



RRPG91030142(66 .P)

法務部法醫研究所
九十一年度委託專題研究計畫期末報告書

計畫編號：IFM91-M02

計畫名稱	北台灣地區食屍性麗蠅昆蟲相之調查與分類研究
	The survey and classification of necrophagous calliphorid fauna (Diptera: Calliphoridae) in northern Taiwan

執行機關： 臺大昆蟲學系

計畫主持人： 蕭旭峰

E-MAIL 信箱 sfshiao@ccms.ntu.edu.tw

連絡電話： (02) 2735-0872 ext.25

傳真號碼 (02)2735-9990

執行期限： 91 年 2 月 1 日起 91 年 12 月 31 日止

計畫名稱：北台灣地區食屍性麗蠅昆蟲相之調查與分類研究

一、目 錄	頁 碼
一、目錄	459
二、計畫中文摘要	460
三、計畫英文摘要	461
四、計畫緣由、目的	463
五、研究方法	473
六、研究結果與討論	478
七、計畫成果自評	521
八、參考文獻	523

二、計畫中文摘要

法醫昆蟲學 (forensic entomology) 為應用昆蟲學知識於刑事案件中，提供調查人員判定死後間隔時間或命案之第一現場，由昆蟲提供之科學證據可降低人為因素所造成之誤判，且可將死後間隔時間估算精確至小時；國外相關之研究報告相當多，亦投入相當的人力進行研究，但反觀國內卻尚無研究結果之發表，本研究之目的即為建立北台灣地區法醫昆蟲學之初步資料，期能提供後續實際應用之參考。由動物屍體模擬實驗中調查屍體昆蟲相組成，可發現麗蠅科昆蟲於屍體腐敗過程中早期即會出現，且其種類及數量均佔屍體昆蟲之冠，於北台灣地區（包括台北縣市、桃園及宜蘭等地）以自製陷阱進行具法醫重要性昆蟲之誘集，發現麗蠅科昆蟲為其中最優勢之一群，而以傳統形態分類方法進行種類鑑定，目前約得十餘種主要麗蠅種類，並得知優勢種類分別為大頭金蠅、紅顏金蠅、肥軀金蠅、銅綠蠅、紫綠蠅及瘦葉帶綠蠅等六種，同時將採集所得之幼蟲攜回實驗室內進行人工飼養，可成功建立包括大頭金蠅、肥軀金蠅、紅顏金蠅及紫綠蠅等數種之室內族群，由此可提供目前難以利用傳統形態分類法進行種類鑑定之麗蠅雌成蟲及幼期分析之用。取採集自大台北地區之六種麗蠅進行 DNA 分析，可發現除了雄成蟲之外，雌成蟲及幼期均可進行 DNA 分析，翅及蛹殼亦不例外；取飼養之大頭金蠅新鮮樣本雄成蟲，予以分節處理，及各個時期之幼期，萃取基因組 DNA 以二倍連續稀釋後進行 PCR 反應所需最低 DNA 濃度之測定，可發現成蟲之頭部、胸部及腹部之基因組 DNA 含量及可進行稀釋之最高倍數，幼期則以三齡幼蟲及蛹期 DNA 總量與可進行 PCR 反應之 DNA 稀釋倍數最大；取不同方法保存之麗蠅成蟲進行保存方法對 DNA 檢測影響之分析，由結果可發現以 75% 酒精保存之樣本與乾燥插針保存之樣本對可萃取之基因組 DNA 總量並無明顯影響，但總體而言保存時間越久，DNA 總量越低。取採集自大台北地區之六種麗蠅，及採集自出雲山之海南綠蠅及南嶺綠蠅，萃取雄成蟲頭部之基因組 DNA，並以自行設計之引子對增幅粒線體 COI 區域並定序，以軟體分析序列並繪出系統樹，系統樹所得之群組關係與傳統形態分類方法所得之結果相符；以序列分析結果設計專一性引子，所設計之六種專一性引子對可成功將八種麗蠅予以分別，由此簡單易辨之引子對檢索表即可由分子層次快速且準確地將八種麗蠅鑑定出種類，提供法醫鑑識人員另一個快速且簡便之方法。另一方面，在分類學及形態學部分，除持續進行採集調查及個別種類之傳統分類研究外，並嘗試以超微形態特徵研究找尋新的可用分類特徵；包括卵期杯狀組織、蛹期表面突起及成蟲胸背板微毛形式等，已獲致不錯的效果。

