



Praca oryginalna
Original paper

Sanaa M. Aly¹, Shereen M. Mahmoud²

Przydatność „długiego fragmentu” genu *COII* przy opisie i klasyfikacji muchówek istotnych w entomologii sądowej

COII "long fragment" reliability in characterisation and classification of forensically important flies

¹Forensic Medicine and Clinical Toxicology Department, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, Egypt

²Department of Forensic Medicine and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Suez Canal University, Ismailia, Egypt

Streszczenie

Wprowadzenie: Identyfikacja molekularna zebranych muchówek ma istotne znaczenie w sądowych analizach entomologicznych przeprowadzanych z odpowiednio dobranym markerem genetycznym. Do prawidłowej identyfikacji gatunku przydatne są wybrane segmenty mitochondrialnego DNA. Celem niniejszej pracy była ocena przydatności fragmentu genu oksydazy cytochromowej II (*COII*) o długości 635 bp przy identyfikacji muchówek mających istotne znaczenie w entomologii sądowej.

Materiał i metody: Analizie poddano 42 osobniki należące do 11 gatunków (*Calliphoridae*: *Chrysomya albiceps*, *C. rufifacies*, *C. megacephala*, *Lucilia sericata*, *L. cuprina*; *Sarcophagidae*: *Sarcophaga carnaria*, *S. dux*, *S. albiceps*, *Wohlfahrtia nuba*; *Muscidae*: *Musca domestica*, *M. autumnalis*). Wybrany marker został poddany amplifikacji metodą PCR, a następnie sekwencjonowaniu. Różnice w sekwencji nukleotydów wyznaczono przy użyciu dwuparametrycznego modelu odległości Kimury (K2P), a następnie zbudowano drzewo filogenetyczne, stosując metodę przyłączania sąsiadów (*neighbour-joining* – NJ).

Wyniki: Wszystkie badane okazy zostały prawidłowo przyporządkowane do gatunków, tworzyły wyraźne klady monofiletyczne i odpowiadały klasyfikacji taksonomicznej. Zmienność wewnątrzgatunkowa wyniosła 0–1%, a zmienność międzygatunkowa 2–20%.

Wnioski: Fragment genu *COII* o długości 635 bp sprawdza się jako marker umożliwiający precyzyjne różnicowanie i identyfikację muchówek mających istotne znaczenie w entomologii sądowej.

Słowa kluczowe: entomologia sądowa, mitochondrialne DNA, oksydaza cytochromowa II, analiza filogenetyczna.

Abstract

Introduction: Molecular identification of collected flies is important in forensic entomological analysis guided with accurate evaluation of the chosen genetic marker. The selected mitochondrial DNA segments can be used to properly identify species. The aim of the present study was to determine the reliability of the 635-bp-long cytochrome oxidase II gene (*COII*) in identification of forensically important flies.

Material and methods: Forty-two specimens belonging to 11 species (*Calliphoridae*: *Chrysomya albiceps*, *C. rufifacies*, *C. megacephala*, *Lucilia sericata*, *L. cuprina*; *Sarcophagidae*: *Sarcophaga carnaria*, *S. dux*, *S. albiceps*, *Wohlfahrtia nuba*; *Muscidae*: *Musca domestica*, *M. autumnalis*) were analysed. The selected marker was amplified using PCR followed by sequencing. Nucleotide sequence divergences were calculated using the K2P (Kimura two-parameter) distance model, and a NJ (*neighbour-joining*) phylogenetic tree was constructed.

Results: All examined specimens were assigned to the correct species, formed distinct monophyletic clades and ordered in accordance with their taxonomic classification. Intraspecific variation ranged from 0 to 1% and interspecific variation occurred between 2 and 20%.

Conclusions: The 635-bp-long *COII* marker is suitable for clear differentiation and identification of forensically relevant flies.

Key words: forensic entomology, mitochondrial DNA, cytochrome oxidase II, phylogenetic analysis.

Wprowadzenie

Analiza muchówek jest metodą przydatną w badaniach sądowych przy ustalaniu minimalnego czasu, jaki upłynął od zgonu (PMI_{min}) [1]. Identyfikacja gatunkowa muchówek mających istotne znaczenie w entomologii sądowej jest zagadnieniem niezwykle złożonym ze względu na niewielki rozmiar cech anatomicznych obserwowanych za pomocą stereomikroskopu [2]. Ponadto większość owadów zabezpieczanych na miejscu badanego zdarzenia znajduje się w stadiach niedojrzałych (jaja, larwy, poczwarki), które wykazują wysoki stopień podobieństwa między gatunkami [3]. Z tego względu identyfikacja gatunkowa bywa trudna nawet dla specjalistów w tej dziedzinie. Rozwiązaniem, zwłaszcza w przypadku badaczy niemających wystarczającej wiedzy taksonomicznej, mogą być metody identyfikacji gatunkowej bazujące na analizie kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Można je również wykorzystywać do analizy starszych próbek owadów w różnych stadiach rozwojowych [4, 5].

