

Método Taguchi para optimizar la amplificación de la región código de barras de ADN en moscas de importancia forense (Diptera: Calliphoridae)

Taguchi method in the optimization of the DNA barcode region amplification in forensic important flies (Diptera: Calliphoridae)

Giovan F. Gómez¹, Andrés F. Londoño², Andrés F. Maya³

Tipo de artículo: Artículo de investigación **Recibido:** 7 de febrero de 2017 **Aprobado:** 19 de abril de 2017

Resumen: La estandarización de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de la región código de barras, constituye un paso crucial en el laboratorio hacia la implementación de esta estrategia en moscas de importancia forense. Tradicionalmente, la búsqueda de condiciones óptimas requiere la ejecución de un gran número de experimentos independientes que varían en las concentraciones de los componentes de la reacción. En este estudio se implementó la metodología Taguchi para establecer las condiciones óptimas usando un número mínimo de experimentos en moscas de la familia Calliphoridae. La cantidad de ADN, así como la temperatura de alineamiento de los cebadores representaron los factores más relevantes en el éxito de la amplificación. Esta metodología puede aplicarse para estandarizar otras técnicas moleculares como una estrategia simple, rápida y de bajo costo.

Palabras clave: Reacción en cadena de la polimerasa, método Taguchi, región código de barras, estandarización.

Abstract: Standardization of molecular techniques, like polymerase chain reaction to amplify the barcode region, constitutes a main step in the laboratory to implement the barcode strategy in flies of forensic importance. Traditionally, a search for optimal conditions requires a large number of independent experiments that vary in the concentration of their compounds. In this study, the Taguchi method was implemented to find out the optimal conditions using a minimum number of experiments in flies of the Calliphoridae family. The amount of DNA and the annealing temperature of the primers were the most relevant factors in the amplification success. This methodology could be applied to standardize other molecular techniques as a simple, rapid and low-cost strategy.

Keywords: polymerase chain reaction, Taguchi method, barcode region, standardization.

¹ Microbiólogo y Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia. Docente de la Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia – Institución Universitaria. Integrante del Grupo de Investigación en Ciencias Forenses y Salud. giovan.gomez@tdea.edu.co. Autor para correspondencia

² Estudiante de Profesional en Criminalística, Tecnológico de Antioquia – Institución Universitaria. Integrante del Grupo de Investigación en Ciencias Forenses y Salud.

Introducción

Las moscas hacen parte del grupo megadiverso de los insectos, uno de los más antiguos y con registros fósiles de hace más de 410 millones de años, los cuales han habitado casi cualquier nicho ecológico sobre la tierra (Condamine, Clapham & Kergoat, 2016). Entre las moscas, orden Diptera, se reconocen predominantemente especies de las familias Calliphoridae, Sarcophagidae y Muscidae que tienen importancia forense colonizando diferencialmente un cadáver de acuerdo con su etapa de descomposición (Benecke, 2001). Así, estas moscas representan un grupo de interés en el ámbito médico-legal porque a través de su estudio se recopilan datos relevantes en la investigación criminal tales como el intervalo post-mortem (IPM), relacionado con el periodo de actividad del insecto en el cuerpo en descomposición (Joseph, Mathew, Sathyan, & Vargheese, 2011) o información como posibles traslados del cadáver.

La identificación precisa de las especies constituye un paso inicial en los análisis de entomología forense (Amendt, Richards, Campobasso, Zehner & Hall, 2011), dado que permite su relación con el ciclo de vida y así, con la estimación precisa del IPM. Sin embargo, esta tarea es un proceso complejo que requiere personal entrenado para asignar cada espécimen a una especie en particular con base en caracteres morfológicos. Aun así, en ocasiones no es posible realizar esta asignación debido a limitantes tales como la existencia de especies aún no descritas en la literatura, la ausencia de claves morfológicas para la mayoría de grupos taxonómicos y estados (huevo, larva, pupa o adulto), la similitud interespecífica o la existencia de complejos de especie (Packer, Gibbs, Sheffield, & Hanner, 2009). El descubrimiento de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) en 1953 (Watson & Crick, 1953) y el posterior desarrollo de la entomología molecular condujeron al uso de esta molécula para la identificación de especies (Wells & Stevens, 2008), al describir genes o fragmentos de ADN conservados en una especie pero variables entre especies (Ratnasingham & Hebert, 2007). La biología molecular se convirtió así en una herramienta complementaria en los estudios de

