

二种尸食性蝇类幼虫形态学变化及在法医学上的意义

赵博^{1*} 王贺¹ 王玲² 王卫杰¹ 李泽民^{1**}

(1 河北医科大学病原生物学教研室 石家庄 050017; 2 河北医科大学第四医院科研中心 石家庄 050051)

Chronometrically morphological change of larvae of two species of necrophagous flies and its implication in forensic medicine. ZHAO Bo^{1*}, WANG He¹, WANG Ling², WANG Wei-Jie¹, LI Ze-Min^{1**}

(1. Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Research Center of the Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract In order to satisfy the need of deducing postmortem interval (PMI) through the larval age, anterior spiracle, posterior spiracle and cephalopharyngeal skeleton of *Aldrichina grahami* (Aldrich) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius) larvae were investigated to select the indexes suitable for deducing larval age through digital image combined with the morphology surveying. The results showed these structures regularly changed with larval daily growth. The indexes, including the sclerotized area of pharyngeal sclerite, the average optical density of pharyngeal sclerite and the posterior spiracle, could be used as the ideal markers of larval age. It could provide some scientific evidences for deducing the PMI exactly.

Key words forensic entomology, *Aldrichina grahami*, *Chrysomya megacephala*, postmortem interval (PMI), cephalopharyngeal skeleton, spiracle

摘 要 为了满足实际工作中利用蝇类幼虫日龄推断尸体死后间隔时间的需求,采用形态观察与图像分析相结合的方法对巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami* (Aldrich)、大头金蝇 *Chrysomya megacephala* (Fabricius) 幼虫前气门、后气门、头咽骨进行了研究,筛选适合日龄推断的指标。结果显示:2种尸食性蝇类幼虫前气门、后气门、头咽骨均随着时间的延长发生规律性的变化。其中,咽骨的骨化面积、平均光密度,后气门的平均光密度是最理想的判断幼虫日龄的指标,为法医昆虫学精确推断死后间隔时间提供重要的指导意义。

关键词 法医昆虫学, 巨尾阿丽蝇, 大头金蝇, 死后间隔时间, 头咽骨, 气门

法医昆虫学是应用昆虫学及其他自然科学的理论与技术,研究并解决司法实践中有关昆虫问题的一门学科^[1]。法医昆虫学在死后间隔时间(postmortem interval, PMI)的推断上体现出无可比拟的优越性,尸食性蝇类因具以腐败动物物质为孳生物的特殊生活习性,常用来推测凶杀案或无名尸案的PMI,为案件侦破提供有利线索^[2,3]。

以往研究发现头咽骨的长度变化与幼虫体长体重的变化规律相同,不仅可以反映幼虫的生长变化,而且稳定性好,气门是蝇类幼虫的呼吸器官,可作为死亡时间推断指标。丁军颖^[4]

研究大头金蝇 *Aldrichina grahami* (Aldrich) 幼虫头咽骨、体表棘刺等特征结构的生长发育变化,随着时间的延长,发现头咽骨几丁质化程度逐渐增强,几丁质化范围逐渐增大。此后,王玲等^[5,6]研究肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis* 幼虫气门、头咽骨,并指出咽骨的骨化面积和平均光密度是推断生长发育时间量化很好的指标。这些研究都为应用蝇类幼虫的生

* E-mail: zhaobo19830602@sina.com.cn

** 通讯作者, E-mail: lizemin1955@sohu.com.cn

收稿日期: 2009-04-20, 修回日期: 2009-06-12

长发育推断 PMI 提供了理论依据。

本研究选取的巨尾阿丽蝇 *Chrysomya megacephala* (Fabricius)、大头金蝇分布十分广泛,属于法医昆虫学侦破案件中应用最多的蝇种。作者选取其幼虫体表的气门和头咽骨作为研究对象,采用形态观察与图像分析相结合的方法筛选适合日龄推断的指标,为法医昆虫学中根据幼虫生长发育情况精确推断死后间隔时间提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 成蝇的采集和饲养

