

**PRIMEROS RESULTADOS SOBRE DESARROLLO
DE *CALLIPHORA VICINA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)
BAJO CONDICIONES CONTROLADAS
DE TEMPERATURA**

BEATRIZ DÍAZ MARTÍN
AINHOA LÓPEZ RODRÍGUEZ
MARTA I. SALOÑA BORDAS¹

Resumen: Los Dípteros son un grupo de animales ectotérmicos, incapaces de regular su temperatura corporal. Por ello, es importante conocer los efectos de la temperatura ambiente en su desarrollo, en especial si se desea realizar una estimación de la edad de una determinada población. En el presente estudio presentamos los patrones de desarrollo de *Calliphora vicina* bajo condiciones controladas dentro de un rango de temperaturas entre 5 y 35°C en un estudio pionero en la Península Ibérica. A medida que la temperatura de exposición aumenta, tanto el tiempo requerido para completar su desarrollo como el tamaño máximo que alcanzan los individuos se ven gradualmente reducidos. El límite superior de temperatura o umbral máximo de desarrollo deberá establecerse aún entre los valores de 31 y 34°C, dado que las larvas no fueron capaces de finalizar su desarrollo larvario a 35°C ni alcanzar el estado de pupa. A su vez, el umbral mínimo de desarrollo parece encontrarse entre 4 y 5°C en el área de estudio. Por otro lado, se estima como rango óptimo para el desarrollo de esta especie, temperaturas entre 20 y 25°C, dado que dentro de este rango alcanzan las mayores dimensiones corporales en el menor tiempo. Fuera de este rango, el estrés biológico parece incrementarse, alcanzando adultos de menores dimensiones y dilatando su tiempo de desarrollo. Por úl-

1. Dpto de Zoología y Biología Celular Animal. Facultad Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU. Campus de Leioa. Barrio de Sarriena s/n. e-mail contacto: m.salona@ehu.es

timo, se presentan diagramas *isomegalo e isomorfo* que facilitarán la estimación de la edad de la larva en condiciones variables, aspecto básico en los cálculos del intervalo *postmortem* (IPM) basados en el periodo de actividad de los insectos (PAI).

Palabras clave: desarrollo larvario, temperatura, IPM, *Calliphora vicina*, Diptera, Calliphoridae, *isomegalo*, *isomorfo*.

Abstract: Diptera is a group of ectothermic animals, as they are not able to regulate their body temperature. Therefore, it is important to know the effect of the environmental temperature on their development. This study shows the developmental pattern of *Calliphora vicina* under controlled conditions, within a range of temperature between 5 and 35°C. As the temperature of exposure is increased, both the time required to end the development and the maximum size decrease gradually. The upper limit of temperature for the development of this species should be checked within a range of 31 and 34°C, as all the colonies died at 35°C without reaching the pupa stage; whereas the minimum threshold seems to be between 4 and 5°C. At the same time, it has been estimated the optimum temperature range in which this species requires lower time of development and reaches its maximum body size. This range comes across 20 and 25°C. When the species completes its development out of this temperature, the biological stress starts to become important. Finally, it has been performed the *isomegalen* and *isomorphen* diagrams for our country, to facilitate the estimation of the larval time of development, basic for the estimation of the post-mortem interval (PMI) based on the period of insect activity (PIA).

Key words: larval development, temperature, PMI, *Calliphora vicina*, Diptera, Calliphoridae, *isomegalen*, *isomorphen*-diagram.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de las evidencias entomológicas se hace cada día más necesario a la hora de estimar con precisión el tiempo transcurrido tras una contaminación ambiental por parte de los artrópodos, especialmente en aquellos casos forenses donde se requiere la estimación del intervalo *post-mortem* (IPM) basado en el periodo de actividad de un insecto (PAI). De esta forma, la habilidad de determinados insectos necrófagos para colonizar materia orgánica en descomposición, así como la información que nos proporcionan de acuerdo a la presencia de determinadas especies y su nivel de desarrollo, es fundamental a la hora de estimar el tiempo transcurrido desde la muerte y sus posibles causas.

Entre los insectos necrófagos que pueden colonizar cadáveres se encuentra la familia *Calliphoridae*, moscas de colores metalizados azul, verde o

incluso negro conocidas vulgarmente como moscardas o moscardones. Algunas de las especies de esta familia han sido largamente estudiadas en la historia de la Entomología Forense, y son las que nos proporcionan un mayor número de datos para conseguir una estimación más precisa del intervalo *postmortem*.

Este intervalo puede ser calculado mediante el estudio del grado de desarrollo de las larvas de los califóridos, al ser los primeros en colonizar los restos cadavéricos. Es especialmente útil conocer la evolución de su longitud, la cual puede ser comparada con los datos obtenidos previamente en condiciones controladas de laboratorio. Sobre esta idea se basan los diagramas isomegalo e isomorfo, que representan el tiempo requerido por las larvas para obtener una determinada longitud o un determinado estado de desarrollo respectivamente a diferentes temperaturas controladas (1).

Ambos métodos son muy útiles en aquellos casos forenses en los que apenas se observan variaciones en la temperatura ambiental en el lugar donde se ha encontrado el cadáver (como en el interior de una casa). Así, los diagramas *isomegalo* e *isomorfo* representan un soporte preciso y efectivo para una estimación precisa del PAI sobre el que calculemos el IPM (2).

Toda esta información, conseguida mediante las diferentes evidencias entomológicas recogidas de un cadáver, fomenta día a día el estudio de los artrópodos en las investigaciones criminales (3). Por esta razón, los estudios de desarrollo larvario bajo condiciones climatológicas conocidas y controladas son cada vez más abundantes, ya que tanto el proceso de descomposición del cadáver como el desarrollo y sucesión de insectos en el mismo están estrechamente relacionados con la temperatura ambiental del lugar del fallecimiento.

Es más, los califóridos son insectos capaces de detectar pequeños cambios de temperatura de aproximadamente $\frac{1}{4}^{\circ}\text{C}$ (4). Al ser ectotermos, su capacidad de desarrollo depende directamente de la temperatura ambiental (5, 6). No solo su desarrollo, casi todos sus procesos fisiológicos son dependientes de esta variante climatológica (7). Además, de acuerdo con Taylor (8), factores abióticos como la temperatura pueden afectar a sus periodos de vuelo, observando como a temperaturas elevadas se aprecia mayor cantidad de insectos por su activación termal. Por todas estas razones, consideramos importante estimar el rango óptimo de temperatura para cada especie de califórido en una región pendiente de estudio situada en el Norte de la Península Ibérica (5, 9).

