

Joanna Stojak

doktorantka w Zakładzie Genetyki i Ewolucji Instytutu Biologii Ssaków Polskiej Akademii Nauk w Białowieży

jstojak@ibs.bialowieza.pl

Zastosowanie metod molekularnych w identyfikacji gatunku, wieku i płci owadów użytecznych w entomologii sądowej

Streszczenie

Entomologia sądowa wykorzystuje owady do ustalania czasu i przyczyny śmierci, a nawet miejsca, w którym nastąpiła. W tym celu stosowane są dwie metody. Metoda rozwojowa opiera się na wzorcach rozwoju larw w określonych warunkach temperaturowo-środowiskowych. Metoda sukcesyjna analizuje występujące w różnych środowiskach wzorce pojawiania się poszczególnych taksonów na zwłokach. W obu tych metodach najistotniejszą kwestią jest poprawna identyfikacja gatunków. W poniższym artykule zaprezentowane zostały molekularne metody identyfikacji, takie jak barkoding DNA czy analiza krzywych denaturacji DNA o wysokiej rozdzielczości (DNA-HRM-PCR).

Słowa kluczowe entomologia sądowa, barkoding DNA, mtDNA, metody molekularne, identyfikacja gatunkowa

Wstęp

Entomologia sądowa jest nauką wykorzystującą owady na potrzeby wymiaru sprawiedliwości. Proces rozkładu zaczynający się w chwili śmierci i trwający aż do całkowitego zeszkielecowania jest procesem złożonym i nieodwracalnym, przeprowadzanym przez szereg drobnoustrojów i zwierząt.

Informacje o czasie, miejscu czy przyczynie zgonu zazwyczaj uzyskiwane są po przeprowadzeniu sekcji sądowo-lekarskiej, na podstawie oceny wczesnych znamion pośmiertnych (m.in. plam opadowych, stężenia pośmiertnego, oziębienia pośmiertnego), czyli do 72 godzin po zaprzestaniu funkcji życiowych [1–2]. Po upływie tego czasu należy posłużyć się metodami oferowanymi przez inne dziedziny nauki, m.in. entomologią sądową.

Badanie kolejności pojawiania się i rozwoju gatunków owadów nekrofilnych na zwłokach pozwala oszacować czas zgonu, natomiast znajomość zasięgów występowania poszczególnych gatunków owadów i ich preferencji środowiskowych umożliwia określenie miejsca zgonu oraz ustalenie, czy zwłoki zostały przemłoszczone [3–5].

W początkowych stadiach rozkładu zwłoki zasiedlane są głównie przez przedstawicieli muchówek

(Diptera), z których najważniejszą rodzinę stanowią plujkowate (Calliphoridae). W późniejszych stadiach rozkładu przeważają chrząszcze (Coleoptera) [6]. Podejrzewa się, że związane jest to z wydzielaniem przez larwy muchówek dużych ilości toksycznego dla larw chrząszczy amoniaku [7]. Znanie są przypadki, gdy w warunkach niesprzyjających rozwojowi much (np. zbyt niska temperatura) chrząszcze z gatunku *Necrodes littoralis* samodzielnie przeprowadziły całkowity rozkład zwłok [8]. Podczas zbierania materiału entomologicznego nie wolno pominąć gatunków pojawiających się na zwłokach przypadkowo (m.in. os, mrówek, motyli) lub przeniesionych przez chrząszcze na drodze forezy (roztocza), stanowiących cenne dla ustalania okoliczności śmierci wskazówki [9–12].

W tradycyjnym podejściu identyfikację gatunkową przeprowadza się z wykorzystaniem specjalistycznych kluczy do oznaczania opartych na cechach morfologicznych. Często jest to jednak zadaniem żmudnym i skomplikowanym, a w przypadku posiadania jedynie fragmentu organizmu czy jego formy młodocianej często niemożliwym. Opracowanie metody ułatwiającej identyfikację gatunkową stanowi kwestię priorytetową, angażującą także inne dziedziny, w tym najprężniej rozwijającą się biologię molekularną.

