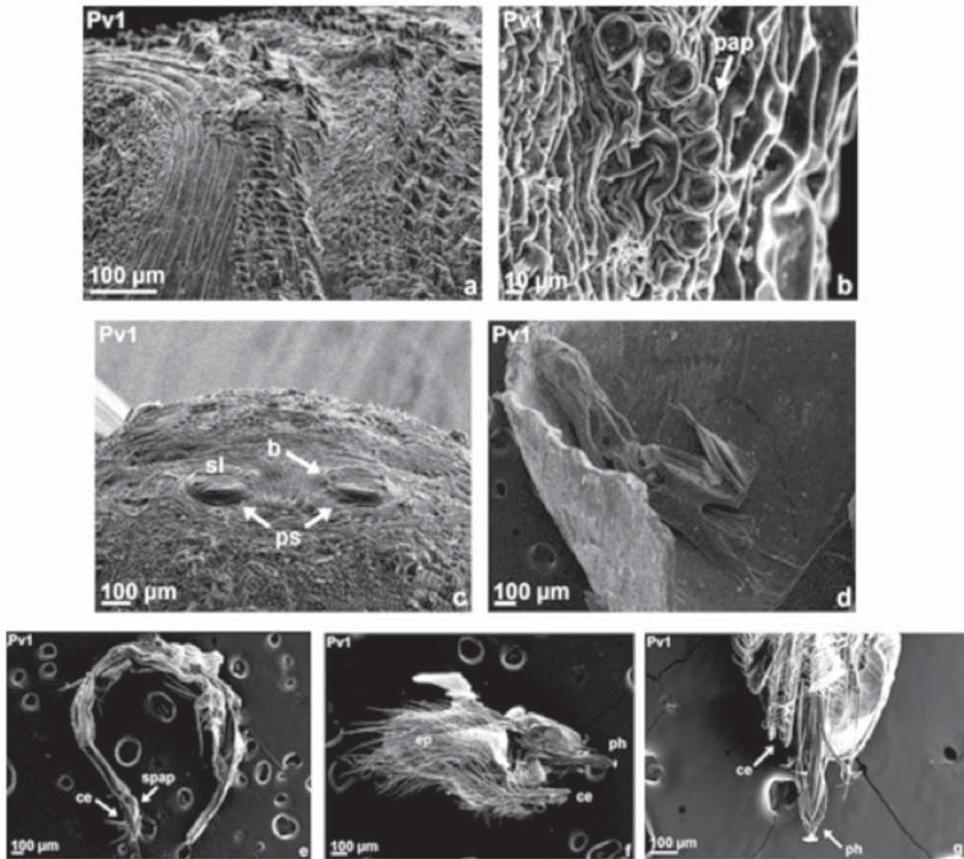
#### PUPAE AND EMPTY PUPARIA

When trying to identify a pupa, we have to look for the same characteristics as in maggots. Pupae and empty puparia have a hardened skeleton, and air drying is enough for SEM after cleaning the surface by ultrasounds (Pv1). This was the first and only protocol tested for these instars and as expected, being quite hard structures, enough image contrast is achieved with neither fixation in glutaraldehyde nor ethanol dehydrations, with the absence of artefact introductions (Figs. 5A-D). We can perfectly see the form of the intersegmental spines and how they are arranged in groups (Fig. 5A), the papillae in the anterior spiracle (Fig. 5B), how the distance between the spiracular discs is similar to their diameter (Fig. 5C) as well as the remains of the mouthhook inside the empty puparia (Fig. 5D), a very useful tool for specific identification.

#### ADULTS

In the case of identifying adults, observing some details of the genitalia as the shape of the supraanal plate, cerci, phallum or epandrium is usually helpful and basic in some other species of the family. Adult genitalia, as pupae and empty puparia, were just cleaned by ultrasounds and air dried (Pv1). It is a fast and simple protocol which, when used in samples with hard structures adequately cleaned, results in images with a good quality,





**Figure 5:** SEM micrographs of *C. vicina* pupae, empty puparia and genitalia treated with Pv1. (a) detail of the intersegmental spines. (b) anterior spiracle of the pupa displaying 8 papillae arranged in a single row. (c) posterior spiracles of the pupa having three spiracular slits on each spiracular disc. (d) detail of an empty puparium with remains of the larval mouthhook. (e) lateral view of female genitalia. (f) lateral view of male genitalia. (g) detail of the cerci and phallus of male genitalia. Abbreviations: (b) button, (ce) cerci, (ep) epandrium, (pap) papillae, (ph) phallus, (ps) posterior spiracles, (sl) spiracular slits and (spap) supraanal plate.

enough contrast and a lack of artefact introductions (Figs. 5E-G). This protocol allows us to see the details of the female (Fig. 5E) and male genitalia (Figs. 5F-G), as well as the long and thin form of male cerci, an important diagnostic character.

## DISCUSSION

The procedure for preparing biological samples for SEM analysis involves several progressive stages and, a deficient treatment in any of these stages may produce distortions, introduction of artefacts to the image or produce the shrinking of the samples that lead to the risk of a misidentification. As such deformations can lead to misinterpretations, they should be minimized as much as possible, keeping at the same time the best contrast of what we want to observe. Between two protocols having similar results we will choose the easier and faster one, as in forensic laboratories the quickness in giving a result is maybe as important as the result itself.

To prepare eggs and maggots for SEM, it is advisable to boil them (1 minute in 100°C water), so that they elongate adequately and putrefaction of the samples is prevented. It is also important to clean them by ultrasounds to prevent artefacts and dirty surfaces, and to wash them several times in a saline solution. During the treatment applied to the samples, it is important to prevent deformations or inadequate manipulations when changing reactive, so it was decided to use containers having a flat surface.

It was confirmed that when samples are not treated with glutaraldehyde (Pv1, Figs. 1A and 3A-B), the structures do not crystallize, an advantage when analyzing features of diagnostic value. But it is also observed a loss of contrast in the image, making difficult a proper focus of the sample and consequently having a loss of information. When fixing samples with glutaraldehyde, a good image contrast is obtained, but it also produces crystallization of the structures introducing artefacts to the sample. This was attributed to the exposed time, as for example with 24 hours immersion in glutaraldehyde (Pv 2, Figs. 1B and 3C), structures suffer a massive crystallization, not allowing us to see characteristics of diagnostic value such as the aspect of posterior spiracles (Fig. 3C).

Although many previous studies have used prolonged times of glutaraldehyde fixation (CHAIWONG *et al.*, 2008, CHEN & FADAMIRO, 2008, PELLEGRINI *et al.*, 2011, RADHAKRISHNAN *et al.*, 2009, SUKONTASON *et al.*, 2003, 2007a, 2008a, 2008b, ŽDÁREK *et al.*, 1996), analyzing the images of the different protocols, we can conclude that glutaraldehyde is necessary to achieve good contrast, but produces strong artefacts that alter the surface appearance. Because of that reason, the best option is to use a mean time of glutaraldehyde treatment, enough to have a good image contrast at SEM

and not too much crystallization with the introduction of artefacts to the image. In addition, this makes the protocol faster. In the specific case of crystallization by glutaraldehyde resulting in artefacts that avoid the recognition of specific structures, one could choose to sacrifice image quality and try to see the structure without glutaraldehyde fixation (Pv1: Figs. 1A and 3A-B), a less contrasted protocol but without crystallization.

Osmium tetroxide has been broadly used in previous similar research (CHAIWONG *et al.*, 2008, CHEN & FADAMIRO, 2008, MARTINS MENDONÇA *et al.*, 2008, 2010, PELLEGRINI *et al.*, 2011, RADHAKRISHNAN *et al.*, 2009, RUIZ-MARTINEZ *et al.*, 1989, SUKONTASON *et al.*, 2003, 2007a, 2008a, 2008b) as postfixation after glutaraldehyde, as it gives better fixation and contrast to the samples. But it can also introduce new artefacts, has a complicated manipulation because of its toxicity, and makes the protocol last longer. Taking all of this into account, we recommend not using osmium tetroxide, as glutaraldehyde gives enough image contrast in our assays.

When using dehydration phases for just 1 or 2 hours, and stopping them at the concentration of conservation of each kind of sample, EtOH 70% for eggs and EtOH 80% for maggots (ADAMS & HALL, 2003, AMENDT *et al.*, 2007), better results were found (Pv6 and Pv7, Figs. 1F, 2A-C and 4), samples dry in a better form and wrinkle less. This makes the protocol faster than some of those previously described (Chaiwong *et al.*, 2008, CHEN & FADAMIRO, 2008, SUKONTASON *et al.*, 2003, 2008a, 2008b).

Most of similar SEM studies (ASPOAS, 1991, CHAIWONG *et al.*, 2008, CHEN & FADAMIRO, 2008, MARTINS MENDONÇA *et al.*, 2008, 2010, PELLEGRINI *et al.*, 2011, RADHAKRISHNAN *et al.*, 2009, RUIZ-MARTINEZ *et al.*, 1989, SUKONTASON *et al.*, 2003, 2007a, 2008a, 2008b, SZPILA & PAPE, 2008, SZPILA & VILLET, 2011, UBERO-PASCAL & PUIG, 2009, UBERO-PASCAL *et al.*, 2005, 2012, ŽDÁREK *et al.*, 1996) use the critical point drying technique or hexamethyldisilazane in the drying process. As hexamethyldisilazane achieves a faster and cheaper dryness than the critical point drying (ANDRADE, per.com.), this last one was not tested. In fact, we found that hexamethyldisilazane produces a strong drying of the samples, and these wrinkle too much (eggs and maggots in Pv1, Pv2, Pv3, Pv4 and Pv5, Figs. 1A-E and 3). Because of that, it was tried to leave samples at room temperature on a blotting paper, protected against any contamination (pupae and empty puparia in Pv1, Pv6 and Pv7, Figs. 1F, 2A-C, 4 and 5). As it can be seen when comparing the images through the different methods of drying, this is the most appropriate drying option, as samples wrinkle less, it is faster and it is also cheaper.

Apart from these general assessments, they were also some specific appreciations done for each specific stages of development of *C. vicina*.

## EGGS

Because of its small size (2 mm in length), the diagnostic structures of the eggs are very difficult to assess through optical microscopy. This makes

SEM techniques particularly useful in describing features of diagnostic value in fly eggs (MARTINS MENDONÇA *et al.*, 2008) and it is therefore interesting to find an easy preparation protocol that allows us to appreciate them.

The egg samples wrinkle in excess during the drying process, because during the dehydration steps the embryo may shrink and the chorion get separated from it. Therefore, to see the egg form it is preferable to see them under a low vacuum microscope in which dehydration steps are not necessary. (Figs. 2D-F). Also, an advantage of this method is that in the early stages of observation the different parts of the egg preserve its shape and size, being possible to make real measurements that can't be done on eggs that have been fixed and/or dehydrated.

However, although under the low vacuum scanning electron microscope structures wrinkled less, the lack of contrast was very high and it was very difficult to focus the image at high magnification and to appreciate the details of the islands in the median area (Fig. 2F), important diagnostic characteristics. In addition, after some time, the samples began to deform as a result of the near environmental vacuum pressure and probably due to an overheating under the beam.

If a low vacuum microscope is not available or specific details are needed to be seen, the best analyzed option is the high vacuum SEM using 2 hours of glutaraldehyde fixation and air drying on a blotting paper (Pv7, Figs. 2A-C). This protocol gives enough image contrast without excessive crystallization of the structures, allowing us to see even the holes in the islands (Fig. 2C).

For instance, the use of an environmental microscope in which the samples will not suffer as they would be at atmospheric pressure is not advised, because the eggs could be heated under the beam even if a thermo-ionic gun is used. A good implementation to the low vacuum microscope would be a cryogenic plate, which should maintain the egg's structure without an increase of the temperature.

## MAGGOTS

The immature stages of most Dipteran families remain poorly understood. Although previous research report the presence of 5-7 papillae in the anterior spiracle (SZPILA, 2010), we observe specimens with 8 natural openings surrounded by the papillae in these spiracles (Fig. 3B). Scavengers are very significant in forensic entomology, being calliphorids the most important in terms of utility (PÉREZ-MORENO *et al.*, 2006). Therefore, more detailed research involving other populations of these worldwide distributed species are already needed. This makes of special interest the development of an appropriate protocol for the preparation of these samples for SEM, being also able to extrapolate the results to other species.

When observing maggots, there is not much difference between the crystallization occurring after 4 hours of glutaraldehyde (Pv 6, Figs. 4A-B) and 2 hours of glutaraldehyde (Pv7, Figs. 4C-F). Both protocols use air drying on blotting paper and as the last one is faster, we consider it the appropriate protocol for the forensic study of such samples.

#### PUPAE AND EMPTY PUPARIA

The use of pupae or empty puparia in forensic entomology is still problematic, since accurate identification of the species is necessary, and the similarities between pupae of different species complicate the process (SUKONTASON *et al.*, 2007b). Therefore, an adequate protocol to characterize pupae and empty puparia by SEM and to identify them properly, is already needed.

Pupae and empty puparia just need to be cleaned by ultrasounds and air dried (Pv1, Figs. 5A-D) as these kind of samples have hardened structures, and without fixation in glutaraldehyde we can get good contrasted images. Thus, wrinkles on the structure are not formed and we avoid artefacts introduced when using glutaraldehyde. Besides, this protocol is easy and fast.

#### ADULTS

In the case of adults, being able to characterize by SEM the genitalia of flies is of interest as it gives indubitable structural information that can be applied in taxonomy (CHAIWONG *et al.*, 2008).

Adult genitalia have also hard structures. Because of that reason, the ideal option is an ultrasonic cleaning followed by air drying on a blotting paper. (Pv1, Figs. 5E-G). As mentioned previously, it is a fast and simple protocol and gives images with a good quality, enough contrast, and lack of artefact introduction.

To summarize all the assessments done in this work, table 2 gives easy clues to select the adequate protocol for the examination of each stage of development, focused on *C. vicina*, through SEM, namely, eggs, maggots, pupae and empty puparia, and adults.

In conclusion, the results here obtained may provide a point of reference for future ultramorphological blowfly analysis, as a tool for the insect identification at any stage of development and even from partial remains.

### CONCLUSIONS

When preparing samples for SEM, it is advisable to boil them for 1 minute (eggs and maggots), make an ultrasonic cleaning and use containers with flat surfaces.

In prolonged times of glutaraldehyde, it crystallizes under SEM producing unwanted artefacts. In low times we lose contrast, making it impossible to observe certain details. In the specific case of crystallization by glutaraldehyde resulting in artefacts that avoid the recognition of specific structures, one could choose to sacrifice image quality and try to see the structure without glutaraldehyde fixation (Pv1), a less contrasted protocol but without crystallization.

As glutaraldehyde gives enough image contrast we recommend not using osmium tetroxide, taking into account the toxicity, the difficulty of handling osmium tetroxide and the artefacts that could enter the image.

We consider not necessary the use of critical point drying, as hexamethyldisilazane achieves a faster and cheaper dryness. In fact, it was determined that the most appropriate option is to dry the samples at room temperature on a blotting paper and protected against any contamination.

To see the eggs shape, it is preferable to use a low vacuum microscope. If this is not available or specific details are needed to be seen, the best analyzed option is the high vacuum SEM using 2 hours of glutaraldehyde fixation and air drying on a blotting paper (Pv7).

We consider that the proper protocol for observing maggots would be 2 hours of glutaraldehyde immersion (Pv7). Although there is not much difference between the crystallization occurring after 4 hours in glutaraldehyde (Pv6), the first one is faster, making it the appropriate protocol for the forensic study of such samples.

Pupae, empty puparia and adults have the ideal protocol in just an ultrasonic cleaning and the air drying on a blotting paper (Pv1) due to their hard structures.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the UPV/EHU «Electronic Microscopy and Material Microanalysis service» (SGIker) installed in the Faculty of Science and Technology, for the use of the scanning electron microscope, the UPV/EHU «Analytical and High resolution Microscopy in Biomedicine service» (SGIker) installed in the Faculty of Medicine, for the use of the low vacuum scanning electron microscope, and Dr. Ricardo Andrade Pocino for his technical support.

## REFERENCES

1. ADAMS ZJO, HALL MJR. 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.

2. AMENDT J, CAMPOBASSO CP, GAUDRY E, REITER C, LEBLANC HN, HALL MJR. Best practice in forensic entomology-standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine* 2007, 121:90-104.
3. 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.
4. ASPOAS BR. Comparative micromorphology of third instar larvae and the breeding biology of some Afrotropical *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae). *Medical and Veterinary Entomology* 1991, 5:437-445.
5. BONACCI T, VERCILLO V, BRANDMAYR P, FONTI A, TERSARUOLO C, BRANDMAYR TZ. A case of *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Calliphoridae) breeding in a human corpse in Calabria (southern Italy). *Legal Medicine* 2009, 11:30-32.
6. BYRD JH, CASTNER JL. Insects of forensic importance. In: *Forensic Entomology. The utility of Arthropods in Legal Investigation*. BYRD JH, CASTNER JL, editors. pp 43-79. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, DC. 2010.
7. CARLES-TOLRÁ H, JORTH-ANDERSEN M. Dípteros. In: *Curso práctico de Entomología*. BARRIENTOS JA, editor. pp: 657-682. Asociación Española de Entomología, CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad), Alicante, Universitat Aut6noma de Barcelona, Bellaterra. 2004.
8. CHAIWONG T, SUKONTASON K, OLSON JK, KURAHASI H, CHAITHONG U, SUKONTASON KL. Fine structure of the reproductive system of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): the external sexual organ. *Parasitological research* 2008, 102:973-980.
9. CHEN L, FADAMIRO HY. Antennal sensilla of the decapitating phorid fly, *Pseudacteon tricuspis* (Diptera: Phoridae). *Micron* 2008, 39:517-525.
10. GARCÍA-ROJO AM. 2004. Estudio de la sucesi3n de insectos en cadáveres en Alcalá de Henares (Comunidad Aut6noma de Madrid) utilizando cerdos dom6sticos como modelos animales. *Boletín de la S.E.A.* 34:263-269.
11. GOLDSTEIN J, NEWBURY D, JOY D, LYMAN C, ECHLIN P, LIFSHIN E, SAWYER L, MICHAEL J. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York: Springer. 2003.
12. G3MEZ-G3MEZ A, MARTÍN-VEGA D, BOTÍAS-TALAMANTES C, BAZ-RAMOS A, DÍAZ-ARANDA LM. La Entomología Forense en España: pasado, presente y perspectivas de futuro. *Cuadernos de Medicina Forense* 2007, 13(47):21-32.
13. GONZÁLEZ-MORA D. Los Calliphoridae de España II: Calliphorini (Diptera). *Eos* 1989, 65(1):39-59.
14. GREENBERG B. *Flies and disease, Vol. 1. Ecology, classification and biotic associations*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1971.
15. HWANG C, TURNER BD. Spatial and temporal variability of necrophagous Diptera from urban to rural areas, *Medical and Veterinary Entomology* 2005, 19:379-391.
16. IRELAND S, TURNER B. The effects of crowding and foodtype on the size and development of *Calliphora vicina*, *Forensic Science International* 2006, 159:175-181.

17. KANESHRAJAH G, TURNER B. 2004. *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. *International Journal of Legal Medicine* 118:242-244.
18. LORD WD. Case histories of the use of insects in investigations. In: *Entomology and Death, a Procedural Guide*. Catts EP, Haskell NH editors. pp 9-37. Joyce's Print Shop, Inc., Clemson, South Carolina. 1990.
19. MARTINS MENDONÇA P, DOS SANTOS-MALLET JR, DE CARVALHO QUEIROZ MM. Ultramorphological Characteristics of Immature Stages of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera: Calliphoridae), a Fly Species of Forensic Importance. *Microscopy Research and Technique* 2010, 73:779-784.
20. MARTINS MENDONÇA P, DOS SANTOS-MALLET JR, PINTO DE MELLO R, GOMES L, DE CARVALHO QUEIROZ MM. Identification of fly eggs using scanning electron microscopy for forensic investigations. *Micron* 2008, 39:802-807.
21. PELLEGRINI A, BIGLIARDI E, BECHI N, PAULESU L, LEHANE MJ, AVANZATI AM. Fine structure of the female reproductive system in a viviparous insect, *Glossina morsitans morsitans* (Diptera, Glossinidae). *Tissue cell* 2011, 43:1-7.
22. PÉREZ-MORENO S, MARCOS-GARCÍA MA, ROJO S. Comparative morphology of early stages of two Mediterranean *Sarcophaga* Meigen, 1826 (Diptera, Sarcophagidae) and a review of the feeding habits of Palaearctic species. *Micron* 2006. 37:169-179.
23. PERIS SV. Claves generales. In: *Curso práctico de Entomología*. BARRIENTOS JA, editor. pp 147-165. Asociación Española de Entomología, CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad) Alicante, and Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra. 2004.
24. RADHAKRISHNAN P, MARCHINI D, TAYLOR PW. Ultrastructure of male reproductive accessory glands and ejaculatory duct in the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Arthropod structure and development* 2009, 38:216-226.
25. REIBE S, MADEA B. How promptly do blowflies colonise carcasses? A study comparing indoor with outdoor locations. *Forensic Science International* 2010, 195:52-57.
26. ROGNES K. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* 1991, 24:1-227.
27. RUIZ-MARTÍNEZ I, SOLER-CRUZ MD, BENÍTEZ-RODRÍGUEZ R, DÍAZ LÓPEZ M, PÉREZ-JIMÉNEZ JM. Preparation of dipteran larvae for scanning electron microscopy with special reference to myiasigen dipteran species. *Scanning Microscopy* 1989, 3(1):387-390.
28. SOLER CRUZ MD. El estudio de las miasis en España durante los últimos cien años. *Ars Pharm* 2000, 41(1):19-26.
29. SUKONTASON KL, KANCHAI C, PIANGJAI S, BOONSRIWONG W, BUNCHU N, SRIPAKDEE D, CHAIWONG T, KUNTALUE B, SIRIWATTANARUNGSEE S, SUKONTASON K. Morphological observation of puparia of *Chrysomya nigripes* (Diptera: Calliphoridae) from human corpse. *Forensic Science International* 2006a, 161:15-19.



30. SUKONTASON K, METHANITIKORN R, CHAIWONG T, KURAHASHI H, VOGTSBERGER RC, SUKONTASON KL. Sensilla of the antenna and palp of *Hydrotaea chalcogaster* (Diptera: Muscidae). *Micron* 2007a, 38:218-223.
31. SUKONTASON K, METHANITIKORN R, KURAHASHI H, VOGTSBERGER RC, SUKONTASON KL. External morphology of *Chrysomya pinguis* (Walker) (Diptera: Calliphoridae) revealed by scanning electron microscopy. *Micron* 2008a, 39:190-197.
32. SUKONTASON KL, NARONGCHAI P, KANCHAI C, VICHAIKAT K, PIANGJAI S, BOONSRIWONG W, BUNCHU N, SRIPAKDEE D, CHAIWONG T, KUNTALUE B, SIRIWAT-TANARUNGSEE S, SUKONTASON K. Morphological comparison between *Chrysomya rufifacies* (Macquart) and *Chrysomya villeneuvei* Patton (Diptera: Calliphoridae) puparia, forensically important blow flies. *Forensic Science International* 2006b, 164:230-234.
33. SUKONTASON KL, NGERN-KLUN R, SRIPAKDEE D, SUKONTASON K. Identifying fly puparia by clearing technique: application to forensic entomology. *Parasitology Research* 2007b, 101:1407-1416.
34. SUKONTASON KL, PIANGJAI S, BOONSRIWONG W, BUNCHU N, NGERN-KLUN R, VOGTSBERGER RC, SUKONTASON K. Observations of the third instar larva and puparium of *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *Parasitology Research* 2006c, 99:669-674.
35. SUKONTASON KL, PIANGJAI S, BUNCHU N, CHAIWONG T, SRIPAKDEE D, BOONSRIWONG W, VOGTSBERGER RC, SUKONTASON K. Surface ultrastructure of the puparia of the blow fly, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), and flesh fly, *Liosarcophaga dux* (Diptera: Sarcophagidae). *Parasitology Research* 2006d, 98(5):482-487.
36. SUKONTASON KL, SRIBANDITMONGKOL P, CHAIWONG T, VOGTSBERGER RC, PIANGJAI S, SUKONTASON K. Morphology of immature stages of *Hemipyrellia ligurians* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) for use in forensic entomology applications. *Parasitology Research* 2008b, 103:877-887.
37. SUKONTASON K, SUKONTASON KL, PIANGJAI S, BOONCHU N, CHAIWONG T, NGERN-KLUN R, SRIPAKDEE D, VOGTSBERGER RC, OLSON JK. Antennal sensilla of some forensically important flies in families Calliphoridae, Sarcophagidae and Muscidae. *Micron* 2004, 35:671-679.
38. SUKONTASON K, SUKONTASON KL, PIANGJAI S, CHAIWONG T, BOONCHU N, KURAHASHI H, VOGTSBERGER RC. Larval ultrastructure of *Parasarcophaga dux* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae). *Micron* 2003, 34:359-364.
39. SZPILA K. Key for the Identification of Third Instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance. In Amendt J, Goff ML, Campobasso CP, Grassberger M. *Current Concepts of Forensic Entomology*. 3, pp 43-56. Springer Verlag Ed. 2010.
40. SZPILA K, PAPE T. Morphological diversity of first instar larvae in *Miltogramma* subgenus *Pediasomyia* (Diptera: Sarcophagidae, Miltogramminae). *Zoologischer Anzeiger* 2008, 247:259-273.
41. SZPILA K, VILLET MH. Morphology and Identification of First Instars of African Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) Commonly of Forensic Importance. *Journal of Medical Entomology* 2011, 48(4):738-752.

42. UBERO-PASCAL N, FORTUÑO JM, PUIG MA. New Application of Air-Drying Techniques for Studying Ephemeroptera and Plecoptera Eggs by Scanning Electron Microscopy. *Microscopy Research and Technique* 2005, 68:264-271.
43. UBERO-PASCAL N, PUIG MA. New type of egg attachment structure in Ephemeroptera and comparative analysis of chorion structure morphology in three species of EphemereIIDae. *Acta Zool-Stockholm* 2009, 90:87-98.
44. UBERO-PASCAL N, LÓPEZ ESCAPLEZ R GARCÍA MD ARNALDOS MI Morphology of preimaginal stages of *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Calliphoridae): A comparative study. *Forensic Science International* 2012, 219: 228-243.
45. WELLS JD, LAMOTTE LR. Estimating the postmortem interval. In: *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. Byrd JH, Castner JL, editors. pp 263-285. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, DC. 2001.
46. ŽĐÁREK J, WEYDA F, CHIMTAWI MB, DENLINGER DL. Functional morphology and anatomy of the polypneustic lobes of the last larval instar of tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *International Journal of Insect Morphology* 1996, 25(3):235-248.

**TABLES**

**Table 1.** Protocols developed for the study. Abbreviations: **Pv:** protocol version, **Sal. Sol.:** saline solution NaCl (0,9 %), **Glutar.:** glutaraldehyde, **PBS:** phosphate buffer solution pH 7.4, **EtOH:** ethanol, **E:** eggs, **M:** maggots, **PP:** pupae, **P0:** empty puparia, **A:** adults, **h:** hours, **Hexameth.:** hexamethyldisilazane, **AD/BP:** air drying on blotting paper.

|            | BOIL    | CLEANING                       |               | FIXATION | CLEANING | DEHYDRATIONS   |             | DRYING                                   |
|------------|---------|--------------------------------|---------------|----------|----------|--|-------------|--|
|            | E and M | Ultra-sounds                   | Sal. Sol.     | Glutar.  | PBS      | EtOH   | Acetone 80% |  |
| <b>Pv1</b> | 1'      | 6-7' in EtOH 70% (M, EtOH 80%) | -             | -        | -        | E, M → 70%, 80%, 90%, 2·100% 12h in each step<br>PP, P0, A → - | E, M 2·12h  | E, M → Hexameth. 2·10' PP, P0, A → AD/BP |
| <b>Pv2</b> | 1'      | 6-7' in PBS                    | several times | 24h      | twice    | 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 2·100% 12h in each step               | 2·12h       | Hexameth. 2·10'                          |
| <b>Pv3</b> | 1'      | 6-7' in PBS                    | several times | 12h      | twice    | 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 2·100% 6h in each step                | 2·6h        | Hexameth. 2·10'                          |
| <b>Pv4</b> | 1'      | 6-7' in PBS                    | several times | 6h       | twice    | 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 2·100% 3h in each step                | 2·3h        | Hexameth. 2·10'                          |
| <b>Pv5</b> | 1'      | 6-7' in PBS                    | several times | 10'      | twice    | 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 2·100% 10' in each step               | 2·10'       | Hexameth. 2·10'                          |
| <b>Pv6</b> | 1'      | 6-7' in PBS                    | several times | 4h       | twice    | 30%, 50%, 70%, (M, 80%) 2h in each step                        | -           | AD/BP                                    |
| <b>Pv7</b> | 1'      | 6-7' in PBS                    | several times | 2h       | twice    | 30%, 50%, 70%, (M, 80%) 1h in each step                        | -           | AD/BP                                    |

**Table 2.** Adequate protocols for the examination of each instar through SEM.  
Abbreviations: **EtOH:** ethanol, **h:** hour, **AD:** air drying, **BP:** blotting paper.

|              |                 | EGGS                             | MAGGOTS                               | PUPAE AND EMPTY PUPARIA | ADULTS           |
|--------------|-----------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|------------------|
| Boil         |                 | 1'                               | 1'                                    | -                       | -                |
| Cleaning     | Ultra-sounds    | 6-7' in PBS                      | 6-7' in PBS                           | 6-7' in EtOH 70%        | 6-7' in EtOH 70% |
|              | Saline Solution | several times                    | several times                         | -                       | -                |
| Fixation     | Glutaral-dehyde | 2h                               | 2h                                    | -                       | -                |
| Cleaning     | PBS             | twice                            | twice                                 | -                       | -                |
| Dehydrations | EtOH            | 30%, 50%, 70%<br>1h in each step | 30%, 50%, 70%, 80%<br>1h in each step | -                       | -                |
|              | Acetone 80%     | -                                | -                                     | -                       | -                |
| Drying       |                 | AD/BP                            | AD/BP                                 | AD/BP                   | AD/BP            |

## **PROTOPHORMIA TERRAENOVAE (ROBINEAU-DESVOIDY, 1830) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) A NEW FORENSIC INDICATOR TO SOUTH-WESTERN EUROPE**

ANABEL MARTÍNEZ-SÁNCHEZ<sup>1</sup>  
CONCEPCIÓN MAGAÑA<sup>2</sup>  
MARTIN TONIOLO  
PAOLA GOBBI  
SANTOS ROJO

**Abstract:** *Protophormia terraenovae* larvae are found frequently on corpses in central and northern Europe but are scarce in the Mediterranean area. We present the first case in the Iberian Peninsula where *P. terraenovae* was captured during autopsies in Madrid (Spain). In the corpse other necrophagous flies were found, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps* and *Sarcophaga argyrostoma*. To calculate the *postmortem* interval, the life cycle of *P. terraenovae* was studied at constant temperature, room laboratory and natural fluctuating conditions. The total developmental time was  $16.61 \pm 0.09$  days,  $16.75 \pm 4.99$  days in the two first cases. In natural conditions, developmental time varied between  $31.22 \pm 0.07$  days (average temperature:  $15.6^\circ\text{C}$ ),  $15.58 \pm 0.08$  days (average temperature:  $21.5^\circ\text{C}$ ) and  $14.9 \pm 0.10$  days (average temperature:  $23.5^\circ\text{C}$ ). Forensic importance and the implications of other necrophagous Diptera presence is also discussed.

**Key words:** Calliphoridae, forensic entomology, accumulated degrees days, fluctuating temperatures, competition, *postmortem* interval, Spain.

**Resumen:** Las larvas de *Protophormia terraenovae* se encuentran con frecuencia asociadas a cadáveres en el centro y norte de Europa pero son raras en el área Mediterránea. Presentamos el primer caso en la Península Ibérica don-

---

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Ambientales/Instituto Universitario CIBIO-Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. Universidad de Alicante, Apdo. 99. E-03080 Alicante, Spain.

<sup>2</sup> Laboratorio de Antropología Forense. Instituto Anatómico Forense de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid, Spain. E-mail: anabel.martinez@ua.es

de se han recolectado larvas de *P. terraenovae* en autopsias efectuadas en Madrid (Spain). Otras especies necrófagas fueron recolectadas del cadáver, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps* y *Sarcophaga argyrostoma*. Para estimar el intervalo *postmortem*, se estudió el ciclo biológico de *P. terraenovae* a temperatura constante, en condiciones de laboratorio y bajo condiciones naturales variables. El tiempo total de desarrollo fue  $16.61 \pm 0.09$  días,  $16.75 \pm 4.99$  días para los dos primeros casos. En condiciones naturales, el tiempo total de desarrollo varió entre  $31.22 \pm 0.07$  días (temperatura media:  $15.6^\circ\text{C}$ ),  $15.58 \pm 0.08$  días (temperatura media:  $21.5^\circ\text{C}$ ) y  $14.9 \pm 0.10$  días (temperatura media:  $23.5^\circ\text{C}$ ). Se discuten tanto la importancia forense como las implicaciones de otros dípteros necrófagos presentes en el estudio.

**Palabras clave:** Calliphoridae, entomología forense, grados día acumulados, temperaturas variables, competición, intervalo *postmortem*, España.

## 1. INTRODUCTION

Two species of the genus *Protophormia* are present in Europe but only *Protophormia terraenovae* (ROBINEAU-DESVOIDY, 1830) is found in the Iberian Peninsula (ROGNES, 1991). *Protophormia terraenovae* is generally described as a cold climate blowfly, which can be found from boreal to subtropical habitats in all Holarctic regions, but it has become established in other continents. Indeed, in 1999 it was reported for the first time in South America (MARILUIS, 1999). In Europe, it is common in northern and central countries (BENECKE, 1998, GRASSBERGER & FRANK, 2004). In the Mediterranean countries, records of this species are very scarce. In Italy, it has been reported from human corpses (INTRONA *et al.*, 1998). In Portugal, it has been captured on pig carrion (ARNALDOS *et al.*, 2006). In Spain, *P. terraenovae* was last recorded in 1958 from the Pyrenees mountains (Viella, Spain) (GONZÁLEZ-MORA & PERIS, 1988) and has been absent in recent studies on sarcosaprophagous communities (CASTILLO, 2002, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003, ARNALDOS *et al.*, 2006) and forensic reports from the Iberian Peninsula.

This species has been used as entomological evidence in criminal investigations to determine the postmortem interval and it is also a serious parasite of cattle, sheep and some wild mammals (JAMES, 1947, INTRONA *et al.*, 1998, MARCHENKO, 2001). Despite many aspects of its development time having been studied in Europe (GRASSBERGER & REITER, 2002) some parameters could vary considering different geographical areas (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Blowfly species do not display the same growth rates as seen in other geographic zones, and therefore, research should be undertaken on the same species in different regions.

An option to utilize *P. terraenovae* as forensic indicator may be considered the use of isomorphen and isomegalen diagrams to determine minimum development time (GRASSBERGER & REITER, 2001, 2002) or to calcu-

late the accumulated degrees days (ADD). These methods imply that development under fluctuating temperatures corresponds to the development under the resulting mean daily temperature (HIGLEY & HASKELL, 2001), but they can be used readily to determine the development stage of any located species when development occurs at constant temperatures. Clarkson and collaborators (CLARKSON *et al.*, 2004) raised *P. terraenovae* under outdoor fluctuating temperatures, and compared the development at a mean constant temperature of 20°C. Recently, development of larvae of different forensically important flies under constant temperatures and under daily fluctuating temperatures in climatic chamber has been investigated and compared (NIEDEREGGER *et al.*, 2010). Nonetheless, studies on which development under both constant and fluctuating temperatures are not frequent.