巨尾阿丽蝇、大头金蝇采自河北医科大学校园。蝇种鉴定按照《中国蝇类检索表》^[1] 系统进行分类。将成蝇置于养蝇笼内,饲以清水、奶粉、糖(奶粉:糖=1:1)。养蝇笼置于生化培养箱内,温度分别设为 20、24 和 28℃,湿度为 65%,光周期为 L:D=12:12。待其性成熟后,用瘦猪肉诱成蝇产卵,连续饲养 3 代后开始实验。将产出时间相差不超过 30 min 的卵块移入小烧杯内,饲以瘦猪肉,保持 1 只幼虫 2 g 猪肉的比例。从幼虫孵化后 12 h 开始,每 12 h 留取 1 次标本,每组每次留取 10 只直至 50% 以上幼虫化蛹为止,将所取幼虫保存于 70% 的甘油酒精中待镜检观察。

1.2 方法

1.2.1 解剖观察 将幼虫标本放于盛有 70% 的酒精的培养皿中,在体视显微镜(OLYMPUS SZX9)下利用解剖剪、手术刀分离出幼虫的头节至其后 2 个胸节部分(供前气门、头咽骨标本制作)和第 8 腹节之后的部分(供后气门标本制作)作为研究对象。不同部位标本收集后通过 10% 的 KOH 消化后乙醇梯度脱水加拿大树脂制成标本封片,在光学显微镜(OLYMPUS BX-61)下观察、拍照。

1.2.2 标本的观察与形态特征的提取 利用计算机图像分析系统(Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统)对不同日龄幼虫的图像进行处理和特征提取。首先利用图像分析系统对图像进行预处理,通过在显示器上交互式操作由该

系统对前气门、后气门、头咽骨的口钩及咽骨的多项指标进行定量测定。为使图像可以进行精确的量化经过预实验选择图像阈值范围,气门平均光密度、头咽骨面积和平均光密度阈值范围设定为 0~170,头咽骨骨化面积阈值范围设定为 0~130。

1.3 数据分析

各组前气门、后气门、头咽骨有关的各项形态学指标均采用均数±标准差表示,分析结果由 SPSS13.0 软件处理得出,应用 Excel 程序作图。

2 结果与分析

2.1 不同温度下 2 种幼虫的形态观察

2.1.1 巨尾阿丽蝇幼虫形态学变化 1 龄幼虫:头咽骨较小,口钩细长,呈“7”形。下口骨细长,呈杆状,背腹角等长。无前气门,后气门只 1 裂,无气门环。

2 龄幼虫:头咽骨增大,棕黄色,可见侧口骨,点状的齿骨,小杆状的附口骨,咽骨腹角长与背角长之比为 1:1.5,腹角窗与背角窗出现。前气门 7~10 个指状突,呈一排。前气门色素管部细长,呈淡黄色。后气门呈开放的环形,淡褐色,具 2 裂,(图版 I:1,3,6,8)。

3 龄幼虫:头咽骨进一步增大,黑褐色,几丁质化范围逐渐增大,其长度和面积均达到最大值,口钩基部变短,呈长方形,端部弯曲,端部长度为基底部的 1.5 倍。下口骨粗大,呈“H”形,侧口骨粗大,腹角长与背角长之比为 1:2,腹角窗及背角窗狭长。齿骨增大,呈不规则三角形。附口骨增大、增粗,呈一端粗的长三角形,横于口钩钩部。前气门孔突数目与 2 龄幼虫相同,色素管部变短、增粗,随着时间的延长颜色逐渐加深。后气门为 1 孔 3 裂,较 2 龄期明显增大,横径约 0.3 mm,气门环狭,呈棕色,钮部色淡(图版 I:2,4,5,7,9,10)。

2.1.2 大头金蝇幼虫形态学变化 1 龄幼虫:头咽骨较小,浅黄色,几丁质化程度低;口钩细长,钩部呈“7”形,基部狭长,细杆状,无齿骨和附口骨;咽骨腹角等于或短于背角。无前气门,后气门只 1 裂,无气门环。