diversidad de especies de moscas de importancia forense.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) ha sido una técnica de biología molecular ampliamente usada en los laboratorios para la amplificación de fragmentos de ADN desde su creación en 1998 (Bartlett & Stirling, 2003). Uno de los fragmentos de ADN que se ha usado mundialmente en estudios de biodiversidad es el denominado Código de Barras de la Vida, un fragmento de alrededor de 650 pares de bases del gen que codifica para la subunidad I de la proteína mitocondrial citocromo oxidasa (COI) (Hebert, Cywinska, Ball & De Waard, 2003). En laboratorio, para lograr la amplificación de fragmentos de ADN de interés usando la técnica RCP, es necesario estandarizarla teniendo en cuenta la concentración precisa de los reactivos que se requieren para que la reacción ocurra en condiciones químicas (p. ej., $MgCl_2$, Taq Pol, concentración de cebadores, etc.) y físicas (p. ej., temperaturas) óptimas. Aunque el método básico para lograrlo ha sido documentado (Ausubel et al., 2003), este requiere probar un rango de concentraciones de cada reactivo, lo cual puede alterar el rendimiento, la especificidad y fidelidad de la polimerasa. Este proceso es complejo y requiere una gran inversión de recursos; por ejemplo, conocer las concentraciones óptimas en una RCP teniendo en cuenta cinco de los reactivos y tres niveles (concentraciones) para cada uno requeriría $35 = 243$ reacciones independientes que permitirían comparar los resultados y elegir las mejores condiciones (Rao, Kumar, Prakasham & Hobbs, 2008).

El método Taguchi, propuesto por el ingeniero japonés Genichi Taguchi, se introdujo inicialmente en Estados Unidos en la década de 1980 como un diseño robusto con el objetivo de generar suficiente información para establecer las condiciones óptimas en un proceso particular usando un número mínimo de experimentos (Celani de Souza et al., 2013). Ha sido ampliamente utilizado en el ámbito industrial, sin embargo, su aplicación en ciencias biológicas ha sido limitada (Cobb & Clarkson, 1994; Rao et al., 2008). Usando este método, por ejemplo

con cinco factores y tres niveles para cada uno (p. ej., diferentes concentraciones, temperaturas o tiempos), el número de experimentos se reduce a sólo 11, lo anterior derivado de la fórmula $E=2k + 1$, donde k representa el número de factores que se debe probar. Los factores son organizados en una matriz ortogonal, donde las columnas representan los factores y las filas los niveles o factores para probar. En la literatura se encuentran disponibles diversas matrices ortogonales (Taguchi & Konishi, 1987) que permiten probar los diferentes niveles y sus interacciones. Teniendo en cuenta la matriz, se realizan los experimentos correspondientes para ver los resultados y conocer las condiciones

óptimas. Bajo esta estrategia, en algunas ocasiones se logra identificar un margen más estrecho de condiciones en el que la RCP funciona, a partir del cual puede generarse un diseño secundario para obtener condiciones más precisas o confirmatorias.

El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas para realizar una RCP para amplificar la región código de barras en moscas de la familia Calliphoridae. Este estudio proporciona las bases técnicas hacia el desarrollo posterior de una base de datos de secuencias de ADN que permita profundizar en el estudio de su diversidad.