In this study, the first case of *P. terraenovae* from a human corpse in Spain is reported. In addition, the survival of this species was studied, analysing different ambient conditions and competition with other necrophagous species. Firstly, experiments were carried out to obtain biological data about the rate of development of *P. terraenovae* under controlled and outdoor conditions and considerations about their influence on postmortem interval (PMI) estimation. Secondly, data about interaction with necrophagous species is analysed. So, *Calliphora vicina* ROBINEAU-DESVOIDY, 1830 shows biological similarities with *P. terraenovae*; both species are original from Holarctic region but have widespread to other regions during the last years, both are abundant in the diptera sarcosaprophagous community, and both are forensic indicators in corpses; moreover both show annual activity peaks in cold months, so they could be found at corpses at the same time.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### CASE REPORT

On 12<sup>th</sup> June 2005, a man and a woman (70 and 75 years old, respectively) were found dead at home, in a central flat of Madrid city, Spain (40.24° N, 3.41° W). The two corpses were found in a room, apparently in a state of natural death. The man was lying on the bed and the woman was sitting in a chair in front of the bed. The authorities were advised and the corpses were taken to the Forensic Anatomy Institute of Madrid where autopsies were carried out on 13<sup>th</sup> June. The man corpse exhibited colliquative necrosis or black putrefaction, while the woman corpse presented the emphysematous or putrefaction stage. Forensic entomology was not routinely used on scene at that time; therefore no entomological evidence was collected there. Outdoor temperatures were registered from 12 June until the death date estimated by the pathologist (30 May), the maximum being 35.5°C and the minimum 15°C; average indoor temperatures were estimated at 24-26°C. Entomological evidence was collected during autopsies and

specimens preserved by immersing in hot water and storage in 70% ethanol. The specimens were identified (VELÁSQUEZ *et al.*, 2010) and compared with the immature collection of the University of Alicante (CEUA-Entomological Collection of University of Alicante). Isomorphen diagrams and growth curves were used in order to estimate PMI (GRASSBERGER & REITER, 2001, 2002, GRASSBERGER *et al.*, 2003, DONOVAN *et al.*, 2006).

#### DEVELOPMENT AT CONSTANT AND FLUCTUATING TEMPERATURES

To study the life cycle of *P. terraenovae*, three rearing cages (40 x 40 x 40 cm) with about fifty specimens each, 25 males and 25 females, were placed under different temperature situations: at constant temperature i.e.: climatic chamber ( $T^a$   $25\pm 0.5^\circ\text{C}$ , RH  $50\pm 10\%$ ), at room temperature i.e.: lab-conditions ( $T^a$ max:  $26.34^\circ\text{C}$ ,  $T^a$ min:  $23.24^\circ\text{C}$ ,  $T^a$  average:  $24.94^\circ\text{C}$ ; RH max-min:  $63\%-19.6\%$ , RH average:  $44.17\%$ ) and at fluctuating conditions i.e.: outdoor conditions (see Table 1). All temperatures were recorded every hour by datalogger (HOBO). When adults emerged, fresh liver was introduced into the cages to enable them to mature and to start laying eggs during their first 96 hours. Minimal developmental times for eggs and larva stages during at least three generations were recorded from the first specimen found. To obtain the minimal period in pupation, the 50 first prepupae were individualised and recorded as average and standard errors. Pupal survival rates in three generations in climatic chamber and outdoor conditions were calculated from the first 50 prepupae collected. From these experiments, temperature and minimum period to adult was used to determine the degree-days (DD) or thermal constant ( $K$ ) in constant conditions (GREENBERG & KUNICH 2002).  $K$  was calculated from the equation  $K=y(t-t_l)$ , where  $y$  is the developmental time (days),  $t$  is the rearing temperature ( $^\circ\text{C}$ ) and  $t_l$  is the lower threshold temperature ( $^\circ\text{C}$ ). Calculations with an inappropriate base temperature ( $t_l$ ) will overestimate the DD, and so the forensic entomologist may give a false postmortem interval. So, base temperatures for common dipteran species may have to be predetermined or based on geographical proximity (GENNARD, 2007). Based on the unknown-origin of our colony of *P. terraenovae* (fish bait bought in Spain), we decided to calculate the DD with minimal temperature values reported for this species [ $t_l=10^\circ\text{C}$  (HIGLEY & HASKELL, 2001, USA),  $8.95^\circ\text{C}$  (GRASSBERGER & REITER, 2002, Europe), and  $7.8^\circ\text{C}$  (MARCHENKO, 2001, Russia)].

#### INTERSPECIFIC COMPETITION

Newly enclosed first stage larvae ( $\pm$  2h old) of *P. terraenovae* (fish-bait origin) and *C. vicina* (Alicante origin) were obtained from laboratory cultures maintained at the University of Alicante (Spain). Larvae were maintained in a controlled room with a temperature of  $23\pm 5^\circ\text{C}$  and relative humidity of  $60\pm 5\%$ . Single species groups or pure cultures of 50, 100, 200 and 400 newly hatched larvae were placed in 20 ml glass vials containing 15 g of pig liver. In



the case of mixed cultures, initial densities of larvae were 25 larvae *P. terraenovae* plus 25 larvae of *C. vicina*, 50 plus 50, 100 plus 100, and 200 plus 200, with the same methodology as in pure cultures. Every vial was then placed in a plastic pot (568 ml) containing a 1 cm layer of sawdust in which wandering larvae could pupariate. Pots were sealed with a fine mesh cover and maintained in the same conditions as the colonies. All pots were checked every day and each density was replicated three times, except 50 larvae density where there were five replicates. Time to the first pupa and adult was noted; dead pupae and adult flies were counted and sexed. Once all individuals had emerged, an index of the size (measurement of the vein dm-cu right wing using a binocular microscope fitted with an eyepiece reticule) of all individuals from each replicate was recorded as a measure of the effect of larval competition (SMITH & WALL, 1997). To determine the possible differences in the size of individuals and in mortality rates, parametric tests were used, ANOVA in the case of multiple samples and t-test for comparison of two samples, because data were normal and homogeneity of variances. In the cases where assumptions of normality did not meet, nonparametric test U Mann-Whitney was used. When P value greater than 0.05 were discriminated. We used the statistical application SPSS.

### 3. RESULTS

#### CASE REPORT

Larvae and pupae of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) and adults of Histeridae (Coleoptera) were recovered from corpses. A single pupa of *P. terraenovae* was identified by its typical anal papillae, strongly developed with a mixture of spines monocuspid, bicuspid and multicuspid (VELÁSQUEZ *et al.*, 2010). This is the first time that this species is recorded from human corpses in the Iberian Peninsula. In the corpse of the man, close to *P. terraenovae*, pupae of *Lucilia sericata* (MEIGEN, 1826), mature larvae of *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1819) and second and third instar larvae of *Sarcophaga argyrostoma* (ROBINEAU-DESVOIDY, 1830) were recovered. In the corpse of the woman, mature larvae of *L. sericata*, *C. vicina* and *S. argyrostoma* were obtained.

To calculate PMI, pupae of *L. sericata* and *P. terraenovae* were used in the case of the man. Time from oviposition to pupation, the isomorphen diagram for *P. terraenovae* and *L. sericata* gave 10 days and 8 days respectively at 24°C. In the case of the woman, larvae of *L. sericata* and *C. vicina* were measured (both 1.4 mm) as well as larvae of *S. argyrostoma* (1.8 mm), the last one most abundant in the sample. These values were plotted against time for 24-26°C in growth curves. So, maximum time from hatching to reach this length was 4 days for *L. sericata*, ~3 for *C. vicina* and ~2 for *S. argyrostoma*. These results are compatible to postmortem minimal data calculated by the pathologist, 12 days for the man (30 May) and 5 days (6 June) for the woman.

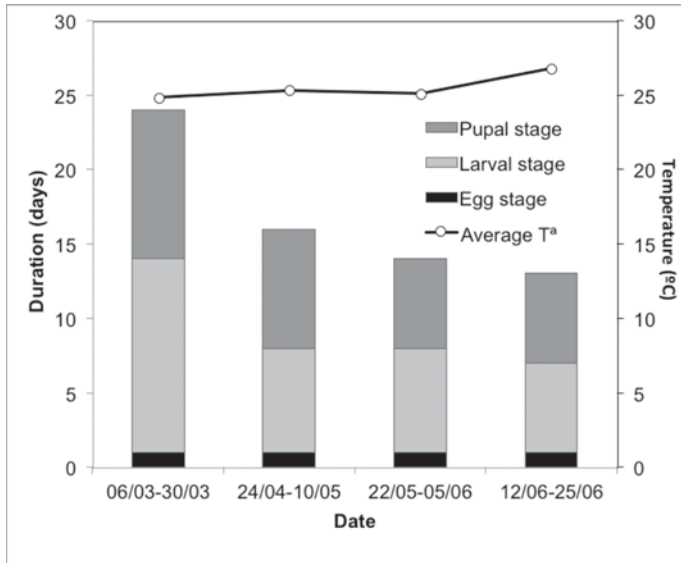
INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE DEVELOPMENT

Under constant temperature conditions the complete life cycle of *P. terraenovae* took  $16.61 \pm 0.09$  days, with the period as larvae  $8.33 \pm 0.04$  and pupae  $7.27 \pm 0.08$  (Table 1). Transformation into DD results in 249.15 with a lower threshold temperature of  $10^\circ\text{C}$  and 266.6 degrees-days with a lower threshold temperature of  $8.95^\circ\text{C}$ . In lab conditions the average total immature period was  $16.75 \pm 4.99$  days, but this varied according to the four generations studied (Fig. 1). Larval period was  $8.25 \pm 3.20$  days, more variable than pupal period,  $7.50 \pm 1.91$  days. In external conditions with fluctuating temperature, the results are different for each generation; the first generation (F1) shows a complete development time of  $31.22 \pm 0.07$  days (average temperature  $15.6^\circ\text{C}$ ) (Table 1). After that and probably related to an increase in outdoor temperatures (average temperature  $21.5^\circ\text{C}$ ), duration decreases considerably down to  $15.58 \pm 0.08$  days for the second generation (F2) and keeps decreasing in the third generation (F3) to  $14.9 \pm 0.10$  days (average temperature  $23.5^\circ\text{C}$ ) (Table 1). The larvae stage required a maximum of 20 days and pupa 10.22 days during F1 (end of April to early of May), and a minimum of 8 and 5.91 days in larva and pupa respectively, during F3 (June to early July) (Table 1). The egg-stage duration was one day in all cases, so this value was added to calculate the duration of the complete life cycle.

Comparing survival of *P. terraenovae* in constant conditions versus outdoor conditions, the percentage of emerged adults in the first case was 100%. However, important variations were observed in outdoor conditions, a 100% rate of survival was only obtained during F1, but during the next generations a decrease in the survival rate was noted related to the increase of temperatures (Table 1).

**Table 1:** Duration (average and error standard in days) and pupal survival rate of *P. terraenovae*.

| AMBIENT CONDITIONS  | LARVAL PERIOD   | PUPAL PERIOD     | TOTAL PERIOD     | Survival |
|---|-----------------|------------------|------------------|----------|
|   | X±SD            | X±SD             | X±SD             |          |
| Climatic chamber (F1, F2, F3)<br>(T: $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) | $8.33 \pm 0.04$ | $7.27 \pm 0.08$  | $16.61 \pm 0.09$ | 100%     |
| Lab conditions (F1 to F4)<br>(Average T: $24.9^\circ\text{C}$ )   | $8.25 \pm 3.20$ | $7.50 \pm 1.91$  | $16.75 \pm 4.99$ | 100%     |
| Outdoor conditions (F1)<br>(Average T: $15.6^\circ\text{C}$ )     | 20              | $10.22 \pm 0.07$ | $31.22 \pm 0.07$ | 100%     |
| Outdoor conditions (F2)<br>(Average T: $21.5^\circ\text{C}$ )     | 8               | $6.58 \pm 0.08$  | $15.58 \pm 0.08$ | 72%      |
| Outdoor conditions (F3)<br>(Average T: $23.5^\circ\text{C}$ )     | 8               | $5.91 \pm 0.10$  | $14.9 \pm 0.10$  | 40%      |



**Figure 1:** Time of development in egg, larval and pupal stages in several generations of *P. terraenovae* under lab-conditions.

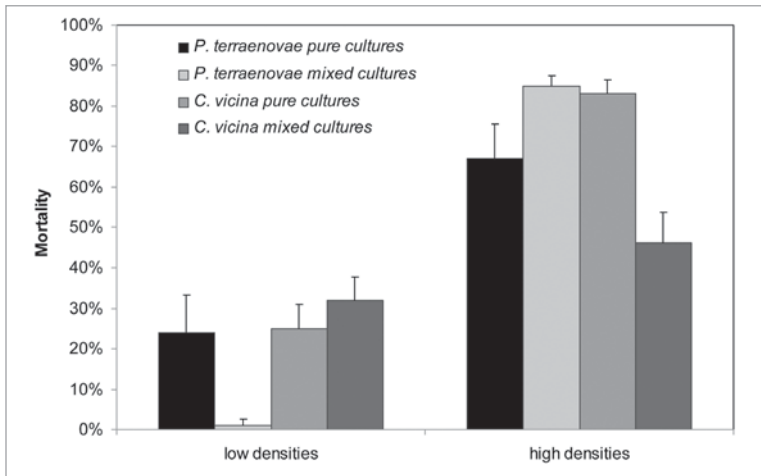
#### INTERSPECIFIC COMPETITION BETWEEN *P. TERRAENOVAE* AND *C. VICINA*

Mortality rate increased significantly with increasing initial density in both species and both types of cultures (pure: *P. terraenovae*:  $F_{3,24} = 42.99$ ; *C. vicina*:  $F_{3,24} = 69.36$  and mixed cultures: *P. terraenovae*:  $F_{2,9} = 610.34$ ; *C. vicina*:  $F_{3,12} = 9.25$ ) (Table 2). Comparing mixed and pure cultures for each species, differences in the mortality rate were observed in lower (50 and 100) and high densities (200 and 400) (Fig. 2). In *P. terraenovae* at low densities, mortality decreased significantly with the presence of *C. vicina* ( $t=3.35$ ). In *C. vicina* at high densities mortality decreased with the *P. terraenovae* presence ( $t = 5.46$ ). These results indicate different behaviour in each species: at high density *C. vicina* is a better competitor and *P. terraenovae* is worse. However at low density, *P. terraenovae* showed an interesting fact, a lower mortality rate in mixed cultures than in pure, contrary to *C. vicina*.

The wing size was analysed by sex separately because females were bigger than males in *C. vicina* (pure:  $F_{1,567}=13.27$ ; mixed:  $F_{1,604}=61.10$ ) and *P. terraenovae* (pure:  $F_{1,751}=40.42$ ; mixed:  $F_{1,358}=11.83$ ). In pure cultures, *P. terraenovae* (males:  $F_{3,393}=257.65$ ; females:  $F_{3,358}=227$ ) (Fig. 3) and *C. vicina* (males:  $F_{3,318}=352.53$ ; females:  $F_{3,249}=446.83$ ) (Fig. 4) showed significant reductions in the size of wing length with increasing density. In mixed cultures similar results were found. However, these differences were not sig-

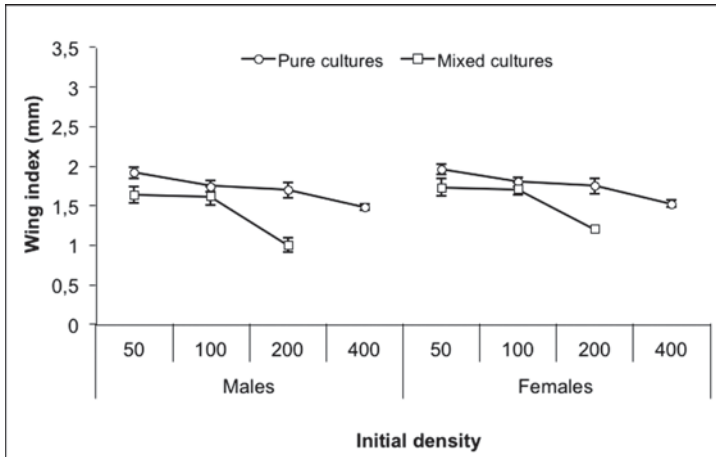
**Table 2:** Mortality rate (%) at initial density of 50, 100, 200 and 400 in pure and mixed cultures of *P. terraenovae* and *C. vicina*.

| INITIAL DENSITY | MORTALITY (%)             |                  |                           |                  |
|-----------------|---------------------------|------------------|---------------------------|------------------|
|                 | INTRASPECIFIC COMPETITION |                  | INTERSPECIFIC COMPETITION |                  |
|                 | <i>P. TERRAENOVAE</i>     | <i>C. VICINA</i> | <i>P. TERRAENOVAE</i>     | <i>C. VICINA</i> |
| 50              | 18.21 ± 10.58             | 9.33 ± 7.02      | 4.33 ± 2.31               | 30.67 ± 2.31     |
| 100             | 29.33 ± 8.08              | 41.33 ± 5.13     | 1.33 ± 1.15               | 34.00 ± 9.16     |
| 200             | 40.33 ± 16.53             | 76.67 ± 5.51     | 69.33 ± 5.13              | 35.67 ± 10.78    |
| 400             | 94.33 ± 0.57              | 91.33 ± 1.53     | 100.00 ± 0                | 57.00 ± 4.58     |

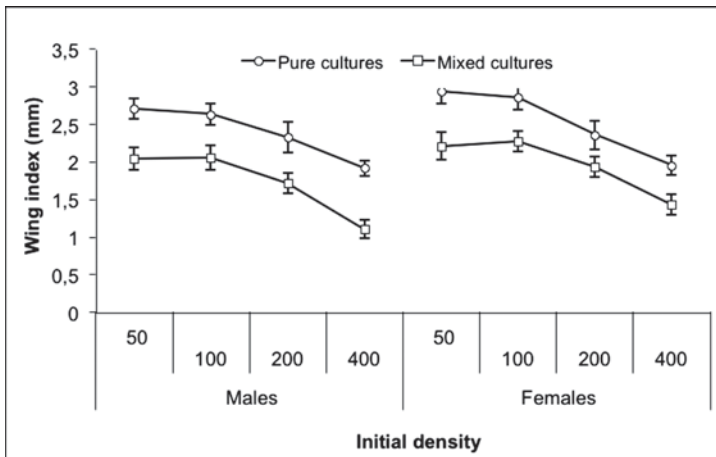


**Figure 2:** Mortality rate (%) at low densities (50, 100) and high densities (200, 400) in pure and mixed cultures of *P. terraenovae* and *C. vicina*.

nificant between the low density groups (50 and 100) and between the high density groups (200 and 400). In terms of reduced adult size, the data suggest increased levels of competition in mixed rather than in pure cultures of *P. terraenovae* (males  $U=13603.5$ ; females  $U=17217.5$ ). The same results were observed in wing sizes of *C. vicina* (males  $U=4585.5$ ; females  $U=8233.5$ ), with larger specimens of pure cultures. In the case of *P. terraenovae*, the effect of the presence of *C. vicina* crops is mainly reflected in densities of 200 (males  $t=39.27$ ; females  $t=38,14$ ), and it is obvious in densities of 400 (200 larvae of *C. vicina* and 200 larvae of *P. terraenovae*) where all the larvae died.



**Figure 3:** Wing-size index in males and females of *P. terraenovae* in pure and mixed cultures.



**Figure 4:** Wing-size index for males and females of *C. vicina* in pure and mixed cultures.

#### 4. DISCUSSION

It is known that *P. terraenovae* is one of the early invaders of carrion and is especially attracted to human cadavers (NUORTEVA, 1987) in north and central Holarctic regions. However, in South Europe, it was recorded for the first time on a human corpse during August in a rural area of southern Ita-

ly (INTRONA *et al.*, 1998). In Spain, this species has been previously reported from mountain areas (GONZÁLEZ-MORA & PERIS, 1988). In Alicante (SE, Spain) some specimens have also been captured in mountain areas (unpublished data). In north and central Europe, *P. terraenovae* is usually a synanthropic species (VILÁGIOVÁ & PEĚKO, 1994), which agrees with the presence of this species in the case here reported (urban area in Madrid city). This new report confirms its role as entomological evidence and its ecological plasticity. In fact, maximum temperatures for development of *P. terraenovae* are about 35°C (GREENBERG & TANTAWI, 1993, GRASSBERGER & REITER, 2002). However, in latest studies about blowflies in Andorra (Pyrenees mountain) (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2001) or other Iberian areas (SALOÑA-BORDAS *et al.*, 2009) its presence is at most rare. CARREÑO *et al.* (2009) propose that *P. terraenovae* is an imported blowflies species commercially available as asticot, so the presence of this species could be related to the use of different species of blowflies and fleshflies as live-bait for fish. This hypothesis might be confirmed by new research and by DNA analysis.

Larvae and adults of *P. terraenovae* are usually present together with other blowflies such as *Calliphora* species and *L. sericata* (GRASSBERGER & FRANK, 2004). In carrion, the food in corpses constitutes an important factor that limits the survival of flies, both intra and interspecific survival. Adaptations consist in the rapidity of larval growth and the ability to form viable pupae at a comparatively low final growth weight. But other species such as the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Ch. albiceps* have predatory habits and are therefore able to destroy competitors on the carcass (ULLYETT, 1950). The presence of *Ch. albiceps* in the reported case could explain the low number of *P. terraenovae*. Perhaps the absence of samples from the death scene could be the cause of this low number of specimens. However, unlike other blowflies, this species usually pupariates on the surface or very close to it, unless the corpse is very wet or exposed to bright light (NUORTEVA, 1987, BENECKE, 1998).

Entomological evidence was different within the two corpses, and probably indicated different PMI in both cases. While *P. terraenovae*, *L. sericata*, *Ch. albiceps* and *S. argyrostoma* were observed on the male corpse, only *L. sericata* and *S. argyrostoma* were collected from the female corpse. Usually, the presence of *Ch. albiceps* is posterior to primary species such as *L. sericata* (TANTAWI *et al.*, 1996, CASTILLO, 2002).

In the place where the corpses were found, temperatures were around 24-26°C. The minimal time for *P. terraenovae* to reach pupa is 10 days at 25°C, but for *L. sericata* pupae it is lower, 8 days (GRASSBERGER & REITER 2001). For this reason, the PMI calculated by the entomologist and pathologist was 12-10 days for the male corpse. For the female corpse, where the biggest larvae were *L. sericata*, the approximation was 4 days using the length of larvae and the development in days of the third stage (oviposition to peak feeding at 24°C) (GRASSBERGER & REITER, 2001), compatible with the estimation of the pathologist, 5 days, PMI 5-4 days. *Ch. albiceps* absence

in the woman's corpse and the more advanced development in specimens from the man, confirmed that the man died before the woman.

GRASSBERGER & REITER (2002) indicate that when temperature is variable, an age range can be estimated in an isomorphen diagram with the maximum and minimum temperature recorded in the rearing place. In *P. terraenovae*, development rates differ between authors and latitudes, but it is generally recognised that larval development starts at 10°C, increases linearly between 15-30°C and then decreases (SMITH, 1986, BYRD & CASTNER, 2001, GRASSBERGER & REITER, 2002). However, holarctic blowfly species could not necessarily exhibit the same growth pattern in different zoogeographic areas. In indoor conditions the use of an isomorphen diagram could provide a quick and precise minimal estimate for the PMI. In our experiments, with development of *P. terraenovae* at constant 25±0,5°C, the life cycle was 16.61±0.09 days, similar to 15.8 days of GRASSBERGER & REITER (2002) and 14.6 days of MARCHENKO (2001) at the same temperatures. When our DD (249.15) are analysed using 10°C as a lower temperature limit, it is within the range (240.2±9.3DD and 251±0.3DD) given by GRASSBERGER & REITER (2002). At mild fluctuating temperature indoors, the duration of the life cycle was between 13 and 24 days, in a small range of temperatures. Finally, in outdoor conditions, the rate of total immature development increased with temperature; time from egg to adult varied from a minimum of 14.9 days at average 23.5°C (in F3), to 31.2 days at average 15.6°C (in F1). These values are compatible with the range of development time (12 to 38 days for F3; more than 16 days for F1) obtained if maximum and minimum external temperatures are introduced in Grassberger & Reiter's diagram (GRASSBERGER & REITER, 2002), but it will be too variable to use as legal proof. However, if average temperature is applied to this diagram, results are better (16.5 and 36.5 days respectively).

Rates of development in fluctuating temperatures increase, producing a shorter period of development when compared to constant temperature in *P. terraenovae* (DAVIES & RATCLIFFE, 1994). However, the effect could be opposite at different stages and, while development rates in larval instars increased at constant temperatures, in pupae they decreased (CLARKSON *et al.*, 2004). The increase in larval development of *P. terraenovae* under fluctuating temperatures versus constant temperatures may be due to compensation between rapid growth at high temperature and slow growth at low temperature (NIEDEREGGER *et al.*, 2010). The duration of the pupal stage is relatively long, representing 43% of the total developmental time (GREENBERG & TANTAWI, 1993). But larvae duration was longer than pupae, which show a percentage similar to those indicated by GREENBERG & TANTAWI (1993). At constant temperature larval period was 8.33 days but in the laboratory this was 8.25±3.20 days and outdoors was the most variable, from 8 days to 20 days. However, the pupa period was 7.27 at 25°, in the laboratory it was 7.50±1.91 and in external 10.22 to 5.91 at high temperature. As is frequently indicated, there is a continuing need to refine and improve developmental data of forensically important blowflies. Precise values for min-

imal developmental estimated by stage are important areas of improvement. It is important to notice that when calculating the PMI not only development times at different temperatures are needed but also temperature of the larval mass as well as the photoperiod, as they may influence the development (NIEDEREGGER *et al.*, 2010).

The main direct effects of larval competition are, among others, increasing mortality and decreasing size, which in the case of females adversely affect their fertility (SMITH & WALL, 1997). Comparing the mortality rate of *P. terraenovae* in pure and mixed cultures, differences were observed, where mortality was higher in pure than in mixed cultures in low densities; however, in high densities the mortality was similar in both cultures. In the case of *C. vicina*, the mortality was higher in mixed than in pure cultures at low densities ( $\leq 100$ ) and in higher densities mortality was lower in mixed than in pure cultures, this may be because the coexistence with *P. terraenovae* decreases intraspecific competition, increasing interspecific competition. As for size, in all experiments the size of males and females increased in mixed cultures contrary to pure cultures where size decreased with an increase of density.

As it is known, the PMI calculation is of great importance in forensic entomology. For this reason, for their estimation should be taken into account: a) species present in the bodies, since the presence of some of them may influence the development of another. In the case report, the presence of *Ch. albiceps* could have a negative effect on *P. terraenovae* therefore explaining the low number found on the bodies, and in the experiment of competition the presence of *C. vicina* increases mortality in *P. terraenovae*, b) the different temperatures either fluctuating or constant, because they influence positively or negatively the life cycle of the species. Throughout this work, it has been shown that fluctuating temperatures accelerate larval development of *P. terraenovae*.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank to Y. Velasquez for collaboration during investigations and for helpful comments on the manuscript. Partial financial support was partially provided by the European Commission [LIFE05 ENV/E/000302], University of Alicante [GRE09-27] and the Regional Ministry of the Generalitat Valenciana [GV/2011/039].

## 6. REFERENCES

1. ARNALDOS I, PRADO-CASTRO C, PRESA JJ, LÓPEZ-GALLEGO E, GARCÍA MD. Importancia de los estudios regionales de fauna sarcosaprófaga. Aplicación a la práctica forense, *Ciencia Forense*. 2006, 8:63-82.



2. BENECKE M. Description and commentary, *Journal of Forensic Science*. 1998, 43:797-805.
3. BYRD JH, CASTNER JL. Forensic entomology. The utility of arthropods in legal investigations. CRC Press, Boca Ratón, EEUU, 2001.
4. CARREÑO S, PINEDA F, FRONTERA E, RODRÍGUEZ E, RAMOS A, SÁNCHEZ A, RODRÍGUEZ A, JIMÉNEZ S, ALVARADO M, MEDINA V, RODRÍGUEZ M, HERNÁNDEZ J. *Protophormia terraenovae*. A new allergenic species in amateur fishermen of Cáceres, Spain, *Allergologia et Immunopathologia*. 2009, 37(2):68-72.
5. CASTILLO M. Estudio de la entomofauna asociada a cadáveres en el Alto Aragón (Spain), *Monografías Sociedad de Entomología Aragonesa*. Vol. 6, Zaragoza, Spain, 2002.
6. CLARKSON CA, HOBISCHAK NR, ANDERSON GS. A comparison of the development rate of *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) raised under constant and fluctuating temperature regimes. *Canadian Society of Forensic Science*. 2004, 37:95-101.
7. DAVIES L, RATCLIFFE GG. Development rates of some pre-adult stages in blowflies with reference to low temperatures, *Medical and Veterinary Entomology*. 1994, 8:245-254.
8. DONOVAN SE, HALL MJR, TURNER BD, MONCRIEFF CB. Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures. *Medical and Veterinary Entomology*. 2006, 20:106-114.
9. GENNARD DE. Forensic entomology: an introduction. Wiley, Chichester, England, 2007.
10. GONZÁLEZ-MORA D, PERIS SV. Los Calliphoridae de España, I: Rhiniinae y Chrysomyinae (Diptera), *Eos*. 1998,64:91-139.
11. 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.
12. GRASSBERGER M, REITER C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen- diagram, *Forensic Science International*. 2001, 120:32-36.
13. GRASSBERGER M, REITER C. Effect of temperature on development of the forensically important holartic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae), *Forensic Science International*. 2002, 128:177-182.
14. GRASSBERGER M, FRIEDRICH E, REITER C. The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in central Europe, *International Journal of Legal Medicine*. 2003, 117:75-81.
15. GREENBERG B, KUNICH JC. Entomology and the law: Flies as forensic indicators. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2002.
16. GREENBERG B, TANTAWI TI. Different developmental strategies in two boreal blow flies (Diptera: Calliphoridae), *Journal of Medical Entomology*. 1993, 30:481-484.

17. HIGLEY LG, HASKELL NH. Insect development and forensic entomology, in: JH Byrd, JL Castner (eds.), *Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations*, CRC Press, Boca Ratón, EEUU. 2001.
18. INTRONA F, CAMPOBASSO CP, DIFAZIO A. Three case studies in forensic entomology from Southern Italy, *Journal of Forensic Science*. 1998, 43:210-214.
19. JAMES MT. The Flies that cause myiasis in man. *Miscellaneous Publication N°631*, Washington, US Department of Agriculture, EEUU, 1947.
20. MARCHENKO MI. Medicolegal relevance on cadaver entomofauna for the determination of the time of death, *Forensic Science International*. 2001, 120:89-109.
21. MARILUIS JC. Presencia de *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy, 1830) en Chile, Sud América (Calliphoridae, Chrysomyinae, Phormiini), *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biología)*. 1999, 95: 69-71.
22. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROGNES K, ROJO S, MARCOS-GARCÍA MA. Primeros datos sobre los califóridos de Andorra (Diptera, Calliphoridae), *Boletín de la Asociación Española de Entomología*. 2002, 25(3-4):79-94.
23. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, SMITH KE, ROJO S, MARCOS-GARCÍA MA, WALL R: Geographic origin affects larval competitive ability in European populations of the blow fly, *Lucilia sericata*, *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2007, 6:93-98.
24. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ AI. Biología de la comunidad de Dípteros necrófilos en ecosistemas del sureste de la península Ibérica. Universidad de Alicante, Spain, 2003.
25. NIEDEREGGER S, PATUSCHEK J, MALL G. Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies, *Forensic Science International*. 2010, 199:72-78.
26. NUORTEVA P. Empty puparia of *Phormia terraenovae* R.-D. (Diptera, Calliphoridae) as forensic indicators, *Suomen Hyönteistieteellinen Aikakauskirja*. 1987, 53:53-56.
27. ROGNES K. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark, *Fauna Entomologica Scandinavica Vol. 24*, Scandinavian Science Press Ltd. Leiden, The Netherlands, 1991.
28. SALOÑA-BORDAS MI, MONEO-PELLITERO J, DÍAZ-MARTÍN 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(1-2):63-89.
29. SMITH KE, WALL R. Asymmetric competition between larvae of the blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* in carrion, *Ecological Entomology*. 1997; 22:467-474.
30. SMITH KGV. *A manual of forensic entomology*. British Museum, Natural History, London and Cornell University Press, Ithaca, 1986.
31. TANTAWI TI, WELLS JD, GREENBERG B, EL-KASY EM. Fly larvae (Diptera: Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae) succession in rabbit carrion: Variation observed in carcasses exposed at the same time and the same place, *Journal of Egyptian German Society of Zoology*. 1996, 25:195-208.

*Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera, Calliphoridae) ...

32. ULLYETT GC. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 1950, 234:77-174.
33. VELÁSQUEZ Y, MAGAÑA C, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROJO S. Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key, Medical and Veterinary Entomology. 2010:293-308.
34. VILÁGIOVÁ I, PEĚKO B. Synantrópne muchy (Diptera) urbánu a suburbánu Košíc, Slovakia Vet Cas. 1994, 19:126-128.

## DATOS PRELIMINARES SOBRE COLONIZACIÓN TEMPRANA Y ACTIVIDAD DIARIA DE LOS PRINCIPALES DÍPTEROS SARCOSAPRÓFAGOS EN EL SURESTE PENINSULAR

MARÍA-ISABEL ARNALDOS<sup>1,2</sup>  
ELENA LÓPEZ GALLEGO<sup>1</sup>  
MARÍA-DOLORES GARCÍA<sup>1,2</sup>

**Resumen:** En la práctica forense, las evidencias entomológicas aportan consideraciones de gran valor en diversos aspectos; tal vez el más demandado sea la estimación del intervalo postmortem (IPM). Para esta estimación, normalmente, se asume que ciertos insectos llegan al cadáver inmediatamente tras ocurrida la muerte. Sin embargo, conviene conocer con la máxima precisión posible el auténtico patrón de colonización temprana de los principales insectos (Dípteros necrófagos). Por otro lado, se asume que las moscas necrófagas son inactivas durante la noche. Este hecho es de gran importancia pues, si esto no fuese así, se podría incurrir en un importante error de cálculo en la estimación de la data de la muerte. Para tratar de evaluar el patrón de colonización temprana y la actividad diaria de los dípteros de interés forense en un medio periurbano de la Región de Murcia, se llevó a cabo un ensayo en el que se utilizó una trampa Schoenly modificada, cebada con un cadáver de lechón, durante un período de 10 días en cada una de las cuatro estaciones anuales, tomándose muestras diariamente cada 6 y 12 horas. Las especies de dípteros capturadas con mayor abundancia fueron *Lucilia sericata* (MEIGEN, 1826), *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1818), *Musca domestica* Linneo, 1758, *Muscina stabulans* (FALLEN, 1816) y *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830. Se registraron las horas en que se obtuvieron las capturas de tales taxones, observándose variación estacional y gradación en horas en la

---

<sup>1</sup> Laboratorio de Entomología Forense. Facultad de Biología, Universidad de Murcia. 30100 Murcia. España.

<sup>2</sup> Unidad de servicio de Entomología Forense y análisis microscópico de evidencias. Servicio externo de ciencias y técnicas forenses. Universidad de Murcia.

llegada de los distintos taxones. Se observaron descensos muy notables de las capturas coincidiendo con el considerado como período nocturno, esto es, el intervalo desde las 21:00 horas de la noche hasta las 09:00 horas de la mañana del día siguiente. A partir de estos resultados, se ha caracterizado la colonización temprana de las principales especies de interés forense en la Región de Murcia y se apunta a la posibilidad, a falta de estudios diseñados específicamente para este propósito, de que la actividad nocturna de las especies consideradas es escasísima o nula, lo que, a efectos forenses prácticos, corroboraría la común asunción de la posible inexistencia de actividad nocturna de dichas especies y, por lo tanto, de ovoposición.

**Palabras clave:** Colonización temprana, actividad diaria, Intervalo post-mortem, Entomología forense, Dípteros.

**Abstract:** Entomological evidence provides data of great value in forensic practice. Probably, the main goal is the estimation of postmortem interval (IPM) that is usually made on the basis of certain facts. It is normally assumed that some insects arrive to the corpse just after death occurred. Nevertheless, it is convenient to know with the maximum accuracy, the early succession pattern of the most relevant insects, such as necrophagous Diptera. On the other hand, it is also assumed that necrophagous flies are not active during night time. This fact can be essential in estimating IPM since it can lead to an estimation bias of 12 hours. In order to evaluate the early colonization pattern and daily activity of Diptera of forensic interest in a periurban environment in Región de Murcia (SE Iberian Peninsula), an experience was carried out using a modified Schoenly trap, baited with a piglet carcass, along the first 10 days of decomposition process. Experience was repeated to cover the four seasons. Samples were taken, daily, every 6 and 12 hours. The most abundant Diptera species were *Lucilia sericata* (MEIGEN, 1826), *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1818), *Musca domestica* Linneo, 1758, *Muscina stabulans* (FALLEN, 1816) and *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830. Time in which they were collected was registered. Seasonal variation and arrival time differences were observed for the different taxa characterizing the pattern of early colonization. During night time (i.e. from 21:00 hours to 09:00 hours of day after) captures were much lower than during day time suggesting that nocturnal activity, and therefore oviposition, of necrophagous Diptera could be very low or even null. Nevertheless, further studies specifically designed to evaluate daily activity are necessary to confirm this possibility.