關鍵詞：麗蠅科、分類學、形態學、分子鑑定、法醫昆蟲、北台灣。

三、計畫英文摘要

Forensic entomology is a discipline that applying entomological background knowledge to assist criminal investigations, especially in estimating Postmortem interval (PMI) or locating the site where the death occurred. By using scientific entomological evidences, we can reduce some of the artificial misinterpretation and precisely estimate PMI in hours. However, no any related study has been done before in Taiwan. This study is aimed to setup the first data of forensic entomology of Taiwan; and moreover, to provide as the reference base for further investigation and application. Using the meat traps, we preliminary surveyed the forensically important insect fauna in areas of northern Taiwan (including Taipei, Taoyuan, and Ilan areas), and found the Calliphoridae is one of the dominant groups. So far, the dominant species collected in this study are: *Chrysomya megacephala*, *C. rufifacies*, *C. pinguis*, *Lucilia cuprina*, *L. porphyrina*, and *Hemipyrellia ligurriens*. Some lab colonies of *C. megacephala*, *C. rufifacies*, *C. pinguis*, and *L. porphyrina* have successfully established. Analysis of PCR products amplified from different segment (including head, thorax, abdomen, wings and legs) of adults of *C. megacephala*, *C. rufifacies*, *C. pinguis*, *L. cuprina*, *L. porphyrina* and *H. ligurriens*, and different immature stages of *C. megacephala*, *C. rufifacies*, *C. pinguis* and *L. porphyrina* by using CCOI-F/CCOI-R primer pairs come to be 1588 bp. For detecting the effects of the different adult body segments, different preserving methods, and different immature stages to the genomic DNA contents, sequential dilutions were performed to assay the minimum DNA concentrations that are detectable in the protocol. Results show that the head, thorax, and abdomen in adults, 3rd instars and pupae have highest DNA extracts; however, no obvious difference was found between samples of different preserving methods. In general, the longer the sample preserved, the lesser the DNA can be extracted. The complete sequence of COI region of blow fly populations from Taiwan and U.S.A. were aligned; and then their phylogeny was constructed by using software "PAUP". Results show that the phylogenetic relationships from molecular data are highly agrees with that from morphological knowledge. On the other hand, six specific primer pairs were designed for using in a molecular primer key of separating eight blow fly species; and the results presented here indicate the high resolution of this primer key in practice. This also suggests a guide and easy way for identifying blow fly species in forensic inspection from molecular level. On the other hand, in classificaion and

morphological studies, we continued doing general species survey and traditional taxomical descriptions, and also try to use ultra-structural morphological characters to assist species identification. Some ultra-structural characters, such as plastrons on eggs, process on puparium, and thoracic micro-chaetotaxy on adults are proven potential useful so far.

Key words: Calliphoridae, classification, morphology, molecular identification, forensic entomology, northern Taiwan.

四、計畫緣由、目的

麗蠅科 (*Calliphoridae*) 屬雙翅目 (*Diptera*) 中的環裂亞目 (*Cyclorrhapha*)，有縫組 (*Schizophora*)、有瓣蠅類 (*Calyptratae*)、肉蠅總科 (*Sacrophagoidae*)。科下共有 11 亞科 27 族 1100 種 (Xue & Chao, 2000)，而其中台灣有記錄的有麗蠅亞科，孟蠅亞科，迷蠅亞科和伏蠅亞科。台灣有記錄的種類，由於國內並沒有人專門從事過麗蠅科的分類，因此現有的資料大多是大陸學者所發表的；Lin 及 Chen 於 1999 年在台灣雙翅目昆蟲名錄中指出，台灣有記錄的麗蠅科有 4 亞科 23 屬 46 種，而經整理中國大陸方面的資料後，台灣有記錄的種類應為 4 亞科 10 族 27 屬 61 種，其中有八種為特有種。