La mayoría de estudios sobre el desarrollo de los califóridos ha tenido lugar en condiciones óptimas de temperatura, por lo general por encima de 20°C (10). Podemos encontrar estudios previos referentes a especies de la familia Calliphoridae, como los realizados para *Calliphora vicina* (4, 5, 12), *Calliphora vomitoria* (5, 11), *Lucilia illustris* (5, 12), *Lucilia sericata* (1, 5, 10), *Chrysomya megacephala* (13), *Chrysomya rufifacies* (3), *Protophormia terraenovae* (5, 14), *Phormia regina* (5, 15) y *Protocalliphora* (16).

Hay también algunos estudios previos para otras familias de dípteros, como *Sarcophagidae* (2, 5, 19), *Muscidae* (5, 20, 21), *Phoridae* (5, 22) y *Drosophilidae* (23). Con respecto a otros insectos de interés forense podemos mencionar estudios previos realizados para especies parasitoides como *Nasonia vitripennis* (24), y varias especies del orden *Coleoptera* (25).

No obstante, todos estos estudios se han realizado con poblaciones no ibéricas, por lo que los riesgos de extrapolación pueden inducir a errores de interpretación considerables, como se indicará posteriormente en la discusión de los resultados que aquí presentamos para *C. vicina* en la Comunidad Autónoma del País Vasco (C.A.P.V.).

Como cabe esperar, el tiempo de desarrollo para cada especie puede variar, aún más entre géneros diferentes. Es más, se han realizado varios estudios para la misma especie con idéntica metodología, obteniendo diferentes resultados. Esto puede ser debido a la adaptación geográfica observada en algunas especies de califóridos. Una especie capturada en un país nórdico completa su ciclo de desarrollo más rápidamente a bajas temperaturas, en comparación con otros especímenes de la misma especie tomadas de una región de clima más cálido (26).

Por último, es necesario remarcar la importancia de otros factores atmosféricos, como por ejemplo las precipitaciones, que pueden retrasar las fases de la descomposición cadavérica por el descenso de la temperatura ambiental o el desplazamiento de la masa larvaria debido a las corrientes de agua que se forman cuando las precipitaciones son muy fuertes. Pero al mismo tiempo, con esta lluvia el cadáver puede rehidratarse, permitiendo una posterior recolonización debida a las modificaciones de sus características físicas y químicas (27).

Se conoce también cómo las drogas pueden cambiar el tiempo requerido para el desarrollo de las larvas, incrementándolo o disminuyéndolo dependiendo de su naturaleza y de sus efectos sobre los tejidos larvarios (28, 29).

El presente estudio ha sido realizado en condiciones controladas de temperatura y humedad, reguladas por una cámara climática Vötsch VCL40003 ubicada en las dependencias del laboratorio de Entomología Forense de la UPV/EHU. Se ha seleccionado *Calliphora vicina* por ser la especie más frecuente y estar activa a lo largo de todo el año en nuestra región (30). Es, además, una especie frecuentemente citada en casos forenses y fácil de mantener en condiciones estándar de laboratorio.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el inicio y mantenimiento de las colonias de cría, se colocaron varias trampas de atracción selectiva en el campus universitario de Leioa

(UPV/EHU). La metodología y materiales utilizados para confeccionar las trampas siguen el modelo propuesto por Hwang & Turner (31), conocido como trampa de doble embudo. Las trampas fueron cebadas con riñón de cerdo y colocadas en los lugares seleccionados, eligiendo para ello aquellos días en que las condiciones ambientales fueran más favorables (evitando días de intenso frío y/o lluvia que comprometieran la actividad de los califóridos).

Una vez retiradas las trampas, cada hembra grávida fue introducida en un recipiente de plástico que contenía una porción de riñón de cerdo fresco para controlar el momento de la ovoposición. Con esto, se persiguen tres objetivos:

- Obtener cultivos larvarios a partir de un solo individuo, que nos permitiera anotar el momento exacto de la ovoposición y, a partir de ahí determinar el tiempo que necesitan las larvas para emerger del huevo a cada temperatura de estudio.
- Confirmar la especie de estudio tras la identificación de los adultos que emergieron de los cultivos.
- Evitar posibles contaminaciones debidas a diferentes ovoposiciones no sincronizadas que pudieran conducir a errores estimativos durante el seguimiento del crecimiento real de la población original.

Tras conseguir la ovoposición sobre la fuente de materia orgánica, los contenedores fueron introducidos inmediatamente en la cámara climática, etiquetando cada muestra con un código alfanumérico, registrando la hora exacta de la ovoposición y la temperatura a la que iba a ser expuesta.

Las temperaturas estudiadas han sido las siguientes: 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C. Las poblaciones eran controladas cada 24 h. Dependiendo del tamaño de la muestra, se decidía previamente el número de individuos a sacrificar en cada control. El procedimiento seguido en cada una de ellas fue siempre el mismo. Normalmente, si la cantidad de huevos era suficiente, se extraían 10 especímenes diarios siempre a la misma hora y se procedía a mantener durante un minuto en agua a 100°C (32). No obstante, en determinadas circunstancias la baja densidad de la población nos obligó a reducir el tamaño de la muestra conservada diariamente para asegurarnos que un mínimo de individuos llegara a la fase de pupa y finalizara su desarrollo hasta la emergencia del imago. Es importante destacar que a bajas temperaturas (5°C) el desarrollo se vio considerablemente ralentizado, de modo que la toma de muestras se realizó cada dos o tres días.

Para el protocolo de cocción se debía proceder rápidamente, intentando que la población estuviera el menor tiempo posible fuera de la cámara y expuesta a la temperatura ambiente del laboratorio (20-24°C). Por ello, cada contenedor era analizado individualmente, extrayendo 10 larvas del mismo para su conservación y reintroduciendo la muestra inmediatamente en la cámara climática.

Una vez cocidas las larvas, las muestras eran etiquetadas y preservadas en viales con etanol al 80%, debidamente etiquetadas, y se procedía a medirlas en el día con ayuda de un microscopio estereoscópico Nikon SMZ 1500.

Las larvas fueron alimentadas *ad libitum*, con lo que un aspecto muy importante a controlar es la cantidad de sustrato disponible en cada contenedor a fin de evitar su agotamiento. En días previos al inicio de la fase migratoria, se proporcionaba vermiculita como sustrato base para la pupación.