Identyfikacja gatunkowa z wykorzystaniem markerów genetycznych

Jedną z metod identyfikacji gatunków, nazywaną barkodingiem DNA (*DNA barcoding*), zaproponował w 2003 roku Paul Hebert z Instytutu Bioróżnorodności Uniwersytetu Guelph w Kanadzie. Wykorzystując tę metodę, przeprowadził analizę setek dorosłych osobników motyli występujących w Kostaryce, bardzo podobnych do siebie morfologicznie, o których sądzono, że reprezentują jeden gatunek *Astraptes fulgerator* (Walch, 1775). Analiza ta ujawniła jednak, że w rzeczywistości badana grupa stanowiła kompleks złożony z 10 różnych gatunków [13–14].

Barkoding DNA wykorzystuje krótkie, wystandaryzowane sekwencje markerów genetycznych do identyfikacji gatunkowej osobnika, z którego te sekwencje pochodzą. Wybrane sekwencje powinny charakteryzować się niską zmiennością w obrębie gatunku (ok. 2%) i równocześnie wysoką zmiennością między gatunkami (ok. 10%) [13]. Projektowanie starterów do reakcji PCR oraz późniejszą standaryzację ułatwiają duża liczba powtórzeń w genomie i oflankowanie konserwatywnymi domenami. Istotna jest również długość sekwencji „kodu paskowego” – krótkie fragmenty, z małą liczbą insercji/delecji, znacznie przyspieszają i ułatwiają identyfikację.

W przeciwieństwie do metod tradycyjnych, do oznaczania gatunku na podstawie sekwencji markerowej wystarczą jedynie fragmenty organizmów (np. pióra, kości) czy stadia trudne w identyfikacji (np. larwy, nasiona) [15].

Odnalezienie jednej markerowej sekwencji DNA standardowej dla wszystkich organizmów okazuje się jednak zbyt skomplikowane, dlatego obecnie prowadzi się badania mające na celu odszukanie markerów DNA najbardziej odpowiednich dla poszczególnych grup organizmów. W przypadku zwierząt (zatem i owadów) najlepszy okazuje się fragment z 5'-końca mitochondrialnego genu podjednostki I oksydazy cytochromowej (*cytochrome c oxidase subunit I* – COI), o długości 648 par zasad.

W identyfikacji gatunkowej zastosowanie znajdują również inne regiony mitochondrialnego DNA (sekwencja cytochromu b, białka wchodzącego w skład kompleksu III łańcucha oddechowego oraz region kontrolny, zwany również pętlą D, będący najszybciej ewoluującą częścią genomu mitochondrialnego), a także markery jądrowe.

Mitochondrialne DNA występuje w komórce w dużej liczbie kopii, jego kolistą strukturą zapewnia większą odporność na degradację, a geny (zazwyczaj) nie ulegają rekombinacji. Dlatego też jedynie markery jądrowe umożliwiają identyfikację i analizę hybryd. W analizach tych powszechne zastosowanie znajdują geny rybosomowego DNA (18S, 5.8S i 28S), oddzielone transkrybowanymi przekładkami ITS1 i ITS2 (*internal transcribed spacer*), stosowanymi jako

sekwencje markerowe u grzybów [16], roślin [17–18] i zwierząt [19–20].

Jednak w dobie intensywnego rozwoju technik sekwencjonowania wysokoprzepustowego, gdy poznanie pełnej sekwencji genomowej dowolnego organizmu okazuje się coraz łatwiejsze i tańsze, metoda barkodingu DNA staje przed poważnym wyzwaniem. Opracowanie bazy sekwencji barkodowych wszystkich organizmów żywych zajmie naukowcom wiele lat, a do tej pory analiza obecnego w próbce DNA pozwoli jedynie na ustalenie, że należy ono do wskazanego przez bazę gatunku lub innego, dla którego jeszcze nie opisano sekwencji barkodowej.