DNA mitochondrialne (mtDNA) ma wiele zalet w porównaniu z DNA jądrowym (nDNA). Ponieważ nDNA odznacza się niższym współczynnikiem mutacji, w identyfikacji opartej na nDNA potrzebna byłaby dłuższa sekwencja nukleotydów niż w przypadku mtDNA. Należy tym samym uznać, że mtDNA lepiej sprawdza się jako narzędzie oznaczania różnic sekwencyjnych u blisko spokrewnionych gatunków [6]. W literaturze przedmiotu można znaleźć prace, w których identyfikację gatunków o istotnym znaczeniu w entomologii sądowej przeprowadzano przy wykorzystaniu różnych *loci* i technik [4, 5, 7–9].

Gen oksydazy cytochromowej II (*COII*) jest przydatny w badaniach ewolucyjnych, genetyce populacyjnej i systematyce ze względu na wysoki stopień zmienności występujący w tym rejonie [10–13]. Wallman i Donnellan [13] oszacowali moc dyskryminacyjną analizy obejmującej wyłącznie *COII* (635 bp) w porównaniu z analizą bazującą na *COI* oraz *COII* w procesie identyfikacji australijskich muchówek z rodziny

Introduction

In forensic investigations, the minimum post-mortem interval (PMI_{min}) can be specified by analysis of flies [1]. Species identification of flies of forensic relevance is very complex, because of the small anatomical features that are observed with a stereomicroscope [2]. Moreover, most insect specimens recovered from the scene are at immature stages (eggs, larvae, or pupae) which are similar in many cases among different species [3]. Therefore, species identification is quite difficult even by experts. Deoxyribonucleic acid (DNA)-based methods for species identification may solve these problems, especially in cases when scientists are not familiar with taxonomy. Moreover it can be applied on stale samples from different life stages [4, 5].

Mitochondrial DNA (mtDNA) has many advantages in comparison with nuclear DNA (nDNA). nDNA has slower mutation rates, so identification would require a longer nucleotide sequence than with mtDNA. So, mtDNA is a better tool to determine differences in sequences of closely related species [6]. It has been reported that a variety of *loci* and techniques were used for identification of forensically important species [4, 5, 7–9].

Cytochrome oxidase II (*COII*) gene is useful in evolution studies, population genetics, and systematics due to the high detected variation within this region [10–13]. Wallman and Donnellan demonstrated the power of discrimination of *COII* data (635 bp) alone in comparison of combined *COI* and *COII* data in identification of blowflies from Australia. Despite the addition of 116 more variable sites from the *COI* data, bootstrap support indicator in both maximum parsimony and maximum likelihood analyses are similar to the analyses based on *COII* data alone.

Therefore, the aim of this study was to determine the reliability of the 635-bp-long *COII* region in

plujkowatych. Pomimo uwzględnienia dodatkowych 116 zmiennych pozycji na podstawie danych COI, wartości *bootstrap* w analizie maksymalnej oszczędności i maksymalnej wiarygodności wykazują, że uzyskane wyniki są zbliżone do badań, w których analizowano wyłącznie dane COII.

W związku z tym celem niniejszej pracy była ocena przydatności fragmentu genu *COII* o długości 635 bp w opisie i klasyfikacji muchówek mających istotne znaczenie w entomologii sądowej.

Materiał i metody

Analizie poddano łącznie 42 osobniki należące do 11 gatunków: 5 gatunków z rodziny *Calliphoridae* (plujkowatych), 4 gatunki z rodziny *Sarcophagidae* (ścierwicowatych) oraz 2 gatunki z rodziny *Muscidae* (muchowatych). Owady zebrano przy użyciu pułapek wabiących zawierających szczątki zwierzęce. W analizie wykorzystano różne stadia rozwojowe (larwy w trzecim stadium, poczwarki i postacie dorosłe). Szczegółowe informacje dotyczące próbek i ich pochodzenia podano w tabeli I. Wszystkie okazy zostały poddane identyfikacji przez entomologów na podstawie kluczowych cech morfologicznych [14–17].