Todos los datos obtenidos en el desarrollo de este experimento forman parte de una base de datos que nos permitirá compararlos con estudios futuros. Todo el material estudiado se encuentra depositado en el laboratorio de Entomología Forense de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

III. RESULTADOS

Se ha analizado un total de 9962 individuos criados a partir de colonias establecidas de *C. vicina* en condiciones controladas de temperatura, desde la fase huevo hasta la emergencia de los adultos. El desarrollo se ha completado con éxito en un rango de temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, y 30°C. A 35°C se produjo un colapso durante la fase migratoria, no alcanzando la fase pupa ninguno de los individuos criados. Se observa como el tiempo medio de desarrollo de la colonia desciende a medida que aumenta la temperatura ambiente. No obstante, superado un determinado valor (>30°C) el desarrollo se ve ralentizado y las larvas no terminan su desarrollo, muriendo a varias semanas de iniciar la migración y deshidratándose por el calor antes de alcanzar la fase de pupa. Del mismo modo, en un ensayo previo realizado por debajo de 5°C (datos no publicados), las larvas no llegaron a pupar dentro del rango de 4-4,5°C. Nos encontramos, por tanto, dentro de los límites del umbral máximo y mínimo de desarrollo, cuyos valores deberán fijarse con mayor precisión en estudios futuros.

La figura I representa el tiempo total que *C. vicina* requiere para completar su ciclo biológico dentro de los rangos de temperatura detallados. Puede observarse la relación inversamente proporcional existente entre temperatura y tiempo de desarrollo, la cual es patente hasta que se superan los límites de tolerancia de esta especie quedando ésta inhabilitada para completar su desarrollo.

A 35°C sólo se representa el tiempo requerido para completar el desarrollo larvario hasta el inicio de la migración. Así, en el caso hipotético de que las larvas hubieran completado su desarrollo, los tiempos habrían sido mayores que a 30°C, rompiéndose la dinámica observada en los rangos

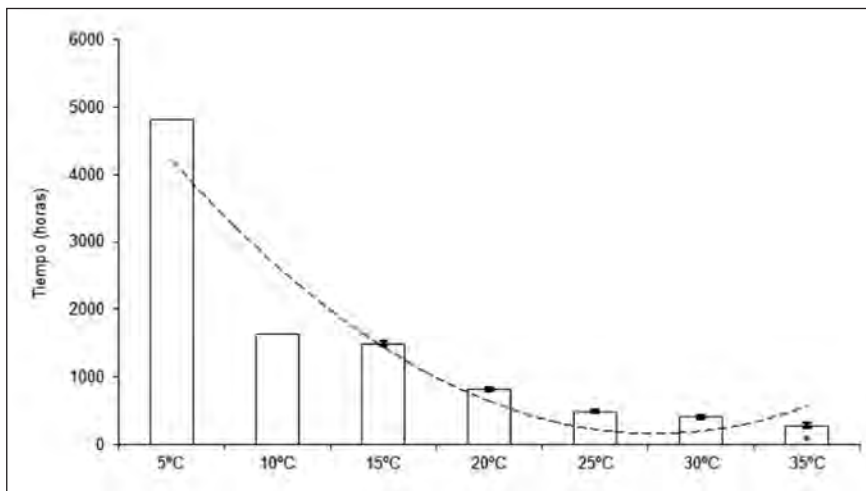


Figura I. Tiempo medio necesario para completar el desarrollo de *Calliphora vicina*. *A 35°C todos los especímenes fallecieron durante la migración y no alcanzaron la fase pupa, por lo que sólo se representa el tiempo transcurrido hasta el inicio de la migración.

previos, donde se confirma que a mayor temperatura menor tiempo de desarrollo. Por ello, el umbral máximo de desarrollo deberá fijarse con más precisión para esta especie en una temperatura superior a 30°C pero inferior a 35°C, donde se produce el colapso durante la migración, si bien dicho aspecto deberá analizarse con más detenimiento en futuros estudios.

Respecto a temperaturas bajas, la actividad del insecto se ve claramente ralentizada, con una fuerte variabilidad entre individuos. Estos reducen su actividad metabólica y deceleran el desarrollo, lo que significa que dedican más tiempo y energía a su crecimiento, dando como resultado larvas de mayor tamaño en muestras criadas a 10°C. En ocasiones, las larvas pueden entrar en diapausa, lo que interfiere en las estimaciones finales del tiempo mínimo de desarrollo. No obstante, en los ensayos en laboratorio no se ha detectado diapausa en las poblaciones estudiadas a 5°C (3 réplicas de 250 individuos). Por debajo de 4°C, el desarrollo se detiene al inicio de la fase migratoria y las larvas no alcanzan la fase de pupa (datos no incluidos en el estudio). Por ello, el umbral mínimo de desarrollo deberá fijarse entre 4 y 5°C en estudios futuros y serán válidos para nuestra región de estudio.

En resumen, a mayor temperatura menor es el tamaño de los ejemplares obtenidos, si bien el tiempo necesario para completar el desarrollo también es menor (Figuras II y III). Como excepción a esta afirmación, las temperaturas extremas conllevan una menor longitud larvaria y un desarro-

llo excesivamente largo, manifestándose fuertes dificultades para alcanzar el estadio de pupa (5°C y 35°C).

La temperatura no sólo tiene influencia en el tiempo requerido para completar el ciclo biológico, sino que afecta a cada una de las fases de desarrollo (Tabla 1).

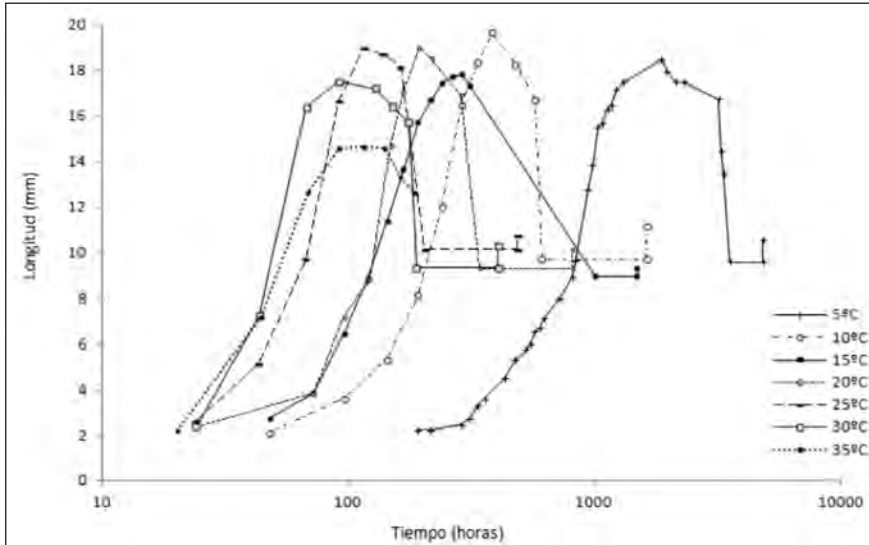


Figura II. Dimensiones de *Calliphora vicina* durante su desarrollo a diferentes temperaturas (Obsérvese que el tiempo, eje X, está ajustado a una escala logarítmica).