Mimo potrzeby dopracowania danych, barkoding DNA zasługuje na miano pełnoprawnego narzędzia taksonomicznego, użytecznego w entomologii sądowej. Wybierając metodę identyfikacji, należy pamiętać jednak, że to metody tradycyjne, opierające się na obserwacji cech morfologicznych, wciąż są najtańsze, najszybsze i zazwyczaj nie wymagają zniszczenia identyfikowanych okazów.

Barkoding DNA staje się coraz popularniejszy w identyfikowaniu gatunków owadów istotnych dla entomologii sądowej, w szczególności plujek (Calliphoridae) i ich larw, podczas gdy równie istotne i znacznie trudniejsze w identyfikacji gatunki chrząszczy są niesłusznie pomijane.

Zastosowanie barkodingu DNA w identyfikacji gatunków istotnych w entomologii sądowej

Przeprowadzona przez Schroedera i in. [21] analiza powielonych i trawionych enzymem restrykcyjnym DraI fragmentów COI i COII (*cytochrome oxidase subunit II*, podjednostka II oksydazy cytochromowej) o długości 349 pz trzech gatunków Calliphoridae wykazała, że sekwencja gatunku *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) różni się od sekwencji gatunku *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830) 34 nukleotydami, a od sekwencji gatunku *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758) 30 nukleotydami. Gatunki *Calliphora vicina* i *Calliphora vomitoria* różnią się 15 nukleotydami. Natomiast analizy filogenetyczne Wellsa i Sperlinga [22] oparte na fragmencie COI ujawniły, że dystans genetyczny w obrębie pojedynczych gatunków Calliphoridae wynosi 1% i mniej, natomiast między gatunkami 3% i więcej.

Meier i in. [23] przeanalizowali 1333 sekwencje COI z 449 gatunków Diptera w celu określenia sekwencji najlepiej identyfikujących gatunki i stworzenia tym samym gotowych narzędzi do potencjalnej identyfikacji osobników odłowionych na miejscu ujawnienia zwłok. Okazało się, że aż 21% gatunków nie ma indywidualnej sekwencji barkodowej.

Analiza COI przeprowadzona przez Rolo i in. [24] dla 95 osobników z 7 gatunków z rodzin Musci-

dae i Calliphoridae (*Musca autumnalis*, *Hydrotaea dentipes*, *Eudasyphora cyanella*, *Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia caesar*, *Pollenia rudis*) potwierdziła przydatność metody w poprawnej identyfikacji z 99–100% skutecznością. Satisfakcjonujące wyniki uzyskali również Gil Arriortua i in. [25], analizujący sekwencję cytochromu b (o długości 307 pz) dla 185 osobników *Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata*, *Lucilia caesar*, *Lucilia ampullacea* i *Chrysomya albiceps*.

Równie popularne okazują się analizy fragmentu COI muchówek z rodziny ścierwicowatych (Sarcophagidae), w przypadku których problemem jest identyfikacja nie tylko larw (a nawet stadium ich rozwoju), ale i osobników dorosłych [26]. Jordaens i in. [27] przeprowadzili sekwencjonowanie COI dla 126 osobników z 56 gatunków ścierwicowatych z Europy Zachodniej, a Meiklejohn i in. [28–29] na podstawie analizy COI z 588 osobników zidentyfikowali barkodowe sekwencje dla 16 gatunków Sarcophagidae z Australii, a także opracowali skuteczną identyfikację stadiów larwalnych *Sarcophaga impatiens* (z 99,95% skutecznością).