2 龄幼虫:头咽骨明显增大,呈不规则的“H”形,棕黄色,可见到细长的侧口骨,点状的齿骨,未见附口骨,并出现腹角窗与背角窗;口钩增大,钩部呈“C”形,基部变宽;咽骨背角略长于腹角。前气门 10~14 个指状突,其色素管部细长,呈淡黄色。后气门 2 裂,2 龄初期多无气门环,若有则只有外缘和内缘的部分可以看见;2 龄后期气门环在腹缘开口(图版I:11,13,16,18)。

3 龄幼虫:头咽骨长度接近最大值,出现点状的附口骨,几丁质化范围显著增大,黑褐色;口钩钩部弯曲程度小,呈倒“L”形,基部宽短,呈矩形;齿骨明显增大,侧口骨也变得粗大;下口骨梯形,腹面有方突。咽骨的背角与腹角宽度略等,背角长约为腹角的 2 倍。前气门孔突数目与 2 龄幼虫相同,色素管部变短、增粗,随着时间的延长颜色逐渐加深。后气门 3 裂,较大,其间距明显小于其横径,后气门下方有 1 对卵圆形凹陷区,见(图版I:12,14,15,17,19,20)。

2.2 不同温度下幼虫前气门平均光密度的变化

1 龄幼虫没有前气门,故 2 龄巨尾阿丽蝇 20~28℃ 各组实验记录开始时间分别于 60、36 和 24 h,3 龄实验记录开始时间为 108、84 和 48 h;2 龄大头金蝇 20~28℃ 各组实验记录开始时间分别于 48、36 和 24 h,3 龄实验记录开始时间为 84、72 和 48 h。结果发现,2 龄初期 20~28℃ 各组幼虫前气门色素管部平均光密度最小,随时间的延长数值呈持续性增加趋势。进入 3 龄后,各组平均光密度值增长速度较 2 龄期略有减慢,3 龄结束时各组数值均达到最大值(图 1,2)。

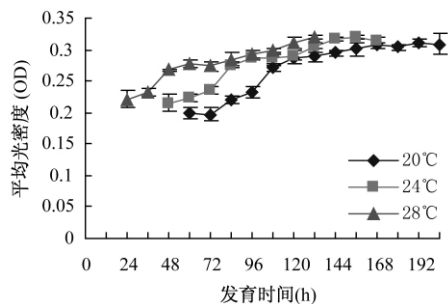


图 1 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫前气门色素管部平均光密度的生长曲线

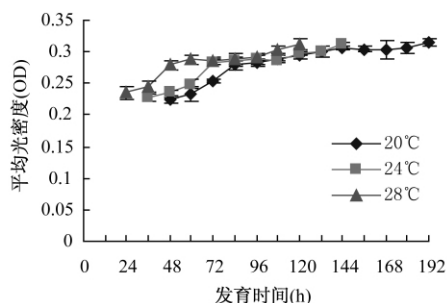


图 2 不同温度下大头金蝇幼虫前气门色素管部平均光密度的生长曲线

2.3 不同温度下幼虫后气门平均光密度的变化

在恒温条件下,后气门平均光密度与其前气门色素管部平均光密度的变化趋势一致,均随着温度的升高呈持续性增长至 3 龄末。然而该指标在幼虫各个龄期内增长幅度较大,龄期间更替时变化平缓,比色素管部平均光密度更适宜进行幼虫日龄的推断(图 3,4)。