Metodología

Material e identificación morfológica. Se recolectaron moscas en las instalaciones del Tecnológico de Antioquia, Medellín, utilizando trampas Van Someren-Rydon modificadas cebadas con vísceras de pollo y cabezas de pescado en descomposición en octubre de 2015. Posteriormente, las moscas se colectaron en frascos de isopropanol al 80% y se identificaron a nivel de especie en el Laboratorio del Grupo de Investigación Ciencias Forenses y de la Salud con la ayuda de claves taxonómicas (Amat, Vélez & Wolff, 2008; Whitworth, 2014).

Extracción de ADN y cuantificación. El cuerpo completo de cada mosca se maceró manualmente utilizando un homogenizador de plástico estéril. El ADN se extrajo siguiendo el protocolo del kit DNeasy Blood and Tissue de QIAGEN con una elución final de 100 μ l. Posteriormente, se procedió a la verificación de cantidad y calidad de ADN midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. El ADN utilizado en este trabajo corresponde a dos especímenes de las especies *Lucilia cuprina* y *Lucilia eximia*, los cuales se usaron en cada uno de los experimentos con el fin de eliminar el efecto de diferencias en cantidad/calidad de ADN entre muestras.

Variables evaluadas y niveles. Para la optimización de la RCP se evaluó la variación de cuatro variables: 1) concentración de cloruro

de magnesio $MgCl_2$, 2) concentración de ADN, 3) concentración de deoxinucleótidos trifosfatos dNTPs y 4) concentración de la polimerasa TaqPol, con tres niveles de concentración cada una (Tabla 1), teniendo en cuenta los rangos sugeridos para cada uno de estos en la literatura (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 2001). Adicionalmente, para cada uno de los experimentos se corrió el programa de RCP bajo cuatro temperaturas de alineamiento (45, 50,8, 54,5 y 60 centígrados) en un termociclador BIORAD C-1000. El perfil térmico consistió en un ciclo de 94 $^{\circ}C$ por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94 $^{\circ}C$ por 30 segundos, alguna de las temperaturas de alineamiento por 30 segundos, 72 $^{\circ}C$ por 2 minutos y una extensión final de 72 $^{\circ}C$ por 5 minutos. Teniendo en cuenta cuatro variables y tres niveles, el método Taguchi estableció $E = 2(4) + 1 = 9$ experimentos que describen variaciones en los factores evaluados en la matriz ortogonal (Tabla 2). La concentración final de los cebadores LCO y HCO (0,4 μ M) (Folmer, Black, Hoeh, Lutz, & Vrijenhoek, 1994) y buffer $(NH_4)_2SO_4$ (1X) permaneció constante en todos los experimentos en un volumen total por reacción de 20 μ l.

Electroforesis. Los productos de la RCP se corrieron en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se revelaron usando luz ultravioleta. Se utilizó un marcador de peso molecular para comparar las bandas resultantes con la referencia.

Tabla 1

Factores y niveles evaluados en la RCP de la región código de barras en moscas (*Diptera: Calliphoridae*)

Variable (unidad)	Nivel I	Nivel II	Nivel III
Concentración de MgCl ₂ (mM)	1,5 (A)	2,5 (B)	4 (C)
Concentración de ADN (ng/μl)	200 (A)	400 (B)	600 (C)
Concentración de dNTPs (mM)	0,2 (A)	0,4 (B)	0,6 (C)
Concentración de TaqPol (Unidades)	1 (A)	2,5 (B)	5 (C)

Tabla 2

Matriz ortogonal para 4 factores y 3 niveles de concentración siguiendo el Método Taguchi

Experimento	Variable				MgCl ₂ (mM)	ADN (ng/μl)	dNTPs (mM)	TaqPol Unidades)
	1	2	3	4				
1	A	A	A	A	1.5	200	0.2	1
2	A	B	B	B	1.5	400	0.4	2.5
3	A	C	C	C	1.5	600	0.6	5
4	B	A	B	C	2.5	200	0.4	5
5	B	B	C	A	2.5	400	0.6	1
6	B	C	A	B	2.5	600	0.2	2.5
7	C	A	C	B	4	200	0.6	2.5
8	C	B	A	C	4	400	0.2	5
9	C	C	B	A	4	600	0.4	1