**Key words:** early colonization, daily activity, postmortem interval, forensic entomology, Diptera.

## 1. INTRODUCCIÓN

El intervalo *postmortem* (IPM), o tiempo transcurrido desde el momento de la muerte, es un asunto de importancia crucial en la investigación de

homicidios (WELLS & LAMOTTE, 2010) e, incluso, en casos de muertes naturales, pues puede tener implicaciones relevantes a efectos legales en relación con la percepción de seguros o herencias (HESSGE *et al.*, 1995, *cf.* WELLS & LAMOTTE, 2010). De hecho, muchas investigaciones forenses dependen de la estimación de un IPM mínimo (REIBE *et al.*, 2010), por lo que es importante estimarlo con la máxima fiabilidad posible (REIBE & MADEA, 2010a).

En relación con la estimación del intervalo *postmortem* (IPM), existen ciertos aspectos de la comunidad sarcosaprófaga que pueden tener especial incidencia en la precisión de dicha estimación. Es frecuente considerar determinadas especies, como las primeras que acceden a un cadáver, cifrando en las etapas de desarrollo de éstas el peso de dicha estimación. El patrón temporal de llegada de los insectos necrófagos a un cadáver es un dato fundamental para la estimación del IPM mínimo (VASCONCELOS *et al.*, 2012). En el caso de cadáveres encontrados en el interior de edificaciones este aspecto resulta aún más importante puesto que no está claro el tiempo necesario para ciertos Díptera para localizar el cuerpo e iniciar la ovoposición (REIBE & MADEA, 2010b). Los dípteros son, por regla general, los primeros organismos que acceden a un cadáver para depositar huevos y desarrollarse en él (ANDERSON, 2010, FARINHA *et al.*, 2014 entre otros), y lo hacen, en condiciones normales, en los primeros momentos después de ocurrida la muerte (GAUDRY, 2008). Por otro lado, las comunidades de Díptera sarcosaprófagos varían tanto geográfica como estacionalmente, por lo que el conocimiento de las comunidades tempranas, especialmente en términos de composición específica y abundancia relativa, de una determinada área, puede ser muy útil en las investigaciones forenses (FARINHA *et al.*, 2014). En la práctica forense, se puede estimar con precisión el IPM a partir de sus estados preimaginales y su tasa de desarrollo (WELLS & LAMOTTE, 2010, entre otros), considerando el inicio del IPM coincidente con el momento en que el primer díptero depositó sus huevos en el cadáver (GENNARD, 2007) por lo que, a la edad larvaria estimada, hay que añadir el período de tiempo que se considere transcurrido entre la muerte y la llegada de las moscas adultas para oviponer.

En relación con ello, a la hora de estimar el IPM se asumen habitualmente, también, ciertos hechos, como la ausencia de oviposición nocturna puesto que las especies más importantes de Díptera no son activas durante la noche (AMENDT *et al.*, 2008, ANDERSON, 2010, NUORTEVA, 1977, ERZINCIOGLU, 1996, SINGH & BARTHI, 2001). En relación con ello, también se asume, implícitamente, que no se produce oviposición durante esas horas por lo que, si se halla un cadáver en las horas tempranas +de un día y en él se observan puestas y larvas, se concluye que el sujeto era ya cadáver antes del anochecer del día anterior. Si la suposición resultare incierta, supondría un error de cálculo de unas 12 horas como mínimo, lo que, a efectos forenses prácticos, puede ser de vital importancia (NORRIS, 1966, GREENBERG, 1990, WOOLDRIDGE *et al.*, 2007, AMENDT *et al.*, 2008, SINGH & BARTHI, 2001, 2008).

Son varios los autores que sugieren inactividad (LEWIS & TAYLOR, 1965, NORRIS, 1966, PYZA & CYMBOROWSKI, 2001) y falta de oviposición nocturna (BALRIDGE *et al.*, 2006, WOOLDRIDGE *et al.*, 2007, AMENDT *et al.*, 2008) o, por el contrario, actividad nocturna, siempre bajo determinadas condiciones ambientales, de determinadas especies de dípteros de interés forense (GREENBERG, 1990, KIRKPATRICK, 2004, SINGH & BARTHI, 2001, 2008). Sin embargo, tales datos proceden de regiones alejadas de la Península Ibérica. En el Sureste de la Península Ibérica hay que considerar un aspecto muy importante en relación con las condiciones climatológicas de la zona, ya que, al menos en las estaciones más cálidas, las elevadas temperaturas reinantes, incluso durante la noche, podrían favorecer la presencia de actividad nocturna de estos insectos.

Dada la ausencia de datos respecto a la colonización temprana y la actividad diaria de los principales Díptera necrófagos en la Península Ibérica parece de interés verificar tales aspectos a fin poder evaluarlos con mayor fidelidad para su potencial aplicación en la práctica forense.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en la Región de Murcia (SE de la Península Ibérica), en el Servicio de Experimentación Agrícola y Forestal de la Universidad de Murcia, situado en el Campus Universitario de Espinardo, a unos 2 km al norte de la ciudad de Murcia. Este lugar es representativo de un medio suburbano con clima mediterráneo árido y dispone de iluminación nocturna por medio de farolas.

Para la captura de ejemplares se utilizó una variante de la trampa diseñada por SCHOENLY *et al.* (1991), de dimensiones 120 x 90 x 60 cm. La trampa consta de 16 orificios de entrada y 9 de salida, dispuestos a dos alturas diferentes (12 y 42 cm). Los orificios de entrada se localizan en puntos equidistantes en los cuatro lados de la trampa. Ocho de ellos se conectan con tubos colectores que recogen la porción de la fauna atraída por el cadáver. Los otros ocho permiten a los artrópodos acceder directamente al cebo. De los 9 orificios de salida, 8 se localizan en las esquinas del dispositivo y el noveno en la parte superior del mismo. Todos ellos están conectados con frascos colectores con solución de Morrill (MORRILL, 1975).

Este diseño permite recoger una gran variedad de artrópodos, tanto los que acceden al cuerpo como los que lo abandonan. Por las propias características del dispositivo, un bajo nivel de capturas podría reflejar una baja actividad de los insectos en relación con el cadáver. El dispositivo no afecta al proceso natural de descomposición ni a la sucesión faunística. Además, permite recoger la fauna sarcosaprófaga y estudiar la dinámica estacional de las poblaciones aplicando métodos estadísticos. Su efectividad ha sido demostrada al ofrecer mejores resultados a la hora de elaborar inventarios

de la fauna sarcosaprófaga adulta que la metodología tradicional (ORDÓÑEZ *et al.*, 2008). Esta metodología ha sido aplicada con éxito en diversas ocasiones (ARNALDOS SANABRIA, 2000 (23); ARNALDOS *et al.*, 2001, BATTÁN HORENSTEIN *et al.*, 2010, 2012, PRADO E CASTRO *et al.*, 2011a, 2011b, 2012, entre otros) presentando la ventaja de que la uniformidad de las poblaciones capturadas con el dispositivo permite no tener que disponer de réplicas o pseudorréplicas.

En el interior de la trampa se dispuso como cebo el cadáver de un lechón, *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, de unos 15 días de edad y unos 3 kg. de peso aproximadamente. Las experiencias se desarrollaron en las cuatro estaciones del año a lo largo de 10 días (primavera: 20-29 Abril; verano: 20-29 Julio; otoño: 15-24 Septiembre; invierno: 17-26 Enero). Se tomaron muestras diariamente, a las 09:00, 15:00 y 21:00 horas. Así, la muestra recogida a las 09:00 horas de cada día es el resultado de la actividad desplegada en torno al crepúsculo vespertino hasta las primeras horas de la mañana.

Durante cada visita a la trampa se vaciaban los botes de recolección y se recargaban con solución de Morrill limpia. Además se anotaba cualquier incidencia que se considerara de interés, como el estado de descomposición aparente del cadáver, algún tipo de fenómeno meteorológico, etc. También se realizó un registro gráfico de la situación del cebo. Las condiciones ambientales en el interior de la trampa se obtuvieron con un *data-logger* DO 9406 Delta OHM que registra temperatura y humedad relativa ( $\Delta T^a$  -20 +80 °C,  $\Delta HR$  5-98%). Ya en el laboratorio, los ejemplares capturados fueron separados y conservados en etanol al 70%. La identificación se llevó a cabo siguiendo distintas obras (BARRIENTOS, 2004, GONZÁLEZ MORA, 1989, GONZÁLEZ MORA & PERIS, 1988, GREGOR *et al.*, 2002, PAPP & SCHUMANN, 2000, PERIS & GONZÁLEZ MORA, 1991).

Los datos de la temperatura ambiental de la zona de estudio correspondiente a los periodos de los muestreos de primavera, verano, otoño e invierno, fueron obtenidos de la estación meteorológica situada en el Servicio de Experimentación Agrícola y Forestal de la Universidad de Murcia en el Campus Universitario de Espinardo que fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Meteorología en su Centro de Guadalupe (Murcia).

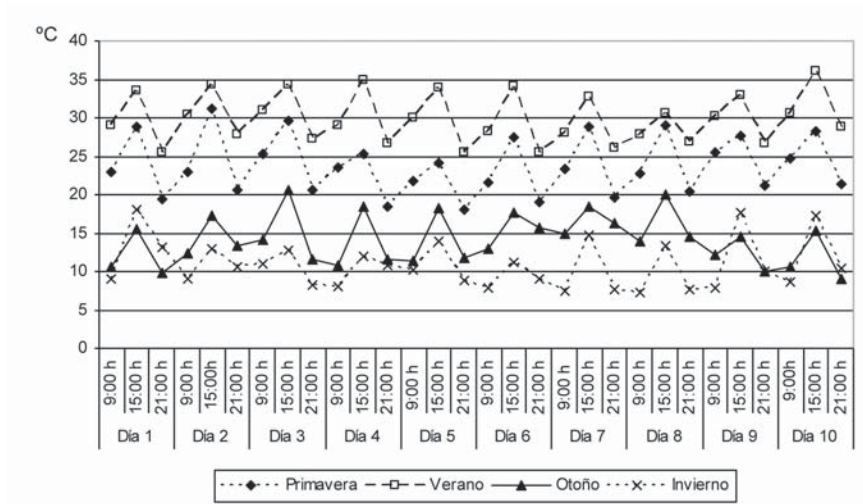
Para comparar las poblaciones de Díptera capturadas a las 9:00, 15:00 y 21:00 h se ha empleado el paquete informático SPSS ver.15<sup>®</sup>, aplicándose el test de Tukey, la prueba de la t de Student y el análisis de la varianza de un solo factor (ANOVA de una vía).

### 3. RESULTADOS

Los resultados de las temperaturas que se registraron durante cada uno de los muestreos realizados a las 09:00, 15:00 y 21:00 horas en las distintas



estaciones anuales se ven recogidas en la Figura 1. Es de destacar que las temperaturas fueron altas, especialmente durante la primavera y el verano, alcanzándose ~20° C en primavera y 25-30°C en verano.



**Figura 1.** Temperaturas medias registradas durante el muestreo a las 09:00, 15:00 y 21:00 horas en las cuatro estaciones del año.

En la Figura 2 se representan las temperaturas medias diarias registradas en cada periodo del día. Puede observarse que las temperaturas durante los periodos de luz (9:00-15:00 h, 15:00-21:00 h y 9:00-21:00 h) fueron muy similares entre sí, y siempre superiores a las registradas durante la noche (21:00-9:00 h).

Durante el periodo de muestreo se observaron las siguientes fases de la descomposición: fresca, enfisematosa, descomposición y descomposición activa (según ANDERSON, 2010). La descomposición activa sólo se alcanzó durante la primavera y el verano, lo que está íntimamente relacionado con las altas temperaturas registradas en estas estaciones. La duración de cada fase de la descomposición aparece en la Figura 3.

La mayoría de los ejemplares capturados durante los primeros 10 días de exposición del cadáver pertenecen al orden Diptera (11.087 ejemplares), lo que representa cerca de un 87% de la fauna total adulta capturada. Este grupo mostró, además, una clara preferencia por las estaciones más cálidas.

Entre los Diptera (Tabla 1), las familias más relevantes fueron Muscidae (~70% de las capturas) y Calliphoridae (casi el 25%). Sarcophagidae, Fannidae y otras familias, como los Phoridae, resultaron menos importantes (<1%). Estas cinco familias representan, en conjunto, el 99,66% del total de dípteros recogidos.

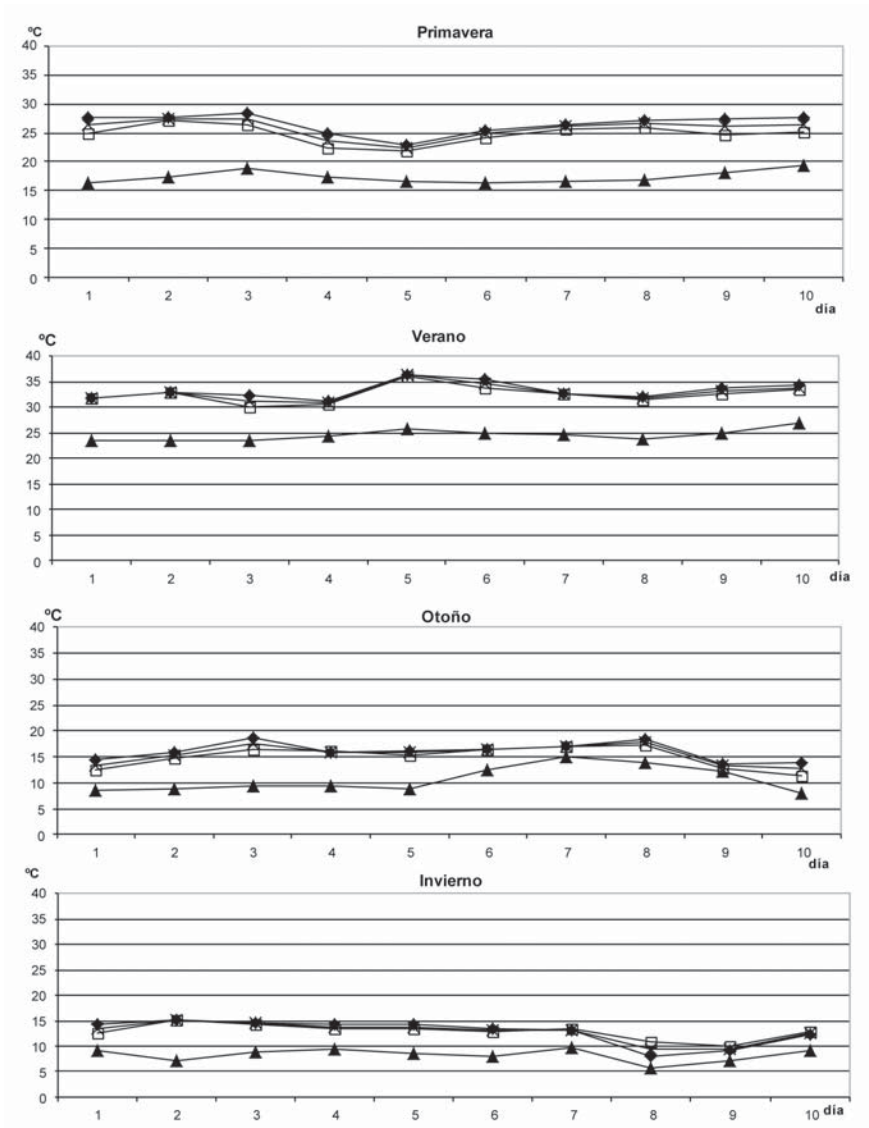


Figura 2. Temperaturas registradas en cada momento del muestreo: ●: entre 09:00 y 15:00; □: entre 15:00 y 21:00; ▲: entre 21:00 y 09:00; ×: entre 09:00 y 21:00.

|                    |           | DÍA 1  |       |       | DÍA 2        |       |       | DÍA 3          |       |       | DÍA 4                 |       |       | DÍA 5                 |       |       | DÍA 6 |       |       | DÍA 7 |       |       | DÍA 8 |       |       | DÍA 9 |       |       | DÍA 10 |       |       |
|--------------------|-----------|--------|-------|-------|--------------|-------|-------|----------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
|                    |           | 9:00   | 15:00 | 21:00 | 9:00         | 15:00 | 21:00 | 9:00           | 15:00 | 21:00 | 9:00                  | 15:00 | 21:00 | 9:00                  | 15:00 | 21:00 | 9:00  | 15:00 | 21:00 | 9:00  | 15:00 | 21:00 | 9:00  | 15:00 | 21:00 | 9:00  | 15:00 | 21:00 | 9:00   | 15:00 | 21:00 |
| ESTACIONES ANUALES | PRIMAVERA | Fresca |       |       | Enfisematosa |       |       | Descomposición |       |       |                       |       |       | Descomposición activa |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |
|                    | VERANO    | Fresca |       |       | Enfisematosa |       |       | Descomposición |       |       | Descomposición activa |       |       |                       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |
|                    | OTOÑO     | Fresca |       |       |              |       |       | Descomposición |       |       |                       |       |       |                       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |
|                    | INVIERNO  | Fresca |       |       |              |       |       |                |       |       | Descomposición        |       |       |                       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |

**Figura 3.** Duración de las fases de la descomposición en las distintas estaciones muestreadas.

Así, las familias más importantes en nuestro estudio fueron Muscidae y Calliphoridae. De ellas, las especies recogidas en mayor abundancia fueron *Musca domestica* Linnaeus, 1758 y *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1818) (Tabla 1). Considerando las estaciones anuales, los Muscidae fueron los más abundantes durante la primavera y el verano, mientras los Calliphoridae dominaron en otoño e invierno, cuando se capturaron pocas familias (Tabla 1).

Las estaciones anuales con mayor porcentaje de capturas son primavera y verano (Figura 2), siendo estas dos estaciones donde se concentran la mayoría de las capturas de las familias más importantes (Tabla 2). Los múscidos presentan su máxima captura en primavera y los califóridos en verano, aunque para este último caso la preferencia no es tan marcada como para los múscidos.

En primavera, *Lucilia sericata* (MEIGEN, 1826) fue la primera especie en llegar al cebo (Figura 4), siendo recogida por primera vez a las 30 horas tras la exposición del cadáver, seguida de *Chrysomya albiceps* y *Muscina stabulans* (FALLEN, 1816) a las 54 horas, y, por último, *Musca domestica* a las 60 horas. El mismo patrón se encontró en verano, aunque la aparición de las especies se adelantó (Figura 4). En este caso, *Lucilia sericata* se recogió por primera vez a las 24 horas, *Muscina stabulans* y *Chrysomya albiceps* a las 30 horas y *Musca domestica* a las 36 horas. En ambas estaciones, los califóridos más abundantes fueron *Chrysomya albiceps* y *Lucilia sericata*, y los múscidos más abundantes *Musca domestica* y *Muscina stabulans*. Por tanto, en estas estaciones, éstas son las especies que se pueden considerar como mejores indicadoras de los estados tempranos de la descomposición.

**Tabla 1.** Total de especies de dípteros recogidos durante el muestreo en las distintas estaciones.

| FAMILIA       | ESPECIE                     | PRIMAVERA |       | VERANO |       | OTOÑO |       | INVIERNO |       | MUESTREO COMPLETO |       |
|---------------|-----------------------------|-----------|-------|--------|-------|-------|-------|----------|-------|-------------------|-------|
|               |                             | N         | %     | N      | %     | N     | %     | N        | %     | N                 | %     |
| Calliphoridae | <i>Calliphora vicina</i>    | 9         | 0,13  | 0      | 0,00  | 12    | 32,43 | 95       | 85,59 | 2744              | 24,75 |
|               | <i>Calliphora vomitoria</i> | 1         | 0,01  | 0      | 0,00  | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  |                   |       |
|               | <i>Chrysomya albiceps</i>   | 602       | 8,51  | 1493   | 38,60 | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  |                   |       |
|               | <i>Lucilia sericata</i>     | 422       | 5,97  | 109    | 2,82  | 1     | 2,70  | 0        | 0,00  |                   |       |
|               | <i>Lucilia sp.</i>          | 1         | 0,01  | 0      | 0,00  | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  |                   |       |
| Muscidae      | <i>Musca domestica</i>      | 5683      | 80,37 | 1807   | 46,72 | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  | 7845              | 70,76 |
|               | <i>Muscina stabulans</i>    | 111       | 1,57  | 139    | 3,59  | 6     | 16,22 | 0        | 0,00  |                   |       |
|               | Otros                       | 68        | 0,96  | 31     | 0,80  | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  |                   |       |
| Sarcophagidae |                             | 49        | 0,69  | 176    | 4,55  | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  | 225               | 2,03  |
| Phoridae      |                             | 16        | 0,23  | 14     | 0,36  | 6     | 16,22 | 10       | 9,01  | 46                | 0,41  |
| Fanniidae     |                             | 97        | 1,37  | 93     | 2,40  | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  | 190               | 1,71  |
| Odiniidae     |                             | 0         | 0,00  | 2      | 0,05  | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  | 2                 | 0,02  |
| Ulidiidae     |                             | 0         | 0,00  | 2      | 0,05  | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  | 2                 | 0,02  |
| Milichiidae   |                             | 0         | 0,00  | 0      | 0,00  | 0     | 0,00  | 1        | 0,90  | 1                 | 0,01  |
| Tachinidae    |                             | 1         | 0,01  | 0      | 0,00  | 0     | 0,00  | 0        | 0,00  | 1                 | 0,01  |
| Psychodidae   |                             | 2         | 0,03  | 0      | 0,00  | 5     | 13,51 | 1        | 0,90  | 8                 | 0,07  |
| Sciaridae     |                             | 4         | 0,06  | 0      | 0,00  | 6     | 16,22 | 4        | 3,60  | 14                | 0,13  |
| Chironomidae  |                             | 0         | 0,00  | 1      | 0,03  | 1     | 2,70  | 0        | 0,00  | 2                 | 0,02  |
| TOTAL         |                             | 7071      | 100   | 3868   | 100   | 37    | 100   | 111      | 100   | 11087             | 100   |

En otoño e invierno el número de individuos capturados fue muy bajo, lo que pudo ser consecuencia de las bajas temperaturas registradas. *Calliphora vicina* ROBINEAU-DESVOIDY, 1830 fue la especie más abundante, apareciendo en el mismo momento (hacia ~30 horas) en ambas estaciones. Así, ésta resulta ser la especie indicadora de los estados tempranos de la descomposición para estas estaciones.

Estos resultados abundan en la idea general de que los Calliphoridae son los primeros colonizadores de un cadáver. Aun así, en el seno de la familia existen diferencias específicas en relación con el momento de aparición; así, *Lucilia sericata* y *Calliphora vicina* actuaron como colonizadores

**Tabla 2.** Estadísticos descriptivos del número de capturas de distintas especies de dípteros a las 09:00 a las 15:00 y las 21:00 horas en primavera y verano.

|                           |       | N  | PRIMAVERA |                   | VERANO |                   |
|---------------------------|-------|----|-----------|-------------------|--------|-------------------|
|                           |       |    | MEDIA     | DESVIACIÓN TÍPICA | MEDIA  | DESVIACIÓN TÍPICA |
| <i>Chrysomya albiceps</i> | 9:00  | 10 | 2,50      | 4,577             | 13,10  | 15,934            |
|                           | 15:00 | 10 | 29,20     | 37,597            | 80,00  | 59,744            |
|                           | 21:00 | 10 | 28,50     | 36,876            | 56,20  | 42,684            |
|                           | Total | 30 | 20,07     | 32,045            | 49,77  | 50,448            |
| <i>Musca domestica</i>    | 9:00  | 10 | 22,60     | 41,961            | 17,50  | 22,402            |
|                           | 15:00 | 10 | 278,00    | 449,910           | 79,10  | 82,665            |
|                           | 21:00 | 10 | 268,10    | 376,223           | 84,20  | 77,402            |
|                           | Total | 30 | 189,57    | 348,898           | 60,27  | 71,318            |
| <i>Muscina stabulans</i>  | 9:00  | 10 | 0,50      | 0,707             | 4,50   | 4,327             |
|                           | 15:00 | 10 | 6,30      | 5,618             | 7,70   | 8,301             |
|                           | 21:00 | 10 | 4,40      | 4,648             | 1,70   | 1,703             |
|                           | Total | 30 | 3,73      | 4,763             | 4,63   | 5,857             |
| <i>Lucilia sericata</i>   | 9:00  | 10 | 3,80      | 5,493             | 2,40   | 3,373             |
|                           | 15:00 | 10 | 19,90     | 22,566            | 2,40   | 2,914             |
|                           | 21:00 | 10 | 18,50     | 25,752            | 6,10   | 7,838             |
|                           | Total | 30 | 14,07     | 20,690            | 3,63   | 5,327             |

primarios, como apuntaron ARNALDOS *et al.* (2001), apreciándose una sustitución específica estacional. Sin embargo, *Chrysomya albiceps* actuó como colonizador secundario, confirmando lo ya referido para esta especie (ARNALDOS *et al.*, 2001) lo que, según MESKIN (1986 entre otros), se debe al comportamiento de las hembras, que está adaptado al carácter predador y necrófago facultativo de las larvas, por lo que la ovoposición se retrasa para hacerla coincidir con la presencia de larvas de otras especies. Nuestros resultados, también, indican el carácter cuando menos secundario de las principales especies de Muscidae. ARNALDOS *et al.* (2001) comentaban esta característica pero, en las tablas que ilustraban la dinámica de las especies a lo largo del periodo de la descomposición, figuraban como apareciendo el primer día de exposición del cadáver. Por ello, nuestros datos aportan un análisis más fino del momento de aparición de estas especies, confirmando experimentalmente su carácter secundario.

Para analizar el ritmo de actividad diaria tan sólo se tuvieron en cuenta las especies de dípteros más representativas en los distintos muestreos (*Lu-*

| PRIMAVERA           |      | DESCOMPOSICIÓN |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
|---------------------|------|----------------|-------|--------------|-------|----------------|------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-----|
|                     |      | FRESCO         |       | ENFISEMATOSO |       | DESCOMPOSICIÓN |      | DESCOMPOSICIÓN ACTIVA |       | DESCOMPOSICIÓN ACTIVA |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
|                     |      | 1              | 2     | 3            | 4     | 5              | 6    | 7                     | 8     | 9                     | 10    |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| DÍA                 | 0    | 6              | 12    | 24           | 30    | 36             | 48   | 54                    | 60    | 72                    | 78    | 84    | 96   | 102   | 108   | 120  | 126   | 132   | 144  | 150   | 156   |     |
| Horas acumuladas    | 9:00 | 15:00          | 21:00 | 9:00         | 15:00 | 21:00          | 9:00 | 15:00                 | 21:00 | 9:00                  | 15:00 | 21:00 | 9:00 | 15:00 | 21:00 | 9:00 | 15:00 | 21:00 | 9:00 | 15:00 | 21:00 | 156 |
| Taxón/hora          |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| <i>C. albiceps</i>  |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| <i>P. sericata</i>  |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| <i>M. domestica</i> |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| <i>M. stabulans</i> |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |

| VERANO              |      | DESCOMPOSICIÓN |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
|---------------------|------|----------------|-------|--------------|-------|----------------|------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-----|
|                     |      | FRESCO         |       | ENFISEMATOSO |       | DESCOMPOSICIÓN |      | DESCOMPOSICIÓN ACTIVA |       | DESCOMPOSICIÓN ACTIVA |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
|                     |      | 1              | 2     | 3            | 4     | 5              | 6    | 7                     | 8     | 9                     | 10    |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| DÍA                 | 0    | 6              | 12    | 24           | 30    | 36             | 48   | 54                    | 60    | 72                    | 78    | 84    | 96   | 102   | 108   | 120  | 126   | 132   | 144  | 150   | 156   |     |
| Horas acumuladas    | 9:00 | 15:00          | 21:00 | 9:00         | 15:00 | 21:00          | 9:00 | 15:00                 | 21:00 | 9:00                  | 15:00 | 21:00 | 9:00 | 15:00 | 21:00 | 9:00 | 15:00 | 21:00 | 9:00 | 15:00 | 21:00 | 156 |
| Taxón/hora          |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| <i>C. albiceps</i>  |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| <i>P. sericata</i>  |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| <i>M. domestica</i> |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |
| <i>M. stabulans</i> |      |                |       |              |       |                |      |                       |       |                       |       |       |      |       |       |      |       |       |      |       |       |     |

Figura 4. Patrón de colonización de los Díptera más importantes durante la Primavera y el Verano. Leyenda : • 1-15 ind., ● 16-50 ind., ● 51-100 ind., ● 101-300 ind., ● 301-500 ind., ■ 501-1000 ind., ▲ > 1000 ind

*Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps*, *Musca domestica* y *Muscina stabulans*), y las dos estaciones de mayor captura, (primavera y verano), que son las que podrían aportar mayor certidumbre en la estimación del comportamiento diario. Se consideraron, por separado, las capturas realizadas a las 09:00, 15:00 y 21:00 horas de cada uno de los días de muestreo. Se puede observar que esas especies fueron mucho menos frecuentes durante la noche. De hecho, aparece un notable descenso en los niveles de captura en las muestras recogidas a las 09:00 horas, que corresponden a los ejemplares del periodo de tiempo entre las 21:00 h y las 9:00 h del día siguiente (Figura 4). Estos datos pueden interpretarse como el resultado de una escasa o incluso nula actividad desplegada a lo largo de las 12 horas crepusculares y nocturnas, lo que permite suponer la baja probabilidad de una eventual ovoposición nocturna, al menos en condiciones ambientales similares a las de este estudio.

No obstante, en algunos casos se han recogido algunos ejemplares a las 09:00 horas (resultado de las capturas en el periodo crepuscular y nocturno). Esto podría deberse a que, en esas estaciones (primavera y verano), el día, y por tanto la luz solar, se había iniciado al menos dos horas antes de la recogida de la muestra lo que, unido a que en el interior de la trampa había un buen número de individuos, que habrían estado activos durante esas dos horas, justificaría las capturas que, en todo caso, eran bajas, sobre todo si se comparan con las capturas registradas a las 15:00 y a las 21:00 horas (Figura 4).

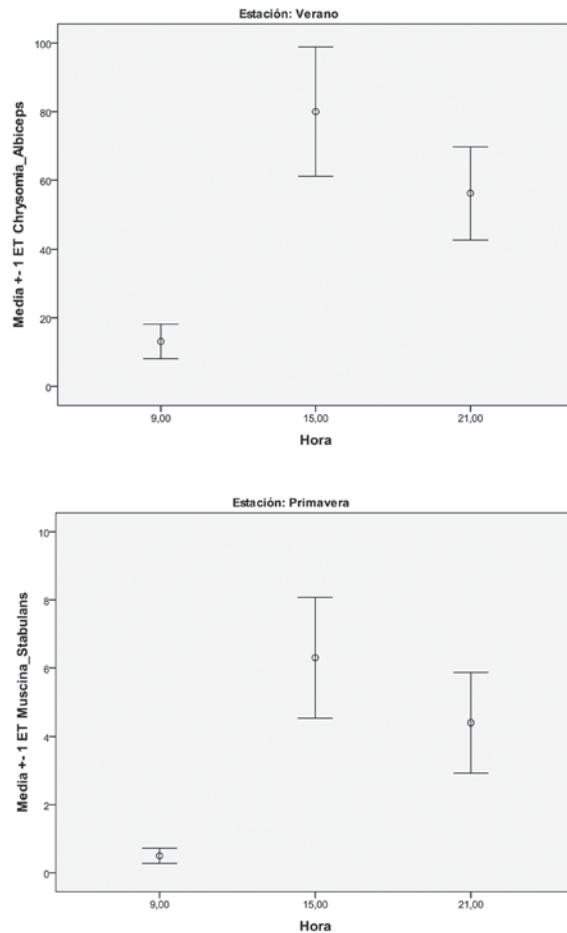
#### ANÁLISIS DEL NÚMERO DE CAPTURAS DE DISTINTAS ESPECIES DE DÍPTEROS A LAS 09:00, LAS 15:00 Y LAS 21:00 HORAS

Para comprobar si existían diferencias significativas entre las poblaciones de Diptera capturadas en los diferentes momentos del día se aplicó un análisis estadístico (ANOVA de un factor) para comparar las poblaciones de los dípteros más representativos (*Calliphora vicina*, *Chrysomya albiceps*, *Musca domestica*, *Muscina stabulans* y *Lucilia sericata*) recogidas a las 09:00, 15:00 y 21:00 h. El análisis se aplicó sólo en aquellas estaciones en que las capturas fueron más representativas (primavera y verano), por lo que se desecharon el otoño y el invierno. Los resultados muestran diferencias significativas ( $p=0.05$ ) sólo para *Chrysomya albiceps* en verano y *Muscina stabulans* en primavera (Tablas 2 y 3 Figura 5).

Los resultados estadísticos de las pruebas F de Anova de un factor comparando el número de ejemplares capturados en función de la hora (09:00, 15:00 y 21:00 horas) indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre *Chrysomya albiceps*, *Musca domestica* y *Lucilia sericata* en las tres horas de recogida de capturas. En el caso de *Muscina stabulans*, el resultado de la prueba F fue estadísticamente significativo ( $F_{2,27}=4,888$ ;  $p=0,015$ ), por lo que el número de individuos capturados varía en función de la hora. La prueba de Tukey para subconjuntos homogéneos indica que no hay diferencias significativas en el número de individuos capturados a las 09:00 y las 21:00 horas, así como a las 15:00 y las 21:00 horas. No obstante, el número

**Tabla 3.** Resultados de las pruebas de ANOVA de un factor para distintas especies de dípteros.

|                     | PRIMAVERA         |              | VERANO            |              |
|---------------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
|                     | F <sub>2,27</sub> | P            | F <sub>2,27</sub> | P            |
| <i>Ch. albiceps</i> | 2.486             | 0.102        | 6.111             | <b>0.006</b> |
| <i>M. domestica</i> | 1.816             | 0.182        | 3.103             | 0.061        |
| <i>M. stabulans</i> | 4.888             | <b>0.015</b> | 2.987             | 0.067        |
| <i>L. sericata</i>  | 1.984             | 0.157        | 1.684             | 0.205        |



**Figura 5.** Resultado de la aplicación estadística ANOVA de un factor para (a) *Chrysomya albiceps* en verano ( $F_{2,27}=6,111$ ,  $p=0,006$ ) y (b) *Muscina stabulans*, en primavera ( $F_{2,27}=4,888$ ,  $p=0,015$ )



de individuos capturados a las 09:00 fue significativamente menor que a las 15:00 horas.

En verano, el número de individuos capturados de las especies *Musca domestica*, *Muscina stabulans* y *Lucilia sericata* fue el mismo en las tres horas. Para *Chrysomya albiceps*, la prueba F ofreció un resultado estadísticamente significativo ( $F_{2,27}=6,111$ ;  $p=0,006$ ). La prueba de Tukey para subconjuntos homogéneos indica que no existen diferencias significativas entre los individuos capturados a las 09:00 y las 21:00 horas, así como a las 15:00 y las 21:00 horas, pero se recogieron menos individuos a las 09:00 que a las 15:00 horas.

ANÁLISIS DEL NÚMERO DE CAPTURAS DE DISTINTAS ESPECIES DE DÍPTEROS DURANTE LOS PERIODOS DE LUZ Y OSCURIDAD

Los resultados de la aplicación de la prueba de la t de Student para muestras independientes a los Díptera capturados durante el periodo de oscuridad (21:00-09:00) y durante el periodo de luz (09:00-21:00) indican que las medias de ambas poblaciones fueron diferentes en algunas de las estaciones estudiadas (Tablas 4 y 5 y Figuras 6 y 7).

En primavera, se han encontrado diferencias en el número de capturas de todas las especies de Díptera consideradas, siendo significativamente menor a las 09:00 horas, lo que indica una menor actividad nocturna de todas las especies durante esta estación.

