

文章编号: 1003-4692(2009)06-0534-04

【论著】

# 丝光绿蝇幼虫不同温度下的形态学变化及法医学意义

赵博<sup>1</sup>, 王玲<sup>2</sup>, 王贺<sup>1</sup>, 王卫杰<sup>1</sup>, 齐莉莉<sup>1</sup>, 李泽民<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 观察不同温度下丝光绿蝇幼虫形态学变化筛选日龄推断的指标。方法 在 20 ℃、24 ℃和 28 ℃下饲养丝光绿蝇, 瘦猪肉诱其产卵, 每隔 12 h 取样 1 次, 直至 50% 以上幼虫化蛹为止, 采用形态观察与图像分析相结合的方法对幼虫前气门、后气门、头咽骨进行观察研究。结果 丝光绿蝇幼虫前气门、后气门、头咽骨均随着时间的延长发生规律性变化, 幼虫后气门平均光密度、咽骨骨化面积及其平均光密度这 3 项指标是推断幼虫日龄较理想的指标。结论 在恒温条件下, 幼虫前气门、后气门、头咽骨均发生规律性变化, 为法医学中尸体死后间隔时间的精确推断提供了一定的理论依据。

**【关键词】** 法医昆虫学; 死后间隔时间; 丝光绿蝇; 头咽骨; 气门

中图分类号: R384.2

文献标识码: A

**Morphological changes of *Lucilia sericata* larvae and its significance in forensic medicine** ZHAO Bo\*, WANG Ling, WANG He, WANG Wei-jie, QI Li-li, LI Ze-min. \*Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Corresponding author: LI Ze-min, E-mail: lizemin1955@sohu.com

**【Abstract】 Objective** Survey the morphological changes of *Lucilia sericata* larvae at different temperature and screen out the indexes deducing larvae age. **Methods** The necrophagous fly *L. sericata* were reared at constant temperature of 20 ℃, 24 ℃ and 28 ℃ respectively and were tempted to lay eggs with lean pork. One Sample was taken at 12 h intervals till 50% of the larvae were in pupae stage. Then, the anterior spiracle, posterior spiracle and cephalopharyngeal skeleton were investigated through digital image processing combined with morphologic observation. **Results** The anterior spiracle, posterior spiracle and cephalopharyngeal skeleton regularly changed with daily larval growth. The three indexes including the sclerotizes area of pharyngeal sclerite, the average optical density of pharyngeal sclerite and the posterior spiracle could be used as the ideal indexes of larvae age. **Conclusion** The regular changes of the three sections at constant temperature would provide some scientific database for the exact deducing of the postmortem interval.

**【Key words】** Forensic entomology; Postmortem interval; *Lucilia sericata*; Cephalopharyngeal skeleton; Spiracle

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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。

目前, 关于幼虫日龄的推断成为研究的热点, 许多学者尝试从不同角度寻找推断日龄的新指标, 包括中肠前端空隙的有无, 嗉囊长度的变化, 体壁表皮成长层数的变化<sup>[3-5]</sup>, 糖类、脂类、蛋白质等生化指标的变化等<sup>[6,7]</sup>, 但这些指标的变化与时间的推移相关性不强, 在实际应用中有一定的限制。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, 而且稳定性较好, 气门是蝇类幼虫的呼吸器官, 可作为死亡时间推断指标。本研究选取丝光绿蝇 (*Lucilia sericata*) 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 PMI 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** 丝光绿蝇采自河北医科大学校园。蝇种鉴定按照《中国常见蝇类检索表》<sup>[8]</sup> 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 留取一次标本, 每组每次留取 10 只直至 50% 以上幼虫化蛹为止, 将所取

作者单位: 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

作者简介: 赵博 (1983-), 女, 河北邢台人, 硕士, 主要从事法医昆虫学研究。E-mail: zhaobo19830602@sina.com.cn

通信作者: 李泽民, E-mail: lizemin1955@sohu.com

幼虫保存于70%的甘油乙醇中待镜检观察。

1.2 方法

1.2.1 解剖观察 将幼虫标本放于盛有70%乙醇的培养皿中,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 $\bar{x} \pm s$ 表示,分析结果由SPSS 13.0软件处理得出,应用Excel软件程序做图。

2 结果与分析

2.1 丝光绿蝇幼虫形态学变化

1龄幼虫:头咽骨较小,呈“人”字形,浅黄色,几丁质化程度低,咽骨腹角等于或短于背角。无前气门,后气门仅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,口钩增大,腹角长度明显短于背角,此时头咽骨几丁质化程度显著增大,并可见到细长的侧口骨,点状