Tabla 1

Tiempo medio (en horas) acumulado que se requiere para alcanzar cada fase de desarrollo dentro de cada rango de temperatura. (H: huevo; L1: larva en fase I; L2: larva en fase II; L3: larva en fase III; P: pupa)

	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
H	96	48	50	24	24	24	20
L1	528	144	96	114	67	44	44
L2	888	240	137	161	92	68	68
L3	3552	612	1006	341	204	190	284
P	4824	1632	1490	816	489	407	-

Se observa como la duración de cada fase de desarrollo disminuye con el incremento de la temperatura, salvo excepciones. En la figura IV se resu-

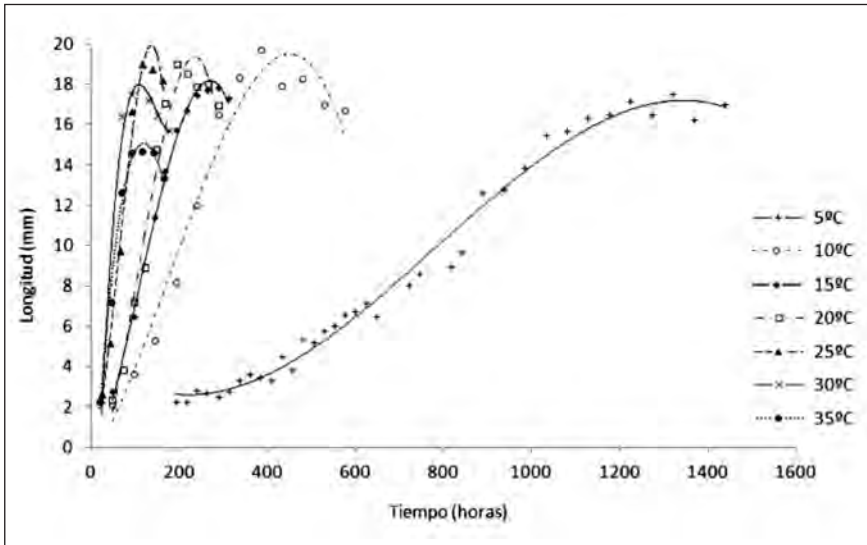


Figura III. Patrón de crecimiento larvario desde la emergencia de la fase L1 hasta el inicio de la migración de L3.

me el tiempo en horas que requiere cada fase dentro de los 6 rangos de temperatura analizados. En dicho gráfico se puede apreciar lo mencionado anteriormente; esto es, que con el incremento de la temperatura se requiere menos tiempo para completar el desarrollo. Cada fase larvaria estudiada sufre un acortamiento en su duración a medida que aumenta la temperatura ambiente, hasta alcanzar la temperatura de colapso a 35°C, momento en que las fases L2 y L3 aumentan el tiempo requerido para pasar a la siguiente fase, muriendo sin alcanzar la fase de pupa.

En la figura V se expresan porcentualmente estos mismos resultados apreciándose diferencias relativas en la duración de cada fase larvaria que no parecen tener una relación directa con la temperatura. Observamos que el porcentaje de tiempo requerido para cada fase con respecto al tiempo total de desarrollo es similar en todas las temperaturas, a excepción de 5°C y 15°C en las que la duración de la fase L3 es especialmente larga. Cabe esperar que otros factores ambientales no considerados en estudios previos de desarrollo, y que no han sido analizados en el presente estudio, pudieran estar influyendo en la duración de cada fase de desarrollo. Del mismo modo, esta fase es extremadamente larga a 35°C debido a la imposibilidad de las larvas L3 de pupar a tan altas temperaturas, falleciendo tras varios días en migración.

Como herramienta útil para la estimación del tiempo de desarrollo a temperaturas variables, presentamos el cálculo de los grados hora acumula-

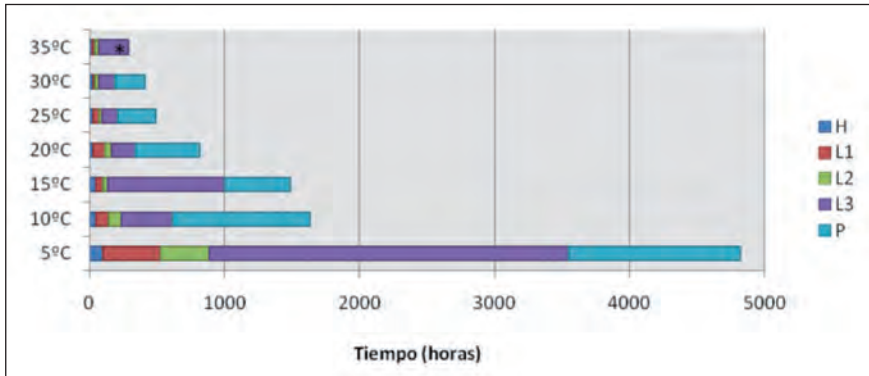


Figura IV. Duración de las diferentes fases de desarrollo para *Calliphora vicina* dentro de cada rango de temperatura en término de horas acumuladas. H: huevo; L1: larva en fase I; L2: larva en fase II; L3: larva en fase III; P: pupa.
* A 35°C *C. vicina* no pudo alcanzar la fase pupa.