Resultados y discusión

La ley de Beer-Lambert permite relacionar la cantidad de luz absorbida con la concentración de la molécula absorbente mediante el uso de espectroscopía (Swinehart, 1962). Particularmente, la relación entre la absorbancia de una muestra a 260 nm y 280 nm (A_{260/280}) es usada típicamente como indicador de la pureza del ADN, y generalmente se considera de alta calidad (libre de impurezas) cuando está entre 1,7 y 2,0 (Neumaier, Braun, & Wagener, 1998). La relación A_{260/280} del ADN evaluado en este estudio con *Lucilia cuprina* y *Lucilia eximia* fue alta, con índices A_{260/280} superiores a 2, resultado que algunos autores han relacionado con posible contaminación de trazas de ARN (Aggarwal, 2008) o como el efecto sobre esta medida de variables en las muestras como el pH y la fuerza iónica (Wilfinger, Mackey & Chomczynski, 1997). Sin embargo, esta característica no inhibió la

RCP como se evidenció con la amplificación de las muestras en el laboratorio.

Aunque en este trabajo se utilizó ADN extraído con kit comercial, que permite la obtención de ADN de buena calidad, típicamente en laboratorios pequeños se utilizan métodos de extracción rápidos que en su mayoría rinden ADN menos puro pero a bajo costo (Asghar, Malik, Anwar, Javed & Raza, 2015; Gutiérrez-López, Martínez-de la Puente, Gangoso, Soriguer & Figuerola, 2015). Teniendo en cuenta que la calidad del ADN extraído se ha reconocido como un punto crítico en el éxito de la amplificación de la región código de barras (Ball & Armstrong, 2008; Gutiérrez-López et al., 2015) y otros marcadores moleculares, se recomienda en estudios futuros evaluar la variabilidad en la eficiencia en la amplificación de fragmentos de

ADN de interés utilizando diferentes métodos de extracción para seleccionar el más costo-efectivo.

Dado que se usaron las mismas muestras para los diferentes experimentos, se descarta que las diferencias encontradas en los resultados procedan de diferencias inter-muestras. Más bien, las diferencias en el éxito de amplificación se soportan por diferencias en las concentraciones finales de los reactivos o ADN molde usados en cada tratamiento. Es notable que las muestras bajo los experimentos 6 y 9, ambos con aproximadamente 600 ng/μl de ADN, rindieron una amplificación de alta calidad, definida como una banda única e intensa en la observación en el gel de electroforesis, a temperaturas de alineamiento entre 45 °C (Figura 1) y 50,8 °C, independientemente de la variación en la concentración de los otros reactivos probados. Temperaturas de alineamiento mayores inhibieron la RCP y mostraron resultados negativos. Este estudio soporta hallazgos previos que sugieren que uno de los principales factores relacionados con el éxito de la amplificación de la región código de barras se relaciona con la concentración de ADN (Watts, Thompson, Allen & Kemp, 2007). Algunos autores y casas comerciales han sugerido que se requieren >104 copias de la secuencia diana de buena calidad y de 25-30 ciclos de RCP para obtener una banda visible en la electroforesis (Promega, 2016).

Aunque los especímenes analizados en este estudio fueron frescos, es de resaltar que otros factores, tales como el nivel de degradación del ADN (Dean & Ballard, 2001) o la cantidad de tejido usado para la extracción de ADN (Watts et al., 2007), son importantes en el éxito de amplificación. El gen COI es de origen mitocondrial, y se ha demostrado que

este genoma se degrada a mayor velocidad que el genoma nuclear (Schwarz et al., 2009). Por lo tanto, variables adicionales como el origen genómico del fragmento de ADN de interés, así como el método y tiempo de preservación de cada muestra tendrán un impacto en el éxito de la RCP, especialmente en muestras antiguas (Wells & Sperling, 2001).