的齿骨;未见附口骨。前气门7~10个指状突,其色素管部细长,淡黄色。后气门1孔2裂气门环色浅有内突,尤其在中、外两气门裂间的内突呈角形向内延伸,见图1A、C、E、H。

3龄幼虫:头咽骨长度很快接近最大值,口钩一般显著地突出在头部锥突下方,口钩大,钩部的弯曲变小,基部变宽,钩部为基部长1.5~2倍;侧口骨粗大,下口骨梯形,侧口骨短于下口骨,在上面稍向背方弯曲。齿骨明显增大,呈波纹状;咽骨宽,腹角上缘扩展,咽骨背角和腹角的长度也不断增加,并且背角与腹角的长度比达到2:1,中部有狭亮区;背角上方尖锐,背堤狭。前气门孔突数目与2龄幼虫相同,色素管部长与宽大致相等,随着时间的延长颜色逐渐加深。后气门3裂,气门环完整,由浅棕色逐步加深为黑色,见图1B、D、F、G、J、K。

2.2 丝光绿蝇幼虫在不同温度下前气门形态指征的变化

2.2.1 前气门色素管部面积的变化 1龄幼虫没有前气门,丝光绿蝇20~28℃各组实验记录开始时间分别于48、36、24 h。结果发现,2龄初期各组前气门色素管部面积值均为最小,不同温度组均值间差异无统计学意义。随着时间的延长各组数值迅速增加,分别在3龄初期达到最大值,随后又迅速下降,进入平台期(图2A)。

2.2.2 前气门色素管部长宽比的变化 在恒温条件下,20~28℃各组幼虫前气门色素管部长宽比随着时间的延长呈持续性下降趋势。2龄初期各组值均为最大,但随着时间的延长数值呈持续性下降趋势。进入3龄后,各组前气门色素管部长宽比值较2龄期下降的速度略有减慢(图2B)。