Z poszczególnych próbek pobrano DNA, wykorzystując zestaw do izolacji DNA QIAamp DNA Mini Tissue Kit (Qiagen, Niemcy). Objętość reakcji PCR wyniosła 37,5 ml i zawierała 20–40 ng DNA, 6 ml dNTP (1 mmol/ml), 1,5 U polimerazy Taq, 3,75 ml buforu 10 (Mg^{2+} 1,5 mmol/l) oraz 0,3 ml starterów (50 nmol/ml). Jako starter wiodący (*forward*) i odwrotny (*reverse*) wykorzystano odpowiednio (5'-AGAGCCTCTCCTT-TAATAGAACA-3') i (5'-GAGACCATTACTTGCTT-TCAGTCATC-3') [18]. Procedury amplifikacji PCR przeprowadzono w termocyklerze (Eppendorf AG 2233, Hamburg, Niemcy). Pierwszym etapem była denaturacja przez 1 minutę w temp. 94°C, a następnie 38 cykli w temp. 94°C przez 1 minutę, w temp. 48°C przez 1 minutę oraz w temp. 72°C przez 2 minuty.

Produkty PCR wyizolowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Oczyszczanie produktów PCR przeprowadzono przy użyciu zestawu Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Niemcy). Przy sekwencjonowaniu nici wstępującej i zstępującej wykorzystano zestaw PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit z oferty ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA).

characterisation and classification of several forensically relevant flies.

Material and methods

A total of 42 specimens were analysed, representing 11 species; 5 species of *Calliphoridae*, 4 species of *Sarcophagidae* and 2 species of *Muscidae*. Traps baited with animal remains were used to collect the samples. Different life stages (third instar larva, pupae and adults) were used. The details and origins of samples are shown in Table I. All specimens were identified by entomologists based on morphological keys [14–17].

DNA was extracted from each sample by using the QIAamp DNA Mini Tissue Kit (Qiagen, Germany). The PCR reaction volume was 37.5 μ l, containing 20 to 40 ng DNA, 6 μ l dNTP (1 mmol/ml), 1.5 U Taq polymerase, 3.75 μ l 10 buffer (Mg^{2+} 1.5 mmol/l), and 0.3 μ l primers (50 nmol/ml). The forward and reverse primers were (5'-AGAGCCTCTCCTTTAATAGAACA-3') and (5'-GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATC-3') respectively [18]. PCR amplifications were performed in a thermocycler (Eppendorf AG 2233, Hamburg, Germany), with initiative denaturing for 1 minute at 94°C, followed by 38 cycles of 94°C for 1 minute, 48°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes.

PCR products were isolated by agarose gel electrophoresis then purification of PCR products was done by using a Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Germany). Sequencing was performed on both forward and reverse strands using ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit by ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Analyses of DNA sequence variations, nucleotide composition and genetic distance were done by using molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) [19]. A BLAST search was performed on the sequencing results. All mt COII sequences were submitted to the GenBank database and assigned accession numbers (Table I). A phylogenetic tree based on the COII sequence was constructed by NJ method using K2P model implemented in the MEGA5 and the tree was tested by 1000 bootstrap replicates. Different phylogenetic trees (maximum

Analizy zmienności sekwencji DNA, składu nukleotydowego i odległości genetycznych przeprowadzono metodą MEGA (*molecular evolutionary genetics analysis*) [19]. Przy przeszukiwaniu wyników sekwencjonowania posłużono się algorytmem BLAST. Wszystkie sekwencje mt COII wprowadzono do bazy danych GenBank i przyporządkowano im numery akcesyjne (tabela I). Na podstawie sekwencji COII skonstruowano drzewo filogenetyczne metodą NJ z użyciem modelu K2P zintegrowanego z MEGA5. Drzewo przetestowano przy użyciu 1000 replikatów typu *bootstrap*. Z wykorzystaniem analizy MEGA zbudowano także inne drzewa filogenetyczne (metodą maksymalnej oszczędności, metodą średnich połączeń – UPGMA i maksymalnej wiarygodności).

Wyniki

Sekwencjonowanie markera genetycznego COII o długości 635 bp przeprowadzono pomyślnie u wszystkich 11 gatunków analizowanych w ramach badania. Wszystkie okazy zostały prawidłowo zidentyfikowane przy przeszukiwaniu algorytmem BLAST. Dopasowanie sekwencji objęło 228 pozycji zmiennych, przy czym 222 pozycje uznano za informacyjne z punktu widzenia reguły parsymonii. Zgodnie z przewidywaniami zaobserwowano, że analizowany region mitochondrialnego DNA (mtDNA) cechuje się wyraźną przewagą par AT (73,4%), co jest charakterystyczne dla mtDNA owadów [20], u których nukleotydy zawierają zasady T (39,8%), C (14,1%), A (33,6%) i G (12,5%).