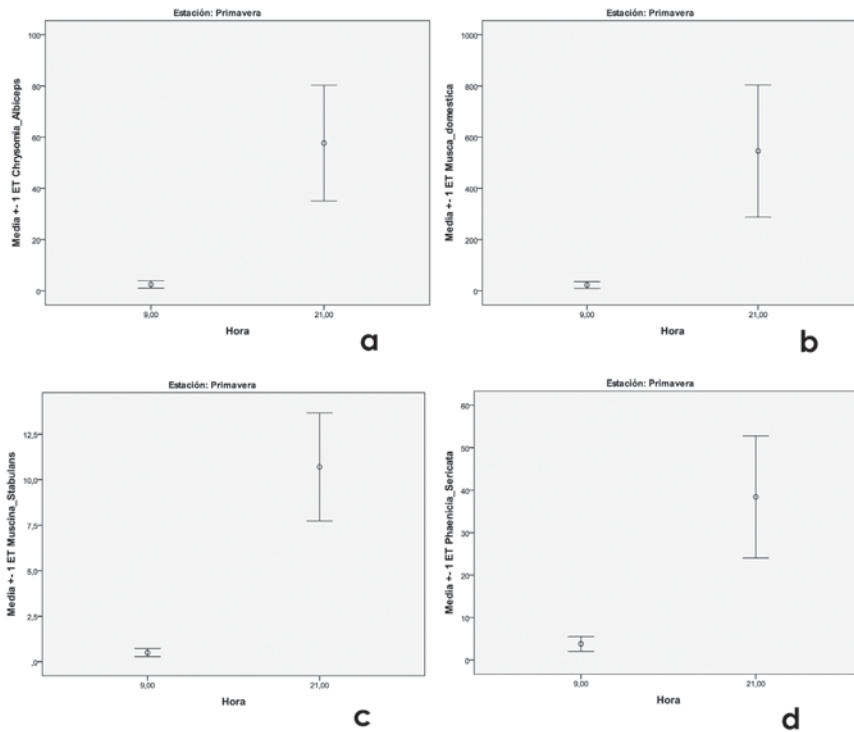
En verano, sólo se han encontrado diferencias en el número de capturas a las 09:00 horas para las especies *Chrysomya albiceps* y *Musca domestica*, lo que indica una menor actividad nocturna para estas especies en verano.

**Tabla 4.** Estadísticos descriptivos del número de capturas de distintas especies de dípteros a las 09:00 y a las 21:00 horas en primavera y verano.

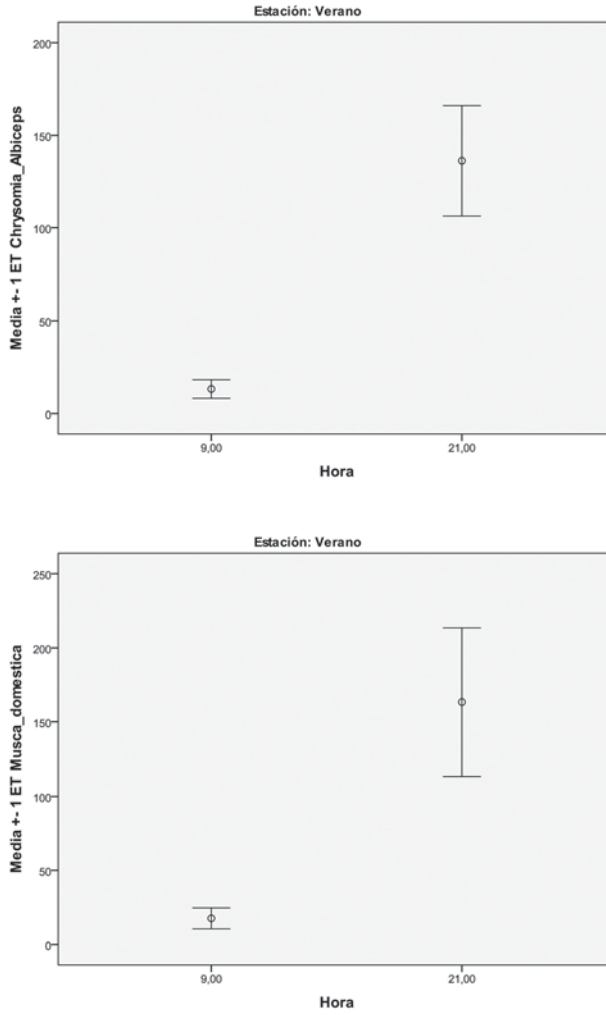
|                           | HORA  | N  | PRIMAVERA |                   | VERANO |                   |
|---------------------------|-------|----|-----------|-------------------|--------|-------------------|
|                           |       |    | MEDIA     | DESVIACIÓN TÍPICA | MEDIA  | DESVIACIÓN TÍPICA |
| <i>Chrysomya albiceps</i> | 9:00  | 10 | 2,50      | 4,577             | 13,10  | 15,934            |
|                           | 21:00 | 10 | 57,70     | 71,505            | 136,20 | 94,602            |
| <i>Musca domestica</i>    | 9:00  | 10 | 22,60     | 41,961            | 17,50  | 22,402            |
|                           | 21:00 | 10 | 546,00    | 816,199           | 163,30 | 158,867           |
| <i>Muscina stabulans</i>  | 9:00  | 10 | 0,50      | 0,707             | 4,50   | 4,327             |
|                           | 21:00 | 10 | 10,70     | 9,381             | 9,40   | 8,796             |
| <i>Lucilia sericata</i>   | 9:00  | 10 | 3,80      | 5,493             | 2,40   | 3,373             |
|                           | 21:00 | 10 | 38,40     | 45,486            | 8,50   | 10,522            |

**Tabla 5.** Resultados estadísticos de la prueba T de Student para dos muestras independientes para distintas especies de dípteros.

|                     | PRIMAVERA       |              | VERANO          |              |
|---------------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
|                     | T <sub>18</sub> | P            | T <sub>18</sub> | P            |
| <i>Ch. albiceps</i> | -2.436          | <b>0.025</b> | -4.058          | <b>0.001</b> |
| <i>M. domestica</i> | -2.025          | <b>0.058</b> | -2.874          | <b>0.010</b> |
| <i>M. stabulans</i> | -3.428          | <b>0.003</b> | -1.581          | 0.131        |
| <i>L. sericata</i>  | -2.388          | <b>0.028</b> | -1.746          | 0.098        |



**Figura 6.** Resultado de la prueba de la t de Student en primavera para (a) *Chrysomya albiceps* (T<sub>18</sub> =-2,436, p=0,025), (b) *Musca domestica* (T<sub>18</sub> =-2,025, p=0,058), (c) *Muscina stabulans* (T<sub>18</sub> =-3,428, p=0,003), (d) *Lucilia sericata* (T<sub>18</sub> =-2,388, p=0,028).



**Figura 7.** Resultado de la prueba de la t de Student en verano para (a) *Chrysomya albiceps* ( $T_{18} = -4,058$ ,  $p = 0,001$ ), (b) *Musca domestica* ( $T_{18} = -2,874$ ,  $p = 0,010$ ).

#### 4. DISCUSIÓN

Resulta de vital importancia conocer los ritmos de actividad de las principales especies de interés forense, para una correcta estimación del IPM, pues se tendrá información acerca de si las especies son activas durante las horas crepusculares y nocturnas. Muchos aspectos del comportamiento y la fisiología de los insectos funcionan controlados por relojes biológicos. Por ejemplo, los ritmos diarios de locomoción general u ovoposición, entre otros, pueden estar limitados a un determinado periodo del día o de la noche. Los insectos, como otros organismos, normalmente ajustan su actividad a un ritmo circadiano, que puede variar en función de numerosos factores, tanto endógenos como exógenos, como muestra SAUNDERS (2002).

En nuestro estudio no se ha constatado la existencia de actividad nocturna significativa de las especies de Calliphoridae y Muscidae consideradas, lo que conduce a suponer la posible ausencia de oviposición. Estos datos contrastan con los procedentes de otras zonas; por ejemplo, en EE.UU. GREENBERG (1990) KIRKPATRICK (2004) y SINGH & BARTHI (2001, 2008), en la India, refieren la capacidad de ciertas especies de califóridos y sarcófágidos normalmente utilizadas como indicadores forenses de efectuar puestas durante la noche en ambientes con iluminación artificial, aunque afirman que la probabilidad de oviposición o larviposición, así como el número de huevos o larvas puestos, es mucho más reducida que durante el día.

Por otro lado, los resultados aquí expuestos están en consonancia con los relativos a los ritmos circadianos de actividad referidos por otros autores, como PAYNE (1965) y MOHR, TOMBERLIN (2014), que refieren una brusca caída de la actividad después de la puesta del sol, o LEWIS, TAYLOR (1965), NORRIS (1966) o PYZA & CYMBOROWSKI (2001), que sugieren la inactividad nocturna de estos insectos. También coinciden con los resultados de este estudio los obtenidos por TESSMER *et al.* (1995), que no registraron ovoposición nocturna (21:00-05:00 h) a pesar de la existencia de iluminación, bien fuera natural o artificial, y de WOOLDRIDGE *et al.* (2007) en condiciones experimentales.

AMENDT *et al.* (2008) concluyen que, en condiciones naturales, la ovoposición nocturna, al menos en Europa Central, es muy improbable. No obstante, en condiciones experimentales, puede producirse ovoposición en ciertas circunstancias, por ejemplo si coinciden, en espacios cerrados, hembras grávidas y cadáveres de suficiente envergadura, que puedan resultar suficientemente atractivos. WOOLDRIDGE *et al.* (2007) sugieren que, aunque no se excluye la posibilidad de que ciertas especies (p.e. *Lucilia sericata*) puedan localizar un sustrato de puesta y poner huevos durante la noche, la probabilidad de que las hembras grávidas se dirijan activamente a un cadáver es relativamente baja, incluso en condiciones de cierta iluminación, como en noches de luna llena o en zonas urbanas iluminadas. Sin embargo,

la probabilidad de que las hembras grávidas se orienten activamente para oviponer sólo por estímulos olfativos, sin una fuente lumínica, parece relativamente baja, aunque se ha registrado oviposición nocturna en condiciones ambientales muy especiales, como baja presión atmosférica, gran iluminación y un mínimo de 26° C (KIRKPATRICK, 2004). Según todos estos autores, las capturas realizadas en la oscuridad se debieron, probablemente, a movimientos al azar, aunque eso no excluye la posibilidad de que puedan localizar restos, y oviponer en ellos, durante la noche.

En nuestro estudio, a partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que las especies de Diptera de mayor significación forense en etapas tempranas de la descomposición muestran un claro ritmo diario, manifestando netamente actividad durante las horas diurnas. De ello se puede concluir que la actividad nocturna de las especies consideradas es escasísima o nula, lo que, a efectos forenses prácticos, abundaría en la común asunción de la inexistencia de oviposición nocturna o su baja probabilidad, aunque no puede descartarse por completo.

No obstante, y dado que el planteamiento inicial de este estudio no iba únicamente dirigido a evaluar la actividad diaria de los Diptera, se hace necesario proseguir las investigaciones con un diseño y protocolo exclusivos, en los que la única variable a considerar sea el momento del día en que se efectúan las capturas, para ratificar los resultados de estos últimos años, determinar la eventual actividad nocturna de las especies de Diptera de interés forense en distintos ambientes de la misma área geográfica y conocer el comportamiento de dichas especies a lo largo de la noche para las distintas estaciones anuales.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. AMENDT J, ZEHNER R, RECKEL F. The Nocturnal Oviposition Behaviour of Blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Central Europe and its Forensic Implications. *Forensic Science International* 2008, 175:61-64.
2. ANDERSON GS. Factors that influence insect succession on Carrion. En: Byrd JH & Castner JL. *Forensic Entomology. The utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press. Boca Raton. 2010.
3. 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.
4. ARNALDOS SANABRIA MI. Estudio de la Fauna Sarcosaprófaga de la Región de Murcia. Su Aplicación a la Medicina Legal. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 2000.
5. BALRIDGE RS, WALLACE SG, KIRKPATRICK R. Investigation of nocturnal oviposition by necrophilous flies in Central Texas. *Journal of Forensic Science* 2006, 51:125-126.

6. BARRIENTOS JA (ed.). Curso práctico de Entomología. Asociación española de Entomología, CIBIO, Centro Iberoamericano de Biodiversidad, Universitat Autònoma de Barcelona Servei de Publicacions. 2004.
7. BATTÁN HORENSTEIN M, LINHARES AX, ROSSO DE FERRADAS B, GARCÍA D. Decomposition and dipteran succession in pig carrion in central Argentina: ecological aspects and their importance in forensic science. *Medical and Veterinary Entomology* 2010, 24:16-25.
8. BATTÁN HORENSTEIN M, ROSSO B, GARCÍA MD. Seasonal structure and dynamics of sarcosaprophagous fauna on pig carrion in a rural area of Cordoba (Argentina): Their importance in forensic science. *Forensic Science International* 2012, 217:146-156.
9. ERZINCLIOGLU Z. Blowflies. Slough: Richmond Publishing. 1996.
10. FARINHA A, DOURADO CG, CENTEIO N, OLIVEIRA AR, DIAS D, REBELO MT. Samll bait traps as accurate predictors of dipteran early colonizers in forensic studies. *Journal of Insect Science* 2014, 14 (77). Disponible online: <http://www.insectscience.org/14.77>
11. GAUDRY E. Species Identification in Forensic Entomology: a Targeted Work to Provide Appropriate Information. Proceedings of the sixth meeting of the EAFE: 9. 2008.
12. GENNARD DE. Forensic Entomology. An Introduction. John Wiley & Sons Ltd. 2007.
13. GONZÁLEZ MORA D. Los Calliphoridae de España, II: Calliphorini (Diptera). *Eos* 1989, 65(1):39-59.
14. GONZÁLEZ MORA D, PERIS SV. *Rhiniinae y Chrysomyinae* (Diptera). *Eos* 1988, 64(1):91-139.
15. GREENBERG B. Nocturnal Oviposition Behaviour of Blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 1990, 27(5):807-810.
16. GREGOR F, ROZKOŠNÝ R, BARTÁK M, VAŇHARA J: The Muscidae (Diptera) of Central Europe. *Folia Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis, Biologia* 2002, 107:1-280
17. HENSSGE CB, MADEA B, KNIGHT L, NOKES L, KROMPECHER T. The estimation of the time since death in the early post-mortem period. 2<sup>nd</sup> edition. Arnold. London UK. 2010
18. KIRKPATRICK RS. *Nocturnal Light and Temperature Influences on Necrophagous, Carrion-associating Blow Fly Species (Diptera: Calliphoridae) of Forensic importance in Central Texas*. Master of Science Thesis. Texas A&M University. 2004.
19. LEWIS T, TAYLOR LR. Diurnal Periodicity of Flight by insects. *Transactions of the Royal entomological Society of London* 1965, 116:393-476.
20. MESKIN I. Factors affecting the coexistence of blowflies (Diptera: Calliphoridae) on the Transvaal Highveld, South Africa. *South African Journal of Science* 1986, 82:244-250.
21. MOHR RM, TOMBERLIN JK. Environmental factors affecting early carcass attendance by four species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) in Texas. *Journal of Medical Entomology* 2014, 51(3):702-708.

22. MORRILL WL. Plastic Pitfall Trap. *Environmental Entomology* 1975, 4:596.
23. NORRIS KR. Daily Patterns of Flight Activity of Blowflies (Calliphoridae: Diptera) in the Canberra District as Indicated by Trap Catches. *Australian Journal of Zoology* 1966, 14:835-853.
24. NUORTEVA P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. En: TEDESCHI CG, ECKERT WG, TEDESCHI LG (eds.) *Forensic Medicine: A study in trauma and environmental hazards*. Vol III. WB Saunders Co. 1977.
25. ORDÓÑEZ A, GARCÍA MD, FAGUA G. Evaluation of Efficiency of Schoenly Trap for Collecting Adult Sarcosaprophagous Dipterans. *Journal of Medical Entomology* 2008, 45(3):522-532.
26. PAPP L, SCHUMANN H. 1.5 Key to families-adults. In: Papp, L & Darvas, B. *Contributions to a Manual of Palaearctic Diptera Vol 1* Budapest: Science Herald, 2000.
27. PAYNE JA. A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology* 1965, 46:592-602.
28. PERIS SV, GONZÁLEZ MORA D. Los Calliphoridae de España III. Luciliini (Diptera). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica.)* 1991, 87(1-4):187-207.
29. 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 (n.s.)* 2011a, 47(1-2):128-139.
30. PRADO E CASTRO C, ARNALDOS MI, SOUSA JP, GARCÍA MD. Preliminary study on a community of sarcosaprophagous Diptera in Central Portugal. *Entomologia Generalis* 2011b, 33(3):183-198.
31. 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(4): 417-31.
32. PYZA E, CYMBOROWSKI B. Circadian Rhythms in Behaviour and in the Visual System of the Blow Fly, *Calliphora vicina*. *Journal of Insect Physiology* 2001, 47:897-904.
33. REIBE S, DOETINCHEM PhV, MADEA B. A new simulation based model for calculating post-mortem intervals using developmental data for *Lucilia sericata* (Dipt.: Calliphoridae). *Parasitology Research* 2010, 107:9-16.
34. REIBE S, MADEA B. Use of *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae) for post-mortem interval estimation indoors. *Parasitology Research* 2010a, 106:637-640.
35. REIBE S, MADEA B. How promptly do blowflies colonise fresh carcasses? A study comparing indoor with outdoor locations. *Forensic Science International*, 2010b, 195:52-57.
36. SAUNDERS DS. *Insect clocks*. Third edition. Elsevier. 2002.
37. SCHOENLY K, GRIEST K, RHINE S. An Experimental Field Protocol for Investigating the Postmortem Interval Using Multidisciplinary Indicators. *Journal of Forensic Sciences* 1991, 36(5):1395-1415.

38. SINGH D, BARTHI M. Further Observations on the Nocturnal Oviposition Behaviour of Blow Flies (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International* 2001, 120:124-126.
39. SINGH D, BARTHI M. Some notes on the nocturnal larviposition by two species of *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae). *Forensic Science International* 2008, 177:e19-e20.
40. TESSMER JW, MEEK CL, WRIGHT VL. Circadian Patterns of Oviposition by Necrophilous Flies (Diptera: Calliphoridae) in Southern Louisiana. *Southwestern Entomologist* 1995, 20(4):665-669.
41. VASCONCELOS SD, CRUZ TM, SALGADO RL, THYSSEN PJ. 2013. Dipterans associated with a decomposing animal carcass in a rainforest fragment in Brazil: Notes on the early arrival and colonization by necrophagous species. *Journal of Insect Science* 13:145. Available online: <http://www.insectscience.org/13.145>
42. WELLS JD, LAMOTTE LR. Estimating the postmortem interval. En: Byrd JH & Castner JL. *Forensic Entomology. The utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press. Boca Raton. 2010.
43. WOOLDRIDGE J, SCRASE L, WALL R. Flight Activity of the Blowflies, *Calliphora vomitoria* and *Lucilia sericata*, in the dark. *Forensic Science International* 2007, 172:94-97.



**DESARROLLO A DISTINTAS TEMPERATURAS  
DE *NASONIA VITRIPENNIS* (HYMENOPTERA:  
PTEROMALIDAE) EN *CALLIPHORA VICINA*  
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE) Y SU USO POTENCIAL  
EN ENTOMOLOGÍA FORENSE**

AILANDER URTIAGA VILLEGAS<sup>1</sup>  
MARTA INÉS SALOÑA-BORDAS<sup>1</sup>

**Resumen:** Se presentan datos pioneros sobre el desarrollo de la avispa parasitoide *Nasonia vitripennis* en condiciones controladas de laboratorio. Para ello, fueron expuestas fases preimaginales de distintas edades de *Calliphora vicina* a adultos de *Nasonia vitripennis* e incubadas a distintas temperaturas ambientales. En aquellas fases previas a la pupa de 6 horas de edad no se detectó ovoposición por parte de *N. vitripennis*. En las pupas de entre 24 y 36 horas de edad, los tiempos de desarrollo para completar el ciclo fueron de 363.28 ( $\pm 9,36$ ), 334.7 ( $\pm 3,06$ ), 313.6 ( $\pm 0,84$ ) y 300.3 ( $\pm 11,62$ ) horas a 25.8 ( $\pm 1,06$ ), 26.95 ( $\pm 0,72$ ), 27.87 ( $\pm 0,58$ ) y 28,5 ( $\pm 0,84$ )°C (media  $\pm$  desviación estándar) respectivamente. La relación entre el ratio de desarrollo y la temperatura fue lineal, dando como resultado una temperatura basal teórica estimada de 13°C. El acúmulo de grados-hora (AGH) estimado para completar el ciclo para *N. vitripennis* fue de 4655,75  $\pm$  160,15 (media  $\pm$  desviación estándar). Los resultados obtenidos aportan una herramienta fundamental para el empleo de esta especie en la estimación del intervalo *postmortem* en regiones biogeográficas similares.

**Palabras clave:** Entomología forense, *Nasonia vitripennis*, desarrollo, parasitoide, intervalo *post-mortem*.

---

<sup>1</sup> 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.

ailanderurtiaga@gmail.com, m.salona@ehu.es

**Abstract:** Pioneer data about the development of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* under laboratory conditions are exposed. Preimaginal stages of different ages of *Calliphora vicina* were exposed to adults of *Nasonia vitripennis* and reared at different environmental temperatures. We didn't detect *N. vitripennis* oviposition in those stages previous to the 6 hours old pupae. In 24-36 hours old pupae, the development times were 363.28 ( $\pm 9,36$ ), 334.7 ( $\pm 3,06$ ), 313.6 ( $\pm 0,84$ ) and 300.3 ( $\pm 11,62$ ) hours when reared at 25.8 ( $\pm 1,06$ ), 26.95 ( $\pm 0,72$ ), 27.87 ( $\pm 0,58$ ) and 28,5 ( $\pm 0,84$ )°C (mean  $\pm$  SD) respectively. The relationship between the development rate and the temperature was linear, providing a theoretical lower threshold development temperature of 13°C. The Accumulated Degree-Hours for completing the life cycle for *N. vitripennis* was 4655,75  $\pm$  160,15 (mean  $\pm$  SD). These results give a basic tool for the use of this species in the estimation of the *post-mortem* interval in similar biogeographical areas.

**Key words:** Forensic entomology, *Nasonia vitripennis*, development, parasitoid, *post-mortem* interval.

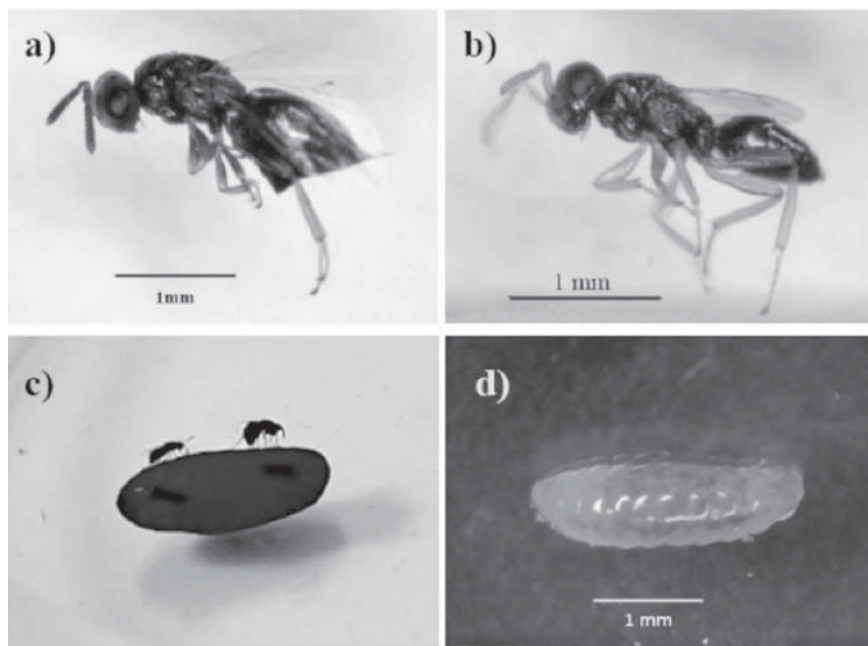
## 1. INTRODUCCIÓN

La entomología forense es la aplicación del conocimiento sobre los insectos y otros grupos de artrópodos en materias criminales y judiciales (HALL, 2001). Su aportación más destacada a la ciencia forense consiste en la estimación de un tiempo mínimo desde la defunción hasta el hallazgo de un cadáver. Dicho periodo se conoce como *Intervalo Postmortem* (IPM). La estimación del IPM puede basarse en el cálculo del tiempo mínimo necesario para la formación y el desarrollo de la entomofauna asociada al cadáver en ausencia de otras evidencias físico-químicas.

Los dos métodos principales para el cálculo del IPM en restos cadavéricos mediante el uso de evidencias entomológicas se basan en la composición de la comunidad de artrópodos y en la edad de los insectos presentes.

Para el cálculo del IPM a partir de la estructura de la comunidad de artrópodos, se identifican las distintas especies presentes en el entorno del cadáver y se comparan con datos de regiones biogeográficas y condiciones ambientales similares (GRASSBERGER & FRANK, 2004). Esto permite estimar una franja de tiempo en la cual la comunidad de artrópodos hallada está presente por norma general en los restos cadavéricos.

La edad de los insectos recogidos en el cadáver puede calcularse determinando la tasa de desarrollo de los insectos más antiguos y estimando el tiempo mínimo necesario para llegar a dicho estado de desarrollo. Para llevar a cabo un cálculo preciso de la edad de los insectos presentes en un cadáver, es imprescindible conocer las condiciones ambientales en las que este se ha encontrado (HIGLEY & HASKELL, 2001). Entre las variables climá-



**Figura 1:** *Nasonia vitripennis*. a) Hembra adulta. b) Macho adulto. c) Hembras adultas taladrando una pupa de *Calliphora vicina*. d) Larva de la avispa extraída del pupario del hospedador.

ticas a tener en cuenta, la temperatura es una de las más estudiadas dado que juega un papel crucial en el desarrollo de las distintas especies de artrópodos. Al tratarse de animales ectotermos, su temperatura interna está determinada por la ambiental, y ésta afecta directamente a su velocidad de desarrollo.

Los dípteros pertenecientes a las familias Calliphoridae y Sarcophagidae suelen ser los primeros en colonizar los cadáveres. De estos, *Calliphora vicina* es una de las primeras en aparecer, y se trata de la especie más abundante, encontrándose tanto en zonas urbanas como rurales de la comunidad autónoma del País Vasco (SALOÑA *et al.*, 2009) y ha sido, por ello, una de las más estudiadas hasta la fecha.

Por su parte, *Nasonia vitripennis* es una pequeña avispa parasitoide de distribución mundial perteneciente a la familia Pteromalidae. Los adultos miden entre 2 y 3 mm, y poseen una coloración negra metálica en el cuerpo y anaranjada en las extremidades. La hembra es ligeramente mayor que el macho y posee unas alas y un abdomen más desarrollados (Figura 1). *N. vitripennis* ovoposita en las fases inmaduras de distintas especies de dípteros, especialmente en miembros de las familias Calliphoridae, Muscidae y Sar-

cophagidae (WHITING, 1967). Cuando las hembras localizan una pupa de díptero apta para la ovoposición, taladran la cutícula, inyectan una sustancia que paraliza o mata al hospedador y colocan sus huevos en su interior. Dentro del hospedador, las fases inmaduras de la avispa se alimentan de los restos fluidos del insecto infestado y se desarrollan hasta alcanzar la fase adulta, momento en el que agujerean la pupa del díptero con sus mandíbulas y emergen para reiniciar el ciclo (BRODEUR & BOIVIN, 2004). En función de la especie del hospedador, el tamaño de la pupa, el periodo de exposición al parasitoide y el número de avispas ovopositando en la misma pupa, hasta 60 avispas pueden desarrollarse en la misma pupa.

Al igual que otros himenópteros, *Nasonia vitripennis* es haplodiploide. Esto significa que la determinación sexual está basada en la dotación cromosómica, siendo los machos haploides y las hembras diploides. Los machos de esta especie nacen de huevos sin fertilizar y las hembras de huevos fertilizados. Este hecho permite que las hembras puedan dar lugar a una progenie masculina sin haber realizado cópula alguna. Este fenómeno también es conocido como partenogénesis haploide.

En consecuencia, *Nasonia vitripennis* posee una serie de cualidades que la convierten en un organismo muy apropiado para trabajos de laboratorio. Es pequeña y manejable; no supone ninguna amenaza para el ser humano; pese a que las hembras son capaces de volar, no suelen hacerlo y prefieren desplazarse andando o a saltos; resulta fácil diferenciar los machos de las hembras; tiene un ciclo vital relativamente corto; su mantenimiento es muy barato y, gracias a la haplodiploidía las hembras pueden dar lugar a descendencia sin necesidad de machos o de cópula, permitiendo incluso la obtención de líneas de hembras genéticamente idénticas (WERREN, 2003).

Además, mientras se encuentran en la pupa del hospedador, las larvas de *N. vitripennis* al ser sometidas a fotoperiodos breves y bajas temperaturas pueden entrar en diapausa y ser conservadas durante dos años a temperaturas entre 2 y 8°C (BERTOSSA *et al.*, 2010).

Dado su fácil manejo y lo interesante de su ciclo biológico, *Nasonia vitripennis* ha sido ampliamente utilizada en estudios de genética, siendo una especie modelo dentro del orden Hymenoptera para este tipo de investigación. Ha sido empleada en estudios de genética básica (SAUL & LI, 1989), genética molecular (MCALLISTER & WERREN, 1997) y genética evolutiva (LOEHLIN *et al.*, 2010).

Como *N. vitripennis* ataca a muchas especies de dípteros que causan daños económicos en el sector ganadero y agrícola, esta avispa tiene un interés especial para el control biológico de plagas (RUTZ & WATSON, 1998). Al tratarse de un insecto cosmopolita y generalista, su uso no representa una amenaza para la biodiversidad, y permite evitar toda la problemática asociada a los pesticidas químicos. Es por ello que adultos y pupas que contienen fases inmaduras de *N. vitripennis* se ofertan por diversas empresas para este fin.

En entomología forense, al parasitar a especies necrófagas de dípteros, *Nasonia vitripennis* posee un interés añadido. Esta avispa pone sus huevos en las pupas de los principales grupos de dípteros presentes en restos cadavéricos. Asimismo, se ha demostrado que su presencia modifica el comportamiento de las larvas necrófagas de distintas especies de dípteros (REIGADA & GODOY, 2012). Como su tiempo de desarrollo total es mayor que el de la mayoría de sus hospedadores, es frecuente hallar pupas que contienen fases inmaduras de *N. vitripennis* una vez que el resto de dípteros no infestados han abandonado el pupario. Este hecho la convierte en una candidata interesante para el cálculo del intervalo *postmortem* (IPM) en aquellos casos en los que los dípteros hayan completado su ciclo y abandonado el área de inspección, o bien para obtener una mayor precisión. Sin embargo, para el empleo adecuado de *N. vitripennis* en la estimación del IPM, es imprescindible conocer más acerca de su biología y de su desarrollo en distintas condiciones ambientales (GRASSBERGER & FRANK, 2003).

Uno de los factores más importantes para estudiar el desarrollo de *N. vitripennis* es determinar a partir de qué momento en el desarrollo del hospedador es capaz de darse la ovoposición. Las fuentes consultadas especifican que la ovoposición no puede darse hasta que el hospedador se encuentra en fase de pupa y lleva, al menos, en torno a 24 horas en esa fase (WHITING, 1967). Sin embargo, en estudios previos se observó una actividad similar a la ovoposición en adultos de este parasitoide sobre larvas migratorias de *Calliphora vicina*, lo cual podría indicar que la ovoposición también se pueda dar en fase larvaria. Dado que este hecho podría alterar los cálculos del desarrollo de ambas especies implicadas, en este estudio se tratará de determinar si se puede dar la ovoposición por parte de *N. vitripennis* en fases inmaduras previas a la pupa de 24 horas de edad de *C. vicina* y, de ser así, comprobar si afecta a los tiempos de desarrollo. Asimismo, dado que no se han realizado hasta la fecha estudios con *C. vicina* como hospedador, también se realizaron experimentos para determinar los tiempos de desarrollo a distintas temperaturas y determinar así sus constantes térmicas, con el objeto de posibilitar el uso de esta especie en la estimación del IPM.

## OBJETIVOS

Sobre la base de las premisas anteriormente expuestas, se propusieron los próximos objetivos:

- Comprobar si *N. vitripennis* es capaz de ovopositar en las distintas fases larvarias de *C. vicina* y en pupas menores de 6 horas de edad y, de ser así, determinar su efecto sobre su desarrollo.
- Determinar los tiempos de desarrollo de *N. vitripennis* a distintas temperaturas.
- Estimar la temperatura basal para el desarrollo de *N. vitripennis* en *C. vicina*.

- Calcular el acúmulo de grados hora necesarios para completar el ciclo vital.
- Valorar el uso potencial de *N. vitripennis* para el cálculo del intervalo *postmortem*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS

Para la obtención de adultos de *Nasonia vitripennis* con los que iniciar una colonia permanente en el laboratorio, 30 pupas de entre 24 y 48 horas de edad de *Calliphora vicina* fueron colocadas a primeros de mayo de 2012 en las inmediaciones de restos cadavéricos de corzo expuestos en un entorno boscoso cercano a la Facultad de Bellas Artes del campus de Bizkaia (Leioa) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Dos semanas después se dio la emergencia de adultos de himenópteros en el laboratorio que fueron identificados como *Nasonia vitripennis* (BOUCEK & RASPLUS, 1991; RUEDA & AXTELL, 1985).

Para el establecimiento de una población de *Nasonia vitripennis* en el laboratorio, los adultos obtenidos de las pupas fueron ubicados en una cámara de cría Vötsch (VCL 4003). En dicha cámara se proporcionó agua junto con una disolución de agua y miel al 50% *ad libitum*. El agua se ofreció en tubos de ensayo de 7,5 ml tapados con algodón, y la mezcla de agua y miel se suministró sobre discos de papel colocados en placas Petri. Para la renovación de la colonia, 12 nuevas pupas de *C. vicina* de unas 24 horas de edad fueron ofrecidas en la cámara cada semana.

Las fases inmaduras de *C. vicina* se obtuvieron a partir de un cultivo que es mantenido en el laboratorio de entomología forense del departamento de Zoología y Biología Celular Animal de la Universidad del País Vasco. Estas moscas se encuentran en una jaula de 50 x 50 x 50 cm en las que se les suministra agua y una mezcla de azúcar y leche en polvo *ad libitum*. Para la obtención de huevos, a las moscas se les ofrecieron fragmentos de víscera de cerdo sobre los que ovopositaron. La víscera con los huevos fue después transferida a la cámara de cría en la que éstos se desarrollaron, sobre una base de vermiculita como sustrato que facilita un entorno adecuado para la posterior pupación. Para la obtención de pupas, se separaron aquellos individuos que acababan de entrar en fase de pupa, anotando la fecha y la hora exacta del ingreso en esta fase con el objeto de tener debidamente datadas las pupas de edades concretas para los ensayos.

### EXPERIMENTOS DE OVOPOSICIÓN

Para los ensayos de desarrollo, se ofrecieron 12 pupas de *Calliphora vicina* a la población de *Nasonia vitripennis* por cada experimento. Estas pupas fue-

ron expuestas durante distintos periodos, que oscilaron entre una y diez horas, tras los cuales fueron transportadas a tres habitaciones con temperaturas distintas o a la cámara climática modelo Vötsch VCL 4003. La temperatura y la humedad se registraron cada hora mediante un Datalogger Escort RH. En todos los ensayos la humedad relativa fluctuó entre el 60 y el 70% con un fotoperiodo diario de 14 horas de sol por 10 horas de oscuridad aproximadamente.

En los experimentos llevados a cabo para demostrar si se podía dar la ovoposición por parte de *N. vitripennis* y completar el desarrollo en fases inmaduras de *C. vicina* previas a la pupa de más de 24 horas de edad, se ofrecieron a la población de avispas 12 larvas del hospedador en segundo instar, 12 larvas en tercer instar, 12 larvas en fase migratoria y 12 pupas de entre 2 y 6 horas de edad. El periodo de exposición a las avispas para la ovoposición fue de 2 horas. Durante este tiempo, las fases inmaduras de *C. vicina* fueron observadas y fotografiadas para constatar la posible interacción entre las avispas y las larvas o pupas jóvenes. Todos los insectos expuestos a las avispas en este experimento fueron transferidos individualmente a tubos de 7,5 ml y se introdujeron en la cámara climática a una temperatura media de 27,87°C.

En los ensayos para determinar el tiempo de desarrollo, se emplearon cuatro grupos de 12 pupas de entre 24 y 36 horas de edad. Tras la exposición a las avispas, tres de estos grupos fueron colocados cada uno en una habitación a una temperatura ambiente concreta y una en la cámara. Para uno de los grupos de las temperaturas ambiente (el que se desarrolló a 26,95°C) y para el grupo en la cámara climática, el periodo de exposición a los parasitoides fue de una hora. Para las otras dos se emplearon periodos de exposición de dos (el que se desarrolló a 25,8°C) y diez horas (el que se desarrolló a 28,5°C).