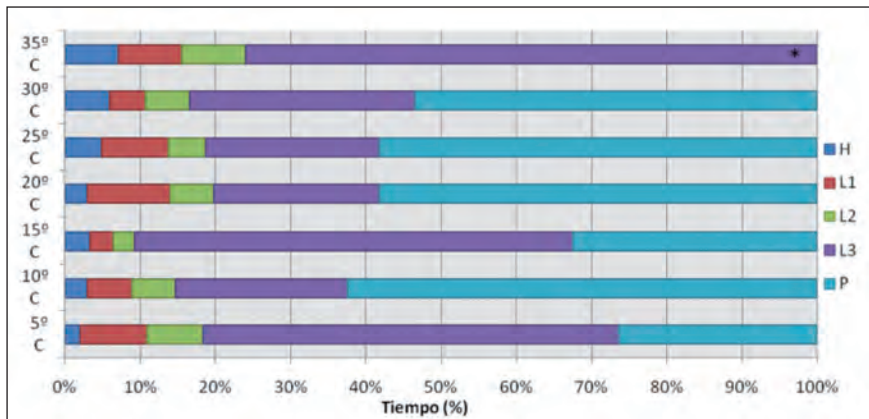


Figura V. Tiempo requerido para completar cada fase de desarrollo en los rangos de temperatura de cría ensayados. H: huevo; L1: larva en fase I; L2: larva en fase II; L3: larva en fase III; P: pupa.
* A 35°C *Calliphora vicina* no pudo alcanzar la fase pupa.

dos (AGH) sobre la base de la temperatura basal, temperatura más baja en la cual *C. vicina* no puede completar su desarrollo (33) obtenida en este estudio (5°C; AGH-B5), para cada fase y rango de temperatura estudiados (Tabla 2).

Tabla 2

Grados hora acumulados en base 5, AGH (-B5), para los rangos de temperatura ensayados.

H: huevo; L1: larva en fase I; L2: larva en fase II; L3: larva en fase III; P: pupa. A 35°C, *C. vicina* no pudo alcanzar la fase pupa falleciendo durante la fase migratoria (-).

GHA (-B5)	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
H	385	198	203	112	117	122	112
L1	2113	582	299	400	194	200	208
L2	3745	966	395	612	290	296	304
L3	14209	2455	4034	1381	839	784	1167
P	19297	6532	5972	3282	1977	1654	-

Se aprecia un descenso de los valores de AGH a medida que se incrementa la temperatura. A 35°C, las larvas sufren un colapso en su desarrollo, obteniéndose valores más elevados de AGH sin finalizar el desarrollo.

Finalmente, se presenta el diagrama isomegalo para nuestro estudio (Figura VI) que representa el tiempo de desarrollo requerido para alcanzar determinadas dimensiones frente a la temperatura. Cada línea agrupa a las larvas de idéntica longitud dentro de cada rango de temperatura testado (1). Se aprecian dos curvas de tendencia entre los rangos de 5-20°C y de 20-35°C que requerirán de ensayos experimentales repetidos en diferentes épocas del año. Es posible que nos encontremos ante factores ambientales no considerados habitualmente en los estudios de desarrollo y que requerirán de nuevas simulaciones controlando aspectos como la humedad, iluminación, ciclos luz:oscuridad (L:O), etc. Por último, se observa como los tiempos de desarrollo se dilatan a 35°C por encontrarnos por encima del umbral máximo de desarrollo.

De forma complementaria, el diagrama isomorfo agrupa las fases de desarrollo en función de la temperatura ambiente (Figura VII). Cada línea marca el momento en que tiene lugar el paso de una fase a la siguiente dentro de cada rango de temperatura (1). En consecuencia, las áreas entre las líneas representan los periodos correspondientes a cada fase morfológica de desarrollo. Este diagrama es especialmente útil en situaciones en que las estimaciones deben realizarse en ambientes estables, como puede ser el interior de una habitación.

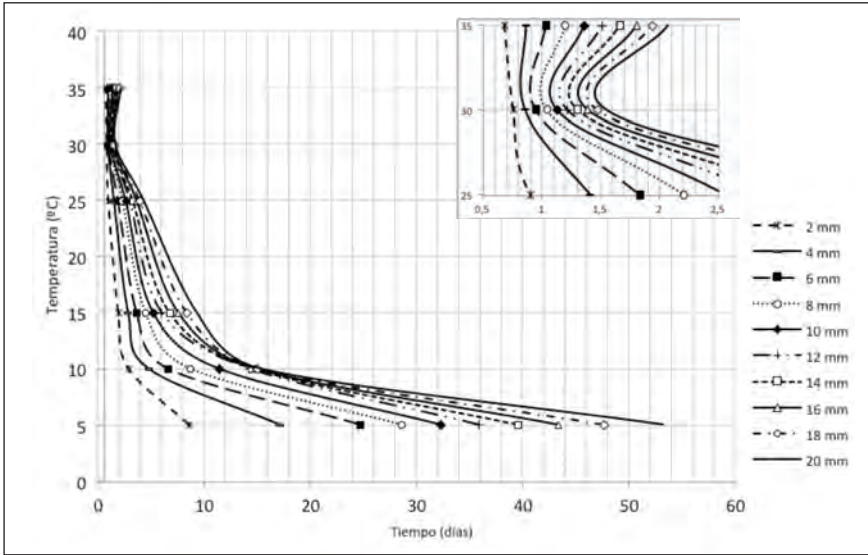


Figura VI. *Calliphora vicina*. Diagrama *isomegalo*; representación del tiempo, expresado en días, necesario para alcanzar una determinada longitud (mm: milímetros) dentro de cada rango de temperaturas ensayado (Obsérvese que el eje X está ajustado a una escala logarítmica).

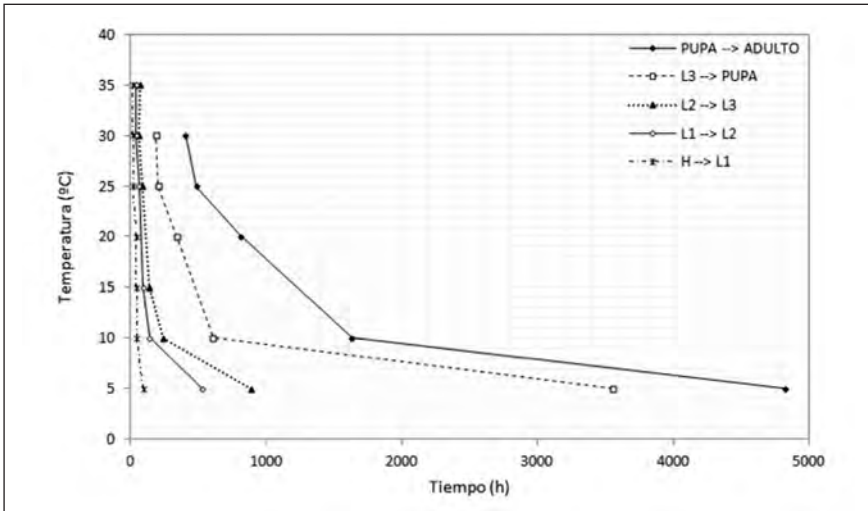


Figura VII. *Calliphora vicina*. Diagrama *Isomorfo*; representación del tiempo, expresado en horas, necesario para culminar el desarrollo de una determinada fase dentro de cada rango de temperaturas ensayado (H, huevo; L1, larva en fase 1; L2, larva en fase 2; L3, larva en fase 3).