Zakres zmienności wewnątrzgatunkowej wśród badanych gatunków wyniósł 0–1%. Haplotypy należące do jednego gatunku tworzyły odrębną grupę monofiletyczną o wysokiej wartości *bootstrap* (ryc. 1.). Zakres zmienności międzygatunkowej wyniósł 2–20%. Odległości między pozycjami uzyskane u przedstawicieli tej samej podrodziny były mniejsze niż odległości do przedstawicieli innych podrodzin. W obrębie podrodziny *Luciliinae* rozbieżność wyniosła 2%. Dla porównania w obrębie podrodziny *Chrysomyinae* wartość ta wyniosła 3–7%. Rozbieżność między podrodziny *Chrysomyinae* i *Luciliinae* wyniosła 8–9%. Różnice między sekwencjami były wyłącznie skutkiem substytucji, ponieważ nie stwierdzono żadnych delecji.

Aby graficznie przedstawić zależności między badanymi gatunkami, przeprowadzono analizę metodą NJ. Drzewo skonstruowane przy użyciu tej metody oraz rozbieżności sekwencyjne przedstawiono odpo-

parsimony, UPGMA and maximum likelihood) were also constructed using MEGA.

Results

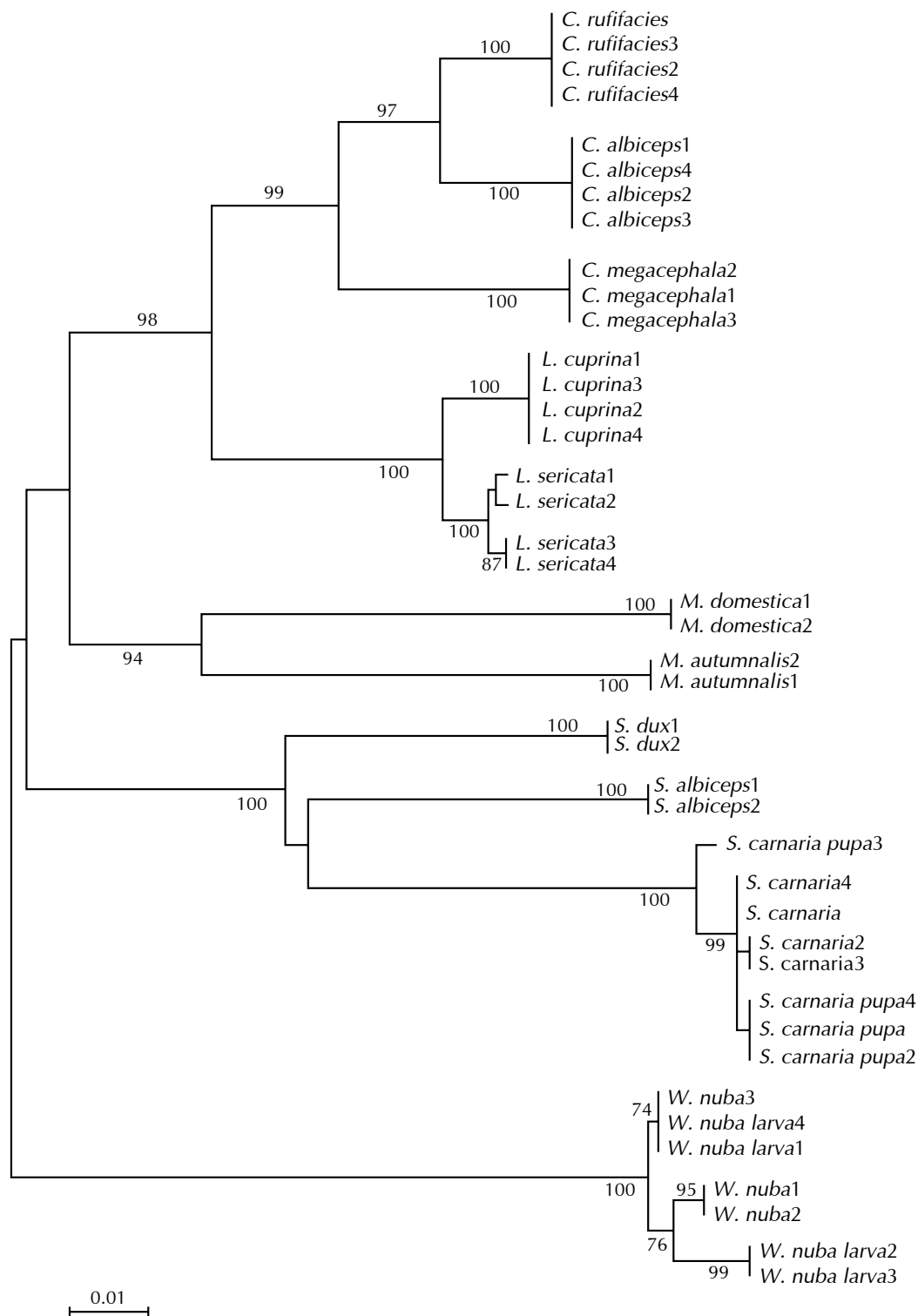
A 635 bp COII genetic marker was successfully sequenced from all 11 tested species. All specimens were identified correctly in the BLAST searches. The sequence alignment consists of 228 variable sites, whereby 222 sites were considered parsimony informative. As expected, this region of mitochondrial DNA (mtDNA) was observed to have a strong AT bias (73.4%), which is characteristic of insect mtDNA [20] where the nucleotide compositions were T (39.8%), C (14.1%), A (33.6%) and G (12.5%).