Tras la ovoposición los cultivos fueron vigilados periódicamente, especialmente los días cercanos a la emergencia, estimados mediante observaciones previas contrastadas con los datos de GRASSBERGER & FRANK (2003). Durante los días previos a la emergencia y mientras esta se dio, los cultivos fueron vigilados cada hora las 24 horas del día. La hora exacta de emergencia de cada individuo fue registrada para cada experimento.

Posteriormente, se calculó el tiempo en horas empleado para completar el desarrollo de cada individuo, registrando la temperatura media a la que se ha dado éste. Con dichos datos se calculó un tiempo medio para completar el ciclo biológico para cada temperatura. A partir de este tiempo de desarrollo se obtuvo el ratio de desarrollo para cada temperatura según el siguiente índice,

$$\text{Ratio de desarrollo} = 1/\text{Tiempo de desarrollo (días)}$$

Con los ratios calculados, se realizó una gráfica cuya regresión lineal permitió la estimación teórica de la temperatura por debajo de la cual no hay desarrollo, es decir, la temperatura basal.

Una vez estimada la temperatura basal, se efectuó el cálculo del Acúmulo de Grados Hora (AGH) necesarios para completar el desarrollo total para *Nasonia vitripennis* restando dicha temperatura a la temperatura media de desarrollo y multiplicándola por el tiempo de desarrollo en horas de cada individuo.

$$AGH = \text{Tiempo de desarrollo} \times (T^a \text{ media} - T^a \text{ Basal})$$

### 3. RESULTADOS

#### OVOPOSICIÓN EN FASES PREVIAS A LA PUPA DE 24 HORAS DE EDAD

Durante los períodos de exposición de las fases larvianas, se observó actividad por parte de *Nasonia vitripennis* sobre las larvas, subiéndose numerosas avispas al lomo de las larvas y colocando el abdomen en una posición similar a la que muestran cuando ovopositan sobre las pupas (Figuras 1c, 2). Este comportamiento se observó tanto sobre las larvas de segundo como las de tercer instar y también sobre aquellas en fase migratoria.



**Figura 2:** Hembras de *Nasonia vitripennis* sobre larvas en tercer instar aún alimentándose (arriba) y en fase migratoria (abajo) de *Calliphora vicina*.



**Tabla 1:** Resultados de la exposición de fases inmaduras de *Calliphora vicina* previas a pupas de 24 horas a *Nasonia vitripennis*. (L2: Larva en segundo instar. L3: Larva en tercer instar, LM: Larva migratoria, P 2-6h: Pupa de entre dos y seis horas de edad).

| INDIVIDUOS OFRECIDOS | FASE    | TIEMPO DE EXPOSICIÓN | AVISPAS EMERGIDAS |
|----------------------|---------|----------------------|-------------------|
| 12                   | L2      | 2h                   | 0                 |
| 12                   | L3      | 2h                   | 0                 |
| 12                   | LM      | 2h                   | 0                 |
| 12                   | P 2-6 h | 2h                   | 0                 |

#### DESARROLLO A TEMPERATURAS VARIABLES

El intervalo de ovoposición tuvo un efecto directo en la cantidad de adultos de avispa que emergieron de una sola pupa de *Calliphora vicina* y en la proporción de pupas en las que se confirmó la ovoposición. Los grupos de 12 pupas de *C. vicina* que fueron expuestas a avispas cuando tenían de 24 a 36 horas de edad, se desarrollaron a  $25,8 \pm 1,06$ ,  $26,95 \pm 0,72$ ,  $27,87 \pm 0,58$  y  $28,5 \pm 0,84^\circ\text{C}$  (media  $\pm$  desviación estándar). Los tiempos para completar el desarrollo de *Nasonia vitripennis* a dichas temperaturas fueron de 363,28 ( $\pm 9,36$ ), 334,7 ( $\pm 3,06$ ), 313,6 ( $\pm 0,84$ ), y 300,3 ( $\pm 11,62$ ) horas respectivamente (media  $\pm$  desviación estándar) (Tabla 2). Se observó una relación lineal entre la temperatura y el tiempo de desarrollo medio (Figura 3).

**Tabla 2:** Tiempos de desarrollo y ratio de desarrollo de *Nasonia vitripennis* a las distintas temperaturas, habiéndose dado la ovoposición en pupas de *Calliphora vicina* de entre 24 y 36 horas de edad. Entre paréntesis aparecen las desviaciones estándar para la temperatura media y el tiempo de desarrollo medio.

| Tª MEDIA          | PUPAS OFRECIDAS | PUPAS DE LAS QUE HAN EMERGIDO AVISPAS | TIEMPO DE EXPOSICIÓN | NÚMERO DE AVISPAS EMERGIDAS | TIEMPO DE DESARROLLO MEDIO | RATIO DE DESARROLLO (1/DÍAS) |
|-------------------|-----------------|---------------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 28,5°C<br>(0,84)  | 12              | 10                                    | 10 h                 | 254                         | 300,3 h<br>(11,62)         | 0,0799                       |
| 27,87°C<br>(0,58) | 12              | 4                                     | 1 h                  | 25                          | 313,6 h<br>(0,84)          | 0,0765                       |
| 26,95°C<br>(0,72) | 12              | 4                                     | 1 h                  | 27                          | 334,7 h<br>(3,06)          | 0,0717                       |
| 25,8°C<br>(1,06)  | 12              | 6                                     | 2 h                  | 42                          | 363,28 h<br>(9,36)         | 0,0661                       |

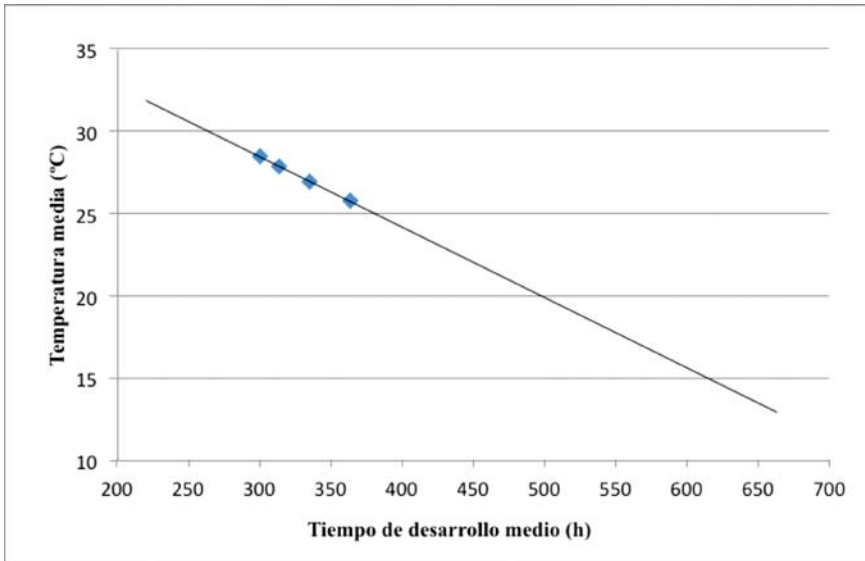


Figura 3: Relación entre la temperatura media y el tiempo de desarrollo medio.

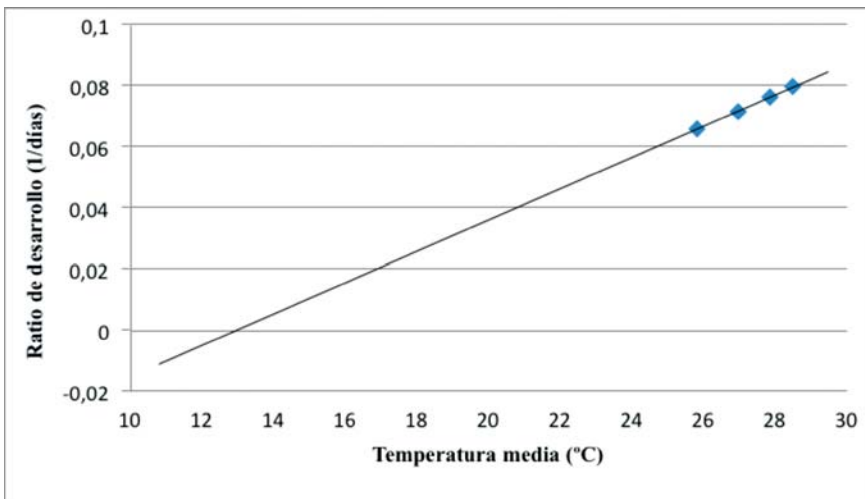


Figura 4: Relación entre el ratio de desarrollo y la temperatura media. A 13°C el ratio de desarrollo es nulo, por lo que se estima como el valor de temperatura basal para *Nasonia vitripennis*.

Para las temperaturas ambientales medias de 25.8, 26.95, 27.87 y 28,5°C los ratios de desarrollo fueron de 0.0799, 0.0765, 0.0717 y 0.0661 respectivamente. Se comprobó que había una relación directa entre el ratio de desarrollo y la temperatura media, con un  $R^2$  de 0,9996 (Figura 4). A partir de esta relación se estimó una temperatura basal de 13°C que deberá ser testada en futuros ensayos.

El AGH fue de  $4655,75 \pm 160,15$  grados/hora (media  $\pm$  desviación estándar) para completar el ciclo, desde la ovoposición hasta la emergencia del adulto del pupario de *C. vicina*.

#### 4. DISCUSIÓN

Pese a que se constató la actividad por parte de *Nasonia vitripennis* sobre las larvas de *Calliphora vicina*, tras la exposición y su incubación no se dio emergencia alguna de avispas. La ausencia de *Nasonia vitripennis* en éstas se comprobó disecando las pupas, confirmando que no se había dado la ovoposición. Esto es probablemente debido a que *Nasonia vitripennis* no puede perforar la cutícula de las larvas hasta que ésta se ha separado de la epidermis tras la formación del pupario (WHITING, 1967), la cual se da en torno a las 24 horas después de la pupación en *Calliphora vicina* (FRAENKEL & BHASKERAN, 1973). Este hecho explica también por qué no se detectó ovoposición en las pupas de entre 2 y 6 horas de edad.

La actividad registrada sobre las larvas de *Calliphora vicina* puede tratarse de una forma de depredación. Cuando se da la ovoposición por parte de *N. vitripennis* en pupas de díptero, a menudo la avispa también forma un tubo alimenticio del que se alimenta de la hemolinfa de la pupa (WHITING, 1967). Es muy probable que este mismo comportamiento sea el que se observó sobre las larvas en los experimentos realizados; es decir, que las avispas realicen pequeños orificios en la cutícula de la larva y se alimenten de su hemolinfa. Esta posibilidad se sustenta en el propio comportamiento de la avispa, la cual es capaz de localizar con eficiencia restos cadavéricos relativamente frescos en los que los dípteros necrófagos depositan sus huevos, y esperan durante semanas en ese lugar hasta que las larvas realizan la pupación. Durante este tiempo, resulta verosímil que *N. vitripennis* pueda alimentarse de la hemolinfa de las larvas presentes. Tal vez estribe en esta actividad de depredación el origen del efecto en el comportamiento que se da en las larvas necrófagas de numerosas especies de Calliphoridae expuestas a *N. vitripennis* y a otros parasitoides (REIGADA & GODOY, 2012).

En otros ensayos con parasitoides, los tiempos de exposición fueron considerablemente mayores (cf. GRASSBERGER & FRANK, 2003, BARBOSA *et al.*, 2008, SCHNEIDERMAN & HORWITZ, 1957, CARDOSO & MILWARD DE AZEVEDO, 1996, MELLO & AGUIAR-COELHO, 2009). En este ensayo en particular, uno de los objetivos era la precisión, por lo que conocer con exacti-

tud la hora en la que se dio la ovoposición resultaba imprescindible. Sin embargo, este hecho hace que la proporción de pupas ofrecidas en las que se da la ovoposición y la cantidad de huevos depositados sea menor. No obstante, también ha proporcionado una precisión mayor en los resultados, con una desviación mucho menor. La relación entre la temperatura y el tiempo necesario para completar el ciclo vital de *Nasonia vitripennis* ha sido lineal, lo que significa que con los resultados obtenidos sería posible estimar el tiempo de desarrollo necesario a otras temperaturas. Asimismo, la relación entre la temperatura y el ratio de desarrollo también son lineales, lo cual hace que el Acúmulo de Grados Hora total obtenido para completar el ciclo en esta especie goce de bastante precisión. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que las temperaturas en las que se ha realizado el estudio han oscilado entre 25 y 30°C, con lo que no disponemos de datos de temperaturas menores, más cercanas a la basal, lo cual podría arrojar mayores diferencias. De la misma forma, tampoco se ha considerado el efecto del multiparasitismo, es decir, que más de una avispa parasitoide pueda ovopositar en una misma pupa, lo que podría llevar a alteraciones en los tiempos de desarrollo (GRILLENBERGER *et al.*, 2009), ni de la posible influencia de otras larvas competidoras o de sus depredadores en el entorno. Pese a todo, los efectos del multiparasitismo se basan en la superpoblación de la pupa del hospedador por el número de avispas desarrollándose en ella, cosa que la brevedad de los periodos de exposición del presente estudio minimizan en gran medida, dado que las puestas no han sido tan abundantes (MELLO & AGUIAR-COELHO, 2010).

Los tiempos de desarrollo obtenidos en el presente estudio difieren con los obtenidos en estudios previos; así, GRASSBERGER & FRANK (2004) empleando como hospedador a *Protophormia terranova* obtuvieron unos tiempos de desarrollo de 355 horas a 25°C, mientras que el tiempo de desarrollo a dicha temperatura del presente estudio sería de 381 horas. A esa misma temperatura de 25°C, SCHNEIDERMAN & HORWITZ (1957) obtuvieron un tiempo de 336 horas, empleando a *Sarcophaga bullata* como hospedador. Por otra parte, BARBOSA *et al.*, (2008) empleando como hospedador a *Cochliomyia macellaria* obtuvieron unos resultados similares a los presentes, tardando *N. vitripennis* una media de 336 horas en completar su desarrollo a 27°C, frente a 334 horas de este estudio. Con *Chrysomya albiceps* como hospedador, CARDOSO & MILWARD DE AZEVEDO (1996) estiman 300 horas para completar el ciclo a 26-30°C, rango de temperaturas que correspondería con un intervalo de 264 y 353 horas empleando los resultados del presente estudio. Por último, trabajando con pupas de *Chrysomya megacephala* MELLO & AGUIAR-COELHO (2009) proponen 347 horas a 26,2°C, frente a 353 del presente estudio a la misma temperatura (Tabla 3). Por ello, a la hora de comparar los resultados, es importante tener en cuenta que el resto de estudios han sido realizados empleando especies de hospedadores distintas y en regiones biogeográficas diferentes.

**Tabla 3:** Comparación de los resultados de los distintos estudios de desarrollo de *Nasonia vitripennis* con los del presente estudio, especificando los autores, el lugar donde se llevó a cabo el estudio, el hospedador empleado, la temperatura media a la que se dio el desarrollo, los tiempos de desarrollos de dichos estudios y el tiempo de desarrollo estimado para el presente estudio a dichas temperaturas

| AUTOR                               | LUGAR          | HOSPEDADOR                     | TEMP.   | TIEMPO DE DESARROLLO | TIEMPO DE DESARROLLO DEL PRESENTE ESTUDIO |
|-------------------------------------|----------------|--------------------------------|---------|----------------------|---|
| Grassberger & Frank (2003)          | Austria        | <i>Protophormia terranovae</i> | 25°C    | 355 h                | 381 h                                     |
| Schneiderman & Horwitzf (1957)      | Nueva York     | <i>Sarcophaga bullata</i>      | 25°C    | 336 h                | 381 h                                     |
| Cardoso & Milward de Azevedo (1996) | Rio de Janeiro | <i>Chrysomya megacephala</i>   | 26-30°C | 300 h                | 264-353 h                                 |
| Barbosa <i>et al.</i> (2008)        | Rio de Janeiro | <i>Chrysomya albiceps</i>      | 27°C    | 336 h                | 334 h                                     |
| Mello & Aguiar-Coelho (2009)        | Sao Paulo      | <i>Chrysomya megacephala</i>   | 26,2°C  | 347h                 | -   |

Un punto importante a considerar es el efecto de la especie empleada como hospedadora en el desarrollo de *N. vitripennis*. Ciertos estudios han demostrado que este parasitoide muestra distintas preferencias por uno u otros hospedadores (DESJARDINS *et al.*, 2010), pero falta determinar si esto afecta en su desarrollo. Los resultados de tiempos de desarrollo de este estudio y los citados para estudios previos, parecen sugerir que sí existen diferencias. No obstante, los estudios antes mencionados también fueron realizados en zonas biogeográficas muy diferentes y con poblaciones de *N. vitripennis* distintas.

La temperatura basal teórica obtenida a partir de la regresión lineal de la relación entre la temperatura y el ratio de desarrollo ha sido 13°C. Esta temperatura es ligeramente superior a los 10°C obtenidos por GRASSBERGER & FRANK (2003). Esto puede ser debido a que ellos emplearon como hospedador a *Protophormia terranovae*, una especie propia del centro y norte de Europa, en lugar de *Calliphora vicina*, pero también puede ser debido a las diferencias entre poblaciones procedentes de regiones biogeográficas distintas, ya que al estar los ensayos de GRASSBERGER & FRANK (*op. cit.*) realizados con poblaciones de *N. vitripennis* del centro de Europa es posible que estas se encuentren adaptadas a temperaturas menores. Esto acentúa la importancia de realizar estudios en zonas biogeográficas distintas (ARNALDOS, 2006) y próximas al área de aplicación de los resultados.

El único estudio que estima el Acúmulo de Grados Hora necesarios para completar el ciclo para *Nasonia vitripennis* hasta la fecha ha sido el aportado por GRASSBERGER & FRANK (2003). Según dicho estudio, el AGH necesario para completar el ciclo de *N. vitripennis* es de 5383,6. Este número dista mucho de los 4655,75 obtenidos en el presente trabajo, lo cual puede atribuirse principalmente a la diferencia entre la temperatura basal de 10°C calculada por GRASSBERGER & FRANK y la de 13°C obtenida en el presente estudio. Una vez más, el hecho de haber trabajado con hospedadores distintos y con poblaciones de regiones biogeográficas distintas puede ser otra causa asociable a esta diferencia.

En teoría, *Nasonia vitripennis* podría ser empleada en el cálculo del IPM en aquellos casos en los que se encuentren pupas que contengan fases inmaduras de esta avispa, y su utilidad sería mayor en aquellos casos en los que las especies de moscas necrófagas que utiliza como hospedadoras ya hayan emergido del pupario. Pero, a la hora de valorar el uso potencial de *Nasonia vitripennis* en el cálculo del IPM debemos tener en cuenta primero algunas limitaciones. Para empezar, cuando un parasitoide se desarrolla en un hospedador, lo mata en el proceso. Esto puede dificultar la identificación específica del hospedador, y la comparación de éste y otros estudios parece sugerir que la especie del hospedador puede influir en el tiempo de desarrollo del parasitoide. Por otra parte, dado que *N. vitripennis* puede ovopositar sobre pupas de avanzada edad, su uso está limitado principalmente al tiempo de desarrollo mínimo, siendo ineficaz a la hora de estimar un límite superior. Pese a todo, en determinadas ocasiones es posible identificar al hospedador mediante las piezas bucales larvarias que quedan en el pupario o mediante técnicas moleculares (AMES *et al.*, 2006). Será entonces cuando obtengamos la mayor precisión empleando el conocimiento adquirido para ambas especies en un cálculo más preciso del IPM.

Los resultados de este trabajo podrían ser empleados en aquellos casos en los que se hallen restos cadavéricos con pupas de *Calliphora vicina* parasitadas por *Nasonia vitripennis* en zonas biogeográficas y con condiciones climáticas similares a las empleadas en este estudio. Para ello, sería fundamental que las pupas fueran individualizadas antes de ser transportadas al laboratorio, y una vez en éste, colocadas a temperaturas controladas hasta registrar la emergencia de los adultos con la mayor precisión posible. Estos adultos y sus hospedadores deberían ser identificados correctamente a nivel de especie, dado que toda identificación errónea puede conllevar que se acumulen errores por extrapolación. La diferencia entre el AGH obtenido en el laboratorio y el necesario para completar el desarrollo permitiría estimar el tiempo de actividad del insecto sobre el cadáver, y de ahí, teniendo en cuenta las condiciones ambientales del lugar, estimar la fecha y la hora mínimas para la ovoposición por parte de *N. vitripennis*. Asumiendo que *C. vicina* habría entrado en fase de pupa como mínimo 24 horas antes, la precisión del cálculo podría ser muy elevada. A partir de entonces, se podrían emplear los datos de desarrollo de *C. vicina* conocidos para la re-

gión de estudio (DÍAZ MARTÍN *et al.*, 2014) para estimar una fecha y hora de defunción mínima con una precisión mayor.

## 5. CONCLUSIONES

1. Se confirma el valor de *Nasonia vitripennis* como modelo experimental para trabajos de investigación forense, y se establecen las pautas básicas para el mantenimiento de sus poblaciones en condiciones controladas de laboratorio.
2. La ovoposición por parte de *N. vitripennis* en *C. vicina* se da sólo a partir de que la pupa de esta última tenga al menos 6 horas de edad, dado que no se confirma su desarrollo antes de este periodo.
3. La temperatura basal estimada para *N. vitripennis* en la región de estudio es de 13°C, y el AGH total para completar el ciclo es de  $4655,75 \pm 160,75$ . Estos datos deben ser empleados en el cálculo del IPM en regiones biogeográficas y condiciones climáticas similares.
4. Pese a sus limitaciones, *N. vitripennis* puede ser empleada en la estimación del IPM en ciertos casos, y permitir el aumento de la precisión de estas estimaciones.
5. Es necesario llevar a cabo más estudios para determinar la edad mínima de la pupa del hospedador en la que *N. vitripennis* puede ovopositar, así como determinar el efecto en el desarrollo que tiene el uso de distintos hospedadores o las condiciones ambientales. Por último, es importante realizar estudios similares a estos en regiones distintas a fin de contrastar posibles diferencias en el desarrollo de distintas poblaciones.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a Maite Paz Goicoechea, Rubén Sánchez Eugenia y Anna Šopovová por su inestimable colaboración.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. AMES C, TURNER B, DANIEL B. Estimating the post-mortem interval (I): The use of genetic markers to aid in identification of Dipteran species and subpopulations. International Congress Series 2006, 1288:795-797.
2. ARNALDOS MI, PRADO E CASTRO C, PRESA JJ, LÓPEZ-GALLEGO E, GARCÍA, MD. Importancia de los estudios regionales de fauna sarcosaprófaga. Aplicación a la práctica forense. Ciencia Forense 2006, 8(1):63-82.

3. BARBOSA LS, COURI MS, AGUIAR-COELHO VM. Development of *Nasonia vitripennis* (WALKER, 1836) Hymenoptera: Pteromalidae) in pupae of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae), using different densities of parasitoid. *Biota Neotropical* 2008, 8(1):49-54.
4. BERTOSSA RC, VAN DIJK J, BEERSMA DG, BEUKEBOOM LW. Circadian rhythms of adult emergence and activity but not eclosion in males of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Journal of Insect Physiology* 2010, 56(7):805-812.
5. BOUCEK Z, RASPLUS JY. Illustrated key to West-palaearctic Genera of Pteromalidae. Paris: INRA. 1991.
6. BRODEUR J, BOIVIN G. Functional ecology of immature parasitoids. *Annual Review of Entomology* 2004, 49(1):27-49.
7. CARDOSO D, MILWARD DE AZEVEDO EMV. Aspects of the biology of *Nasonia vitripennis* (Walker) Hymenoptera, Pteromalidae) in the pupae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *C. albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), under laboratory conditions. *Revista Brasileira de Entomologia* 1996, 40(1):143-146.
8. DESJARDINS CA, PERFECTI F, BARTOS JD, ENDERS LS, WERREN, JH. The genetic basis of interspecies host preference differences in the model parasitoid *Nasonia*. *Heredity* 2010, 104(3), 270-7.
9. DÍAZ MARTÍN B, LÓPEZ RODRÍGUEZ A, SALOÑA BORDAS MI. 2014. Primeros resultados sobre desarrollo de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) bajo condiciones controladas de temperatura. *Ciencia Forense* 11:251-270.
10. FRAENKEL G, BHASKERAN G. Pupariation and pupation in cyclorhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. *Annals of the Entomological Society of America* 1973, 66(1):418-422.
11. GRASSBERGER M, FRANK C. Temperature-related development of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* as forensic indicator. *Medical and Veterinary Entomology* 2003, 17(3):257-62.
12. GRASSBERGER M, FRANK C. Initial Study of Arthropod Succession on Pig Carrion in a Central Europe urban habitat. *Journal of Medical Biology* 2004, 41(3):511-523.
13. GRILLENBERGER BK, VAN DE ZANDE L, BIJLSMA R, GADAU J, BEUKEBOOM LW. Reproductive strategies under multiparasitism in natural populations of the parasitoid wasp *Nasonia* (Hymenoptera). *Journal of Evolutionary Biology* 2009, 22(3), 460-740.
14. HALL RD. Perceptions and Status of Forensic Entomology. En Byrd JH, Castner JL. *Forensic Entomology. The utility of Arthropods in Legal Investigations*, pp. 1-15. CRC Press LLC. 2001
15. HIGLEY LG, HASKELL NH. Insect development and forensic entomology. En Byrd JH, Castner JL. *Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, pp. 287-302. CRC Press LLC. 2001
16. LOEHLIN DW, ENDERS LS, WERREN JH. Evolution of sex-specific wing shape at the widerwing locus in four species of *Nasonia*. *Heredity* 2010, 104(3):260-269.
17. MCALLISTER BF, WERREN JH. Phylogenetic analysis of a retrotransposon with implications for strong evolutionary constraints on reverse transcriptase. *Molecular Biology and Evolution* 1997, 14(1):69-80.



18. MELLO RDS, AGUIAR-COELHO VM. Durations of immature stage development period of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) under laboratory conditions: implications for forensic entomology. *Parasitology Research* 2009, 104(2):411-418.
19. MELLO RDS, BORJA GEM, AGUIAR-COELHO VM. Effects on Microhymenopteran Progeny of Different Host Exposure Periods (*Chrysomya megacephala*, Calliphoridae) to the Parasitoid Wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2010, 53(2):77-85.
20. REIGADA C, GODOY WAC. Direct and indirect top-down effects of previous contact with an enemy on the feeding behavior of blowfly larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2012, 142(1):71-77.
21. RUEDA LM, AXTELL RC. Guide to common species of pupal parasites (Hymenoptera: Pteromalidae) of the house fly and other muscoid flies associated with poultry and livestock manure. Technical Bulletin. North Carolina Agricultural Research Service, 1985.
22. RUTZ DA, WATSON DW. Parasitoids as a component in an integrated fly-management program on dairy farms. En *Mass-reared Natural Enemies: Applications, Regulation, and Needs*, pp 185-201. Entomological Society of America Monograph, Annapolis, MD. 1998,
23. SALOÑA MI, MONEO J, DÍAZ-MARTÍN 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(1-2):63-89.
24. SAUL G, LI B. Gene map of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (= *Mormoniella vitripennis*). *Genetic Maps: locus maps of complex genomes*, pp 198-201. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
25. SCHNEIDERMAN BYHA, HORWITZ J. The induction and termination of facultative diapauses in the Chalcid wasp *Mormoniella vitripennis* (Walker) and *Tritneptis klugii* (Ratzeburg). *Journal of Experimental Biology* 1957, 35(1):520-551.
26. TURCHETTO M, VANIN S. An approach to fly parasitoids interference on entomoforensic evaluations. *Parasitologia* 2002, 44(1):189-194.
27. WERREN JH. *Nasonia* homepage [2003] [www.rochester.edu/College/BIO/labs/WerrenLab/nasonia/](http://www.rochester.edu/College/BIO/labs/WerrenLab/nasonia/).
28. WHITING AR. The biology of the parasitic wasp *Mormoniella vitripennis* (= *Nasonia brevicornis*) (Walker). *The Quarterly Review of Biology* 1967, 42(1):333-406.

**CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO  
DE LOS CALLIPHORIDAE Y SARCOPHAGIDAE  
SARCOSAPRÓFAGOS PRESENTES EN UN AGROSISTEMA  
DEL SURESTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA**

YELITZA VELÁSQUEZ<sup>1</sup>  
PAOLA GOBBI  
ANABEL MARTÍNEZ-SÁNCHEZ  
SANTOS ROJO

**Resumen:** Se presenta un listado de 11 especies de Calliphoridae y Sarcophagidae capturados en la estación Biológica Torretes situada en el término municipal de Ibi y colindante con el Parque Natural del Carrascal de la Font Roja, al norte de la provincia de Alicante. Los ejemplares fueron obtenidos tras un muestreo de 72 horas mediante el empleo de diversas trampas cebadas con hígado de cerdo y carcasas de pollo evisceradas, en una zona de pinar y en una zona soleada de cultivo. También se indica la distribución actualizada de las especies capturadas en España y una síntesis sobre los aspectos más importantes sobre su bionomía.

**Palabras clave:** Calliphoridae, Sarcophagidae, dípteros necrófagos, faunística, España, península Ibérica.

**Abstract:** A list of 11 species of Calliphoridae and Sarcophagidae captured at Torretes Biological Station located in the town of Ibi and adjacent to the Natural Park of Font Roja in the north of the province of Alicante is presented. The specimens were obtained over a 72 hours sampling by baited traps with pork liver and eviscerated chicken carcasses in a pine forest area and in a crop sunny area. The current distribution of the species captured in Spain, and a summary of the most important aspects of their bionomics is also detailed.

---

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Ambientales/Instituto Universitario CIBIO-Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. Universidad de Alicante, Apdo. 99. E-03080 Alicante, Spain.

E-mail: yv@alu.ua.es, anabel.martinez@ua.es

**Key words:** Calliphoridae, Sarcophagidae, necrophagous diptera, faunistic, Spain, Iberian Peninsula.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los dípteros necrófagos son generalmente los primeros insectos en llegar y colonizar la materia orgánica muerta, siendo además los insectos más numerosos en la mayor parte de las sucesiones heterotróficas. Desde el punto de vista forense, los dípteros sarcosaprófagos por excelencia pertenecen a las familias Calliphoridae y Sarcophagidae. Ambas familias son ubicuas y junto a otros dípteros sarcosaprófagos, proporcionan información útil para la estimación del intervalo postmortem y otras circunstancias asociadas a un fallecimiento. Sus larvas se alimentan y se desarrollan en el cadáver, por lo tanto, a partir de sus ciclos de vida o de la sucesión de insectos presentes en el cuerpo, es posible calcular el tiempo de la muerte (BYRD & CASTNER, 2001, MAGAÑA, 2001). Por otro lado, sus especies están implicadas en múltiples temas relacionados con la salud humana como son la transmisión de enfermedades y las miasis (PAPE, 1987, ROGNES, 1991).

La península Ibérica abarca una amplia diversidad de hábitats, y la comunidad de dípteros califóridos y sarcófagidos ha sido estudiada en algunas zonas. En el norte se han realizado estudios sobre la distribución y diversidad de califóridos en diferentes hábitats del País Vasco (SALOÑA *et al.*, 2009); CASTILLO (2002) evaluó la entomofauna en cadáveres de cerdo en el noreste de España, en la provincia de Huesca. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.* (1998, 2000a,b) estudiaron los califóridos y sarcófagidos necrófagos y coprófagos asociados a un agroecosistema de dehesa en Salamanca, y en la comunidad de Madrid MARTÍN-VEGA & BAZ (2013) analizaron la composición de dípteros necrófagos en función del gradiente altitudinal y las estaciones del año. En el sureste, ARNALDOS *et al.* (2001, 2004b) y ROMERA (2003) evaluaron las familias Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae y Sarcophagidae asociadas a cadáveres de pollo en la provincia de Murcia, mientras que en Alicante se han realizado estudios de los dípteros sarcosaprófagos tanto en medios insulares como en medios continentales urbanos (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2005, VELÁSQUEZ *et al.*, 2011). En el sur destacar los estudios sobre la diversidad de esta comunidad en función del hábitat (ROMERO PALANCO *et al.*, 2006), y los resultados en entomología forense aplicada (GONZÁLEZ MEDINA *et al.*, 2011a,b). En Portugal, PRADO E CASTRO *et al.* (2008, 2012), aportaron datos sobre los califóridos en cadáveres de cerdo, en Coimbra y Lisboa, y CAINE *et al.* (2009) y GILARRIORTUA *et al.* (2013) utilizaron técnicas moleculares para la identificación de especies de esta familia en cadáveres humanos.

Los estudios sobre entomofauna sarcosaprófaga dentro de ambientes específicos en la península Ibérica favorecerán la investigación forense en

la región mediterránea. Este trabajo constituye un aporte al conocimiento de los califóridos y sarcófagidos sarcosaprófagos presentes en un ecosistema de montaña mediterránea del sureste de España.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en dos ambientes distintos, dentro de La Estación Biológica «Torretes Font-Roja» (CIBIO-Universidad de Alicante) situada en el Parque Natural del Carrascal de la Font Roja (Alicante, España). Por un lado se seleccionó una zona de sombra, dominada por pinos (*Pinus halepensis*) y escaso matorral. El otro hábitat seleccionado fue una terraza soleada caracterizada por cultivos de almendro (*Prunus dulcis*), en cuyos límites se observaban abundantes especies de matorral mediterráneo (Cistaceae, Fabaceae y Lamiaceae). En ambos ambientes, se colocaron 2 trampas WOT orientadas por el viento (VOGT & HAVENSTEIN, 1974) y cebadas con 150 g de hígado de cerdo. Para comparar estas especies con aquellas que definitivamente se desarrollan sobre este mismo cebo, se dispusieron 2 contenedores de plástico (30 x 20 x 20 cm) con 150 g de hígado de cerdo, aproximadamente a un metro de altura, que permitían la entrada y la oviposición de los dípteros.

Con el fin de comparar la atracción a diferentes tipos de sustratos de materia orgánica de origen animal, en la zona soleada de cultivo se dispusieron simultáneamente cadáveres de pollo de dos tamaños. Así, dos pollos de 600 g cada uno, se colocaron sobre una bandeja con tierra en el fondo y dentro de una jaula de acero que excluyó a los vertebrados carroñeros. Otros dos cadáveres de pollo de 230 g aproximadamente se dispusieron en contenedores de plástico (30 x 20 x 20 cm) a un metro de altura aproximadamente. Finalmente, estos datos fueron comparados con los resultados obtenidos en las trampas WOT y en los contenedores a un metro de altura, cebados con hígado de cerdo.

En cada localidad, las trampas y los cebos estuvieron separados entre sí 10 metros y permanecieron expuestos durante 72 horas en el mismo periodo del mes de junio de 2007. Los promedios de temperaturas mínimas, máximas y medias registradas en el pinar fueron 15,5°C, 31°C y 23,3°C, respectivamente, y en la terraza de cultivo fueron 13°C, 42°C y 27,5°C.

Tras el periodo de exposición en el campo, las trampas y los cebos fueron trasladados al laboratorio. Los cebos de hígado y los cadáveres de pollo se mantuvieron en condiciones controladas en una cámara de crecimiento con temperatura constante de 23°C, humedad 60-70% y fotoperíodo 14:10, permitiendo el desarrollo completo de las especies que se encontraban criando, hasta la emergencia del adulto. Finalmente, todos los adultos fueron identificados de acuerdo a PAPE (1987), GONZÁLEZ-MORA & PERIS

(1988), GONZÁLEZ-MORA (1989), PERIS *et al.* (1990), PERIS & GONZÁLEZ-MORA (1991), ROGNES (1994) y ROGNES & PATERSON (2005).

### 3. RESULTADOS

Se recolectaron un total de 210 ejemplares. Se identificaron 11 especies de Calliphoridae y Sarcophagidae (Tabla 1), no distribuidas por igual en todos los sustratos expuestos. A continuación presentamos un listado comentado de las especies, incluyendo su distribución y algunos aspectos sobre su bionomía.