Do tej pory opublikowano jedynie dwie prace dotyczące barkodingu DNA chrząszczy istotnych w entomologii sądowej. W jednej z nich Schilthuizen i in. [30] analizowali z zastosowaniem markerowych sekwencji DNA chrząszcze z podrodziny zyzkowatych (Coleoptera: Leiodidae: Cholevinae). Małe rozmiary, trudności w oznaczaniu zarówno larw, jak i postaci dorosłych sprawiają, że mimo częstego odławiania przedstawicieli tej rodziny na zwłokach entomofagów sądowi nie stosują ich nazbyt często do szacowania czasu zgonu. W badaniach wykorzystanych zostało 86 osobników (wybierano jedynie samce, ponieważ w tym przypadku identyfikacja gatunkowa jest niezwykle łatwa, wymaga jedynie izolacji kopulatora), należących do kilku rodzajów (*Catops*, *Fissocatops*, *Apocatops*, *Choleva*, *Nargus*, *Ptomaphagus*, *Sciodrepoides*), zebranych na terenie Holandii i Francji. Przeprowadzone analizy COI udowodniły, że metoda molekularna znacznie ułatwia i przyspiesza identyfikację gatunkową osobników z podrodziny zyzkowatych – dystanse genetyczne między gatunkami wynosiły aż 9%, a w obrębie gatunków 4% lub mniej. Jedynie *Catops nigricans* i *Catops fuscus* nie zostały odseparowane tą metodą.

Identyfikacja gatunku, wieku i płci z zastosowaniem innych metod molekularnych

Niezwykle ciekawą metodą identyfikacji gatunkowej, łączącą kilka technik, jest metoda DNA-HRM-PCR. Wykorzystuje ona łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time PCR* – RT-PCR) oraz analizę krzywych denaturacji DNA o wysokiej rozdzielczości (*high resolution melting* – HRM). DNA-HR-

M-PCR umożliwia szybką detekcję i analizę jednonukleotydowych różnic (*single nucleotide polymorphism* – SNP) w otrzymanych produktach PCR, na podstawie pomiaru zmian we fluorescencji, wywołanych odłączeniem się zinterkalowanego z kwasem nukleinowym barwnika podczas rozplatania się podwójnej nici DNA (tworzony jest tzw. profil topnienia DNA). Metodę wykorzystali Malewski i in. [31] do identyfikacji występujących w Polsce 16 istotnych w entomologii sądowej gatunków Calliphoridae. W reakcji PCR powielano dwa krótkie fragmenty COI, o długości 119 i 70 pz. Analiza HRM kilkunastu osobników należących do tego samego gatunku wykazała jedynie niewielkie różnice w krzywych denaturacji. Co więcej, czułość i dokładność metody umożliwiły przeanalizowanie zsyntezowanych oligonukleotydów *Lucilia sericata* z Polski, Francji, Anglii, Indii oraz USA pod kątem geograficznego zróżnicowania danych genetycznych, tak często utrudniającego poprawną identyfikację.

Z kolei ocena wielkości genomów za pomocą cytometrii przepływowej (*flow cytometry* – FCM) pozwala na identyfikację nie tylko gatunku, ale również płci osobnika. Technika FCM opiera się na pomiarze fluorescencji analizowanych komórek, umożliwiając ocenę właściwości fizykobiologicznych ich składników, takich jak np. kwasy nukleinowe. Metoda doskonale sprawdza się w przypadku gatunków blisko ze sobą spokrewnionych, uwiadamiając niezwykle subtelne różnice, trudne do uchwycenia przez inne metody molekularne. Co ważne, cytometria przepływowa doskonale sprawdza się także w identyfikacji gatunku i płci stadiów larwalnych. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Picard i in. [32], w których oszacowano wielkości genomów dla obu płci 17 istotnych w entomologii sądowej gatunków Diptera. Analizy te wykazały, że średnia wielkość wynosiła od 425,8 Mb w przypadku samicy *Chrysomya rufifacies* do 1197,4 Mb w przypadku samicy *Haematobia irritans*.

Metody molekularne znajdują również zastosowanie w określaniu wieku form preimaginalnych owadów, zwłaszcza problematycznych poczwerek, w przypadku których twarda otoczka kokonu utrudnia obserwację zachodzących w osobniku subtelnych zmian i ocena wieku metodą morfologiczną wymaga niezwyklej wiedzy o zachodzących podczas przepoczwarczania procesach. Obliczenia te umożliwia analiza zależnej od wieku (stadium rozwoju) ekspresji genów (*differentially expressed genes* – DEGs), polegająca na tworzeniu specyficznych gatunkowo profili prezentujących kaskadę hierarchicznie aktywowanych po sobie genów regulujących rozwój osobnika. Przeprowadzona następnie korelacja transkryptomu analizowanego osobnika i poszczególnych punktów pełnego profilu ekspresji genów pozwala na oszacowanie, na jakim etapie rozwoju się ów osobnik znajduje, a tym samym oszacowanie jego wieku. Podstawą tych analiz jest metoda qRT-PCR (*quantitative real-time PCR*), pozwalająca na określenie ilości powstającego