The range of intraspecific value among the tested species was 0-1%. The haplotypes belonging to one species formed a distinct monophyletic group with high bootstrap support (Fig. 1). The range of interspecific variation was between 2% and 20%. Members of the same subfamily were closer to each other in their positions than to members of other subfamilies. Within the subfamily *Luciliinae*, the divergence was 2%. While within the *Chrysomyinae* subfamily, it was 3–7%. The divergence between the subfamilies *Chrysomyinae* and *Luciliinae* was 8–9%. The differences between the sequences were due only to substitutions since no deletions were observed.

Neighbor-joining analysis was conducted to display relationships among tested species. A NJ tree and sequence divergences are shown in Fig. 1 and Table II respectively. All three fly families (*Calliphoridae*, *Sarcophagidae* and *Muscidae*) yielded three distinct groups. All species were monophyletic with bootstrap supports of 94–100%.

Discussion

The use of mtDNA in population genetic studies has been popular due to the extensive intraspecific polymorphism. Most of the research in this area has been focused on COI as a genetic marker of different length [21–25]. To our knowledge, there is no publication about this genetic marker from Egypt, while the only available Chinese publication based on the same marker used only blowfly species from the west of China [18].



Ryc. 1. Drzewo skonstruowane metodą przyłączania sąsiadów (NJ) przy zastosowaniu modelu dwuparametrycznego Kimury (K2P), obrazujące zależności filogenetyczne wśród 11 gatunków należących do rzędu Diptera, na podstawie analizy regionu *COII* o długości 635 bp

Fig. 1. The neighbour-joining (NJ) tree using Kimura's two-parameter (K2P) model illustrating phylogenetic relationships among 11 species belong to Diptera, based on the 635-bp-long *COII* region

Tabela I. Dane dotyczące okazów owadów wykorzystanych w badaniu**Table I.** Data of specimens used in this study

Próbka Sample	Gatunek Species	Typ okazu Type of specimen	Lokalizacja Location	Metoda utrwalenia Preservation	Numer dostępu Accession number
1	<i>Sarcophaga carnaria</i> (Linnaeus 1758)	poczwarka pupa	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	70-procentowy etanol 70% ethanol	JQ821688
2		poczwarka pupa	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	70-procentowy etanol 70% ethanol	JQ821689
3		poczwarka pupa	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	70-procentowy etanol 70% ethanol	JQ821690
4		dorosły ♀ adult ♀	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821691
5		dorosły ♂ adult ♂	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821692
6		dorosły ♂ adult ♂	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821693
7		dorosły ♂ adult ♂	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	70-procentowy etanol 70% ethanol	JQ821694
8		dorosły ♂ adult ♂	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821695
9	<i>Sarcophaga dux</i> (Thompson, 1869)	dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	ususzenie dry	JQ821696
10		dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	ususzenie dry	JQ821697
11	<i>Sarcophaga albiceps</i> (Meigen, 1826)	dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	ususzenie dry	JQ821698
12		dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	ususzenie dry	JQ821699
13	<i>Wohlfahrtia nuba</i> (Wiedemann, 1830)	dorosły ♂ adult ♂	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821700
14		dorosły ♂ adult ♂	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821701
15		dorosły ♂ adult ♂	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821702
16		larwa larva	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	70-procentowy etanol 70% ethanol	JQ821703
17		larwa larva	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	70-procentowy etanol 70% ethanol	JQ821704
18		larwa larva	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	70-procentowy etanol 70% ethanol	JQ821705
19		larwa larva	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	70-procentowy etanol 70% ethanol	JQ821706
20	<i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758)	dorosły ♀ adult ♀	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821707
21		dorosły ♀ adult ♀	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821708
22	<i>Musca autumnalis</i> (De Geer, 1776)	dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	-20°C	JQ821709

Tabela I. Cd.