Los cebadores usados en la RCP amplificaron tanto la muestra de ADN de *L. cuprina* como la de *L. eximia*, razón por la cual puede ser descartado en el experimento el efecto de la hibridación diferencial de los cebadores al ADN en estas especies. Como se ha reportado previamente en la literatura, los cebadores diseñados por Folmer et al. (1994) son universales, aunque se han propuesto algunas variaciones en algunos grupos taxonómicos (Sharma & Kobayashi, 2014). En el caso de la familia Calliphoridae algunos autores han propuesto otros cebadores (Sperling, Anderson, & Hickey, 1994; Wells & Sperling, 2001) que amplifican una región más corta del gen COI, pero parecen tener una mayor eficiencia en los estudios de varias especies de esta familia (Nakano & Honda, 2015). El análisis de secuencias del gen COI de diferentes especies de Calliphoridae permitirá confirmar si los sitios de hibridación de estos cebadores son conservados en este grupo taxonómico, o si es necesario su rediseño.

En conclusión, el método Taguchi permitió de manera rápida y eficiente determinar las condiciones óptimas para la amplificación del marcador COI en las especies analizadas de la familia Calliphoridae. Se recomienda aplicar esta metodología para estandarizar la amplificación de otros marcadores genéticos o para poner a punto otros procedimientos de laboratorio en el campo de la entomología forense.

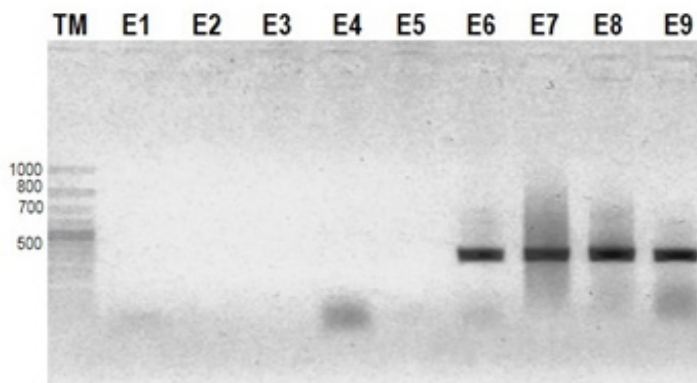


Figura 1. Gel de agarosa al 1 %, 90 voltios, 45 minutos. TM: Tamaño de peso molecular, E: Experimento. Temperatura de alineamiento: 45 °C

Agradecimientos: Este proyecto recibió apoyo financiero del Tecnológico de Antioquia, Institución Universitaria, y del proyecto Colciencias código 50862 de la convocatoria 712, 2015.

GFG recibió apoyo del Programa de Formación Doctoral "Francisco José De Caldas", Convocatoria 511-2010, del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias, Colombia.

Referencias bibliográficas

- Aggarwal, S. (2008). Short tandem repeat genotyping. En *Techniques in Molecular Biology* (pp. 127-134). Lucknow: International Book Distributing CO.
- Amat, E., Vélez, M. C., & Wolff, M. (2008). Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Caldasia*, 30(1), 231-244.
- Amendt, J., Richards, C. S., Campobasso, C. P., Zehner, R., & Hall, M. J. R. (2011). Forensic entomology: Applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7(4), 379-392. <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9209-2>
- Asghar, U., Malik, M. F., Anwar, F., Javed, A., & Raza, A. (2015). DNA extraction from insects by using different techniques: A review. *Advances in Entomology*, 3, 132-138.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (Eds.) (2003). *Current Protocols in Molecular Biology. Molecular Biology* (Vol. 1). New York. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>
- Ball, S. L., & Armstrong, K. F. (2008). Rapid, one-step DNA extraction for insect pest identification by using DNA barcodes. *Journal of Economic Entomology*, 101(2), 523-532.
- Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*, 226, 3-6. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
- Benecke, M. (2001). A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International*, 120(1-2), 2-14. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00408-X](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00408-X)
- Celani de Souza, H. J., Borges Silva, M., Moyses, C. B., Lopes Alberto, F., Pontes, F. J., Ferreira, U. R., Duarte, R. N., Sanches da Silva, C. E. (2013). Robust Design and Taguchi Method Application. En M. Borges Silva (Ed.), *Design of Experiments - Applications* (pp. 1-20). InTech.
- Cobb, B. D., & Clarkson, J. M. (1994). A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research*, 22(18), 3801-3805. <https://doi.org/10.1093/nar/22.18.3801>