produktu w rzeczywistym czasie jego powstawania (jednoczesne namnażanie i monitorowanie ilości po każdym cyklu) [33]. Do tej pory opracowano profile DEGs dla dwóch gatunków istotnych w entomologii sądowej. W przypadku gatunku *Lucilia sericata* zidentyfikowane DEGs nie pozwalały na poprawne oszacowanie wieku poczwarki [34, 35], natomiast badania nad DEGs u *Calliphora vicina* pokazują, że metoda ta może stanowić alternatywę dla tradycyjnych metod szacowania wieku owadów [33].

Tę samą metodę zastosowano również do oceny wieku złożonych przez muchówki *Lucilia sericata* jaj, wykorzystując ekspresję trzech genów: *bcd* (obserwowany we wczesnym rozwoju jaja), *sll* (determinujący wzór grzbietowo-brzusznego ubarwienia, jego wysoka ekspresja obserwowana jest w gruczołach śliniankowych) oraz *cs* (warunkujący prawidłowe tworzenie się chityny podczas rozwoju kutikuli larw). Dzięki zróżnicowanemu poziomowi ekspresji wymienionych trzech genów w zależności od czasu, który upłynął od owipozycji, trwające kilkanaście godzin stadium jaja może być podzielone na mniejsze okresy, umożliwiając tym samym precyzyjne ustalenie jego wieku [34].

Podczas szacowania czasu zgonu i określania wieku form preimaginalnych niezwykle istotne są warunki środowiska. Zbyt niska temperatura może wywoływać okresowe zwolnienie rozwoju larw (diapauza), którego nieuwzględnienie w obliczeniach generuje poważne błędy. Brak morfologicznych różnic między larwą rozwijającą się prawidłowo i tą znajdującą się w stanie diapauzy uniemożliwiało do tej pory stworzenie skutecznej metody ich rozpoznawania. Porównanie profili ekspresji genów larw poza diapauzą i w jej trakcie pozwoliło na odnalezienie genów charakterystycznych dla tego procesu. W przypadku *Sarcophaga crassipalpis* obserwuje się podwyższoną ekspresję m.in. genów *hsp23* i *hsp70* [36, 37], u *Lucilia cuprina* – m.in. *hsp23* i *hsp24* [38], a u *Calliphora vicina* – m.in. *hsp23*, *hsp24*, *hsp70* oraz AFBP [39].

Analiza zależnej od wieku ekspresji genów jest powszechnie stosowana w biologii molekularnej rozwoju, a wykorzystywane przez nią techniki i narzędzia z łatwością można wprowadzić do laboratoriów prowadzących sądowe analizy DNA. Zastosowanie mikromacierzy i pełne zautomatyzowanie metody zwiększa przepustowość analizy i zmniejsza ryzyko błędów, pozwalając również na dokładne przewidzenie ich poziomu w uzyskiwanych wynikach, spełniając tym samym założenia standardu Dauberta [34].

Podsumowanie

Dokładna i poprawna identyfikacja gatunków użytecznych w entomologii sądowej jest niezwykle istotna, gdyż każdy błąd w oznaczeniu doprowadzić może do oskarżenia niewinnej osoby, podczas gdy przestępca nadal będzie pozostawał na wolności. Entomologia

sądowa jest stosowana w wielu krajach, z których najwyższy poziom zaawansowania wykazują Stany Zjednoczone, Francja i Kanada. Na całym świecie znaleźć można jedynie 70 w pełni wykształconych i pracujących wyłącznie w tej specjalności naukowców [40]. Wyniki uzyskane z obserwacji procesu rozkładu zwłok (przeprowadzanych przez antropologów sądowych m.in. na Uniwersytecie Tennessee w USA) mogą być przenoszone do prawdziwych spraw kryminalnych, a działająca na terenie USA Amerykańska Narodowa Służba Oceaniczna i Meteorologiczna (The National Oceanic and Atmospheric Administration – NOAA), gdzie dostępne są (za niską opłatą) dane temperaturowe prawie ze wszystkich regionów, stanowi źródło niezwykle cennych w szacowaniu czasu zgonu informacji [41].