IV. DISCUSIÓN

Tanto en el mundo animado como en el inanimado, el mantenimiento del orden frente a la tendencia natural al caos demanda energía. Los seres vivos obtenemos la energía necesaria para mantener nuestra compleja organización a partir de procesos metabólicos que permiten la rotura de enlaces químicos de moléculas complejas adquiridas durante la alimentación (34). Gracias a la energía obtenida, son posibles los procesos fisiológicos que permiten a todo ser vivo cubrir los gastos mínimos de mantenimiento y crecimiento, así como realizar los movimientos mecánicos básicos o poder alcanzar la madurez sexual y reproducirse con éxito.

La temperatura es un factor clave, dado que afecta directamente sobre estos procesos. Cambios térmicos en el entorno (tanto incremento como descenso) afectan a todos los niveles biológicos de los seres vivos: desde un nivel molecular, con la alteración de la membrana celular (variación de su fluidez) que afecta a las funciones celulares a nivel del organismo, con consecuencias sobre su metabolismo y otras funciones biológicas (35). Finalmente, todo esto implica que la cantidad de energía que se necesita para suplir los costes de mantenimiento del organismo (coste basal o mínimo) será variable en función de la temperatura ambiente, en especial en aquellos organismos que no son capaces de regular su temperatura corporal en sus procesos metabólicos (animales ectotérmicos).

De acuerdo con el modelo del gráfico (figura VIII), a bajas temperaturas tanto los costes basales del individuo como su demanda aeróbica son bajos, lo que provoca que no se obtenga oxígeno suficiente para generar cantidad suficiente de energía. Por ello, si la escasa energía que puede obtenerse es destinada a realizar movimientos mecánicos el metabolismo se ve ralentizado (36). Incluso se ha visto, como respuesta a temperaturas inferiores a 15°C, que las larvas de las especies *C. vicina* y *C. vomitoria* pueden entrar en estado de diapausa (7). No obstante, en nuestros estudios en laboratorio no se ha observado esta respuesta en *C. vicina*.

Por el contrario, a altas temperaturas el cuerpo metaboliza más rápido y desarrolla mayor poder metabólico. A estas temperaturas, el coste basal aumenta en extremo, así como la tasa de reacciones metabólicas, de tal manera que podemos encontrarnos ante una respuesta fisiológica similar a la detectada a bajas temperaturas; el organismo ralentiza su actividad para adaptarse al desajuste que suponen las situaciones ambientales extremas. Por ello, el óptimo fisiológico viene definido como el rango de temperaturas dentro del cual la eficacia metabólica del individuo es máxima.

Esto conlleva la necesidad de definir para cada especie el rango de temperaturas dentro del cual se encuentra su óptimo fisiológico, así como las temperaturas a partir de las cuales no puede continuar su desarrollo o lo lleva a cabo con extrema dificultad (Figura IX).

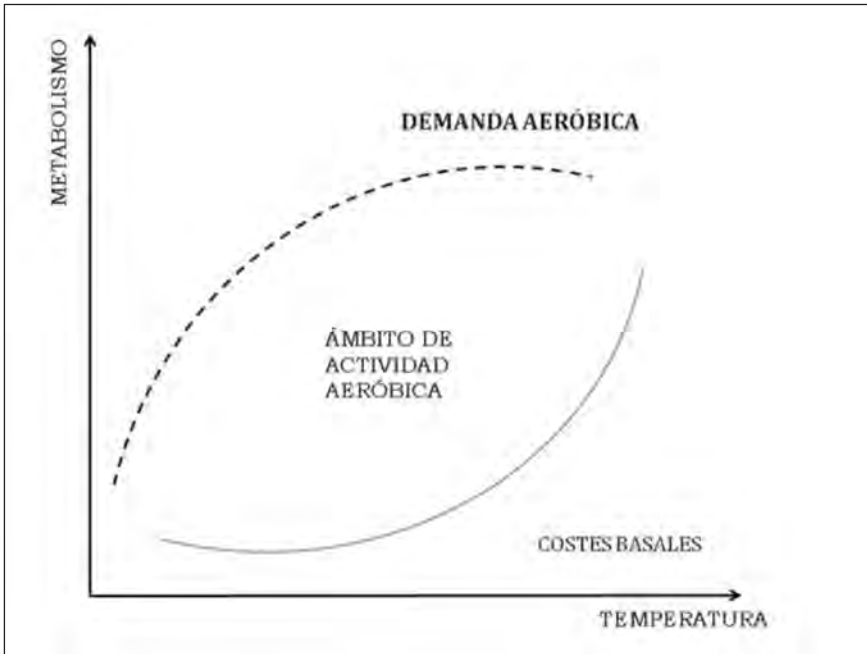


Figura VIII. Influencia de la temperatura sobre la pérdida de energía (coste basal) y su gasto (demanda aeróbica). La diferencia entre ambas curvas marca el exceso de energía que el organismo puede emplear para regular su respuesta mecánica y otras actividades biológicas (35).

Basados en los resultados de este estudio, el límite letal superior de temperatura para *C. vicina* deberá establecerse entre 31 y 34°C, valor por encima del cual esta especie no puede completar su desarrollo ni cerrar su ciclo biológico. Los resultados observados en nuestra región concuerdan con los obtenidos por Donovan *et al.* (38). Sin embargo, estudios previos llevados a cabo en otras regiones bioclimáticas indican la imposibilidad de *C. vicina* y *C. vomitoria* de completar su desarrollo a temperaturas iguales o superiores a 29°C (13) o inferiores a 16°C (4, 38). En nuestro caso demostramos la capacidad de la especie para completar su desarrollo entre 5 y 30°C, lo que nos confirma la existencia de diferencias biogeográficas que no deben ignorarse y que nos obligan a tratar con extrema prudencia datos procedentes de regiones alejadas del área geográfica de aplicación, por el riesgo de extraer conclusiones erróneas a partir de datos extrapolados. Así, el umbral mínimo de desarrollo muestra especiales discrepancias con resultados obtenidos previamente en el Norte de Europa, dado que no conseguimos cerrar el ciclo por debajo de 4°C mientras que Marchenko establece un lí-



Figura IX. Relación entre las áreas de tolerancia y resistencia de los organismos frente a cualquier factor ambiental (37).

mite basal de 2°C para Rusia (5), pero sí obtenemos resultados positivos a 5 y 10°C, valores en los que Reiter indica que *C. vicina* no puede completar su desarrollo en Austria (4, 37).