**Tabla 1.** Califóridos y Sarcófágidos asociados a cebos de hígado y pollo en la Estación Biológica «Torretes-Font Roja», Alicante, España. (A): adultos capturados en trampas WOT. (L): adultos emergidos de larvas capturadas en los cebos expuestos, (T): terraza y (P): pinar.

| ESPECIES  | HÍGADO |      | POLLO<br>(600G) | POLLO<br>(230G) |
|---|--------|------|-----------------|-----------------|
|   | T      | P    | T               | T               |
| Calliphoridae   |        |      |                 |                 |
| <i>Calliphora vicina</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)      | A      | A    | L               | -               |
| <i>Calliphora vomitoria</i> (Linnaeus, 1758)            | A      | A    | -               | -               |
| <i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann, 1819)             | A      | A    | -               | -               |
| <i>Lucilia caesar</i> (Linnaeus, 1758)                  | A      | A    | -               | -               |
| <i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1826)                  | A, L   | A, L | L               | L               |
| Sarcophagidae   |        |      |                 |                 |
| <i>Sarcophaga africa</i> (Wiedemann, 1824)              | -      | A, L | -               | -               |
| <i>Sarcophaga argyrostoma</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) | -      | -    | -               | L               |
| <i>Sarcophaga cultellata</i> (Pandellé, 1896)           | -      | A    | L               | -               |
| <i>Sarcophaga nigriventris</i> (Meigen, 1826)           | -      | L    | -               | -               |
| <i>Sarcophaga teretirostris</i> (Pandellé, 1896)        | -      | A    | -               | -               |
| <i>Sarcophaga tibialis</i> (Macquart, 1851)             | -      | -    | -               | L               |

#### FAMILIA CALLIPHORIDAE

##### *Calliphora vicina*

Distribución: Afrotropical, Australasia, Holártica, Neotropical y Oriental (ROGNES, 2004). En España se ha citado en Álava, Albacete, Alicante, Almería, Ávila, Barcelona, Bilbao, Burgos, Cáceres, Cádiz, Castellón, Ciudad Real, La Coruña, Cuenca, Gerona, Guadalajara, Guipúzcoa, Huelva, Huesca, Logroño, Madrid, Murcia, Navarra, Oviedo, Palencia, Las Palmas, Sala-

manca, Santa Cruz de Tenerife, Segovia, Sevilla, Soria, Teruel, Toledo, Valencia Valladolid, Vizcaya, Zamora y Zaragoza (GONZÁLEZ-MORA, 1989).

**Bionomía:** Especie con preferencia por hábitats urbanos, aunque también puede estar presente en ambientes rurales (SALOÑA *et al.*, 2009). Es frecuente en el interior de las casas en busca de alimento y en los basureros urbanos (GONZÁLEZ-MORA, 1989). Especie miásica facultativa en animales domésticos y en el hombre (SOLER CRUZ, 2000). Ha sido citada en cadáveres humanos en varios casos forenses en la península Ibérica (DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ & GÓMEZ FERNÁNDEZ, 1957, PÉREZ DE PETINTO, 1975, ARNALDOS *et al.*, 2004a, GARCÍA-ROJO, 2004, BAZ *et al.*, 2007, SALOÑA *et al.*, 2009, GONZÁLEZ MEDINA *et al.*, 2011b, GILARRIORTUA *et al.*, 2013). Está presente durante todo el año, siendo más abundante en invierno en el sureste del país y en primavera en el centro y norte de España (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000b, ARNALDOS *et al.*, 2001, CASTILLO, 2002, ARNALDOS *et al.*, 2004b, GARCÍA-ROJO, 2004, BAZ *et al.*, 2007; SALOÑA *et al.*, 2009). Su fenología en Alicante en trampas WOT cebadas con hígado muestra máximos en invierno, aunque está presente, a excepción de agosto, durante todo el año (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003).

#### *Calliphora vomitoria*

**Distribución:** Australasia y Holártica (ROGNES, 2004) y en las siguientes provincias de España: Álava, Alicante, Ávila, Barcelona, Burgos, Cáceres, Ciudad Real, Guipúzcoa, Huesca, León, Logroño, Madrid, Murcia, Navarra, Oviedo, Palencia, Salamanca, Santa Cruz de Tenerife, Segovia, Sevilla, Toledo, Valencia Valladolid, Vizcaya, Zamora y Zaragoza (ARNALDOS *et al.*, 2001, ARNALDOS *et al.*, 2004b, GONZÁLEZ-MORA, 1989, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 1998, SALOÑA *et al.*, 2009).

**Bionomía:** Esta especie tiene preferencia por hábitats rurales y poco antropizados (SALOÑA *et al.*, 2009). Especie miásica facultativa en animales domésticos y en el hombre (SOLER CRUZ, 2000). Ha sido citada en cadáveres humanos en varios casos forenses en España (RÍOS, 1902a,b, DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ & GÓMEZ FERNÁNDEZ, 1957, PÉREZ DE PETINTO, 1975, GONZÁLEZ MEDINA *et al.*, 2011a, GILARRIORTUA *et al.*, 2013). En el norte de España se encuentra todo el año y es más abundante en primavera, mientras que en el sureste está ausente en verano y es más abundante en invierno, aunque en localidades insulares de Alicante no se capturó (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003, ARNALDOS *et al.*, 2004b, SALOÑA *et al.*, 2009).

#### *Chrysomya albiceps*

**Distribución:** Esta especie se distribuye en las regiones Afrotropical, Palearctica, Neotropical y Oriental (ROGNES, 2004) mientras que en España se ha citado en Álava, Alicante, Baleares, Cádiz, Castellón, Granada, Guadalajara, Guipúzcoa, Huesca, Jaén, Madrid, Málaga, Murcia, Navarra, Oviedo, Santander, Santa Cruz de Tenerife, Segovia, Valencia, Vizcaya, Zaragoza (GONZÁLEZ-MORA & PERIS, 1988, SALOÑA *et al.*, 2009).

**Bionomía:** Presente tanto en ambientes urbanos como rurales (SALOÑA *et al.*, 2009). Las larvas son miásicas facultativas en vertebrados y las larvas maduras son predadoras facultativas de otras larvas de califóridos (FARIA *et al.*, 1999, FARIA & GODOY, 2001, GRASSBERGER *et al.*, 2003). En España, ha sido citada en cadáveres humanos en varios casos forenses (DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ & GÓMEZ FERNÁNDEZ, 1963, PÉREZ DE PETINTO, 1975, MAGAÑA 2001, ARNALDOS *et al.*, 2005, GILARRIORTUA *et al.*, 2013, VELÁSQUEZ *et al.*, 2013). En el norte del país se encuentra en verano y otoño y en el centro-norte ocurre en primavera, verano y otoño. En el sureste está presente todo el año teniendo su pico poblacional en otoño (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000b, ARNALDOS *et al.*, 2001, CASTILLO, 2002, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003, ARNALDOS *et al.*, 2004b, GARCÍA-ROJO, 2004, BAZ *et al.*, 2007, SALOÑA *et al.*, 2009, GILARRIORTUA *et al.*, 2013).

#### *Lucilia caesar*

**Distribución:** En la región Paleártica (ROGNES, 2004). En España se ha citado en Álava, Asturias, Guipúzcoa, Huesca, Madrid, Murcia, Navarra, Pontevedra, Santander, Segovia, Valencia, Vizcaya, Zamora, Zaragoza (PERIS & GONZÁLEZ-MORA, 1991, SALOÑA *et al.*, 2009). Este registro constituye la primera cita en Alicante.

**Bionomía:** Esta especie muestra preferencia por hábitats rurales (SALOÑA *et al.*, 2009). Especie miásica facultativa en mamíferos (SOLER CRUZ, 2000). Ha sido citada en cadáveres humanos en varios casos forenses en España (DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ & GÓMEZ FERNÁNDEZ, 1957, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2006, GILARRIORTUA *et al.*, 2013). En el norte y centro de España se encuentra en primavera, verano y otoño, siendo más abundante en verano. En el sureste del país ha sido capturada en primavera (PERIS & GONZÁLEZ-MORA, 1991, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000b).

#### *Lucilia sericata*

**Distribución:** Afrotropical, Australasia, Holártica, Neotropical y Oriental (ROGNES, 2004). En España se ha citado prácticamente en todo el territorio. Un mapa con la distribución de la especie en el país puede encontrarse en PERIS & GONZÁLEZ MORA (1991).

**Bionomía:** Es más frecuente en hábitats urbanos y también puede encontrarse en el interior de las casas (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003, SALOÑA *et al.*, 2009). Especie miásica facultativa en mamíferos (SOLER CRUZ, 2000). Ha sido asociada con cadáveres humanos en España (GONZÁLEZ-MORA *et al.*, 1990, MAGAÑA, 2001, ARNALDOS *et al.*, 2005, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2006, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2007, GILARRIORTUA *et al.*, 2013). Está presente durante todo el año en todo el territorio español y la actividad máxima de los imagos se centra en verano (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000b; ARNALDOS *et al.*, 2001, CASTILLO, 2002, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003, ARNALDOS *et al.*, 2004b, GARCÍA-ROJO, 2004, BAZ *et al.*, 2007, SALOÑA *et al.*, 2009).

FAMILIA SARCOPHAGIDAE

*Sarcophaga africa*

Distribución: Afrotropical, Australasia, Paleártica (PAPE, 2004, BDWD, 2015) y en España se ha recolectado en Alicante, Almería, Ávila, Barcelona, Cádiz, Cuenca, Gran Canaria, Granada, Guadalajara, Huelva, Huesca, Logroño, Madrid, Málaga, Menorca, Murcia, Navarra, Salamanca, Segovia, Sevilla, Tenerife, Teruel, Toledo, Valencia y Zaragoza (PERIS *et al.*, 1999, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000a).

Bionomía: Es una especie sinantrópica (PAPE, 1987). En las dehesas de la provincia de Salamanca, se encontró asociada a heces de grandes ungulados e hígado de cerdo (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000a,b). Se han encontrado larvas de esta especie en casos de miasis en Sudáfrica (ZUMPT, 1965) y ha sido citada en cadáveres humanos en otros países (INTRONA *et al.*, 1998) sin embargo en España no se ha registrado en ningún caso de miasis o forense. La actividad imaginal en el centro-occidental del país se limita a los meses de verano. En el sureste aparece a lo largo de todo el año, salvo en invierno, siendo más abundante en verano (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003, ROMERA *et al.*, 2003).

*Sarcophaga argyrostoma*

Distribución: Afrotropical, Australasia, Holártica, Neotropical y Oriental (BDWD, 2015). En España se encuentra en Alicante, Ávila, Ciudad Real, Gran Canaria, Granada, Guadalajara, Huesca, Ibiza, Madrid, Murcia, Navarra, Tenerife, Toledo, Valencia, Zaragoza (PERIS *et al.*, 1999, CASTILLO 2002, ROMERA *et al.*, 2003).

Bionomía: La larva es necrófaga y aunque en otros países ha sido citada en casos de miasis en humanos y en ovejas (PAPE, 1987), en España no se ha registrado ningún caso. Es el sarcófago más frecuente en cadáveres humanos en la península Ibérica, lo que le confiere una gran importancia forense en la región (VELÁSQUEZ *et al.*, 2010). En el noreste del país ha sido el más abundante en cadáveres de cerdo durante todo el año (CASTILLO, 2002). Mientras que en el sureste, aparece relacionada con cadáveres durante los meses más cálidos del año (ROMERA *et al.*, 2003).

*Sarcophaga cultellata*

Distribución: Paleártica (BDWD 2015). En España se ha colectado en Alicante, Almería, Guadalajara, Huesca, Madrid, Murcia, Salamanca, Sevilla, Toledo, Valencia, Zaragoza (PERIS *et al.*, 1999, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000a,b, CASTILLO, 2002).

Bionomía: La biología de esta especie es prácticamente desconocida (ROMERA *et al.*, 2003). El primer registro de esta especie en un cadáver humano ha sido en España, siendo un nuevo indicador forense para la región del Mediterráneo y el suroeste de Europa (VELÁSQUEZ *et al.*, 2010). Se



ha encontrado asociada con cadáveres de cerdos durante el verano en Huesca (CASTILLO, 2002). También en verano se encontró asociada a heces de grandes ungulados e hígado de cerdo en las dehesas de encinas de la provincia de Salamanca (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000a,b). Además, ha sido capturada con cebos de pollo en otoño en Murcia (ROMERA *et al.*, 2003).

#### *Sarcophaga nigriventris*

Distribución: En las zonas Paleártica y Afrotropical (PERIS *et al.*, 1994, BDWD, 2015). En España ha sido citada en Alicante, Huesca, Madrid, Navarra, Santander, Valencia, y Zaragoza (PERIS *et al.*, 1994, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003).

Bionomía: Especie parásita, depredadora y necrófaga de caracoles y varios artrópodos como abejas, escarabajos y saltamontes (PAPE, 1987). En Irlanda ha estado relacionada con cadáveres de pequeños vertebrados (BLACKITH & BLACKITH, 1990) y hasta el momento se desconoce su relación con cadáveres humanos. En España existen pocos datos sobre la biología de esta especie. En Alicante, se ha encontrado asociada al caracol *Otala punctata* (PÉREZ MORENO, 2004) y a cebos de pescado durante el verano (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2005).

#### *Sarcophaga teretirostris*

Distribución: Paleártica (BDWD, 2015). En España ha sido capturada en Alicante, Asturias, Lérida, Madrid, Navarra, Santander, Valencia y Zaragoza (PERIS *et al.*, 1999).

Bionomía: La larva se desarrolla en cadáveres de animales, incluyendo gasterópodos (BARKER, 2004). En España se desconoce la biología de esta especie.

#### *Sarcophaga tibialis*

Distribución: Afrotropical, Australasia, Paleártica (BDWD, 2015). En España se ha capturado en Alicante, Murcia, Castellón de la Plana, Gran Canaria, Huesca, Ibiza, Madrid, Mallorca, Navarra, Tenerife, Valencia, Zaragoza (PERIS *et al.*, 1999, CASTILLO, 2002, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003).

Bionomía: Las larvas de esta especie presentan hábitos necrófagos. Fuera de España ha sido observada en lesiones miásicas (ZUMPT, 1965) y hasta el momento se desconoce su asociación con cadáveres humanos. Ha sido encontrada asociada al caracol *Otala punctata* (PÉREZ-MORENO *et al.*, 2006). En Huesca ha estado asociada a cadáveres de cerdo durante la primavera (CASTILLO, 2002). En el sureste del país es la especie más abundante a lo largo de todo el año, estando ausente en invierno (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003, ROMERA *et al.*, 2003).

#### 4. DISCUSIÓN

Del total de especies identificadas, 5 pertenecen a la familia Calliphoridae y 6 a la familia Sarcophagidae. Todas ellas se han encontrado asociadas a restos de animales en otros estudios de fauna sarcosaprófaga en el territorio ibérico (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2000a,b, ARNALDOS *et al.*, 2001, 2004b, CASTILLO, 2002, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2003, GARCÍA-ROJO, 2004, BAZ *et al.*, 2007, SALOÑA *et al.*, 2009, PRADO E CASTRO *et al.*, 2011). En el caso de *S. argyrostoma* y *S. cultellata*, aportamos sus primeros datos en la provincia de Alicante y, aunque no hay registros publicados sobre la presencia de *L. caesar* en la provincia de Alicante, esta especie fue capturada en el año 2003 en el mismo Parque, utilizando cebos de hígado y pescado (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, datos sin publicar).

En la Tabla 1 se observa que las 5 especies de califóridos fueron atraídas al hígado; sólo *C. vicina* y *L. sericata*, especies más sinantrópicas, también estuvieron asociadas a los cebos de pollo. Todas las especies fueron colectadas tanto en la terraza soleada como en el pinar sombreado. Entre los sarcófagos, se observó una mayor diferencia en la atracción hacia los distintos cebos y entre los ambientes muestreados. *Sarcophaga africa*, *S. nigriventris* y *S. teretirostris* fueron capturadas con los cebos de hígado y sólo en el pinar sombreado, *S. argyrostoma* y *S. tibialis* se colectaron sólo con el pollo, mientras que *S. cultellata* estuvo asociada a los 2 cebos y se encontró tanto al sol como a la sombra.

Es importante destacar las especies que criaron en los cebos de hígado ofrecidos fueron *L. sericata*, *S. africa* y *S. nigriventris*, mientras que *C. vicina*, *L. sericata*, *S. argyrostoma*, *S. cultellata* y *S. tibialis*, lo hicieron en el pollo. Las especies que criaron en hígado, solo lo hicieron en aquellos expuestos a la sombra, excepto *L. sericata* debido a su marcado carácter termófilo. Por otro lado, de las especies que criaron en el pollo, destacar que *C. vicina* y *S. cultellata* solo lo hicieron en aquellos de mayor tamaño, mientras que *S. argyrostoma* y *S. tibialis* por el contrario solo dispusieron sus larvas en los pollos de menor tamaño. De nuevo, *L. sericata* ovipositó indistintamente en ambos tipos. Aunque es bien conocido que el modelo adecuado para estudios aplicados a la entomología forense es un cadáver de cerdo (PAYNE, 1965, GOFF, 2000, SCHOENLY *et al.*, 2007), los resultados obtenidos en este estudio contribuyen a la ampliación del conocimiento de la biología de estas especies, algunas de ellas poco conocidas hasta el momento en la región (i.g. *S. cultellata* y *S. teretirostris*).

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido apoyado por el Progama Alban, (Programa de Becas de Alto Nivel para América Latina, No. E06D101359VE) y parcialmente fi-

nanciado por los proyectos GV/2011/039 (Generalitat Valenciana) y GRE09-27 (Universidad de Alicante).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. ARNALDOS MI, SÁNCHEZ F, ÁLVAREZ P, GARCÍA MD. A forensic entomology case from the southeastern Iberian Peninsula. *Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology* 2004a, 5:22-25.
3. ARNALDOS MI, ROMERA E, PRESA JJ, LUNA A, GARCÍA MD. Studies on seasonal arthropod succession in the southeastern Iberian Peninsula. *International Journal of Legal Medicine* 2004b, 118:197-205.
4. ARNALDOS MI, GARCÍA MD, PRESA JJ, ROMERA E, LUNA A. Estimation of postmortem interval in real cases on the basis of experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Science International* 2005, 149:57-65.
5. BARKER GM. Natural enemies of terrestrial molluscs. CABI Publishing, Wallingford. 2004.
6. BAZ A, CIFRIÁN B, DÍAZ-ARANDA LM, MARTÍN-VEGA D . The distribution of adult blow-flies (Diptera: Calliphoridae) along an altitudinal gradient in Central Spain. *Annales de la Société Entomologique de France* 2007, 43:289-296.
7. BLACKITH RE, BLACKITH GR. Insect infestation of small corpses. *Journal of Natural History* 1990, 24:699-709.
8. BYRD JH, CASTNER JL. Insects of forensic importance pp. 43-79. In JH Byrd and JL Castner [eds.]. *Forensic entomology. The utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press Boca Ratón. 2001.
9. CAINÉ LM, CORTE REAL F, SALOÑA-BORDAS MI, MARTÍNEZ DE PANCORBO M, LIMA G, MAGALHÃES T, PINHEIRO F. DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. *Forensic Science International* 2009, 184(1-3):e21-e23.
10. CASTILLO M. Estudio de la entomofauna asociada a cadáveres en el Alto Aragón (España). *Monografías de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 6:1-94. 2002.
11. DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ J, GÓMEZ FERNÁNDEZ L. Observaciones en torno a la entomología tanatológica. Aportación experimental al estudio de la fauna cadavérica. *Revista Ibérica de Parasitología* 1957, 17:3-30.
12. DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ J, GÓMEZ FERNÁNDEZ L. Momificación cadaverica particularmente rápida, operada bajo la acción de numerosas larvas de *Chrysomya albiceps*. *Wiedemann*, 1819. *Revista Ibérica de Parasitología* 1963, 23:43-62.
13. FARIA LDB, GODOY WAC. Prey choice by facultative predator larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2001, 96: 875-878.

14. FARIA LDB, ORSI L, TRINCA LA, GODOY WAC. Larval predation by *Chrysomya albiceps* on *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria*. Entomologia Experimentalis et Applicata 1999, 90:149-155.
15. GARCÍA-ROJO A. 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.
16. GILARRIORTUA M, SALOÑA BORDAS MI, CAINÉ LM, PINHEIRO F, DE PANCORBO MM. Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae). Forensic Science International 2013, 228(1-3):132-136.
17. GOFF ML. A fly for the prosecution. How insect evidence helps solve crimes. Harvard University Press, Massachusetts. 2000.
18. GONZÁLEZ MEDINA A, ARCHILLA PEÑA F, JIMÉNEZ RÍO G. Presencia de *Cynomya mortuorum* (Linnaeus, 1761) (Diptera, Calliphoridae) en cadáveres humanos en España. Boletín de la Asociación Española de Entomología 2011a, 35(3-4):515-518.
19. GONZÁLEZ MEDINA A, GONZÁLEZ HERRERA L, MARTÍNEZ TÉLLEZ I, ARCHILLA PEÑA F, JIMÉNEZ RÍOS G. Análisis patológico y entomológico de unos restos humanos hallados en una zanja en Granada (España). Revista Española de Medicina Legal 2011b, 37(3):113-116.
20. GONZÁLEZ-MORA D. Los Calliphoridae de España, II: Calliphorini (Diptera). Eos-Revista Española de Entomología 1989, 65: 39-59.
21. GONZÁLEZ-MORA D, PERIS SV. Los Calliphoridae de España: 1: Rhiniinae y Chrysomyinae (Diptera). Eos-Revista Española de Entomología 1988, 64:91-139.
22. GONZÁLEZ-MORA D, PERIS SV, SÁNCHEZ-PÉREZ JD. Un caso de entomología forense. Revista Española de Medicina Legal 1990, 17:19-21.
23. GRASSBERGER M, FRIEDRICH E, REITER C. The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in Central. International Journal of Legal Medicine 2003, 117:75-81.
24. INTRONA F, CAMPOBASSO CP, DI FAZIO A. Three case studies in forensic entomology from southern Italy. Journal of Forensic Science 1998, 43:210-214.
25. MAGAÑA C. La entomología forense y su aplicación a la medicina legal. Data de la muerte. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa 2001, 28:49-57.
26. MARTÍN-VEGA D, BAZ A. Sarcosaprophagous Diptera assemblages in natural habitats in central Spain: spatial and seasonal changes in composition. Medical and Veterinary Entomology 2013, 27:64-76.
27. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A. Biología de la comunidad de Dípteros necrófilos en ecosistemas del sureste de la península Ibérica, pp. 577. Universidad de Alicante. 2003.
28. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROJO S, MARCOS-GARCÍA MA. Sarcófagos necrófilos y coprófilos asociados a un agroecosistema de dehesa (Diptera: Sarcophagidae). Boletín de la Asociación Española de Entomología 2000a, 23:148-150.

29. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROJO S, MARCOS-GARCÍA MA. Annual and spatial activity of dung flies and carrion in a Mediterranean holm-oak pasture ecosystem. *Medical and Veterinary Entomology* 2000b, 14:56-63.
30. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, MARCOS-GARCÍA MA, ROJO S. Biodiversidad de la comunidad de dípteros sarcosaprófagos en ambientes insulares del sudeste Ibérico (Diptera, Calliphoridae, Muscidae, Sarcophagidae). *Nouvelle Revue of Entomologie* 2005, 22:251-265.
31. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROJO S, RÖGNES K, MARCOS-GARCÍA MA. Califóridos con interés faunístico en agroecosistemas de dehesa y catálogo de las especies ibéricas de Polleniinae (Diptera: Calliphoridae). *Boletín de la Asociación Española de Entomología* 1998, 22:171-183.
32. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROJO S, PÉREZ-BAÑÓN C, MAGAÑA C. Forensic importance of *Lucilia* flies in Mediterranean countries with remarks about larval morphology and biology of *L. sericata* and *L. caesar*, pp. 44, Proceedings of the fourth meeting of European Association for Forensic Entomology, Bari, Italia. 2006.
33. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, SMITH KE, ROJO S, MARCOS-GARCÍA MA, WALL R. Geographic origin affects larval competitive ability in European populations of the blow fly, *Lucilia sericata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2007, 6:93-98.
34. PAPE T. The Sarcophagidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* 203 pp. 1987.
35. PAPE T. *Fauna Europaea: Brachycera, Sarcophagidae*. 2004.
36. PAYNE JA. A summer carrion study of the baby pig, *Sus scrofa* Linneaus. *Ecology* 1965, 46:592-602.
37. PÉREZ MORENO S. Dípteros sarcófágidos (Diptera, Sarcophagidae) relacionados con gasterópodos terrestres (Mollusca, Gastropoda) en Ecosistemas Mediterráneos. *Boletín de la Asociación Española de Entomología* 2004, 28:187-205.
38. PÉREZ-MORENO S, MARCOS-GARCÍA MA, ROJO S. Comparative morphology of early stages of two Mediterranean *Sarcophaga* Meigen, 1826 (Diptera; Sarcophagidae) and a review of the feeding habits of Palaearctic species. *Micron* 2006, 37:169-179.
39. PÉREZ DE PETINTO M. La miasis cadavérica en la esqueletización. *Real Sociedad Española de Historia Natural* 1975, 1:463-482.
40. PERIS SV, GONZÁLEZ-MORA D. Los Calliphoridae de España, III. Luciliini (Diptera). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biología)* 1991, 87:187-207.
41. PERIS S, GONZÁLEZ-MORA D, MINGO E. Los Helicophagellina (sensu VERVES, 1986) (Diptera, Sarcophagidae) de la Península Ibérica. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* 1994, 91:143-153.
42. PERIS SV, GONZÁLEZ-MORA D, MINGO E. Los Parasarcophagina (Diptera, Sarcophagidae) de la Península Ibérica. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biología)* 1999, 95:115-134.
43. PRADO E, CASTRO C, SERRANO A, ARNALDOS MI, GARCÍA MD. Calliphoridae succession patterns from two locations in Portugal, pp. 43, Proceedings of the sixth meeting of the European Association for Forensic Entomology, Kolymbari, Crete, 2008.

44. 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(4):417-431.
45. PRADO E CASTRO C, ARNALDOS MI, SOUSA JP, GARCÍA MD. Preliminary study on a Community of Sarcosaprophagous Diptera in Central Portugal. *Entomol Gener, Stuttgart* 2011, 33 (3):183-198.
46. RÍOS T. Los insectos y la putrefacción del cadáver (I-II). *La Clínica Moderna, Revista de Medicina y Cirugía* 1902a, 1:74-80.
47. RÍOS T. Los insectos y la putrefacción del cadáveres (III-IV). *La Clínica Moderna, Revista de Medicina y Cirugía* 1902b, 1:171-180.
48. ROGNES K. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Escandinavica* 1991, 24:1-272.
49. ROGNES K. Fauna Europaea: Calliphoridae. In Thomas P [ed.], *Fauna Europaea: Diptera, Brachycera*. 2004.
50. ROGNES K. First record of the Sheep Green Bottle fly *Lucilia cuprina* (Wiedemann) from Europe (Diptera: Calliphoridae). *Eos-Revista Española de Entomología* 1994, 69:41-44.
51. ROGNES K, PATERSON HEH. *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) and *C. putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) are two different species. *African Entomology* 2005, 13:49-70.
52. ROMERA E, ARNALDOS MI, GARCÍA MD, GONZÁLEZ-MORA D. Los Sarcophagidae (Insecta, Diptera) de un ecosistema cadavérico en el sureste de la Península Ibérica. *Anales de Biología* 2003, 25:49-63.
53. ROMERO PALANCO JL, MUNGUÍA GIRÓN F, GAMERO LUCAS J. Entomología cadavérica en la provincia de Cádiz (S. de España). *Ciencia Forense* 2006, 8:83-106.
54. SALOÑA MI, MONEO J, DÍAZ B. Estudio de la distribución de califóridos (Diptera: Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco. *Boletín de la Asociación Española de Entomología* 2009, 33:63-69.
55. SCHOENLY KG, HASKELL NH, HALL R, GBUR JR. Comparative Performance and Complementarity of Four Sampling Methods and Arthropod Preference Tests from Human and Porcine Remains at the Forensic Anthropology Center in Knoxville, Tennessee. *Journal of Medical Entomology* 2007, 44:881-894.
56. SOLER CRUZ M. El estudio de las miasis en España durante los últimos cien años. *Ars Pharmaceutica* 2000, 41:19-26.
57. VELÁSQUEZ Y, IVORRA T, GRZYWACZ A, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, MAGAÑA C, GARCÍA-ROJO A, ROJO S. Larval morphology, development and forensic importance of *Synthesiomia nudiseti* (Diptera: Muscidae) in Europe: a rare species or just overlooked? *Bulletin of Entomological Research* 2013, 103:98-110.
58. VELÁSQUEZ Y, MAGAÑA C, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROJO S. Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. *Medical and Veterinary Entomology* 2010, 24:293-308.

59. VELÁSQUEZ Y, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, ROJO S. A preliminary analysis of early colonization of pig carcass by blowflies (Diptera: Calliphoridae) in the Iberian Peninsula. *Pest Technology* 2011, 5 (11):23-25.
60. VOGT WG, HAVENSTEIN DE. A standardized bait trap for blowfly studies. *Journal of Australian Entomological Society* 1974, 13:249-253.
61. ZUMPT F. *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. Butterworths, London. 1965.

## ARTHROPODS OF FORENSIC INTEREST ASSOCIATED TO PIG CARCASSES IN AIAKO HARRIA NATURAL PARK (BASQUE COUNTRY, NORTHERN SPAIN)

BEATRIZ DÍAZ-MARTÍN<sup>1</sup>  
MARTA I. SALOÑA-BORDAS<sup>2</sup>

**Abstract:** A checklist of carrion-related arthropods collected in association to pig carcasses in Aiako Harria Natural Park (Basque Country, northern Spain) is presented. Leaving aside the subphylum Myriapoda, there are 16 orders represented in 7837 specimens, being the most important those of the class Insecta (7667 specimens; 98%). The moment in which they were present during the decomposition of a piglet carcass is detailed, and an analysis of the diversity of each decomposition stage was performed. Fresh stage is the moment when a higher degree of dominance and less diversity were found, being the dry stage the most diverse one. It should be stressed out the huge amount of new records: 2 new species for Science [*Crossopalpus* sp. n. (nr. *nigritellus* and *aeneus*) and *Drapetis* sp. n. (group *exilis*) (Diptera: Hybotidae)]; 1 genus (*Alloborborus*) and 8 species new for the Iberian Peninsula (*Crossopalpus humilis*, *Meroplus fukuharai*, *Nemopoda speiseri*, *Sepsis luteipes*, *Alloborborus pallifrons*, *Phthitia empirica*, *Spelobia cambrica*, *Trachyopella kuntzei*); 7 new species for Spain (*Siphunculina aenaea*, *Siphunculina quinquangula*, *Megaselia citrinella*, *Megaselia meconicera*, *Megaselia tama*, *Pseudacteon formicarium*, *Ischiolepta denticulata*); 1 new species for the peninsular Spain (*Telomerina levifrons*); 2 family, 12 genus and 29 species new for the Basque Country; and 1 family, 4 genus and 3 species new for Guipúzcoa. This study may serve as a reference for future forensic studies in the Basque Country and other similar biogeoclimatic areas.

**Key words:** Forensic Entomology, arthropods, diversity, pig carcass, Basque Country.

<sup>1</sup> Department of Entomology, Aranzadi Science Society, Zorroagaina 11, E-20014 San Sebastián.

<sup>2</sup> Department of Zoology and Animal Cellular Biology, Faculty of Science and Technology (UPV/EHU). Sarriena s/n, E-48940 Bilbao, Spain.  
bdiaz@aranzadi-zientziak.org; m.salona@ehu.es



**Resumen:** Presentamos un primer listado de artrópodos relacionados con restos cadavéricos en el Parque Natural de Aiako Harria (País Vasco, norte de España). Sin considerar al subphylum Myriapoda, hemos encontrado 7837 especímenes representados en 16 órdenes, siendo los más importantes los correspondientes a la clase Insecta (7667 especímenes, 97%). Se especifica el momento de la descomposición cadavérica en que se encontraron, así como el valor de la diversidad en cada fase de descomposición cadavérica. En el estado fresco se obtiene el mayor valor de dominancia y el menor valor de diversidad, siendo el estado seco el más diverso de todos. Debemos destacar la cantidad de nuevos taxones recolectados: 2 nuevas especies para la Ciencia [*Crossopalpus* sp. n. (nr. *nigritellus* and *aeneus*) y *Drapetis* sp. n. (grupo *exilis*) (Diptera: Hybotidae)]; 1 género (*Alloborborus*) y 9 especies nuevas para la Península Ibérica (*Crossopalpus humilis*, *Meroplilus fukuharai*, *Nemopoda speiseri*, *Sepsis luteipes*, *Alloborborus pallifrons*, *Phthitia empirica*, *Spelobia cambrica*, *Trachypella kuntzei*); 7 nuevas especies para España (*Siphunculina aenaea*, *Siphunculina quinquangula*, *Megaselia citrinella*, *Megaselia meconicera*, *Megaselia tama*, *Pseudacteon formicarum*, *Ischiolepta denticulata*); 1 nueva especie para España peninsular (*Telomerina levifrons*); 1 familia, 11 géneros y 28 especies nueva para el País Vasco; y 1 familia, 4 géneros y 3 especies nuevas para Guipúzcoa. Este estudio servirá como referencia para futuros estudios forenses en el País Vasco y otras áreas biogeoclimáticas similares.

**Palabras clave:** Entomología forense, artrópodos, diversidad, restos cadavéricos, País Vasco.

## 1. INTRODUCTION

Arthropods are main responsible of the consumption of corpses and carcasses, reducing them to skeleton in few days under adequate conditions. They feed on the body, and live or breed in/on a corpse, thus depending on their biological preferences, and on the state of body decomposition. This produces a faunal succession which varies through season and environmental conditions, and that can be useful for the estimation of time since death (1, 2).

However, the evaluation and use of succession patterns have necessarily been based on the adequate knowledge of the insect fauna in the region in which a corpse is discovered, as species vary widely with geographic region (3, 4). This sort of information is often generated in forensics through field experiments based on carrion decomposition in which nonhuman carcasses are usually employed, due to legal impediments on using human corpses as models (5, 6). If this baseline fauna is unknown, then the forensic entomologist needs to draw upon the existing bibliography and choose the one which deals with areas of similar characteristics, although the accuracy of post-mortem interval estimations will be diminished (4, 7).

In the Iberian Peninsula, detailed studies in this field are scarce, and other papers contribute data only for certain groups (8). Besides, they have been performed in central and southern areas of the Iberian Peninsula (5, 8, 9, 10, 11), remaining the northern region unexplored. This lack of information is a particularly important problem, as the predominant climate types of our peninsula differ considerably, and the typical Atlantic climate of the Basque Country makes unfeasible any extrapolation of the data without assuming a great error on post-mortem calculations.

Therefore, this study is aimed to contribute to increase the knowledge of our fauna with an extensive inventory of carrion-associated arthropods, including information about their successional patterns, in order to create a database of reference for regions with similar biogeoclimatic characteristics.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### SAMPLING PROCEDURE

The collection of samples was realized during the ongoing of a field experiment focused on insect succession on carrion during summer months in 2009 and 2010. It took place in «Aiako Harria» Natural Park (Errenteria, Guipúzcoa, Spain), concretely in an unused area of the Urdaburu-Añarbe forest which previously served for the recuperation of wild board populations (12). It was, however, noticeable the recreational use of surrounding areas and the intermittent presence of livestock and horses.

Five domestic piglets (*Sus scrofa* LINNAEUS, 1758) were sacrificed each year for the research. Pigs are considered the best non-human model because of their similarities regarding body size, skin, organs and tissue structure, or diet (13, 14, 15). Carcasses laid over a metallic net on the forest ground, with a minimum distance of 10 meters between them, and covered with a jail to prevent the action of scavengers. For more details, previous works can be consulted (12, 16, 17).

Flying adults were daily collected with handheld insect net upon decomposing carcasses, helped with forceps or paintbrushes to collect specimens directly from carcasses or surrounding area. Samples were preserved in ethanol 70% and properly labeled, keeping them in the reference collection of the Forensic Entomology Laboratory, University of the Basque University (UPV/EHU, Biscay, Spain).

### IDENTIFICATION

Due to the vast increase in number of known forms of animals and to the continuous renovation of the classification, mechanisms of modern taxonomy have become so complex as to beginners discourage (18). Moreover, arthropods constitute the most important group in terms of

number and diversity of the Animal Kingdom. For all these reasons, multi-disciplinary teams are needed for an accurate identification of all the species involved in the carcass reduction. That for, the first step in the identification process is to divide the collected arthropods in groups (taxa), following experts' instructions or the last review published by the Spanish Association of Entomology (19).

More specific keys were used for genus and species level, confirming the findings with experts on each group. Some taxa were entirely sent to the specialist, depending on the difficulty of each group.