W Polsce możliwości zastosowania owadów nekrofilnych do określania czasu zgonu bada sześć ośrodków: poznańsko-toruński, gdański, warszawski, krakowski, łódzki i katowicki. Niewątpliwie metody molekularne w istotny sposób podnoszą znaczenie analiz entomologicznych i stanowią ich cenne uzupełnienie.

Podziękowania

Dziękuję anonimowemu recenzentowi za cenne uwagi, które pomogły podnieść wartość tej publikacji.

Bibliografia

- Dix J.: Color atlas of forensic pathology, CRC Press LLC 2000.
- Shkrum M.J., Ramsay D.A.: Forensic pathology of trauma. Common problems for the pathologist, New Jersey 2007.
- Kaczorowska E., Pieśniak D., Szczerkowska Z.: Entomologiczne metody określania czasu śmierci, „Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii” 2002, 52(2–3): 305.
- Kaczorowska E., Pieśniak D., Szczerkowska Z.: Wykorzystanie metod entomologicznych w próbach określania daty zgonu – opis przypadków, „Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii” 2004, 54 (2–3): 169.
- Matuszewski S., Bajerlein D., Konwerski S.: Katalog owadów przydatnych do ustalania czasu śmierci w lasach Polski. Część 3: chrząszcze (Insecta: Coleoptera), „Problemy Kryminalistyki” 2010, 269: 5.
- Gennard D.E.: Forensic Entomology. An introduction, Chichester 2007.
- Crowson R.A.: The biology of Coleoptera, London 1981.
- Kulshrestha P., Satpathy D.K.: Use of beetles in forensic entomology, „Forensic Science International” 2001, 120: 15.
- Bharti M., Singh D.: Insect faunal succession on decaying rabbit carcasses in Punjab, India, „Journal of Forensic Sciences” 2003, 48 (5): 1133.
- Grassberger M., Frank C.: Temperature-related development of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* as forensic indicator, „Medical and Veterinary Entomology” 2003, 17: 257.