Table I. Cont.

Próbka Sample	Gatunek Species	Typ okazu Type of specimen	Lokalizacja Location	Metoda utrwalenia Preservation	Numer dostępu Accession number
23		dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821710
24	<i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann, 1830)	dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821711
25		dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821712
26		dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821713
27		dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821714
28	<i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1826)	dorosły ♀ adult ♀	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821715
29		dorosły ♀ adult ♀	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821716
30		dorosły ♀ adult ♀	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821717
31		dorosły ♀ adult ♀	Ismailia, Egipt Ismailia, Egypt	ususzenie dry	JQ821718
32	<i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794)	dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821719
33		dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821720
34		dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821721
35	<i>Chrysomya rufifacies</i> (Macquart, 1842)	dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821722
36		dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821723
37		dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821724
38		dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821725
39	<i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann, 1819)	dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821726
40		dorosły ♀ adult ♀	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821727
41		dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821728
42		dorosły ♂ adult ♂	Changsha, Chiny Changsha, China	–20°C	JQ821729

Tabela II. Obliczone rozbieżności wewnątrz- i międzygatunkowe wyrażone jako wartość procentowa łącznej liczby 635 bp *COII* na podstawie metody przyłączania sąsiadów (NJ) przy zastosowaniu modelu dwuparametrycznego Kimury (K2P)

Table II. Calculated intraspecific and interspecific divergences expressed as percentage of total 635 bp of *COII* using neighbour-joining (NJ) approach with Kimura's two-parameter (K2P) model

Gatunek Species	Numer* Number*	Zakres** Range**	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>S. carnaria</i>	8	0–1	–										
<i>S. albiceps</i>	2	0	10	–									
<i>S. dux</i>	2	0	11	9	–								
<i>W. nuba</i>	6	0–1	19	19	17	–							
<i>M. domestica</i>	2	0	17	16	17	18	–						
<i>M. autumnalis</i>	2	0	17	18	16	19	12	–					
<i>L. cuprina</i>	4	0	17	15	15	16	15	14	–				
<i>L. sericata</i>	4	0	16	14	14	16	14	14	2	–			
<i>C. megacephala</i>	3	0	17	16	16	16	16	15	8	9	–		
<i>C. rufifacies</i>	4	0	16	15	14	17	14	13	9	9	7	–	
<i>C. albiceps</i>	4	0	18	15	16	17	16	13	9	8	6	3	–

*Liczba okazów

*Number of specimens

**Zakres wewnątrzspecyficznych wariacji

**Range of intraspecific variations

wiednio na ryc. 1. i w tabeli II. Wszystkie trzy rodziny muchówek (*Calliphoridae*, *Sarcophagidae* i *Muscidae*) tworzyły trzy odrębne grupy. Wszystkie gatunki były monofiletyczne, a ich wartości *bootstrap* kształtowały się w przedziale 94–100%.

Dyskusja

Analiza mtDNA jest powszechnie wykorzystywana w populacyjnych badaniach genetycznych ze względu na wysoki stopień polimorfizmu wewnątrzgatunkowego. Większość badań przeprowadzonych dotychczas w tej dziedzinie koncentrowała się na COI jako markerze genetycznym o różnej długości [21–25]. Według wiedzy autorów nie ma jednak opublikowanych prac analizujących ten marker genetyczny z obszaru Egiptu. Dostępna jest jedna praca chińska, w której wykorzystano ten sam marker, jednak analiza objęła wyłącznie gatunki plujkowatych z zachodnich Chin [18]. W związku z tym w niniejszej pracy skoncentrowano się na zbadaniu przydatności regionu COII o długości 635 bp przy rozróżnianiu muchówek należących do odmiennych gatunków i mających istotne znaczenie w entomologii sądowej, pochodzących z Egiptu i południowych Chin.

Therefore, the focus of this work was to test the reliability of 635-bp-long COII region to distinguish between several flies of forensic interest (belonging to different species) from Egypt and the south of China.

Our results showed that the range of intraspecific divergence was 0–1% and between-species divergence was 2–20%. There is no overlapping between maximum intraspecific and minimum interspecific nucleotide divergence which helped in correct identification of species. Although *L. sericata* and *L. cuprina* species could not be separated by Ying *et al.* [18], this study showed that both sister species can be separated without bias. It revealed a sufficient separation between these 2 sister species with 100% bootstrap support.