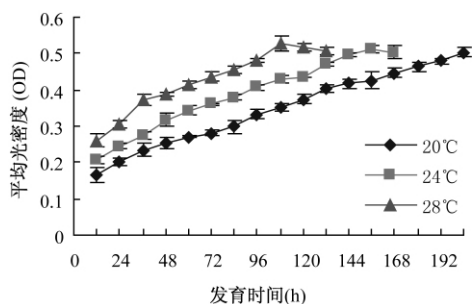


图 3 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫后气门平均光密度的生长曲线

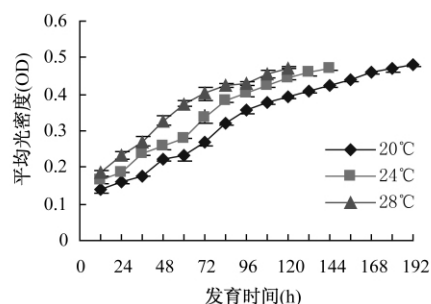


图 4 不同温度下大头金蝇幼虫后气门平均光密度的生长曲线

2.4 不同温度下幼虫口钩形态指征的变化

2.4.1 口钩面积的变化 在恒温条件下,幼虫

口钩的面积随时间的延长而呈阶段性增加,在每个龄期内生长速度平稳、变化不明显,龄期更替时面积变化显著。达到最大值后,进入平台

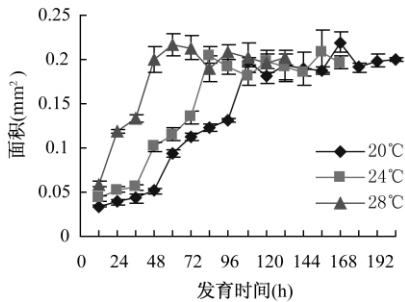


图 5 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫口钩面积的生长曲线

2.4.2 口钩骨化面积的变化 在恒温条件下,2 种幼虫口钩的骨化面积在 1、2 龄期内随时间的延长而增加,进入 3 龄达到最大值后,进入平台期。在不同温度下,口钩骨化面积的发育速率随温度升高而加快。与口钩面积相比,2 种幼虫

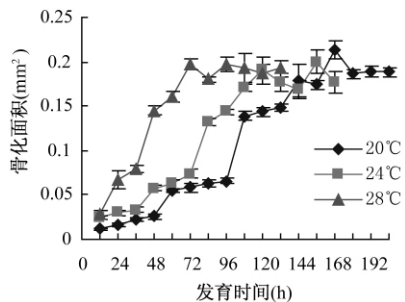


图 7 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫口钩骨化面积的生长曲线

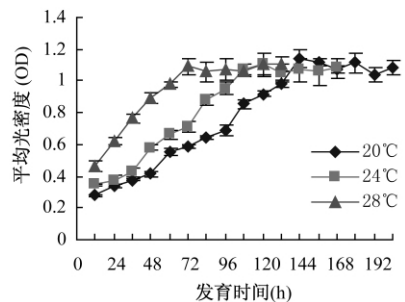


图 9 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫口钩平均光密度的生长曲线

期。在供试的 3 个温度下,2 种幼虫的口钩面积的发育速率都会随温度升高而加快,温度越高达到最大值的时间越短(图 5,6)。

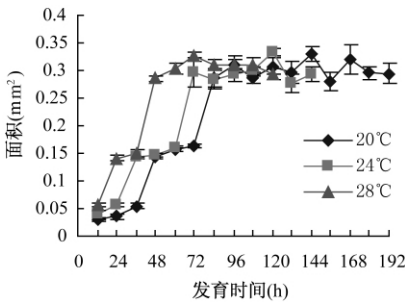


图 6 不同温度下大头金蝇幼虫口钩面积的生长曲线

骨化面积达到最大值的时间明显延迟(图 7,8)。2.4.3 口钩平均光密度的变化 在恒温条件下,2 种幼虫口钩平均光密度随时间的延长而持续性增加,龄期更迭时变化显著,达到最大值后曲线进入平台期(图 9,10)。