Aún más, en estudios realizados para otras especies de califóridos, se obtienen valores más elevados de temperatura referentes al límite letal superior de los aquí obtenidos para *C. vicina*. Es el caso de *Phormia regina*, cuyo límite letal superior se establece a 40°C (17); y *Lucilia illustris*, capaz de completar su desarrollo a 40°C, si bien la mayoría de los individuos murieron durante dicho estudio (14).

A tan altas temperaturas, las reacciones metabólicas se aceleran incrementándose la demanda biológica de oxígeno (DBO). Si la eficiencia res-

piratoria no puede satisfacer dichos niveles de DBO, el resultado final puede ser la muerte. Del mismo modo, se ve afectada la economía del agua, elemento fundamental en los procesos de termorregulación, que pueden derivar en la deshidratación y daños irreversibles que conduzcan al fallecimiento.

En el caso concreto de las larvas de dípteros, éstas requieren menos tiempo para completar su desarrollo cuando la temperatura es elevada (figura I). No obstante, la energía disponible para el crecimiento se ve limitada por su necesidad de satisfacer gastos metabólicos basales elevados, de tal manera que los individuos alcanzan tallas inferiores a las alcanzadas dentro de su rango óptimo de desarrollo (Figura II).

Del mismo modo, a bajas temperaturas los individuos ven ralentizados todos sus procesos, dando como resultado un menor input de energía. No obstante, dado que a esta temperatura los costes basales se realizan con un mínimo de energía, esto permite dedicar más energía al crecimiento pudiendo alcanzar tamaños superiores, en torno a 20 mm a 10°C. Sin embargo, a 5°C la eficiencia es tan baja que el bajo aprovechamiento metabólico afecta finalmente a su talla, alcanzando tamaños inferiores. Es probable que a tan bajas temperaturas el total de energía que son capaces de acumular no sea suficiente para satisfacer nada más que el consumo basal.

Entre ambas situaciones extremas, umbral máximo y mínimo de desarrollo, encontramos el rango óptimo de temperatura en nuestra región entre 20 y 30°C para *C. vicina*. Dentro de este rango, el tiempo requerido para el desarrollo disminuye gradualmente (Tabla 2) y el porcentaje de duración de cada fase (Figura V) permanece relativamente estable. No obstante, analizando la figura II puede acotarse el óptimo fisiológico al rango de 20 a 25°C, temperaturas para las cuales la especie *C. vicina* desarrolla individuos de longitud máxima en menor tiempo. A 15°C se observa mayor diferencia proporcional, entrando en lo que se conoce como zona de compensación parcial donde el desarrollo se ve afectado de forma significativa.

Siguiendo esta tendencia, deberíamos esperar que a 10°C las larvas fueran de menor tamaño que a temperaturas superiores, necesitando además más tiempo para finalizar el desarrollo; sin embargo, se observan larvas que alcanzan mayores dimensiones para el mismo tiempo de desarrollo. Una posible explicación para este fenómeno podría buscarse en la capacidad de aclimatación ecológica de las poblaciones animales. De hecho, los cultivos expuestos a 10°C corresponden a poblaciones invernales mientras que los expuestos a 15°C fueron recogidos en verano, lo que pudo suponer mayor dificultad de aclimatación de las segundas frente a las primeras y que derivara en una menor capacidad de desarrollo.

Comparando nuestros resultados para *C. vicina* con estudios previos (4, 5, 12, 27), observamos fuertes diferencias respecto al tiempo total requerido para cada fase de desarrollo a temperaturas de 15 y 20°C, dado que en

ambos casos obtenemos menores tiempos de desarrollo. Por este motivo debemos ser muy cautos a la hora de asumir que las constantes metabólicas puedan ser las mismas para todas las poblaciones de especies holárticas. Las diferencias biogeográficas pueden llevar netas diferencias en su desarrollo (26), por lo que deberán ser debidamente analizadas en futuros estudios comparativos.

Respecto a los valores de AGH calculados, podemos contrastar nuestros datos con los valores obtenidos a 20°C por Ames & Turner en el Reino Unido (7). En ambos estudios concluimos que a temperaturas más elevadas las larvas requieren menos tiempo de desarrollo y acumulan menor cantidad de energía metabólica expresada como AGH. Sin embargo, como indican Ames & Turner (7), los valores AGH y AGD pueden variar a determinada temperatura ambiente dentro del mismo género e incluso dentro de la misma especie. De acuerdo con estos investigadores y en concordancia con la hipótesis sobre la aclimatación ecológica, una respuesta a esta variabilidad podría ser consecuencia de las diferencias climatológicas de las zonas de estudio, las cuales influyen en la capacidad de aclimatación de las especies estudiadas.

En resumen, comparando los resultados obtenidos en este estudio con observaciones previas llevadas a cabo en diferentes regiones bioclimáticas, se confirma que a mayor temperatura ambiental menor es el tiempo de desarrollo para cada fase, lo que implica menor tiempo requerido para completar el desarrollo larvario (3, 12). Esta norma deja de cumplirse en situaciones extremas, donde el organismo sufre un colapso y puede ver frenado su desarrollo sin llegar a completar el ciclo, como se observa a 35°C en *C. vicina*. Las diferencias fenológicas observadas obligarán a contrastar estos resultados pioneros en la Península Ibérica con nuevas réplicas efectuadas en diferentes épocas del año, diferentes regiones de nuestra rica geografía peninsular, abarcando mayor número de poblaciones, de cara a elaborar modelos válidos para las diferentes comunidades autónomas. Por último, se confirma el riesgo que supone extrapolar resultados de otras regiones bigeográficas.

V. AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento a la inestimable ayuda prestada por Nerea Vacas y Javier Moneo durante el cuidado y mantenimiento de las colonias y de los cultivos, así como por su apoyo técnico durante el trabajo de laboratorio.