For the most abundant and better studied groups, the following taxonomic keys were used:

- COLEOPTERA: BAHILLO DE LA PUEBLA (unpublished data); CHARRIER, 2002 (20); MARTÍN PIERA & LÓPEZ COLÓN, 2000 (21); PRIETO PILOÑA & PÉREZ VALCÁRCCEL, 2002 (22); YÉLAMOS, 2002 (23).
- DIPTERA (adults and maggots): MANUEL CASTILLO (unpublished data); SZPILA & GRZYWACZ (unpublished data); GONZÁLEZ MORA, 1989 (24); PERIS & GONZÁLEZ MORA, 1991 (25); ROGNES (1980, 1991, 1998) (26, 27, 28); ROZKOŠNÝ *et al.*, 1997 (29).

For more complex taxa, the following specialists aid in the identification process:

- COLEOPTERA
  - Carabidae: Jesús Lencina
  - Histeridae: Tomás Yélamos
  - Leiodidae: Javier Fresneda
  - Nitidulidae: Pablo Bahillo
  - Staphylinidae: Raimundo Outerelo
  - Trogidae: Pablo Bahillo, Jesús Romero Samper
- DIPTERA
  - Agromyzidae: Miloš Černý
  - Chironomidae: Oscar Soriano
  - Chloropidae: Emilia P. Nartshuk
  - Ephydriidae: Tadeusz Zatwarnicki
  - Fanniidae: Andrzej Grzywacz
  - Muscidae: Krzysztof Szpila, Andrzej Grzywacz
  - Phoridae: Henry Disney
  - Psychodidae: Rüdiger Wagner
  - Sarcophagidae: Dolores González Mora
  - Scatopsidae: Jean Paul Haenni

- Sciaridae: Kai Heller
  - Tachinidae: Hans Peter Tschorsnig
  - Acartophthalmidae, Carnidae, Heleomyzidae, Milichiidae, Opomyzidae, Piophilidae, Sepsidae, Sphaeroceridae, Syrphidae, Tabanidae, Ulidiidae: Miguel Carles Tolrá
  - Ceratopogonidae, Dolichopodidae, Empididae, Hybotidae: Daniel Ventura
- HEMIPTERA: Xanti Pagola
- QUELICERATA:
- Arachnida: Alberto Castro

Opportunistic and accidental species will not be examined in detail, focusing the analysis and discussion on taxa of forensic interest. Nevertheless, it is worth noting that they may also provide useful information when carrion fauna is considered as a whole (3, 30, 31), so they are also included, at least at class level.

All these material is kept in ethanol of 70° and can be found in the arthropod collection of the Forensic Entomology research group of the University of the Basque University (UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain).

#### Analysis of diversity

It is also of interest to check out the effect of changes in the environment on the community. That for, it is necessary to have previous information about the biologic diversity of the community (species richness or  $\alpha$  diversity) and the rate of change or replacement in species composition between different communities ( $\beta$  diversity) (32). In the absence of species information on several taxa, all calculations have been made at family's level, with the statistical software PAST (33) (Table 2).

The easiest and commonest way to evaluate the diversity is based on Margalef index, which estimates the rate at which species are added when expanding the sample. This index is used for comparison with previous works. Nevertheless, it is strongly influenced by sampling effort, so Fisher index was also calculated, as it enables a more objective comparison between samples (32, 34).

It is also advisable to quantify the representativeness of the species, to improve the understanding of the community diversity. Hence, it has been calculated the Simpson's index, which is strongly influenced by the importance of the most dominant species.

On the other hand, decomposition process can be understood as a temporal gradient, and therefore the rate of species replacement through time of decomposition was evaluated (Fig. 3). With this aim, it has been calcula-

ted the turnover rate, which gives a percentage of similarity between successive time periods [cf. MAGURRAN, 2004 (34)]:

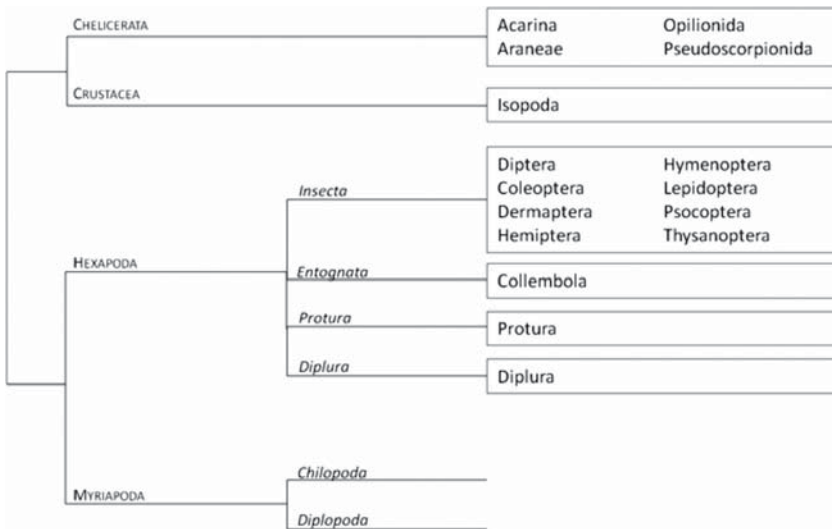
$$t = \frac{a + b}{N_A + N_B}$$

where *a* and *b* are the number of species present only in sample A and B respectively, and  $N_A$  and  $N_B$  are the total number of species in each sample.

Assisted by the statistical software PAST, the Bray-Curtis dissimilarity index (1-D) is also reported, as it takes into account not only the presence or absence of species, but also their abundance (32). Both indexes show complementarily if the community composition changes through time and, if so, how it does.

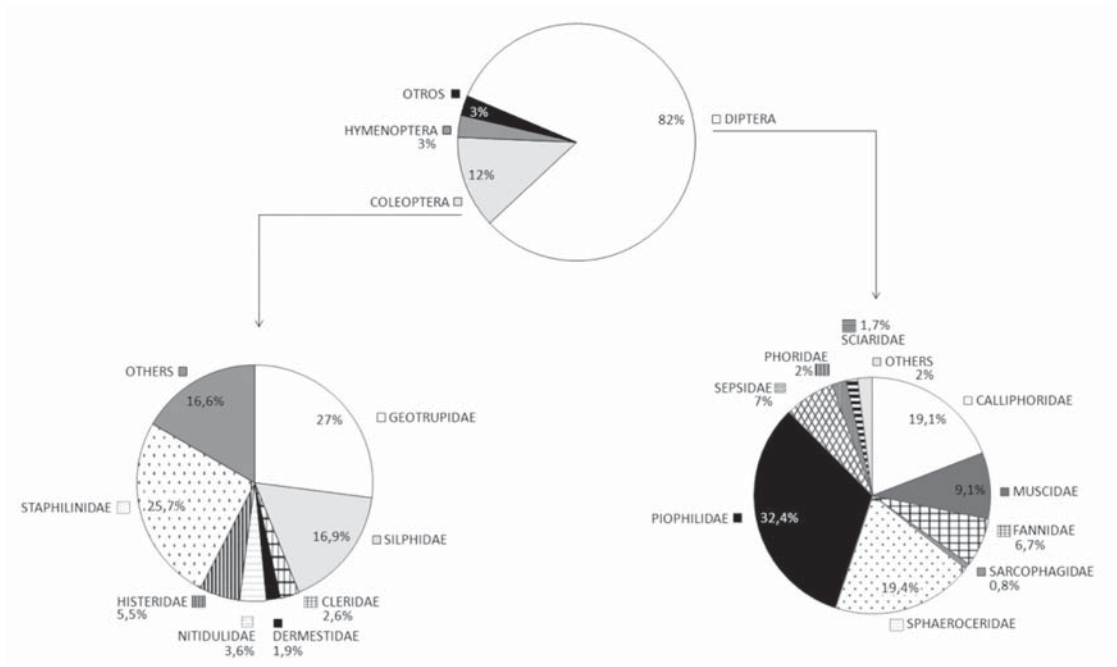
### 3. RESULTS

A total of 7837 adult specimens were collected during the research, which ascribed up to 255 known species and remaining 21 taxa/families unidentified and pendant of a more detailed revision.



**Figure 1:** Main taxa collected during the whole experiment (from left to right: subphylum, class, order). Notice that the length of lines does not imply a meaning of evolutive distance between groups.

Leaving aside the subphylum Myriapoda, there are 16 orders represented (Fig. 1), being the most important those of the class Insecta (Fig. 2). Diptera is the predominant order (82%), with 30 families and more than 177 species collected. They are followed by coleopterans (12%), with 13 families and more than 58 species; and Hymenoptera (3%). Relative abundance of the dominant families is shown in Fig. 2.3.



**Figure 2:** Relative abundance of the main groups of arthropods collected, with detail of Diptera and Coleoptera main families.

Table 1 reports the presence/absence of the different taxa associated to each stage of decomposition, as well as the total number of specimens collected during the whole experiment. Information about new records is also included, detailing the region for which the taxon is first reported.

To analyse the diversity, indexes of common used are shown in Table 2. Advanced Decay stage is the one with the higher abundance, but it is the Dry stage where the higher diversity was found, estimated both with Margalef and Fisher indexes. Regarding Simpson index, it is lowest during the Fresh stage, indicating that probably one or more taxa have a high degree of dominance.

**Table 1:** Presence/Absence of arthropods, with the total number of each taxon in both 2009 and 2010. New record of species, genera or family are specified with a superindex (G: Guipuzkoa; BC: Basque Country; S: Spain; SP: Spanish Peninsular territory; IP: Iberian Peninsula); names in bold report to new species for the Science. n.c.: not counted.

| ORDER / FAMILY                  | SPECIES   | STAGE OF DECOMPOSITION |   |     |     |   |        |
|---------------------------------|---|------------------------|---|-----|-----|---|--------|
|                                 |   | F                      | B | AcD | AdD | D | NUMBER |
| <b>DIPTERA</b>                  |   |                        |   |     |     |   |        |
| ACARTHOPHTHALMIDAE <sup>G</sup> | <i>Acartrophthalmus</i> <sup>G</sup> <i>bicolor</i> <sup>BC</sup>   |                        |   | x   | x   |   | 5      |
| AGROMYZIDAE                     | <i>Liriomyza pusilla</i>  |                        |   |     | x   |   | 1      |
| ANTHOMYIDAE                     | Unidentified species  |                        | x |     | x   | x | 9      |
| CALLIPHORIDAE                   | <i>Bellardia sp.</i>  |                        |   |     | x   | x | 13     |
|                                 | <i>Calliphora vicina</i>  | x                      | x | x   | x   | x | 23     |
|                                 | <i>Calliphora vomitoria</i>   | x                      | x | x   | x   | x | 67     |
|                                 | <i>Chrysomya albiceps</i>   | x                      | x | x   | x   | x | 154    |
|                                 | <i>Lucilia ampullacea</i>   | x                      | x |     | x   | x | 27     |
|                                 | <i>Lucilia caesar</i>   | x                      | x | x   | x   | x | 926    |
|                                 | <i>Lucilia illustris</i>  | x                      | x |     | x   |   | 5      |
|                                 | <i>Lucilia sericata</i>   |                        |   |     | x   |   | 1      |
|                                 | <i>Polenia rudis</i>  |                        |   |     |     | x | 1      |
|                                 | <i>Rhimiinae</i> (un. sp.)  |                        | x |     | x   |   | 5      |
| CARNIDAE <sup>BC</sup>          | <i>Meoneura</i> <sup>BC</sup> <i>neottiophila</i> <sup>BC</sup>     |                        | x | x   | x   | x | 18     |
|                                 | <i>Meoneura sp.</i>   |                        |   |     | x   |   | 1      |
| CECIDOMYIDAE                    | Unidentified species  |                        |   |     |     | x | 7      |
| CERATOPOGONIDAE                 | <i>Culicoides</i> ( <i>Avaritia</i> ) <i>scoticus</i>               | x                      |   |     |     |   | 1      |
|                                 | <i>Culicoides</i> ( <i>Culicoides</i> ) <i>impunctatus</i>          |                        |   |     |     | x | 1      |
|                                 | <i>Culicoides</i> ( <i>Silvaticulicoides</i> ) <i>pallidicornis</i> |                        | x |     |     |   | 1      |
|                                 | <i>Forcipomyia</i> ( <i>Euprojoannisia</i> ) <i>titillans</i>       |                        |   |     |     | x | 1      |
|                                 | <i>Forcipomyia</i> ( <i>Forcipomyia</i> ) <i>ciliata</i>            |                        |   | x   |     |   | 1      |
| CHIRONOMIDAE                    | SubFam Orthoclaadiinae  |                        |   |     |     | x | 2      |
| CHLOROPIDAE                     | <i>Oscinella frit</i>   |                        |   | x   |     |   | 1      |
|                                 | <i>Siphunculina aenaea</i> <sup>S</sup>                             |                        |   |     |     | x | 1      |
|                                 | <i>Siphunculina quinquangula</i> <sup>S</sup>                       |                        |   |     | x   | x | 5      |
|                                 | <i>Tricimba cincta</i>  |                        |   |     | x   | x | 2      |
| DOLICHOPODIDAE                  | <i>Chrysotus gramineus</i>  |                        |   |     | x   |   | 1      |
| EPHYDRIDAE                      | <i>Hydrellia sp.</i>  |                        |   | x   |     |   | 1      |

| ORDER / FAMILY | SPECIES  | STAGE OF DECOMPOSITION     |   |     |     |   | NUMBER |   |
|----------------|--|----------------------------|---|-----|-----|---|--------|---|
|                |  | F                          | B | AcD | AdD | D |        |   |
| FANNIIDAE      | <i>Fannia canicularis</i>  |                            | x | x   | x   | x | 17     |   |
|                | <i>Fannia fuscata</i>  |                            | x | x   | x   | x | 17     |   |
|                | <i>Fannia manicata</i>   | x                          | x | x   | x   | x | 43     |   |
|                | <i>Fannia scalaris</i>   |                            |   |     |     | x | 3      |   |
|                | <i>Fannia sp.</i>  | x                          | x | x   | x   | x | 352    |   |
| HELEOMYZIDAE   | <i>Suillia affinis</i>   |                            |   |     |     | x | 2      |   |
|                | <i>Suillia variegata</i>   |                            |   |     | x   |   | 1      |   |
| HYBOTIDAE      | <b><i>Crossopalpus sp. n.</i></b><br><b>(nr. <i>nigritellus</i> y <i>aeneus</i>)</b> |                            |   |     |     | x | 1      |   |
|                | <i>Crossopalpus humilis</i> <sup>JP</sup>  |                            |   |     | x   | x | 13     |   |
|                | <b><i>Drapetis sp. n.</i></b><br><b>(group <i>exilis</i>)</b>                        |                            |   | x   |     | x | 2      |   |
| MILICHIIDAE    | <i>Leptometopa</i> <sup>BC</sup> <i>latipes</i> <sup>BC</sup>                        |                            |   |     | x   |   | 1      |   |
| MUSCIDAE       | <i>Azelia sp.</i>  | x                          | x | x   | x   | x | 84     |   |
|                | <i>Dasyphora albofasciata</i>  |                            | x |     |     | x | 2      |   |
|                | <i>Eudasyphora sp.</i>   | x                          |   | x   | x   | x | 9      |   |
|                | <i>Graphomya sp.</i>   |                            | x | x   | x   | x | 9      |   |
|                | <i>Gymnodia sp.</i>  |                            | x | x   | x   |   | 6      |   |
|                | <i>Hebecnema sp.</i>   |                            |   |     | x   | x | 3      |   |
|                | <i>Hydrotaea aenescens</i>   |                            |   | x   | x   |   | 28     |   |
|                | <i>Hydrotaea armipes</i>   |                            |   | x   | x   | x | 15     |   |
|                | <i>Hydrotaea capensis</i>  |                            | x | x   | x   |   | 3      |   |
|                | <i>Hydrotaea dentipes</i>  | x                          | x | x   | x   | x | 64     |   |
|                | <i>Hydrotaea ignava</i>  |                            | x | x   | x   | x | 53     |   |
|                | <i>Hydrotaea pilipes</i>   |                            |   | x   | x   | x | 22     |   |
|                | <i>Hydrotaea similis</i>   | x                          | x | x   | x   |   | 157    |   |
|                | <i>Hydrotaea sp.</i>   | x                          |   |     | x   | x | 12     |   |
|                | <i>Morellia sp.</i>  | x                          |   |     |     | x | 2      |   |
|                | <i>Musca autumnalis</i>  | x                          | x | x   | x   | x | 58     |   |
|                | <i>Musca domestica</i>   |                            |   |     | x   | x | 4      |   |
|                | <i>Muscina levida</i>  |                            |   | x   | x   | x | 14     |   |
|                | <i>Muscina pascuorum</i>   |                            |   | x   |     | x | 4      |   |
|                | <i>Muscina prolapsa</i>  |                            | x | x   | x   | x | 8      |   |
|                | <i>Mydaea sp.</i>  | x                          |   |     | x   | x | 5      |   |
|                | <i>Myospila sp.</i>  |                            |   |     |     | x | 1      |   |
|                | <i>Phaonia sp.</i>   | x                          |   | x   |     | x | 10     |   |
|                | <i>Stomoxys calcitrans</i>   | x                          | x |     | x   | x | 5      |   |
|                | Other Muscidae species   |                            | x | x   |     | x | 5      |   |
|                | OPOMYZIDAE   | <i>Geomyza tripunctata</i> |   |     |     |   | x      | 1 |



| ORDER / FAMILY | SPECIES   | STAGE OF DECOMPOSITION |   |     |     |   |        |
|----------------|---|------------------------|---|-----|-----|---|--------|
|                |   | F                      | B | AcD | AdD | D | NUMBER |
| PHORIDAE       | <i>Conicera floricola</i>                                       |                        |   |     |     | x | 2      |
|                | <i>Conicera tibialis</i>  |                        |   |     | x   |   | 2      |
|                | <i>Diplonevra florescens</i>                                    |                        |   | x   |     |   | 3      |
|                | <i>Megaselia albicaudata</i>                                    |                        |   |     |     | x | 1      |
|                | <i>Megaselia brevicostalis</i>                                  | x                      |   | x   | x   | x | 71     |
|                | <i>Megaselia citrinella</i> <sup>s</sup>                        |                        |   |     | x   |   | 1      |
|                | <i>Megaselia elongata</i>                                       |                        |   | x   |     |   | 1      |
|                | <i>Megaselia giraudii</i>                                       | x                      |   |     |     |   | 1      |
|                | <i>Megaselia meconicera</i> <sup>s</sup>                        |                        |   |     |     | x | 1      |
|                | <i>Megaselia tama</i> <sup>s</sup>                              |                        |   |     | x   | x | 4      |
|                | <i>Megaselia tarsalis</i>                                       |                        |   | x   | x   | x | 4      |
|                | <i>Megaselia verna</i>  |                        |   |     |     | x | 1      |
|                | <i>Megaselia sp near angusta</i>                                | x                      |   |     | x   | x | 5      |
|                | <i>Megaselia sp A</i>   | x                      |   |     | x   | x | 3      |
|                | <i>Megaselia sp B</i>   |                        |   |     |     | x | 1      |
|                | <i>Megaselia sp C</i>   |                        | x |     |     |   | 1      |
|                | <i>Metopina perpusilla</i>                                      |                        |   | x   | x   |   | 2      |
|                | <i>Pseudacteon formicarum</i> <sup>s</sup>                      |                        |   |     | x   | x | 5      |
|                | <i>Pseudacteon lundbecki</i>                                    |                        |   |     | x   |   | 2      |
| PIOPHILIDAE    | <i>Liopiophila varipes</i>                                      | x                      | x | x   | x   | x | 441    |
|                | <i>Parapiophila</i> <sup>BC</sup> <i>vulgaris</i> <sup>BC</sup> |                        |   | x   | x   | x | 48     |
|                | <i>Piophila</i> <sup>BC</sup> <i>casei</i> <sup>BC</sup>        |                        |   |     | x   |   | 1      |
|                | <i>Piophila megastigmata</i> <sup>BC</sup>                      |                        |   | x   | x   |   | 13     |
|                | <i>Prochyliza</i> <sup>BC</sup> <i>nigrimana</i> <sup>BC</sup>  |                        | x | x   | x   |   | 6      |
|                | <i>Protopiophila latipes</i>                                    |                        | x | x   | x   | x | 118    |
|                | <i>Stearibia</i> <sup>C</sup> <i>nigriceps</i> <sup>C</sup>     | x                      | x | x   | x   | x | 1447   |
| PSYCHODIDAE    | <i>Psychoda albipennis</i>                                      |                        |   |     |     | x | 4      |
|                | <i>Psychoda minuta</i>  |                        |   |     |     | x | 1      |
|                | <i>Psychoda cf. surcoufi</i>                                    |                        |   |     |     | x | 3      |
|                | <i>Psychoda sp.</i>   |                        |   |     |     | x | 1      |
|                | <i>Tinearia alternata</i>                                       |                        |   |     |     | x | 1      |
| SARCOPHAGIDAE  | <i>Ravinia pernix</i>   |                        |   |     | x   | x | 5      |
|                | <i>Sarcophaga (Bellieriomima) subulata</i>                      |                        |   |     |     | x | 2      |
|                | <i>Sarcophaga (Helicophagella) noverca</i>                      |                        |   |     |     | x | 1      |
|                | <i>Sarcophaga (Parasarc.) atratrix</i>                          |                        |   |     | x   | x | 2      |
|                | <i>Sarcophaga (Sarc.) pyrenaica</i>                             |                        |   |     | x   | x | 3      |

| ORDER / FAMILY                        | SPECIES  | STAGE OF DECOMPOSITION |   |     |     |    |        |
|---------------------------------------|--|------------------------|---|-----|-----|----|--------|
|                                       |  | F                      | B | AcD | AdD | D  | NUMBER |
| SARCOPHAGIDAE                         | <i>Sarcophaga albiceps</i>                               | x                      |   | x   | x   | x  | 16     |
|                                       | <i>Sarcophaga incisilobata</i>                           |                        |   |     |     | x  | 1      |
|                                       | <i>Sarcophaga sp.</i>                                    |                        | x |     | x   | x  | 20     |
| SCATOPSIDAE                           | <i>Coboldia fuscipes</i>                                 |                        |   |     |     | x  | 3      |
|                                       | <i>Thripomorpha cf. coxendix</i>                         |                        |   |     |     | x  | 1      |
| SCIARIDAE                             | <i>Bradysia angustipennis</i>                            |                        |   |     |     | x  | 1      |
|                                       | <i>Bradysia hilaris</i> -Gr.                             |                        |   |     |     | x  | 1      |
|                                       | <i>Bradysia subrufescens</i>                             |                        |   |     |     | x  | 1      |
|                                       | <i>Bradysia sp.</i>                                      |                        |   |     |     | x  | 1      |
|                                       | <i>Cratyna sp.</i>                                       |                        |   |     |     | x  | 1      |
|                                       | <i>Hyperlasion wasmanni</i>                              |                        |   |     | x   | x  | 9      |
|                                       | <i>Lycoriella cellaris</i>                               |                        |   |     |     | x  | 2      |
|                                       | <i>Phytosciara sp.</i>                                   |                        |   |     |     | x  | 1      |
|                                       | <i>Phytosciara (Dolichosciara) flavipes</i>              |                        |   |     |     | x  | 1      |
|                                       | <i>Phyxia scabiei</i>                                    |                        |   |     |     | x  | 1      |
|                                       | <i>Scatopsiara atomaria</i>                              |                        |   |     | x   | x  | 2      |
|                                       | <i>Scatopsiara multispina</i>                            |                        |   | x   | x   | x  | 86     |
|                                       | Other Sciaridae species                                  |                        |   | x   |     |    | 1      |
| SEPSIDAE                              | <i>Meroplius<sup>BC</sup> fukuharai<sup>JP</sup></i>     |                        |   | x   | x   | x  | 16     |
|                                       | <i>Meroplius minutus<sup>BC</sup></i>                    |                        | x | x   | x   | x  | 295    |
|                                       | <i>Nemopoda nitidula</i>                                 | x                      |   | x   | x   | x  | 45     |
|                                       | <i>Nemopoda speiseri<sup>JP</sup></i>                    |                        |   | x   | x   | x  | 6      |
|                                       | <i>Sepsis fulgens</i>                                    |                        |   | x   | x   | x  | 27     |
|                                       | <i>Sepsis luteipes<sup>JP</sup></i>                      | x                      |   | x   | x   | x  | 17     |
|                                       | <i>Sepsis punctum</i>                                    | x                      |   | x   | x   | x  | 28     |
|                                       | Other Sepsidae species                                   |                        |   |     | x   | x  | 5      |
| SIMULIDAE                             | Unidentified species                                     |                        |   |     |     | x  | 7      |
| SPHAEROCERIDAE                        | <i>Alloborborus<sup>JP</sup> pallifrons<sup>JP</sup></i> |                        | x |     |     |    | 1      |
|                                       | <i>Bifronsina bifrons</i>                                |                        |   |     | x   | x  | 3      |
|                                       | <i>Borborillus<sup>G</sup> vitripennis<sup>G</sup></i>   | x                      |   |     | x   |    | 3      |
|                                       | <i>Chaetopodella scutellaris</i>                         | x                      | x | x   | x   | x  | 347    |
|                                       | <i>Coproica ferruginata</i>                              |                        |   |     | x   | x  | 7      |
|                                       | <i>Coproica hirticula<sup>BC</sup></i>                   |                        | x | x   | x   | x  | 260    |
|                                       | <i>Coproica lugubris<sup>BC</sup></i>                    |                        |   |     | x   | x  | 16     |
|                                       | <i>Coproica pusio</i>                                    |                        | x | x   | x   | x  | 41     |
|                                       | <i>Coproica rohaceki</i>                                 |                        |   | x   | x   | x  | 18     |
|                                       | <i>Coproica vagans<sup>G</sup></i>                       | x                      | x | x   | x   | x  | 35     |
|                                       | <i>Elachisoma<sup>BC</sup> aterrimum<sup>BC</sup></i>    |                        |   |     | x   | x  | 15     |
| <i>Elachisoma bajzae<sup>BC</sup></i> |  |                        | x | x   | x   | 10 |        |

| ORDER / FAMILY         | SPECIES   | STAGE OF DECOMPOSITION      |   |     |     |   |        |    |
|------------------------|---|-----------------------------|---|-----|-----|---|--------|----|
|                        |   | F                           | B | AcD | AdD | D | NUMBER |    |
| SPHAEROCERIDAE         | <i>Elachisoma pilosum</i> <sup>BC</sup>                           |                             |   |     |     | x | 1      |    |
|                        | <i>Gonioneura</i> <sup>BC</sup> <i>spinipennis</i> <sup>BC</sup>  |                             |   | x   | x   | x | 7      |    |
|                        | <i>Ischiolepta denticulata</i> <sup>E</sup>                       | x                           |   |     |     | x | 2      |    |
|                        | <i>Ischiolepta vaporariorum</i> <sup>BC</sup>                     |                             |   | x   | x   |   | 2      |    |
|                        | <i>Leptocera caenosa</i>  |                             | x | x   | x   | x | 43     |    |
|                        | <i>Minilimosina</i> <sup>C</sup> <i>alloneura</i> <sup>BC</sup>   |                             |   | x   |     | x | 5      |    |
|                        | <i>Minilimosina fungicola</i> <sup>BC</sup>                       |                             |   |     | x   | x | 5      |    |
|                        | <i>Minilimosina parvula</i> <sup>BC</sup>                         | x                           |   | x   | x   | x | 22     |    |
|                        | <i>Norrbonnia costalis</i>  | x                           |   |     |     |   | 1      |    |
|                        | <i>Opalimosina</i> <sup>BC</sup> <i>calcarifera</i> <sup>BC</sup> |                             |   |     | x   | x | 22     |    |
|                        | <i>Opalimosina collini</i> <sup>BC</sup>                          |                             |   |     |     | x | 2      |    |
|                        | <i>Opalimosina czernyi</i> <sup>BC</sup>                          |                             |   |     |     | x | 1      |    |
|                        | <i>Opalimosina liliputana</i> <sup>BC</sup>                       |                             |   | x   | x   | x | 76     |    |
|                        | <i>Opalimosina mirabilis</i> <sup>BC</sup>                        |                             |   |     | x   | x | 9      |    |
|                        | <i>Opalimosina simplex</i> <sup>BC</sup>                          |                             | x | x   | x   | x | 24     |    |
|                        | <i>Paralimosina fucata</i>  | x                           | x |     | x   | x | 16     |    |
|                        | <i>Phthitia empirica</i> <sup>IP</sup>                            |                             |   |     | x   |   | 3      |    |
|                        | <i>Spelobia baezi</i> <sup>BC</sup>                               |                             |   | x   | x   | x | 19     |    |
|                        | <i>Spelobia cambrica</i> <sup>IP</sup>                            |                             |   |     | x   | x | 7      |    |
|                        | <i>Spelobia clunipes</i>  | x                           |   | x   | x   | x | 37     |    |
|                        | <i>Spelobia luteilabris</i>                                       | x                           | x | x   | x   | x | 69     |    |
|                        | <i>Spelobia nana</i> <sup>BC</sup>                                |                             |   |     | x   | x | 4      |    |
|                        | <i>Spelobia palmata</i>   | x                           |   |     |     |   | 2      |    |
|                        | <i>Sphaerocera curvipes</i>                                       | x                           |   |     | x   | x | 5      |    |
|                        | <i>Telomerina flavipes</i>  |                             |   | x   | x   | x | 12     |    |
|                        | <i>Telomerina levifrons</i> <sup>SP</sup>                         |                             |   | x   | x   | x | 39     |    |
|                        | <i>Terrilimosina schmitzi</i>                                     |                             |   |     | x   |   | 2      |    |
|                        | <i>Trachyopella</i> <sup>BC</sup> <i>kuntzei</i> <sup>IP</sup>    |                             |   |     | x   | x | 11     |    |
|                        | <i>Trachyopella lineafrons</i> <sup>BC</sup>                      |                             | x | x   | x   | x | 38     |    |
|                        | Other Sphaeroceridae species                                      |                             |   |     | x   |   | 1      |    |
|                        | SYRPHIDAE   | <i>Episyrphus balteatus</i> |   |     | x   | x | x      | 10 |
|                        |   | <i>Eristalis similis</i>    |   |     |     |   | x      | 1  |
|                        |   | <i>Meliscaeva cinctella</i> |   |     |     |   | x      | 1  |
| <i>Syritta pipiens</i> |   |                             |   |     | x   |   | 1      |    |
| TABANIDAE              | <i>Dasyrhamphis atra</i>  | x                           |   |     |     |   | 1      |    |
|                        | <i>Tabanus bromius</i>  | x                           |   |     |     |   | 1      |    |
| TACHINIDAE             | <i>Peribaea tibialis</i>  |                             |   |     |     | x | 1      |    |
|                        | <i>Voria rurales</i>  |                             |   |     |     | x | 1      |    |
|                        | <i>Winthemia cf. quadripustulata</i>                              |                             |   |     |     | x | 7      |    |

Arthropods of forensic interest associated to pig carcasses in Aiako Harria Natural Park...

| ORDER / FAMILY    | SPECIES                                  | STAGE OF DECOMPOSITION |   |     |     |   |        |
|-------------------|--|------------------------|---|-----|-----|---|--------|
|                   |  | F                      | B | AcD | AdD | D | NUMBER |
| ULIDIIDAE         | <i>Euxesta pechumani</i>                 |                        |   |     | x   |   | 2      |
| <b>COLEOPTERA</b> |  |                        |   |     |     |   |        |
| APHODIDAE         | Unidentified species                     |                        |   |     | x   |   | 1      |
| CARABIDAE         | <i>Steropus (Steropus) madidus</i>       | x                      |   | x   |     |   | 3      |
| CLERIDAE          | <i>Necrobia ruficollis</i>               |                        |   |     |     | x | 1      |
|                   | <i>Necrobia rufipes</i>                  |                        |   | x   | x   | x | 10     |
|                   | <i>Necrobia violacea</i>                 |                        |   |     | x   | x | 15     |
| CURCULIONIDAE     | Unidentified species                     | x                      | x |     | x   |   | 6      |
| DERMESTIDAE       | <i>Dermestes frischii</i>                |                        |   |     | x   | x | 6      |
|                   | <i>Dermestes mustelinus</i>              |                        |   |     | x   | x | 3      |
|                   | <i>Dermestes undulatus</i>               |                        |   |     | x   | x | 10     |
| GEOTRUPIDAE       | <i>Anoplotrupes stercorosus</i>          | x                      | x | x   | x   | x | 124    |
|                   | <i>Sericotrupes niger</i>                |                        |   |     |     | x | 1      |
|                   | <i>Thyphaeus thypoeus</i>                |                        |   |     |     | x | 1      |
|                   | <i>Trypocopris pyrenaicus</i>            | x                      | x | x   | x   | x | 142    |
| HISTERIDAE        | <i>Carcinops pumilio</i>                 |                        |   |     | x   | x | 7      |
|                   | <i>Hister unicolor</i>                   |                        |   |     | x   | x | 3      |
|                   | <i>Margarinotus (Plomister) brunneus</i> | x                      | x |     | x   | x | 24     |
|                   | <i>Saprinus (Saprinus) planiusculus</i>  |                        |   | x   |     |   | 3      |
|                   | <i>Saprinus (Saprinus) semistriatus</i>  | x                      | x | x   | x   |   | 6      |
|                   | <i>Saprinus (Saprinus) subnitescens</i>  |                        | x | x   | x   |   | 15     |
|                   | Unidentified species                     | x                      | x | x   | x   | x | 55     |
| LEIODIDAE         | <i>Sciodrepoides fumatus</i>             |                        |   |     | x   | x | 18     |
|                   | <i>Sciodrepoides watsoni</i>             |                        |   |     | x   |   | 1      |
| NITIDULIDAE       | <i>Nitidulidae sp.</i>                   |                        |   |     |     | x | 8      |
|                   | <i>Omosita colon</i>                     |                        |   |     |     | x | 12     |
|                   | <i>Omosita depressa</i>                  |                        |   |     | x   | x | 14     |
|                   | <i>Omosita discoidea</i>                 |                        |   |     |     | x | 2      |
| OEDEMERIDAE       | Unidentified species                     |                        |   | x   |     |   | 1      |
| SILPHIDAE         | <i>Necrodes littoralis</i>               | x                      | x | x   | x   |   | 141    |
|                   | <i>Nicrophorus humator</i>               |                        |   | x   |     |   | 1      |
|                   | <i>Nicrophorus vespilloides</i>          | x                      | x | x   | x   |   | 24     |
|                   | <i>Oceoptoma thoracica</i>               |                        |   |     | x   |   | 1      |
|                   | <i>Tanatophilus rugosus</i>              |                        | x |     |     |   | 1      |
|                   | <i>Tanatophilus sinuatus</i>             |                        |   | x   |     |   | 2      |

| ORDER / FAMILY              | SPECIES                                  | STAGE OF DECOMPOSITION |   |     |     |   | NUMBER |
|-----------------------------|--|------------------------|---|-----|-----|---|--------|
|                             |  | F                      | B | AcD | AdD | D |        |
| STAPHYLINIDAE               | <i>Acrotona pygmaea</i>                  |                        |   |     | x   | x | 10     |
|                             | <i>Acrulia inflata</i>                   |                        |   |     |     | x | 1      |
|                             | <i>Aleochara (s.str.) curtula</i>        |                        | x | x   | x   | x | 22     |
|                             | <i>Aleochara (s.str.) stichai</i>        |                        |   |     |     | x | 1      |
|                             | <i>Anotylus complanatus</i>              | x                      |   |     | x   | x | 8      |
|                             | <i>Anotylus sculpturatus</i>             |                        | x |     |     |   | 1      |
|                             | <i>Atheta (Microdota) amicula</i>        | x                      |   |     |     | x | 3      |
|                             | <i>Atheta (Microdota) indubia</i>        |                        |   |     |     | x | 1      |
|                             | <i>Atheta (Microdota) mortuorum</i>      |                        |   |     | x   | x | 7      |
|                             | <i>Atheta (s.str.) aquatica</i>          |                        |   |     |     | x | 6      |
|                             | <i>Atheta (s.str.) fungicola</i>         |                        |   |     | x   | x | 3      |
|                             | <i>Autalia impressa</i>                  |                        |   |     |     | x | 2      |
|                             | <i>Autalia puncticollis</i>              |                        |   |     |     | x | 1      |
|                             | <i>Bisnius fimetarius</i>                |                        | x | x   | x   | x | 38     |
|                             | <i>Creophilus maxillosus</i>             |                        | x | x   | x   | x | 46     |
|                             | <i>Dimetrota nigripes</i>                |                        |   |     |     | x | 5      |
|                             | <i>Drusilla canaliculata</i>             |                        |   | x   |     | x | 2      |
|                             | <i>Gabrius exiguus</i>                   |                        | x |     |     |   | 1      |
|                             | <i>Gyrophypnus (s.str.) fracticornis</i> |                        |   |     | x   | x | 3      |
|                             | <i>Megarthritis denticollis</i>          |                        |   |     |     | x | 1      |
|                             | <i>Myrmecopora (Iliusa) fugax</i>        |                        |   |     |     | x | 1      |
|                             | <i>Ontholestes tesellatus</i>            |                        |   | x   |     | x | 2      |
|                             | <i>Oxytelus (Epomotylus) sculptus</i>    | x                      | x | x   |     | x | 9      |
|                             | <i>Philonthus cochleatus</i>             | x                      | x | x   | x   | x | 12     |
|                             | <i>Philonthus coprophilus</i>            |                        |   |     | x   |   | 1      |
|                             | <i>Philonthus nitidus</i>                |                        |   |     |     | x | 1      |
|                             | <i>Philonthus politus</i>                |                        |   | x   | x   | x | 11     |
|                             | <i>Philonthus succicola</i>              | x                      | x |     | x   | x | 12     |
|                             | <i>Philonthus varians</i>                |                        |   |     | x   | x | 4      |
|                             | <i>Platysthetus arenarius</i>            |                        | x |     | x   | x | 27     |
|                             | <i>Proteinus brachypterus</i>            |                        |   |     |     | x | 3      |
|                             | <i>Rugilus (s.str.) orbiculatus</i>      |                        |   |     |     | x | 1      |
|                             | <i>Tachinus flabolumbatus</i>            |                        |   |     |     | x | 2      |
| Other Staphylinidae species |  |                        |   |     | x   | 9 |        |
| TROGIDAE                    | <i>Trox scaber</i> <sup>BC</sup>         |                        |   |     | x   | x | 3      |
| OTHER families              | Unidentified species                     | x                      | x | x   | x   | x | 133    |