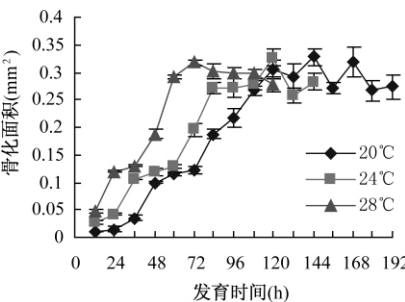


图 8 不同温度下大头金蝇幼虫口钩骨化面积的生长曲线

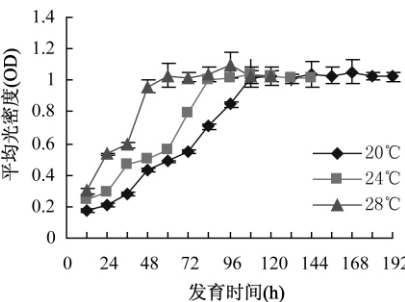


图 10 不同温度下大头金蝇幼虫口钩平均光密度的生长曲线

2.5 不同温度下幼虫咽骨形态指征的变化

2.5.1 咽骨面积的变化 在恒温条件下,2种幼虫咽骨面积的变化规律与口钩面积变化趋势相同。在1、2龄期内不断增大,且龄期更替时

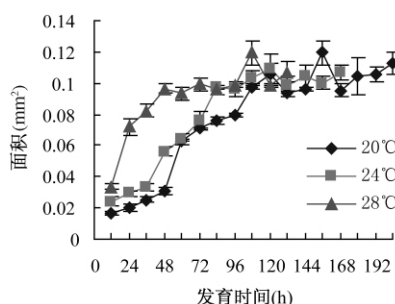


图 11 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫咽骨面积的生长曲线

2.5.2 咽骨骨化面积的变化 在恒温条件下,2种幼虫随时间的延长20~28℃各组幼虫咽骨骨化面积呈现持续性增加的趋势,并一直持续到3龄结束。该曲线在龄期间较咽骨面积曲线过渡平稳,是推测 PMI 的理想指标。咽骨骨化

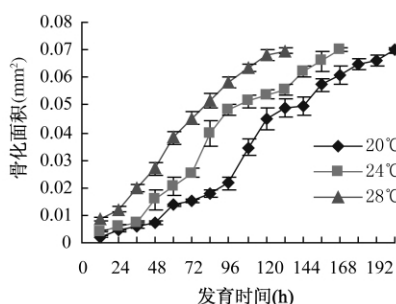


图 13 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫咽骨骨化面积的生长曲线

2.5.3 咽骨平均光密度的变化

在恒温条件下,咽骨平均光密度的变化趋势与咽骨骨化面积的变化趋势相同,数值随温度升高呈持续性增加至3龄结束。达到最大平均光密度的时间与咽骨骨化面积达到最大值时间一致(图15,16)。

3 讨论

法医昆虫学作为现代侦查破案重要手段,已得到了法医界的广泛认可和重视,在凶杀案

变化显著,进入3龄达到最大值后,进入平台期,在各个观察点高温组增长速度明显快于低温组(图11,12)。

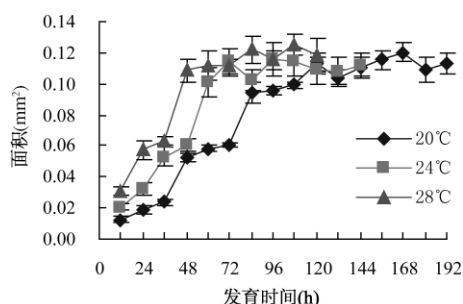


图 12 不同温度下大头金蝇幼虫咽骨面积的生长曲线

面积的发育速率随温度升高而加快,温度越高、3龄期越短,达到最大骨化面积的时间就越短。与咽骨面积相比,2种幼虫骨化面积达到最大值的时间明显延迟(图13,14)。

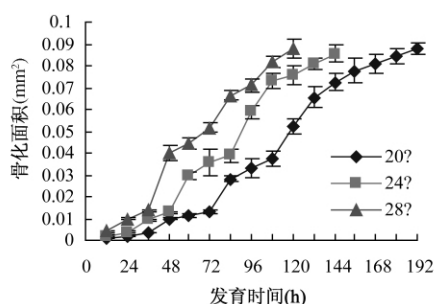


图 14 不同温度下大头金蝇幼虫咽骨骨化面积的生长曲线

或无名尸案的侦破工作中,正确判断死亡时间是尸检工作的重要任务之一。死亡时间一般通过死后间隔时间(PMI)来确定,正确估计死后间隔时间是刑事案件侦破工作的关键。双翅目的丽蝇往往是首先发现并到达尸体即产卵在尸体上,所以测定尸体上蝇类幼虫发育龄期就可以推断死后间隔时间。