11. Disney R.H.L., Munk T.: Potential use of Braconidae (Hymenoptera) in forensic cases, „Medical and Veterinary Entomology” 2004, 18: 442.
12. Medina A.G., Herrera L.G., Perotti M.A., Rios G.J.: Occurrence of *Poecilochirus austroasiaticus* (Acar: Parasitidae) in forensic autopsies and its application on postmortem interval estimation, „Experimental and Applied Acarology” 2013, 59: 297.
13. Hebert P.D.N., Cywinska A., Shelley L.B., deWaard J.H.: Biological identifications through DNA barcodes, „Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences” 2003, 270: 313.
14. Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W.: Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*, „Proceedings of the National Academy of Sciences, USA” 2004, 101: 14812.
15. Bogdanowicz W., Draber-Mońko A., Malewski T.: Biologiczna metka, „Academia” 2008, 13: 31.
16. Seifert K.A.: Progress towards DNA barcoding of fungi, „Molecular Ecology Resources” 2009, 9 (Suppl.1): 83.
17. Mai J.C., Coleman A.W.: The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants, „Journal of Molecular Evolution” 1997, 44: 258.
18. Alvarez I., Wendel J.F.: Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, „Molecular Phylogenetics and Evolution” 2003, 29: 417.
19. Joseph N., Krauskopf E., Vera M.I., Michot B.: Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast, „Nucleic Acids Research” 1999, 27: 4533.
20. Schultz J., Maisel S., Gerlach D., Müller T., Wolf M.: A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota, „RNA” 2005, 11(4): 361.
21. Schroeder H., Klotsbach H., Elias S., Augustin C., Püeschel K.: Use of PRC-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses, „Forensic Science International” 2003, 132: 76.
22. Wells J.D., Sperling F.A.H.: DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae), „Forensic Science International” 2001, 120: 110.
23. Meier R., Shiyang K., Vaidya G., Ng P.K.L.: DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success, „Systematic Biology” 2006, 55(5): 715.
24. Rolo E.A., Oliveira A.R., Dourado C.G., Farinha A., Rebelo M.T., Dias D.: Identification of sarcosaprophagous Diptera species through DNA barcoding in wildlife forensics, „Forensic Science International” 2013, 228: 160.
25. GilArriortua M., Salona Bordas M.I., Caine L.M., Pinheiro F., de Pancorbo M.M.: Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae), „Forensic Science International” 2013, 228: 132.
26. Zehner R., Amendt J., Schutt S., Sauer J., Krettek R., Povolny D.: Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae), „International Journal of Legal Medicine” 2004, 118: 245.
27. Jordaens K., Sonet G., Bourguignon L., Richet R., Dupont E., Braet Y., Desmyter S.: Identification of forensically important *Sarcophaga* species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene, „International Journal of Legal Medicine” 2013, 127: 491.
28. Meiklejohn K.A., Wallman J.F., Dowton M.: DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera), „International Journal of Legal Medicine” 2011, 125: 27.
29. Meiklejohn K.A., Wallman J.F., Dowton M.: DNA barcoding identifies all immature life stages of a forensically important flesh fly (Diptera: Sarcophagidae), „Journal of Forensic Sciences” 2013, 58 (1): 184.
30. Schilthuizen M., Scholte C., van Wijk R.E.J., Dommershuijzen J., van der Horst D., zu Schlochtern M.M., Lievers R., Groenenberg D.S.J.: Using DNA-barcoding to make the necrobiont beetle family Cholevidae accessible for forensic entomology, „Forensic Science International” 2011, 210: 91.
31. Malewski T., Draber-Mońko A., Pomorski J., Łoś 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.
32. Picard C.J., Johnston J.S., Tarone A.M.: Genome sizes of forensically relevant Diptera, „Journal of Medical Entomology” 2012, 49(1): 192.
33. Boehme P., Spahn P., Amendt J., Zehner R.: Differential gene expression during metamorphosis: a promising approach for age estimation of forensically important *Calliphora vicina* pupae (Diptera: Calliphoridae), „International Journal of Legal Medicine” 2013, 127: 243.
34. Tarone A.M., Jennings K.C., Foran D.R.: Aging blow fly eggs using gene expression; a feasibility study, „Journal of Forensic Sciences” 2007, 52: 1350.
35. Tarone A.M., Foran D.R.: Gene expression during blow fly development: improving the precision of age estimates in forensic entomology, „Journal of Forensic Sciences” 2011, 56: S112.
36. Yocum G.D., Joplin K.H., Denlinger D.L.: Upregulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, „Insect Biochemistry and Molecular Biology” 1998, 28: 677–682.
37. Rinehart J.P., Yocum G.D., Denlinger D.L.: Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, „Insect Biochemistry and Molecular Biology” 2000, 30:515–521.
38. Concha C., Edman R.M., Belikoff E.J., Schiemann A.H., Carey B., Scott M.J.: Organization and expression of the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*) hsp23, hsp24, hsp70 and hsp83 genes, „Insect Biochemistry and Molecular Biology” 2012, 21:169–180.
39. Fremdt H., Amendt J., Zehner R.: Diapause-specific gene expression in *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) – a useful diagnostic tool for forensic entomology, „International Journal of Legal Medicine” 2013, doi 10.1007/s00414-013-0920-x.
40. Kaczorowska E., Draber-Mońko A.: Wprowadzenie do entomologii sądowej, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego 2009.
41. Megyesi M.S., Nawrocki S.P., Haskell N.H.: Using Accumulated Degree-Days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains, „Journal of Forensic Sciences” 2005, 50 (3): 618.