The 635-bp-long COII region was capable of differentiating between all 11 tested species which originate from 2 different geographical regions. This could be attributed to sufficient bootstrap support (94–100%). All species are reciprocally monophyletic; this is considered as a criterion for species distinction [26]. Thus, this fragment of COII has great potential in species identification of forensic interest. A previous study, based on

W omawianym badaniu zakres zmienności wewnątrzgatunkowej wyniósł 0–1%, a rozbieżność międzygatunkowa 2–20%. Wartości maksymalne i minimalne międzygatunkowej zmienności nukleotydów nie nakładają się na siebie, co sprzyja prawidłowej identyfikacji gatunków. Choć w pracy Ying i wsp. [18] nie udało się rozróżnić gatunku *L. sericata* od *L. cuprina*, w niniejszym badaniu rozróżnienie obu bliźniaczych gatunków było możliwe bez obciążenia. Uzyskano wystarczającą odrębność między gatunkami przy wartości *bootstrap* wynoszącej 100%.

Region *COII* o długości 635 bp wykazał zdolność różnicowania wszystkich 11 gatunków objętych badaniem, pochodzących z dwóch różnych regionów geograficznych. Można to przypisać odpowiednim wartościom *bootstrap* (94–100%). Wszystkie gatunki są wzajemnie monofiletyczne, a aspekt ten uznawany jest za kryterium rozróżniania gatunków [26]. Ten fragment genu *COII* ma więc wysoki potencjał identyfikacji gatunków istotnych z punktu widzenia analiz sądowych. Wynik ten odbiegał od wcześniejszego badania wykorzystującego niewielki fragment *COII* (o długości 189 bp), w którym nie uzyskano skojarzenia *M. autumnalis* z innymi gatunkami z tej samej rodziny (*Muscidae*) – gatunek ten został przyłączony do kladu *Chrysomyinae* (rodzina *Calliphoridae*) [27]. W przypadku analizy długiego fragmentu *COII* *M. autumnalis* udało się zaklasyfikować do właściwej rodziny. Potwierdzono tym samym przydatność długiego fragmentu *COII* (635 bp) przy segregowaniu gatunków zgodnie z ich klasyfikacją taksonomiczną.

Niezależnie od analizy metodą NJ, Nelson i wsp. [28] zwrócili uwagę na konieczność stosowania różnych metod konstruowania drzew filogenetycznych. Z tego względu dane zgromadzone na potrzeby niniejszego badania zostały również przeanalizowane metodą średnich połączeń (UPGMA), maksymalnej wiarygodności i oszczędności, dając zbliżone wyniki (dane nie zostały uwzględnione w pracy). Rezultaty niniejszego badania są spójne z wynikami pracy Wells i wsp. [26] w takim zakresie, że podobne topologie uzyskane dzięki różnym metodom potwierdzają odporność (*robustness*) sygnału filogenetycznego w zbiorze danych. W innej pracy Wells i wsp. [29] podkreślają jednak konieczność wykorzystywania wystarczająco szerokiej bazy genetycznej dla wszystkich gatunków jako niezbędnego warunku determinującego dokładność identyfikacji gatunków.

Podsumowując, należy stwierdzić, że długi (635 bp) fragment genu *COII* stanowi obiecujący marker ge-

a small (189bp) *COII* fragment, displayed failure of *M. autumnalis* to cluster with other species belonging to the same family (*Muscidae*) but joined with Chrysomyinae (family: *Calliphoridae*) clade [27]. A long fragment of *COII* succeeded to cluster *M. autumnalis* with its family. Therefore, this study displayed the success of a long (635 bp) *COII* to order species in accordance with their taxonomic classification.

Besides NJ analysis, Nelson *et al.* [28] discussed the need of different “tree-building methods”. Therefore, UPGMA, ML and MP analyses were also applied on our data and yielded similar results (data not shown). The results of the present study are consistent with Wells *et al.* [26], who mentioned that similar topologies based on different methods confirm the robustness of the phylogenetic signal in data set. However, Wells *et al.* [29] have emphasized the importance of using a broad enough genetic database of all species as a mandatory tool for accurate species identification.

In conclusion, identification by analysing 635-bp-long *COII* region was a promising genetic marker to achieve correct identification results. However, the data used in the present study needs to be enriched by studying more individuals from each species and more species/populations also should be included.