杨慧霞^[8]曾对巨尾阿丽蝇和肥须亚麻蝇2种蝇类幼虫头咽骨各部位的长度进行过分析。李艳宇^[9]对丝光绿蝇幼虫气门、体表棘刺、头

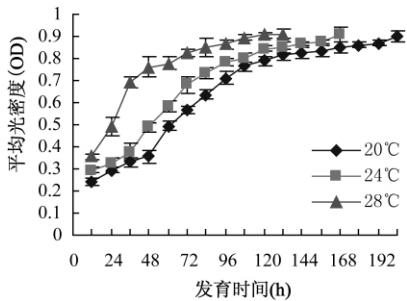


图 15 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫咽骨平均光密度的生长曲线

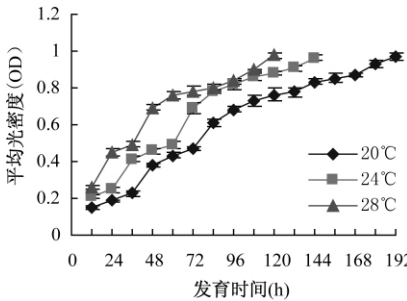


图 16 不同温度下大头金蝇幼虫咽骨平均光密度的生长曲线

咽骨各部位进行分析测量。这些研究表明幼虫气门、头咽骨形态学变化是判断龄期和分类的重要特征,而且他们变化与幼虫体长体重的变化规律相同,不仅可以反映幼虫的生长变化,而且稳定性好,故本次试验选用幼虫气门、头咽骨作为形态学研究对象,筛选判断幼虫生长发育历期的适宜指标,不仅可以指导 PMI 的推测,而且为法医昆虫学研究提供理论基础。