2.2.3 前气门色素管部平均光密度的变化 在恒温条件下,2龄初期20~28℃各组幼虫前气门色素管部平均光密度最小,但随着时间的延长数值呈持续性增加趋

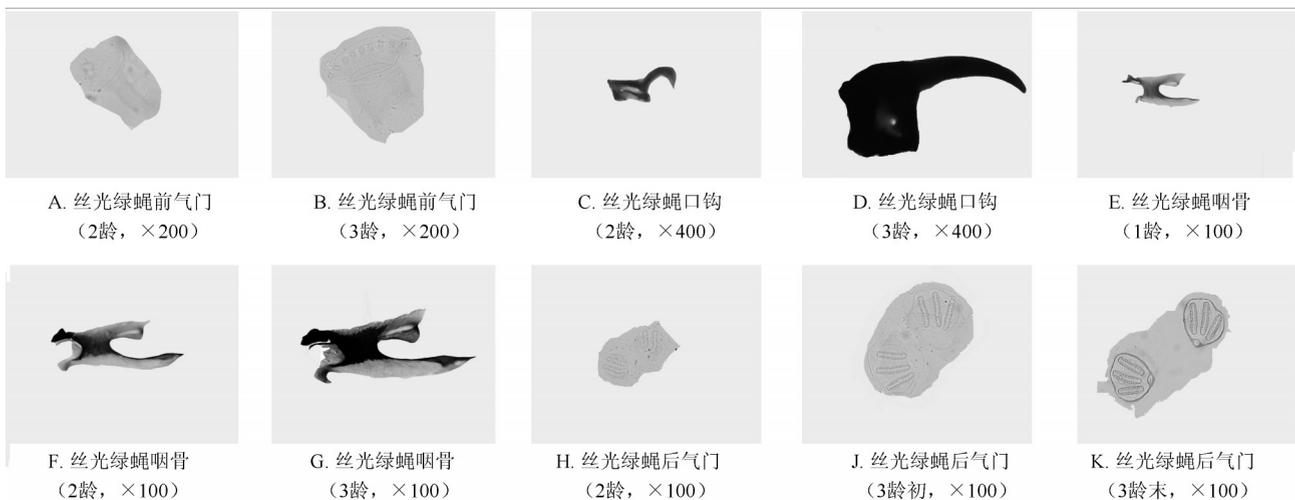


图1 丝光绿蝇的形态学变化

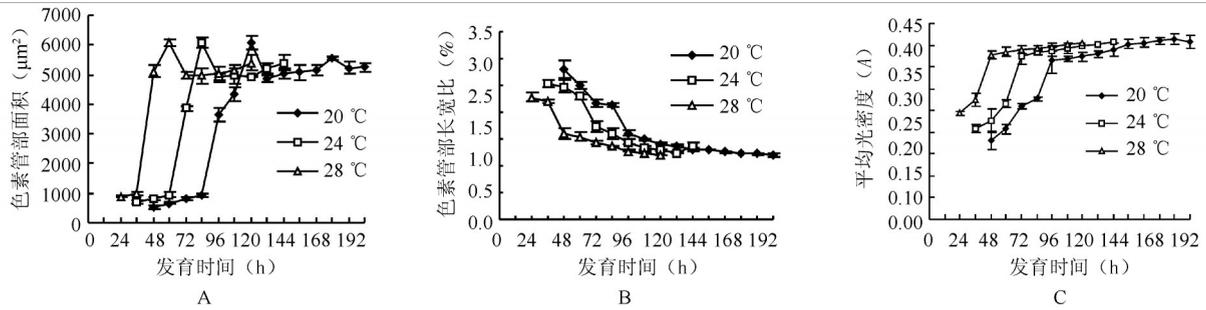


图2 不同温度下丝光绿蝇幼虫前气门色素管部面积、长宽比及平均光密度的生长曲线

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2C)。  
**2.3 丝光绿蝇幼虫在不同温度下后气门形态指征的变化** 在恒温条件下,幼虫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)。

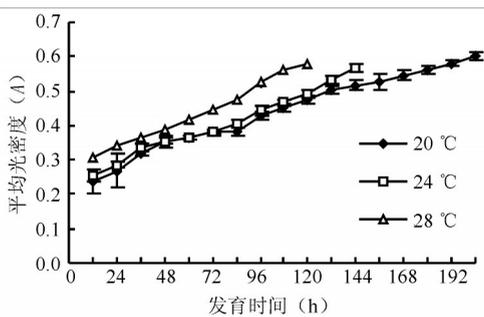


图3 不同温度下丝光绿蝇幼虫后气门平均光密度的生长曲线

**2.4 丝光绿蝇幼虫在不同温度下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,幼虫口钩面积随着时间的延长而呈阶段性增加,在每个龄期内增长速度平稳、变化不明显,龄期更替时面积变化显著。达到最大值后,进入平台期。幼虫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4A)。

**2.4.2 口钩骨化面积的变化** 在恒温条件下,幼虫口

钩的骨化面积在1、2龄期内随着时间的延长而增加,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,各组口钩骨化面积最大值几乎为各组所对应口钩面积的最大值(图4B)。

**2.4.3 口钩平均光密度的变化** 在恒温条件下,幼虫口钩平均光密度随着时间的延长而持续性增加,龄期更替时变化显著,达到最大值后曲线进入平台期(图4C)。

**2.5 丝光绿蝇幼虫在不同温度下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,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5A)。

**2.5.2 咽骨骨化面积的变化** 在恒温条件下,幼虫随着时间的延长 20~28 °C 各组幼虫咽骨骨化面积呈持续性增加的趋势,并一直保持到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,两种幼虫骨化面积达到最大值的时间明显延迟(图5B)。