The authors declare no conflict of interest.

netyczny umożliwiającą uzyskanie prawidłowych wyników w procedurze identyfikacji. W kolejnych badaniach należałoby jednak rozszerzyć pulę danych poprzez analizę większej liczby osobników reprezentujących poszczególne gatunki, jak również większej liczby gatunków/populacji.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

References

1. Smith KG. A manual of forensic entomology. Cornell University Press, London 1986.
2. Seong HP, Yong Z, Huguo P, Yu DH, Jeong HJ, Yoo GY, Chung U, Jo TH, Hwang JJ. Use of cytochrome c oxidase subunit I (COI) nucleotide sequences for identification of the Korean Luciliinae fly species (Diptera: Calliphoridae) in forensic investigations. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 1058-1063.
3. Wells JD, Sperling FA. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 1999; 36: 222-226.
4. Sperling FA, Anderson GS, Hickey DA. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J Forensic Sci* 1994; 39: 418-427.
5. Wells JD, Stevens JR. Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 2008; 53: 103-120.
6. Waugh J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays* 2007; 9: 188-197.
7. Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, Pueschel K. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Sci Int* 2003; 132: 76-81.
8. Wallman JF, Leys R, Hogendoorn K. Molecular systematics of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. *Invert Syst* 2005; 19: 1-15.
9. Picard CJ, Villet MH, Wells JD. Amplified fragment length polymorphism confirms reciprocal monophyly in *Chrysomya putoria* and *Chrysomya chloropyga*: a correction of reported shared mtDNA haplotypes. *Med Vet Entomol* 2012; 26: 116-119.
10. Malgorn Y, Coquoz R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae: an interest in forensic entomology. *Forensic Sci Int* 1999; 102: 111-119.
11. Harrison RG. Animal mtDNA as a genetic marker in population and evolution biology. *Trends Ecol Evolut* 1989; 4: 6-11.
12. Junqueira ACM, Lessinger AC, Azeredo-Espin AM. Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Med Vet Entomol* 2002; 16: 39-45.
13. Wallman JF, Donnellan SC. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Sci Int* 2001; 120: 60-67.
14. Shaumar N, Mohammad S. Keys for identification of species of Family Sarcophagidae (Diptera) in Egypt. *Bull Soc Entomol Egypt* 1983; 64: 121-135.
15. Shaumar NF, Mohammad SK, Mohammad SA. Keys for identification of species of Family Calliphoridae (Diptera) in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 1989; 19: 669-681.
16. Shaumar NF, Mohamed SK, Shoukry IF. Flies of subfamily Muscinae (Muscidae-Diptera) in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 1985; 15: 513-523.
17. Lu BL, Wu HY. Classification and identification of important medical insects of China, Henan science and technology publishing house, Zhengzhou 2003.
18. Ying BW, Liu TT, Fan H et al. The application of mitochondrial DNA cytochrome oxidase II gene for the identification of forensically important blowflies in Western China. *Am J Forensic Med Pathol* 2007; 28: 308-313.
19. Tamura K, Dudley J, Nei M et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596-1599.
20. Crozier RH, Crozier YC. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 1993; 133: 97-117.
21. Aly SM, Mahmoud SM. Molecular Identification of Forensically relevant Diptera: missed important criteria. *Int J Sci Res* 2016; 5: 139-140.
22. Aly SM. Reliability of long vs short COI markers in identification of forensically important flies. *Croat Med J* 2014; 55: 19-26.
23. Aly SM, Wen J. Applicability of partial characterization of cytochrome oxidase I in identification of forensically important flies (Diptera) from China and Egypt. *Parasitol Res* 2013; 112: 2667-2674.



24. Aly SM, Wen J, Wang X. Identification of forensically important Sarcophagidae (Diptera) based on partial mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. *Am J Forensic Med Pathol* 2013; 34: 159-163.
25. Aly SM, Wen J. Molecular identification of forensically relevant Diptera inferred from short mitochondrial genetic marker. *Libyan J Med* 2013; 8: 20954.
26. Wells JD, Pape T, Sperling FAH. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *J Forensic Sci* 2001; 46: 1098-1102.
27. Aly SM, Wen J, Wang X, Cai J. Cytochrome oxidase II gene "short fragment" applicability in identification of forensically important insects. *Rom J Leg Med* 2012; 20: 231-236.
28. Nelson LA, Wallmann JF, Downton M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med Vet Entomol* 2007; 21: 44-52.
29. Wells JD, Wall R, Stevens JR. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for species determination. *Int J Legal Med Sci Law* 2007; 121: 229-233.

Adres do korespondencji

Sanaa M. Aly
Forensic Medicine and Clinical Toxicology Department
Faculty of Medicine
Suez Canal University
Ismailia, Egypt
e-mail: sasydayem@hotmail.com

Address for correspondence

Sanaa M. Aly
Forensic Medicine and Clinical Toxicology Department
Faculty of Medicine
Suez Canal University
Ismailia, Egypt
e-mail: sasydayem@hotmail.com