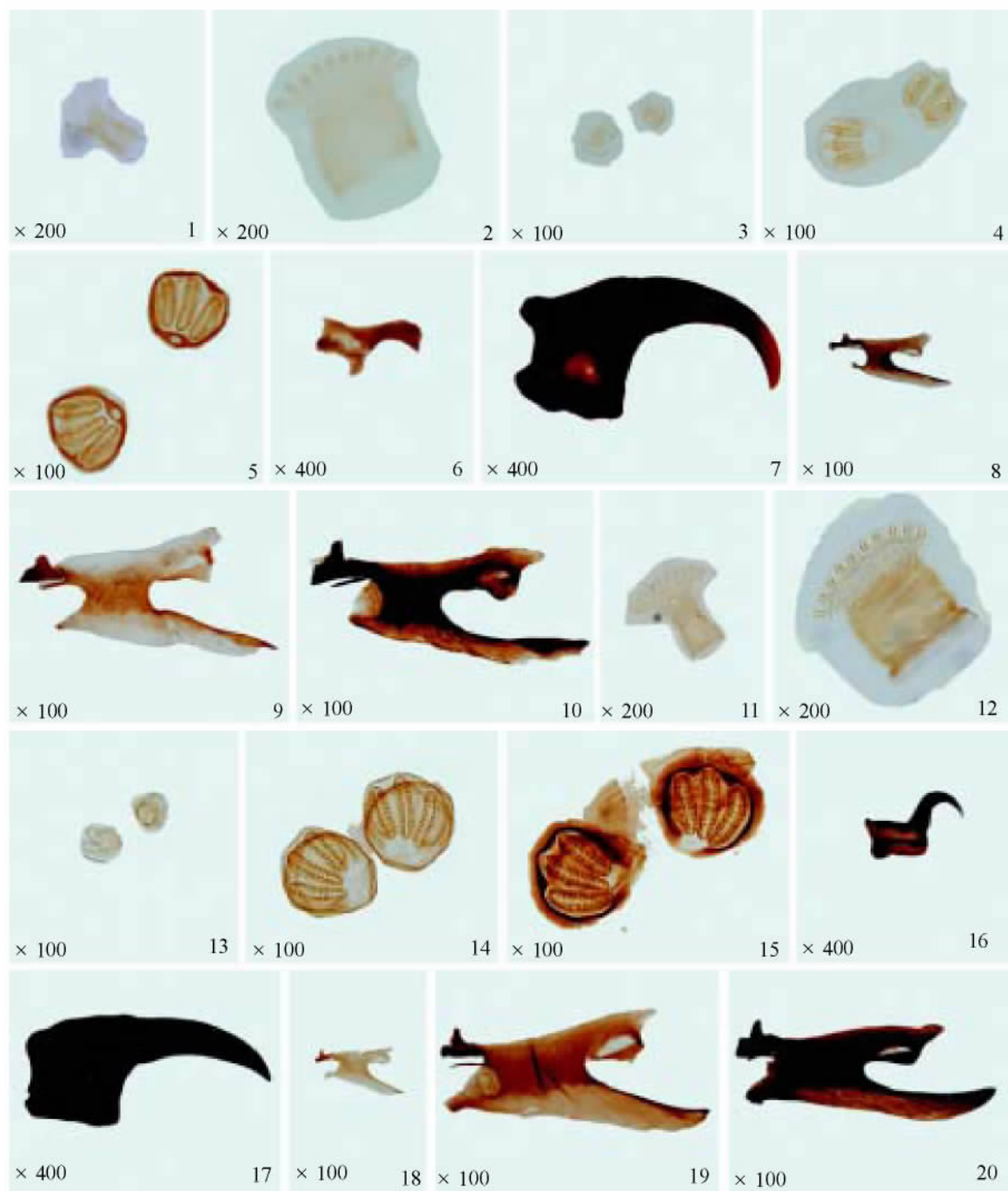
气门是蝇类幼虫的呼吸器官,主要作用是控制气体的出入和限制水分的过度蒸发。前气门于 2 龄期出现,随着龄期的更迭,颜色由淡黄色逐渐加深,色素管部由细长逐渐变短、增粗。后气门位于幼虫第 8 腹节的后表面,有 1 裂、2 裂、3 裂的明显变化,再加上气门环的有无、完整与否,颜色深浅、线条粗细等变化,可找到其明显的规律性。徐世锬等^[6]人曾对大头金蝇、家蝇等幼虫的后气门进行了光镜和扫描电镜的观察比较。基于这些特点,本试验对其幼虫前气门和后气门的平均光密度进行了测定。结果发现:前气门平均光密度与其后气门色素管部平均光密度的变化趋势一致,均随时间的延长呈持续性增长至 3 龄末。后气门平均光密度在各组幼虫龄期内增长速度较大,在龄期间增长速度平缓,比前气门色素管部平均光密度更适宜于进行幼虫日龄的推测。

头咽骨是幼虫体内的骨性结构,稳定性好,不易受人为因素的干扰,能准确的反应幼虫发育情况,因而蝇类幼虫头咽骨指标的测定是更为准确的指标。通过图像分析口钩的 3 项指标

得出以下结果:口钩的面积、骨化面积和平均光密度随时间延长呈阶段性增加,且显著变化均发生在龄期更替的过程,此结果符合 Dyar 氏法则,这与王玲等研究的肥须亚麻蝇幼虫口钩变化结果相一致^[6]。研究发现,虽然口钩骨化面积及平均光密度达到最大值的时间较口钩面积达到最大值的时间晚,但也很快进入平台期,故只适合龄期推断,不能对日龄尤其是 3 龄内的日龄进行精确区分。幼虫咽骨的颜色在 3 个龄期内一直不断变化,这是寻找量化指标的前提。试验中作者通过在 3 个温度下的观察,咽骨的面积变化与口钩面积的变化趋势相似,进入 3 龄很快进入平台期,不适宜作为幼虫日龄判断的指标。但咽骨的平均光密度和骨化面积从 1 龄始至 3 龄末一直呈现持续性增长,仅就 3 龄期而言,变化幅度也很明显。因此这两项指标的变化曲线是较理想的日龄推断指标。