**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5C)。

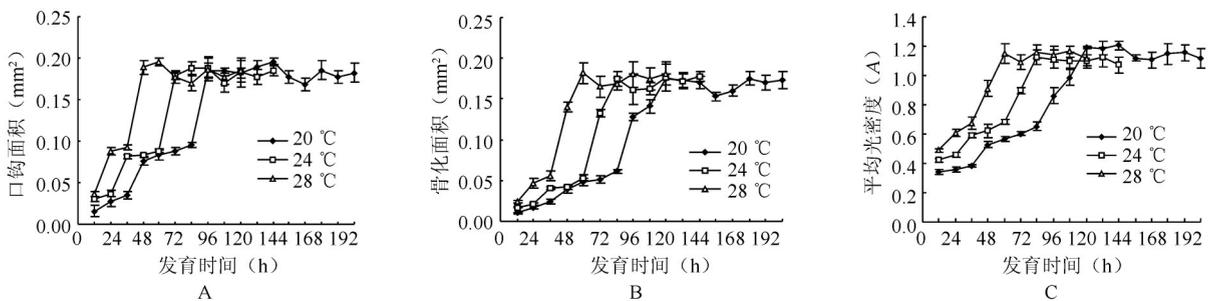


图4 不同温度下丝光绿蝇幼虫口钩面积、骨化面积、平均光密度的生长曲线

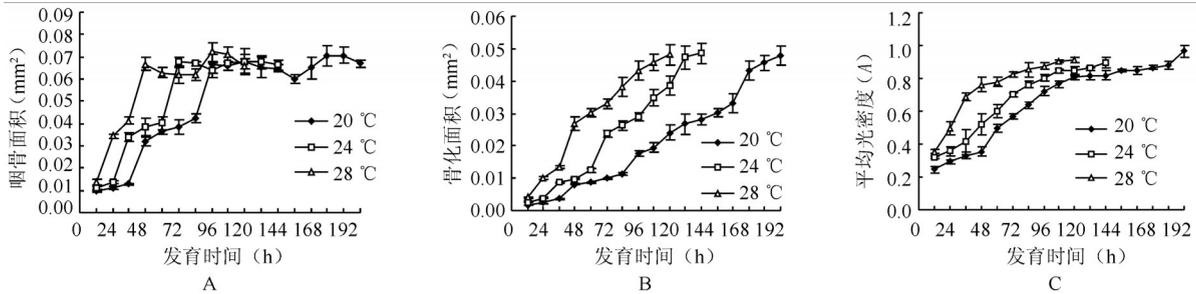


图5 不同温度下丝光绿蝇幼虫咽骨面积、骨化面积、平均光密度的生长曲线

### 3 讨论

在刑侦工作中,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PMI来确定,正确估计PMI是刑事案件侦破工作的关键。双翅目的丽蝇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的发育龄期就可以推断PMI。

丁军颖<sup>[9]</sup>研究大头金蝇(*Chrysomya megacephala*)幼虫头咽骨、体表棘刺等特征结构的生长发育变化。李艳宇<sup>[10]</sup>对丝光绿蝇幼虫气门、体表棘刺、头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的重要特征,而且它们的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,故本次实验选用幼虫气门、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了理论基础。

气门的主要作用是控制气体的出入和限制水分的过度蒸发。徐世铎等<sup>[11]</sup>曾对大头金蝇、家蝇(*Musca domestica*)等幼虫的后气门进行光镜和扫描电镜的观察比较。研究发现: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。

在国内,赵汗青等<sup>[12]</sup>率先利用计算机视觉技术探讨昆虫的数学形态特征,实现了对昆虫初步自动鉴别的可能性。我们在此基础上应用计算机图像分析系统对头咽骨的相关数据进行了分析,绘制出幼虫生长发育的曲线,是法医昆虫学领域的一个重要突破。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<sup>[13]</sup>。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。实验中我们通过在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龄末一直呈持续性增长,仅就3龄期而言,变化幅度也很明显。因此这2项指标的变化曲线是较理想的日龄推断指标。

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。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,本实验通过预试验选择了合适的阈值范围,可以更准确地对图像进行测量,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;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[M]. 重庆:重庆出版社,2000:2-3.
- [2] Amendt J, Krettek R, Zehner R. Forensic entomology[J]. Naturwissenschaften, 2004, 91(2): 51-65.
- [3] Greenberg B. Flies as forensic indicators[J]. J Med Ent, 1991, 28(5): 565-577.
- [4] 马玉堃, 胡萃, 洪健, 等. 巨尾阿丽蝇幼虫表皮几丁质片层的透射电镜观察[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2001, 8(1): 41-45.
- [5] Willams H. A model for aging of fly larvae in forensic entomology[J]. Forensic Sci Int, 1984, 25(1): 191-199.
- [6] 高玉坤. 两种尸食性蝇类幼虫血淋巴可溶性蛋白组成的时间特征[D]. 石家庄:河北医科大学基础医学院学士学位论文, 2008.
- [7] 李凯. 尸食性蝇类的分子鉴别及其发育生物化学特征用于死后间隔时间推断的基础研究[D]. 杭州:浙江大学农业与生物技术学院博士学位论文, 2006.
- [8] 范滋德. 中国常见蝇类检索表[M]. 2版. 北京:北京科学出版社, 1992: 829.
- [9] 丁军颖. 温度对大头金蝇幼虫发育的影响及其法医学意义[D]. 石家庄:河北医科大学基础医学院学士学位论文, 2003.
- [10] 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[D]. 石家庄:河北医科大学基础医学院学士学位论文, 2007.
- [11] 徐世铎, 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[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1999, 6(4): 227-232.
- [12] 赵汗青, 沈左锐, 于新文. 数学形态特征应用于昆虫自动鉴别的研究[J]. 中国农业大学学报, 2002, 7(3): 38-42.
- [13] Hutchinson GE, Tongqing N. The possible adaptive significance of the Brooks-Dyar rule[J]. Theor Biol, 1984, 106: 437-439.

[收稿日期:2009-05-30]