- Condamine, F. L., Clapham, M. E., & Kergoat, G. J. (2016). Global patterns of insect diversification: towards a reconciliation of fossil and molecular evidence? *Scientific Reports*, 6, 19208. <https://doi.org/10.1038/srep19208>
- Dean, M. D., & Ballard, J. W. O. (2001). Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98(3), 279-283.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>
- Gutiérrez-López, R., Martínez-de la Puente, J., Gangoso, L., Soriguer, R. C., & Figuerola, J. (2015). Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of hematophagous louse flies (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of Vector Ecology*, 40(1), 11-15. <https://doi.org/10.1111/jvec.12127>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270, 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Joseph, I., Mathew, D., Sathyan, P., & Vargheese, G. (2011). The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 3(2), 89-91. <https://doi.org/10.4103/0975-1475.92154>
- Nakano, A., & Honda, J. (2015). Use of DNA sequences to identify forensically important fly species and their distribution in the coastal region of Central California. *Forensic Science International*, 253, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.05.001>
- Neumaier, M., Braun, A., & Wagener, C. (1998). Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry*, 44(1), 12-26.
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., & Hanner, R. (2009). DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*, 9(Suppl. 1), 42-50. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02631.x>
- Promega. (2016). PCR Amplification. Recuperado de: <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/pcr-amplification/>
- Rao, R. S., Kumar, C. G., Prakasham, R. S., & Hobbs, P. J. (2008). The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: A critical appraisal. *Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1002/biot.200700201>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7, 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/574.873224> 1/1989
- Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H., Aubrey, A. D., ... Poinar, H. (2009). New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Research*, 37(10), 3215-3229. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp159>
- Sharma, P., & Kobayashi, T. (2014). Are "universal" DNA primers really universal? *Journal of Applied Genetics*, 55(4), 485-496. <https://doi.org/10.1007/s13353-014-0218-9>
- Sperling, F. A., Anderson, G. S., & Hickey, D. A. (1994). A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 39(2), 418-427.
- Swinehart, D. F. (1962). The Beer-Lambert Law. *Journal of Chemical Education*, 39(7), 333. <https://doi.org/10.1021/ed039p333>
- Taguchi, G., & Konishi, S. (1987). *Taguchi Methods: Orthogonal Arrays and Linear Graphs*. Dearborn, Michigan, USA: American Supplier Institute.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. <https://doi.org/10.1097/BLO.0b013e3181468780>

- Watts, P. C., Thompson, D. J., Allen, K. A., & Kemp, S. J. (2007). How useful is DNA extracted from the legs of archived insects for microsatellite-based population genetic analyses? *Journal of Insect Conservation*, 11(2), 195-198. <https://doi.org/10.1007/s10841-006-9024-y>
- Wells, J. D., & Sperling, F. a H. (2001). DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120(1-2), 110-115. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00414-5](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00414-5)
- Wells, J. D., & Stevens, J. R. (2008). Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology*, 53, 103-120. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091423>
- Whitworth, T. (2014). A revision of the Neotropical species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae). *Zootaxa* (3810). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3810.1.1>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474-481.