El estudio ha sido parcialmente financiado por la UPV/EHU (Vicerrectorado de Investigación) y por el Gobierno Vasco (Departamentos de Agricultura, y de Educación, Universidades e Investigación), dentro de sus programas de ayuda a la Investigación y de formación del personal investigador.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. GRASSBERGER M, REITER C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* development with special reference to the isomegalen and isomorphen diagram. *Forensic Science International* 2001, 120 (1-2): 32-36.
2. GRASSBERGER M, FLEISCHMANN W. The Biobag - A New Device for the Application of Medicinal Maggots. *Dermatology* 2002, 204 (4): 306.
3. BYRD JH, BUTLER JF. Effects of temperature on *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) development. *Journal of Medical Entomology* 1997, 34(3): 353-358.
4. REITER C. Zum Wachstumsverhalten der Maden der blauen Schmeissfliege *Calliphora vicina*. *Zeitschrift der Rechtsmedizin* 1984, 91: 295-308.
5. MARCHENKO MI. Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. *Forensic Science International* 2001, 120:89-109.
6. ABBOTT CE. The Effect of Temperature and Relative Humidity upon the Olfactory Responses of Blowflies. *Psyche* 1932, 39 (4): 145-149.
7. AMES C, TURNER B. Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. *The Royal Entomological Society* 2003, 17: 178-186.
8. FAUCHERRE J, CHERIX D, WYSS C. Behaviour of *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) Under Extreme Conditions. *Journal of Insect Behavior* 1999, 12 (5): 687-690.
9. WALL RS, FRENCH N, MORGAN KL. Effects of temperature on the development and abundance of the sheep blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research* 1992, 82: 125-131.
10. TAYLOR LR. Analysis of the Effect of Temperature on Insects in Flight. *The Journal of Animal Ecology* 1963, 32 (1): 99-117.
11. ALLEN JC. A Modified Sine Wave Method for Calculating Degree Days. *Environmental Entomology* 1976, 53: 388-396.
12. ANDERSON GS. Minimum and Maximum Developmental Rates of Some Forensically Important Calliphoridae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences* 1999, 45 (4): 824-832.
13. GREENBERG B., TANTAWI TI. Different Developmental Strategies in Two Boreal Blow Flies (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 1993, 30 (2): 481-484.
14. HANSKI I. Assimilation by *Lucilia illustris* (Diptera) larvae in constant and changing temperatures. *Oikos* 1976, 27 (2): 288-299.
15. WELLS JD, KURAHASHI H. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) development: Rate, variation and the implications for forensic entomology. *Japanese Journal of Sanitary Zoology* 1994, 45: 6.
16. GRASSBERGER M, REITER C. Effects of Temperature on Development of *Lyo-pygia* (= *Sarcophaga*) *argyrostoma* (Robineau-Desvoidy). *Journal of Forensic Sciences* 2002, 47 (6): 1332-1336.

17. BYRD J, ALLEN JC. The development of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigen). *Forensic Science International* 2001, 120 (1-2): 79-88.
18. DAWSON R, HILLEN K, WHITWORTH TL. Effects of experimental variation in temperature on larval densities of parasitic *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae) in nest of tree swallows (Passeriformes: Hirundinidae). *Environmental Entomology* 2005, 34 (3): 563-568.
19. BYRD JH, BUTLER JF. Effects of temperature on *Sarcophaga haemorrhoidalis* (Diptera: Sarcophagidae) development. *Journal of Medical Entomology* 1998, 35 (5): 694-698.
20. FLETCHER MG, AXTELL RC, STINNER RE. Longevity and fecundity of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) as a function of temperature. *Journal of Medical Entomology* 1990, 27 (5): 922-926.
21. DADOUR IR, COOK DF, WIRTH N. Rate of development of *Hydrotaea rostrata* under summer and winter (cyclic and constant) temperature regimes. *Medical and Veterinary Entomology* 2001, 15 (2): 177-182.
22. DISNEY RHL. Duration of development of two species of carrion-breeding scuttle flies and forensic implications. *Medical and Veterinary Entomology* 2005, 19 (2): 229-235.
23. DAVIDSON J. On the Relationship between temperature and rate of development of insects at constant temperature. *Journal Animal Ecology* 1944, 13: 26-38.
24. GRASSBERGER M, FRANK C. Temperature-related development of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* as forensic indicator. *Medical and Veterinary Entomology* 2003, 17 (3): 257-262.
25. RICHARDSON MS, GOFF ML. Effects of Temperature and Intraspecific interaction on the Development of *Dermestes maculatus*. *Journal of Medical Entomology* 2001, 38 (3): 347-351.
26. GRASSBERGER M, REITER C. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International* 2002, 128: 177-182.
27. ARCHER MS. Annual variation in arrival and departure times of carrion insects at carcasses: implications for succession studies in forensic entomology. *Australian Journal of Zoology* 2003, 51 (6): 569-576.
28. GOFF ML, OMORI AI, GOODBROD JR. Effect of Cocaine in Tissues of the Development Rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Medical Entomology* 1989, 26 (2): 91-93.
29. GOFF ML, BROWN WA, HEWADIKARAM KA, OMORI AI. Preliminary observations on the effects of Methamphetamine in Decomposing Tissues on the Development Rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera, Sarcophagidae) and Implications of this Effect on the Estimations of Postmortem intervals. *American Society for Testing and Materials* 1991, 36 (2): 537-542.
30. SALOÑA BORDAS MI, MONEO PELLITERO J, DÍAZ MARTÍN B. Fenología de Calífidos (Diptera, Calliphoridae) en la Comunidad Autónoma del País Vasco (C.A.P.V.) *Ciencia Forense* 2009/2010, 9-10: 93-104.

31. HWANG C, TURNER BD. Spatial and temporal variability of necrophagous Diptera from urban to rural areas. *Medical and Veterinary Entomology* 2005, 19: 379-391.
32. 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.
33. NIEDEREGGER S, PASTUSCHEK 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.
34. HILL RW. *Fisiología Animal Comparada: un enfoque ambiental*. Reverté, Barcelona, España, 1980.
35. WILLMER PG, STONE GN, JOHNSTON IA. *Environmental physiology of animals*. 2ª ed. Blackwell Science, Oxford, U.K. 2005.
36. MYKOWIAK JB, DOUMS C. Effects of refrigeration on the biometry and development of *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae) and its consequences in estimating post-mortem interval in forensic investigations. *Forensic Science International* 2002, 125 (1-2): 254-261.
37. BOTELLO AV, RENDÓN VON OSTEN J, GOLD-BOUCHOT G, AGRAZ-HERNÁNDEZ C. *Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental. Diagnóstico y Tendencias*. 2ª Edición. 2005.
38. 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 (1): 106-114.