现仍存在问题有待进一步研究解决:
① 头咽骨是幼虫体内的骨性结构,其稳定性好,但虫体仍然存在个体差异,所以在案件侦破实际应用中还有待进一步研究;
② 应用图像分析技术对图像形态指标进行量化,消除了主观因素的影响,但是没有研究确定所选区域颜色阈值的范围,所以本试验通过预试验选择了合适的阈值范围,可以更准确的对图像进行测量,减少误差,如能进一步通过数学方法推导出公式并进行曲线拟合,计算将更准确、客观;
③ 昆虫是冷血动物,其生长发育的速率主要取决于环境,其中起决定性作用的是温度,本试验是

图版 I



1. 巨尾阿丽蝇前气门(2龄) 2. 巨尾阿丽蝇前气门(3龄) 3. 巨尾阿丽蝇后气门(2龄) 4. 巨尾阿丽蝇后气门(3龄初)
 5. 巨尾阿丽蝇后气门(3龄末) 6. 巨尾阿丽蝇口钩(2龄) 7. 巨尾阿丽蝇口钩(3龄) 8. 巨尾阿丽蝇咽骨(2龄) 9. 巨尾阿丽蝇咽骨(3龄初) 10. 巨尾阿丽蝇咽骨(3龄末) 11. 大头金蝇前气门(2龄) 12. 大头金蝇前气门(3龄) 13. 大头金蝇后气门(2龄) 14. 大头金蝇后气门(3龄初) 15. 大头金蝇后气门(3龄末) 16. 大头金蝇口钩(2龄) 17. 大头金蝇口钩(3龄) 18. 大头金蝇咽骨(2龄) 19. 大头金蝇咽骨(3龄初) 20. 大头金蝇咽骨(3龄末)

在可控条件下即恒温下进行的,但自然界环境千变万化,一天的温度是不会是恒定不变的,因此需要综合性考虑全面分析,才能提高 PMI 预测的准确性。

参 考 文 献

- 1 胡萃. 法医昆虫学. 重庆:重庆出版社,2000. 2 ~ 3.
- 2 Amendt J., Krettek R., Zehner R. Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, 2004, **91**(2): 51 ~ 65.
- 3 Turchetto M., Vanin S. Forensic entomology and globalization. *Parassitologia*, 2004, **46**(1 ~ 2): 187 ~ 190.
- 4 丁军颖. 温度对大头金蝇幼虫发育的影响及其法医学意义. 学位论文. 石家庄:河北医科大学基础医学院, 2003.
- 5 王玲, 刘彬, 王贺, 等. 肥须亚麻蝇幼虫不同发育阶段气门形态学变化. 昆虫学报, 2008, **51**(7): 707 ~ 713.
- 6 王玲, 刘彬, 李泽民. 肥须亚麻蝇幼虫头咽骨形态学分析及其法医学意义. 昆虫知识, 2008, **45**(1): 133 ~ 137.
- 7 范滋德. 中国常见蝇类检索表. 北京:北京科学出版社, 第 2 版, 1992. 829.
- 8 杨慧霞. 温度对巨尾阿丽蝇和肥须亚麻蝇幼虫头咽骨发育的影响及其法医学意义. 学位论文. 石家庄:河北医科大学基础医学院, 2002.
- 9 李艳宇. 温度对丝光绿蝇幼虫生长发育的影响及其法医学意义. 学位论文. 石家庄:河北医科大学基础医学院, 2007.
- 10 徐世鐸, 陆秀君, 金立群. 蝇幼虫后气门结构的光镜和扫描电镜的对照研究. 寄生虫与医学昆虫学报, 1999, **6**(4): 227 ~ 232.