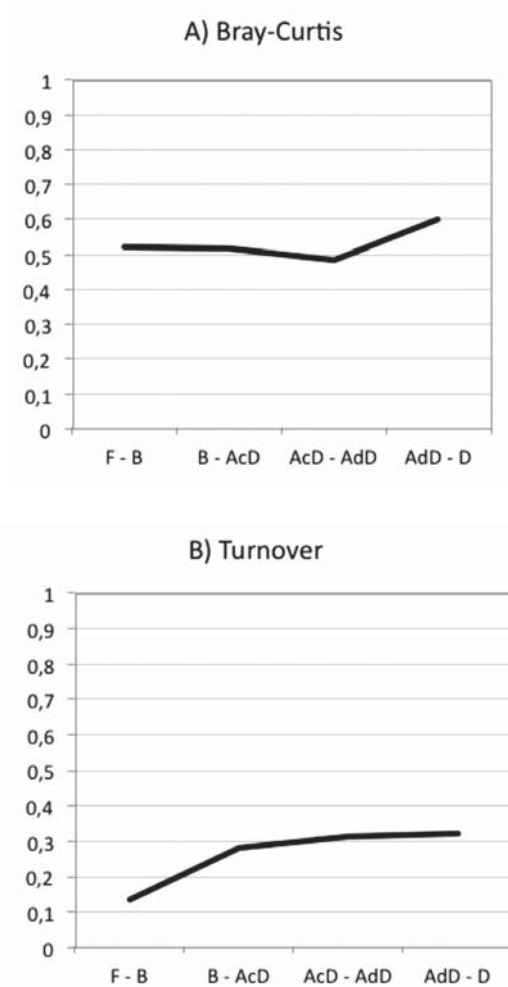
| ORDER / FAMILY               | SPECIES  | STAGE OF DECOMPOSITION |   |     |     |   |        |
|------------------------------|--|------------------------|---|-----|-----|---|--------|
|                              |  | F                      | B | AcD | AdD | D | NUMBER |
| <b>HYMENOPTERA</b>           |  |                        |   |     |     |   |        |
| HYMENOPTERA                  | Unidentified species   | x                      | x | x   | x   | x | 100    |
| FORMICIDAE                   |  | x                      | x | x   | x   | x | 136    |
| LEPIDOPTERA                  |  | x                      |   |     |     |   | 1      |
| <b>EXOPTERYGOTA</b>          |  |                        |   |     |     |   |        |
| PSOCOPTERA                   |  |                        |   |     |     | x | 6      |
| THYSANOPTERA                 |  |                        |   |     |     | x | 2      |
| <b>HEMIPTERA</b>             |  |                        |   |     |     |   |        |
| CICADELLIDAE                 | Unidentified species   | x                      |   | x   |     | x | 4      |
| CIXIIDAE                     | Unidentified species   |                        |   |     |     | x | 1      |
| DELPHACIDAE                  | Unidentified species   | x                      |   | x   | x   | x | 6      |
| ISSIDAE                      | <i>Issus coleoptratus</i>  |                        |   |     |     | x | 3      |
| ANTHOCORIDAE                 | <i>Xylocoris (Proxylocoris) galactinus</i>   |                        |   |     |     | x | 5      |
| CERATOCOMBIDAE <sup>BC</sup> | <i>Ceratocombus</i> <sup>BC</sup><br>( <i>Ceratocombus</i> ) <i>coleoptratus</i> <sup>BC</sup> |                        |   |     | x   | x | 4      |
| COREIDAE                     | <i>Coreus marginatus marginatus</i>  |                        |   |     | x   | x | 3      |
| LYGAEIDAE                    | <i>Scolopostethus affinis</i>  |                        |   |     |     | x | 1      |
| PENTATOMIDAE                 | <i>Piezodorus lituratus</i>  |                        | x |     |     |   | 1      |
| APHIDIDAE                    | Unidentified species   |                        |   |     | x   | x | 3      |
| <b>OTHER TAXA</b>            |  |                        |   |     |     |   |        |
| DERMAPTERA                   |  |                        |   | x   |     | x | 3      |
| COLLEMBOLA                   |  | x                      |   |     | x   | x | 67     |
| PROTURA                      |  |                        |   | x   |     | x | 6      |
| DIPLURA                      |  |                        |   |     |     | x | 1      |
| MYRIAPODA                    | DIPLOPODA  |                        |   |     |     | x | 1      |
|                              | CHILOPODA  |                        |   |     |     | x | 20     |
| ISOPODA                      |  |                        |   |     |     | x | 23     |
| <b>CHELICERATA</b>           |  |                        |   |     |     |   |        |
| ACARI                        |  | x                      | x | x   | x   | x | n.c.   |
| <b>ARACHNIDA</b>             |  |                        |   |     |     |   |        |
| LINYPHIIDAE                  | <i>Diplocephalus latifrons</i>   |                        |   |     |     | x | 3      |
|                              | <i>Erigone dentipalpis</i>   |                        |   |     |     | x | 1      |
|                              | <i>Tiso vagans</i>   |                        |   |     |     | x | 2      |
|                              | <i>Centromerita concinna</i>   |                        |   |     |     | x | 1      |
|                              | <i>Centromerus sylvaticus</i>  |                        |   |     |     | x | 4      |
|                              | <i>Diplostyla concolor</i>   |                        |   |     |     | x | 3      |
|                              | <i>Tenuiphantes sp.</i>  |                        |   |     |     | x | 2      |
|                              | <i>Tenuiphantes flavipes</i>   |                        |   |     |     | x | 6      |
|                              | <i>Tenuiphantes tenuis</i>   |                        |   |     | x   |   | 1      |

| ORDER / FAMILY    | SPECIES                   | STAGE OF DECOMPOSITION |   |     |     |   |        |
|-------------------|---------------------------|------------------------|---|-----|-----|---|--------|
|                   |                           | F                      | B | AcD | AdD | D | NUMBER |
| LYCOSIDAE         | <i>Pardosa sp.</i>        |                        |   |     | x   | x | 4      |
|                   | <i>Pardosa lugubris</i>   |                        |   |     |     | x | 1      |
|                   | <i>Trochosa terricola</i> | x                      |   |     |     | x | 5      |
| SALTICIDAE        | <i>Heliophanus sp.</i>    |                        |   |     |     | x | 1      |
| THERIDIIDAE       | <i>Episinus truncatus</i> |                        |   |     | x   |   | 1      |
| OPILIONIDA        |                           |                        |   |     |     | x | 10     |
| PSEUDOSCORPIONIDA |                           |                        |   |     |     | x | 4      |

**Table 2:** Diversity indexes associated to the decomposition stages calculated with the statistical software PAST (HAMMER, 2001).

|                              | STAGE OF DECOMPOSITION |         |             |               |        |
|------------------------------|------------------------|---------|-------------|---------------|--------|
|                              | FRESH                  | BLOATED | ACTIVE DEC. | ADVANCED DEC. | DRY    |
| <b>Number of Individuals</b> | 755                    | 412     | 1120        | 3250          | 2300   |
| <b>Number of Taxa</b>        | 24                     | 20      | 30          | 37            | 47     |
| <b>Margalef index</b>        | 3,471                  | 3,156   | 4,13        | 4,452         | 5,943  |
| <b>Fisher index (alpha)</b>  | 4,724                  | 4,394   | 5,67        | 5,853         | 8,362  |
| <b>Simpson index (1-D)</b>   | 0,6145                 | 0,8153  | 0,8633      | 0,7645        | 0,9035 |

Dissimilarity was highest during the first and last moments of decomposition (Fig. 3A), remaining lower between those moments. On the other hand, species replacement expressed by turnover rate indicated a very low change on species identity during the first stages (Fig. 3B), so the most important changes were in the abundance of the species present. These findings agree with results summarised on Table 2. Fresh stage was characterised by dominant species which become less important in number with the arrival of new species during the ongoing of bloated stage, resulting in that peak of dissimilarity. After this first moment, species replacement kept constant.



**Figure 3:** A) Bray-Curtis dissimilarity index graphical representation from data calculated with the statistical software PAST (HAMMER, 2001);  
B) Turnover [ $t=(a+b)/(NA + NB)$ ].

#### 4. DISCUSSION

Arthropods, scavengers and microbes compete for cadaveric resources on a dynamic process of colonization, development and succession patterns (35). Natural inhabitants of the soil disappear (36, 37), and this new ephemeral



ecosystem provided by the dead corpse becomes dominated by cadaveric fauna, from which the most important is the class Insecta (more than 97% of the total). This result is much greater than the 70-86% proposed by other authors (38, 39, 40). It is also important to remark that, although mites are already under revision and not included in the report, they can provide forensically important information (41, 42) and will be studied in detail in future research.

From the class Insecta, the most abundant families belong to the orders Diptera and Coleoptera, both making up to 94% of the total necrophagous fauna found on carcasses. Most of the reliable forensic indicators are found among the families of these orders (39).

There is also an important amount of new records (see Table 2) that denotes the low level of knowledge of the carrion fauna in our region. As a brief summary, the following new records are pointed out for Diptera:

- a) 2 new species for Science: *Crossopalpus* sp. n. (nr. *nigritellus* and *aeneus*) and *Drapetis* sp. n. (group *exilis*) (Diptera: Hybotidae).
- b) 1 genus and 8 species new for the Iberian Peninsula.
- c) 7 new species for Spain.
- d) 1 new species for the peninsular Spain.
- e) 1 family, 11 genus and 28 species new for the Basque Country.
- f) 1 family, 4 genus and 3 species new for Guipuzkoa.

For Coleoptera, a new record has recently been reported for the species *Trox scaber* (Coleoptera: Trogidae) in the Iberian Peninsula (43).

Such an important amount of new findings gives us an idea about the necessity of increasing the effort dedicated to faunistic studies in some regions (16).

Carrion fauna has been found to be very diverse and quite variable. Each stage of decomposition is characterized by a particular group of organisms, each of which occupy a particular niche (39). However, in summer the process occurs fast as the warm temperature and high humidity favour bacterial growing and larval development (30, 38). This leads the dry stage to be the longest one, and therefore, the general trend is for specimens to be captured then (8), so a gradual change in biological diversity ( $\alpha$  diversity) is observed.

Fresh and bloated stages are characterized by groups of arthropods that depend predominantly on the carrion as their direct source of food. Blowflies may arrive within seconds to the corpse, and maggots take top billing in the carcass reduction (13, 39). These results on the lowest values of Margalef index obtained through the whole process, with a slightly degree of dominance (according to Simpson index values) by the forming maggot mass and fly adults.

Very few of these species remain until dry stage (39). Hence, in this stage the dominance becomes less influent and the diversity rise up. In fact, the greatest value on Margalef index occurs on the last stage, concurring with the highest value of Simpson index.

Decomposition stages were also analyzed not as independent units, but as a continuous process of changes on the community composition ( $\beta$  diversity, Fig. 3), and similar conclusions were obtained. Changes from fresh to bloated stage occurred with minimal variations regarding the identity of the families collected, but with major changes in the abundance on each family (there are changes in dominance, which is higher in fresh comparing to bloated stage). By contrast, family replacement is higher in latter stages, although the abundance of each one does not vary significantly (and so the dominance, which is much lower).

Several studies have been performed including diversity indexes (8, 43, 44). Most of them also concluded that diversity tended to be higher in late stages of decomposition, but they have not been compared as the sampling methodology, indexes and/or the manner of applying them are not equal.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the University of the Basque Country (Vice-rectorado de Investigación, UPV/EHU) and by the Basque Government (EAJ/GV, Departamento de Agricultura & Departamento de Educación, Universidades e Investigación).

## 6. BIBLIOGRAPHY

1. BENECKE M. Six Forensic Entomology Cases: Description and Commentary. *Journal of Forensic Sciences* 1998, 43(4):797-805.
2. BENECKE M. Six Forensic Entomology Cases: Description and Commentary. *Forensic Pathology Reviews* 2005, 2:207-240.
3. ARNALDOS MI, GARCÍA MD, ROMERA E, PRESA JJ, LUNA A. Estimation of post-mortem interval based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Science International* 2005, 149:57-65.
4. SHARANOWSKI BJ, WALKER EG, ANDERSON GS. Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. *Forensic Science International* 2008, 179:219-240.
5. 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.

6. WELLS JD, LA MOTTE LR. Estimating the post-mortem interval. In: Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. Second edition. JH Byrd & JL Castner eds. pp. 367-388. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2010.
7. ARNALDOS MI, PRADO E CASTRO C, PRESA JJ, LÓPEZ-GALLEGO E, GARCÍA MD. Importancia de los estudios regionales de fauna sarcosaprófaga. Aplicación a la práctica forense. *Ciencia Forense* 2006, 8:63-82.
8. ARNALDOS MI, ROMERA E, PRESA JJ, LUNA A, GARCÍA MD. Studies on seasonal arthropod succession on carrion in the southeastern Iberian Peninsula. *International Journal of Legal Medicine* 2004, 118:197-205.
9. CASTILLO MIRALBÉS M. Estudio de la Entomofauna asociada a cadáveres en el Alto Aragón (España). *Monografías de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)* 6, 2002.
10. 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 (S.E.A.)* 2004, 34:263-269.
11. ROMERO PALANCO JL, MUNGUÍA GIRÓN F, GAMERO LUCAS J. Entomología cadavérica en la provincial de Cádiz (S. de España). *Ciencia Forense* 2006, 8:83-106.
12. DÍAZ MARTÍN B, SALOÑA BORDAS MI. Primera cita y nuevos datos sobre los hábitos necrófagos de *Trox scaber* (LINNAEUS, 1767) (Coleoptera, Trogidae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco (C.A.P.V.). *Boletín de la Asociación Española de Entomología* 2012, 36(1-2):53-59.
13. CATTS EP, GOFF ML. Forensic Entomology in Criminal Investigations. *Annual Review of Entomology* 1992, 37:253-272.
14. GOFF ML. Estimation of Postmortem Interval Using Arthropod Development and Successional Patterns. *Forensic Science Review* 1993, 5:81-94.
15. SCHOENLY KG, HASKELL NH, MILLS DK, BIEME-NDI C, LARSEN K, LEE Y. Using pig carcasses as Model Corpses to Teach Concepts of Forensic Entomology and Ecological Succession. *The American Biology Teacher* 2006, 68(7):402-410.
16. CARLES-TOLRÁ M, DÍAZ B, SALOÑA MI. Algunos dípteros necrófilos capturados sobre cadáveres de cerdos en el País Vasco (España) (Insecta: Diptera: Brachycera). *Heteropterus Revista Entomológica* 2012, 12(2):213-222.
17. VENTURA D, DÍAZ B, SALOÑA MI. *Crossopalpus humilis* (Frey, 1913) en la Península Ibérica y la relación de la familia Hybotidae con cadáveres de vertebrados (Diptera: Empidoidea: Hybotidae). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)* 2012, 50:527-532.
18. SCHENK ET, McMASTER JH. Procedure in Taxonomy. Third edition. Stanford University Press, Stanford, California. 123 pp. 1956.
19. BARRIENTOS JA. coord. 2004. Curso práctico de Entomología. Sociedad española de Entomología (ed.), 947 pp.
20. CHARRIER S. Clé de détermination des Coléoptères Lucanides et Scarabéides de Vendée et de l'Ouest de la France. *Le Naturaliste Vendéen* 2002, 2:61-93.

21. MARTÍN PIERA F, LÓPEZ COLÓN JI. Coleoptera, Scarabaeoidea I. In: Fauna Ibérica, vol. 14, Ramos MA *et al.* (eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid. 526 pp. 2000.
22. PRIETO PILOÑA F, PÉREZ VALCÁRCCEL J. Catálogo de los Silphidae y Agyrtidae (Coleoptera) de la Península Ibérica e Islas Baleares. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)* 2002, 30:1-32.
23. YÉLAMOS T. Coleoptera, Histeridae. In: Fauna Ibérica, vol. 17, Ramos MA *et al.* (eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid. 411 pp. 2002.
24. GONZÁLEZ MORA D. Los Calliphoridae de España, II: Calliphorini. *Eos* 1989, 65:39-59.
25. 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.
26. ROGNES K. The blow-fly genus *Lucilia* Robineau-Desvoidy (Diptera, Calliphoridae) in Norway. *Fauna Norvegica* 1980, 27:39-52.
27. ROGNES K. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark. E.J. Brill/Scandinavian Science Press Ltd., New York. 272 pp. 1991.
28. ROGNES K. Family Calliphoridae. In Papp L & Darvas B. 1998. Vol. 3: Manual of Palearctic Diptera. Science Herald, pp. 617-648. 1998.
29. ROZKOŠNÝ R, GREGOR F, PONT AC. The European Fanniidae (Diptera). *Acta Scientiarum Naturalium Bohemicae-Brno*, 1997. 31(2):1-80.
30. ANTON E, NIEDEREGGER S, BEUTEL RG. Beetles and flies collected on pig carrion in an experimental setting in Thuringia and their forensic implications. *Medical and Veterinary Entomology* 2011, 25(4):353-364.
31. TOMBERLIN JK, BYRD JH, WALLACE JR, BENBOW ME. Assessment of Decomposition Studies Indicates Need for Standardized and Repeatable Research Methods in Forensic Entomology. *Journal of Forensic Research* 2012, 3(5):1-10.
32. MORENO CE. Métodos para medir la biodiversidad. *M&T-Manuales y Tesis de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)*, Vol. 1. Zaragoza. 84 pp. 2001.
33. HAMMER Ø, HARPER DAT, RYAN PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1): 9 pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). 2001.
34. MAGURRAN AE. Measuring Biological diversity. Blackwell Science Ltd. 260 pp. 2004.
35. CARTER DO, YELLOWLESS D, TIBBETT M. Cadaver Decomposition in Terrestrial Ecosystems. *Naturwissenschaften* 2007, 94:12-24.
36. BORNEMISSZA GF. An analysis of arthropod succession in carrion and its effect of its decomposition on soil fauna. *Australian Journal of Zoology* 1957, 5:1-12.
37. SALOÑA MI, MORAZA ML, CARLES TOLRA M, IRAOLA V, BAHILLO P, YÉLAMOS T, OUTERELO R, ALCARAZ R. Searching the Soil: Forensic Importance of Edaphic Fauna After the Removal of a Corpse. *Journal of Forensic Sciences* 2010, 55:1652-1655.
38. HORENSTEIN MB, ROSSO B, GARCÍA MD. Seasonal structure and dynamics of sarcosaprophagous fauna on pig carrion in a rural area of Cordoba (Argenti-

- na): Their importance in forensic science. *Forensic Science International* 2012, 217:146-156.
39. PAYNE JA. A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology* 1965, 46:592-602.
  40. TANTAWI TI, EL-KADY EM, GREENBERG B, EL-GHAFFAR HA. Arthropod succession on exposed rabbit carrion in Alexandria, Egypt. *Journal of Medical Entomology* 1996, 33:566-580.
  41. PEROTTI MA. Mégnin re-analysed: the case of the newborn baby girl, Paris, 1878. *Experimental and Applied Acarology* 2009, 49:37-44.
  42. RASMY AH. The humans lie but the spiders do not lie: An overview on forensic Acarology. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 2011, 1:109-110.
  43. HORENSTEIN MB, ARNALDOS MI, ROSSO B, GARCÍA MD. Estudio preliminar de la comunidad sarcosaprófaga en Córdoba (Argentina): Aplicación a la entomología forense. *Anales de Biología* 2005, 27:191-201.
  44. PRADO E CASTRO C, ARNALDOS MI, SOUSA JP, GARCÍA M. Preliminary study on a Community of Sarcosaprophagous Diptera in Central Portugal. *Entomologia generalis* 2011, 33(3):183-198.

## NORMAS DE PUBLICACIÓN

1. La revista *Ciencia Forense* considera para su publicación aquellos trabajos relacionados con la Medicina Forense en sus distintas áreas (Derecho Médico y Deontología, Tanatología, Patología Forense, Sexología Forense, Medicina Legal en la Infancia, Psiquiatría Forense, Genética Forense, Odontología Forense, Medicina Legal Laboral y Toxicología Forense).

2. La revista se dividirá en las siguientes secciones:

- REVISIONES. Artículos en los que se realice una puesta al día sobre temas de actualidad o de gran interés para la comunidad forense. Serán trabajos encargados por el Comité de Redacción. Los autores que espontáneamente deseen colaborar en esta sección pueden solicitarlo al director de la revista.
- ORIGINALES. Trabajos de investigación sobre cualquier tema de interés médico-legal.
- ORIGINALES BREVES. Trabajos de investigación o bien exposición de casos, que por sus características puedan ser publicados de forma abreviada. Deberán tener una extensión máxima de hasta 8 páginas DIN A-4, incluidas las tablas, figuras y referencias bibliográficas.
- OPINIÓN Y CUESTIONES A DEBATE. La revista brinda una oportunidad en esta sección al intercambio y a la discusión de ideas y opiniones sobre cuestiones polémicas o que necesiten de una reflexión profunda. Cualquier autor que espontáneamente desee colaborar en esta sección puede solicitarlo al director de la revista. La estructura del trabajo no ha de seguir el esquema que se exige en el caso de un artículo original de investigación.
- Otras secciones (NOTICIAS, CALENDARIO DE ACTIVIDADES, NOVEDADES EDITORIALES, etc.).

3. Los trabajos que se envíen para su publicación en la revista, habrán de ser inéditos y no estar pendientes de publicación en otra revista.

4. Se remitirán mecanografiados a doble espacio, por una sola cara, en papel DIN A-4, con 30 a 35 líneas de entre 60 y 70 espacios en cada página.

5. Se presentarán por triplicado, incluyendo tres copias de la iconografía y una copia en disquete indicando el nombre del primer autor, inicio

del título y programa utilizado. Serán precedidos de una hoja en la que se haga constar: título del trabajo, nombre del autor (o autores), dirección, número de teléfono y de fax; así como dirección de correo electrónico, si procede, situación académica o profesional y nombre de la institución académica a la que pertenece. Se acompañará de una carta de presentación en la que se solicita el examen de los mismos y la sección de la revista donde desearía que se publicase; en ella debe exponerse claramente que el trabajo no ha sido publicado previamente, que todos los autores están de acuerdo en su contenido y que ceden los derechos de publicación a la revista *Ciencia Forense*, de la Institución «Fernando el Católico».

#### TEXTO

Se recomienda la redacción de texto en estilo impersonal. Se estructurará el trabajo en los siguientes apartados: Resumen, Introducción, Material y Método, Resultados, Discusión y Bibliografía.

#### RESUMEN

Debe adjuntarse en español y en inglés. La extensión del resumen no ha de superar las 250 palabras, ni ser inferior a 150. El contenido del resumen estructurado para los originales se divide en cuatro apartados. Introducción, Material y Métodos, Resultados, y Conclusiones. En cada uno de ellos se ha de escribir, respectivamente, el problema motivo de investigación, la manera de llevar a cabo la misma, los resultados más destacados y las conclusiones que se derivan de estos resultados. Al final del resumen deben figurar hasta 6 palabras clave de acuerdo con Medical Subject Headings de Index Medicus.

#### INTRODUCCIÓN

Será breve y debe proporcionar sólo la explicación necesaria para que el lector pueda comprender el texto que sigue a continuación. No debe contener tablas ni figuras. Debe incluir un último párrafo en el que se expongan de forma clara el o los objetivos del trabajo.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se indica el tiempo que ha durado, las características de la serie estudiada, el criterio de selección, las técnicas utilizadas, proporcionando detalles suficientes para que el estudio pudiera repetirse sobre la base de esta información. Se han de escribir con detalle los métodos estadísticos.

## RESULTADOS

Relatan, no interpretan, las observaciones efectuadas con el método empleado. Estos datos se complementan con tablas y figuras, considerando que no ha de repetirse en el texto la misma información.

## DISCUSIÓN

Los autores tienen que exponer sus propias opiniones sobre el tema. Destacan el significado y aplicación práctica de los resultados; las consideraciones sobre una posible inconsistencia de la metodología y las razones por las cuales pueden ser válidos los resultados, la relación con publicaciones similares y comparación entre áreas de acuerdo y desacuerdo y las indicaciones y directrices para futuras investigaciones. Por otra parte debe evitarse que la discusión se convierta en una revisión del tema y se repitan los conceptos que han aparecido en la introducción. Tampoco deben repetirse los resultados del trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Cuando se considere necesario se citarán personas, centros o entidades que hayan colaborado o apoyado la realización del trabajo. Si existen implicaciones comerciales, también deben figurar.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Se presentarán según orden de aparición en el texto con la correspondiente numeración correlativa. En el artículo constará siempre la numeración de la cita entre paréntesis, vaya o no vaya acompañado del nombre de los autores; cuando se mencionen éstos en el texto, si se trata de un trabajo realizado por dos, se mencionarán ambos y si se trata de varios se citará el primero seguido por la expresión *et al.*

En lo posible se evitarán las frases imprecisas como citas bibliográficas. No pueden emplearse como tales «observaciones no publicadas» ni «comunicación personal», aunque sí se pueden incluir así en el texto.

Las referencias bibliográficas deben comprobarse por comparación con los documentos originales, indicando siempre las páginas inicial y final. A continuación se dan unos ejemplos de formatos de citas:

Artículos de revista:

- CAPLAN RM. A fresh look at some lab ideas in counting medical education. *Möbius* 1983, 3 (1): 55-61.



Libros:

- CAMPBELL DT, STANLEY JC. *Experimental and quasi experimental designs for research*. Chicago: Rand McNally and Company, 1963.

6. Las fotografías se seleccionarán cuidadosamente, procurando que sean de buena calidad y omitiendo las que no contribuyan a una mejor comprensión del texto. Se aceptarán diapositivas o fotografías en blanco y negro, en casos especiales y previo acuerdo con los autores, se aceptarán diapositivas en color. El tamaño será 9x12 cm. Es muy importante que las copias fotográficas sean de calidad inmejorable. Las fotografías irán numeradas al dorso mediante una etiqueta adhesiva, indicando además el nombre del primer autor; con una flecha se señalará la parte superior; debe procurarse no escribir en el dorso ya que se producen surcos en la fotografía. Las ilustraciones se presentarán por separado, dentro de un sobre; los pies de las mismas deben ir mecanografiados en hoja aparte. Siempre que se considere necesario se utilizarán recursos gráficos para destacar la parte esencial.

7. Las gráficas (hasta un máximo de seis) se obtendrán a partir del ordenador con impresión de alta calidad. Se tendrá en cuenta las mismas normas del apartado anterior. Las fotografías y gráficas irán numeradas de manera correlativa y conjunta como figuras.

8. Las tablas se presentarán en hojas aparte que incluirán: la numeración de la tabla con caracteres arábigos, enunciado correspondiente; una tabla por hoja. Se procurará que sean claras y sin rectificaciones, las siglas y abreviaturas se acompañarán siempre de una nota explicativa al pie. Si una tabla ocupa más de un folio se repetirán los encabezamientos en la hoja siguiente. La revista admitirá tablas que ocupen como máximo una página impresa de la misma. Cuando se haya efectuado un estudio estadístico se indicará al pie de la tabla las técnicas empleadas y el nivel de significación, si no se hubiera incluido en el texto de la tabla.

9. El Comité de Redacción acusará recibo de los trabajos enviados a la revista e informará acerca de su aceptación. Siempre que el Comité sugiera modificaciones, los autores deberán remitir, junto con la nueva versión del artículo y tres copias, una carta que se expongan de forma detallada las modificaciones efectuadas, tanto las sugeridas por el propio Comité como las que figuran en los informes de los expertos consultados.

**REVISTA CIENCIA FORENSE**

NÚMEROS PUBLICADOS:

Volumen 1 (1998):  
MONOGRÁFICO «MUERTE SÚBITA»

Volumen 2 (1999):  
MONOGRÁFICO «MALOS TRATOS EN LA INFANCIA»

Volumen 3 (2001):  
MONOGRÁFICO «MEDICINA LEGAL Y GERIATRÍA»

Volumen 4 (2002):  
MONOGRÁFICO «DELITOS SEXUALES»  
SECCIÓN ESPECIAL:  
AVANCES EN GENÉTICA FORENSE I

Volumen 5-6 (2003-2004):  
MONOGRÁFICO «DROGODEPENDENCIAS Y MEDICINA LEGAL»  
SECCIÓN ESPECIAL:  
AVANCES EN GENÉTICA FORENSE I (cont.)

Volumen 7 (2005):  
MONOGRÁFICO «ODONTOLOGÍA FORENSE»

Volumen 8 (2007):  
MONOGRÁFICO «ENTOMOLOGÍA FORENSE»

Volumen 9-10 (2009-2010):  
MONOGRÁFICO EN HOMENAJE AL PROF. J. L. ROMERO PALANCO  
«PRESENTE Y FUTURO DEL EJERCICIO DE LA MEDICINA LEGAL Y FORENSE  
EN ESPAÑA»

Volumen 11 (2014):  
MONOGRÁFICO: ENFERMEDAD PROFESIONAL  
ARTÍCULOS ORIGINALES

\* \* \*

COLECCIÓN «ORFILA ROTGER»

Número 1:  
González- Andrade F, Martínez-Jarreta B.  
*Técnicas Instrumentales en Genética Forense.*  
Zaragoza, 2001

Número 2:  
Vásquez P, Martínez-Jarreta B.  
*Documentos Médico-legales.*  
Zaragoza, 2002



**INSTITUCIÓN «FERNANDO EL CATÓLICO»**

Excma. Diputación de Zaragoza  
Plaza España, 2  
50071 Zaragoza (España)

**CIENCIA FORENSE**  
**Acuerdo de intercambio**

Área: Medicina Legal y Forense  
Directora: M.<sup>a</sup> Begoña Martínez Jarreta  
Secretario: Andrés Alcázar Crebillén  
Año de fundación: 1999  
Periodicidad: Anual  
Formato: 17 x 24 cm  
Editor: Institución «Fernando el Católico»  
Zaragoza (Spain)  
ISSN 1575-6793  
347.6(460.22)  
Intercambio de Publicaciones: Tff. (34) 976 288 878 - 288 879 \* Fax 288 869  
E-mail: [interch@ifc.dpz.es](mailto:interch@ifc.dpz.es) \* [http:// ifc.dpz.es](http://ifc.dpz.es)

**Correspondencia:** Institución «Fernando el Católico», Excma. Diputación de Zaragoza, Intercambio de Revistas. Plaza de España, n.º 2. - 50071 Zaragoza (España).

**Rogamos remitan este impreso cumplimentado**

Revista o colección: .....  
ISSN o ISBN ..... Periodicidad: .....  
Materia: ..... Formato: .....  
Entidad: .....  
Dirección: .....  
.....  
CP: ..... Ciudad: ..... País: .....  
Teléfono: ..... Fax: .....  
Referencia: ..... E-mail: .....  
Fecha ..... Firma .....

Fdo.:

**Institución Fernando el Católico**  
Excma. Diputación de Zaragoza  
Plaza de España, 2  
50071 Zaragoza (España)



Tels.: [34] 976 28 88 78/79  
Fax: [34] 976 28 88 69  
E-mail: [ventas@ifc.dpz.es](mailto:ventas@ifc.dpz.es)  
<http://ifc.dpz.es>

### BOLETÍN DE SUSCRIPCIÓN A PUBLICACIONES PERIÓDICAS DE LA IFC

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Anuario Aragonés de Gobierno Local | <input type="checkbox"/> Ius Fugit                            |
| <input type="checkbox"/> Archivo de Filología Aragonesa     | <input type="checkbox"/> Jerónimo Zurita, Revista de Historia |
| <input type="checkbox"/> Caesaraugusta                      | <input type="checkbox"/> Nassarre                             |
| <input type="checkbox"/> Ciencia Forense                    | <input type="checkbox"/> Palaeohispánica                      |
| <input type="checkbox"/> Emblemata                          | <input type="checkbox"/> Revista de Derecho Civil Aragonés    |

#### DATOS PERSONALES DE ENVÍO

D./Dña./Entidad: .....  
NIF/CIF: .....  
Domicilio: .....  
Código Postal: ..... Ciudad: .....  
Provincia/País: ..... Teléfono: .....  
E-mail: .....

#### Forma de pago: Domiciliación bancaria

Titular de la cuenta: .....  
Banco/Caja: .....  
Agencia: .....  
Domicilio: .....  
Población: .....  
CP: ..... Provincia/País: .....

| IBAN | Internacional | Entidad | Oficina | DC | Número de cuenta o libreta |
|------|---------------|---------|---------|----|----------------------------|
|      |               |         |         |    |                            |

Ruego se sirvan aceptar con cargo a nuestra cuenta corriente las facturas presentadas por Institución Fernando el Católico (CIF: P5090001H) a cambio de la entrega domiciliaria de los próximos números que reciba y hasta nueva orden, todo ello con un descuento del 25% sobre precio de venta al público.

Firma:



CECEL (CSIC)



## CONTENIDOS

### Monográfico: Entomología Forense II

---

C. Magaña Loarte: *Problemas a resolver en la estimación de la data de la muerte mediante las evidencias entomológicas.*

M. GilArriortua; M. I. Saloña Bordas; M. M. De Pancorbo: *Uso de Vestigios Moleculares en Entomología Forense.*

M.-I. Arnaldos; C. Ruiz; B. Torres; I. Begoña; M.-D. García; D. González-Mora; J. Serrano: *DNA barcoding of two forensically important fleshfly species (Diptera: Sarcophagidae) from Spain and notes on barcoding success within genus Sarcophaga Meigen, 1826.*

M.-I. Saloña-Bordas; M. A. Perotti: *Acarología Forense.*

E. Etxeberria-Rekalde; M. GilArriortua; M. I. Saloña-Bordas; M. L. Nó: *Developing and easy and efficient protocol for the study of different blowfly instars through scanning electron microscopy.*

A. Martínez-Sánchez; C. Magaña; M. Toniolo; P. Gobbi; S. Rojo: *Protophormia terraenovae (robineau-desvoidy, 1830) (diptera, calliphoridae) a new forensic indicator to South-Western Europe.*

M.-I. Arnaldos; E. López Gallego; M.-D. García: *Datos preliminares sobre colonización temprana y actividad diaria de los principales dípteros sarcosaprófagos en el sureste peninsular.*

A. Urriaga Villegas; M. I. Saloña Bordas: *Desarrollo a distintas temperaturas de Nasonia vitripennis (hymenoptera: pteromalidae) en Calliphora vicina (diptera: calliphoridae) y su uso potencial en entomología forense.*

Y. Velásquez; P. Gobbi; A. Martínez-Sánchez; S. Rojo: *Contribución al conocimiento de los calliphoridae y sarcophagidae sarcosaprófagos presentes en un agrosistema del sureste de la península ibérica.*

B. Díaz-Martín; M. I. Saloña-Bordas: *Arthropods of forensic interest associated to pig carcasses in aiako harria Natural Park (Basque Country, Northern Spain).*

### Normas de publicación

---