麗蠅屬於中大型的蠅類，體色大多呈綠色或紫色金屬光澤，也有黃色或黑褐色的種類；雄蟲複眼通常緊鄰，稱為合眼；雌蟲複眼遠離，為離眼。本科分布於世界各地，成蟲大多喜歡訪花，可利用於授粉；且其嗜食人類食物，並多半帶有病原菌，成蟲可藉由機械方式傳播病菌、病毒、蠕蟲卵或病原胞囊，導致霍亂、傷寒、痢疾、食物中毒、癩瘋或肺結核等疾病，在流行病學上具重要性。有些種類的幼蟲可以利用於蛆療法，對付抗生素也數少無策的大範圍壞死傷口；也有寄生性的麗蠅，產卵於人畜的傷口上，造成引起人畜感染蠅蛆症，造成龐大損失。

近幾年開始在國外新興的法醫昆蟲學，就是主要靠著觀察案發現場的昆蟲相以期尋找出與判案有關的線索，而其中最重要的主角就是麗蠅。可惜國內目前相關資料仍十分缺乏，且麗蠅並不容易單從外表做區分，所以種類鑑定資料的建立便成為首要且必須的工作。本研究于北台灣以自製的陷阱，放以腐肉誘集食屍性麗蠅。依據成蟲的外部形態及雄性外生殖器等形態特徵分別作分類介紹與形態比較。並利用掃描式電子顯微鏡觀察成蟲胸背板微毛列式 (thoracic micro-chaetotaxy) 及卵裂中杯狀突起 (plastron) 形狀、密度、大小等特徵進行形態學研究，希望

能找到新的且能有效辨識種類之分類特徵；此外，發現胸背板剛毛基部之特殊構造，在種內穩定性高，種間具有極大的差異性；期望能成為一新的、穩定且便利之超微形態特徵，期望以此為基礎，逐步建立台灣法醫昆蟲學的基礎資料。

往昔研究

一、分類學研究

早在 18 世紀中葉，Linnaeus(1758, 1761)已命名了多種麗蠅；當時他依口器與觸角的形式將雙翅目分成 10 屬，因此 *Musca* 屬中既包括有瓣蠅類 *Calyptratae* 也包括了無瓣蠅類 *Acalyptratae*，他將 *Musca* 屬按觸角又分成五群，將現在的家蠅科與麗蠅科因觸角芒同為羽狀放在同一群。19 世紀的 Meigen(1803-1838)主要研究歐洲的雙翅目，他的採集地點主要在德國、法國、奧地利、丹麥與葡萄牙；並命名了多種麗蠅。Wiedemann(1817-1830)除了研究歐洲的種類外，還研究了非洲、東南亞、大洋洲和南美洲的種類，並命名了 *Lucilia cuprina*、*Hemipyrellia ligurriens*、*Hemipyrellia pulchra*、*Bengalia torosa*、*Idiella mandarina*、*Rhinia apicalis*、*Stomorphina xanthogaster* 等種類。Robineau-Desvoidy(1830, 1863)主要是研究有瓣蠅類，並利用幼蟲的生活方式於分類；他不但記錄了許多種，而且發表了許多屬，如 *Amenia*、*Bellardia*、*Bengalia*、*Calliphora*、*Chrysomya*、*Lucilia*、*Melinda*、*Onesia*、*Phormia*、*Phaenicia*、*Rhinia* 等。

麗蠅科自成一個科，科內分亞科始於 20 世紀初的 Villeneuve(1914)，他依翅脈上的小剛毛列將麗蠅分為兩群，即無毛群(*Calliphoridae nudiae*)，包括現今的 *Calliphorinae* 與 *Ameniinae*，及有毛群(*Calliphoridae ciliae*)，包括 *Chrysomyinae*、*Phormiinae* 與 *Rhiniinae*。同時，Malloch 發表了一些以前未注意到的特徵於麗蠅科的分類中應用，如前胸側板中央凹陷與後足基節表面毛的有無，上肢瓣處之剛毛有無和以後眶先毛列的有無來區別某些寄蠅科與麗蠅

科的種等。19 世紀另一位蠅類學者 Townsend 在麗蠅科發表了許多屬種，如 *Protophormia*、*Hypopygiopsis*、*Dexopollenia*、*Hemipyrellia*、*Metalliopsis*、*Borbororhinia*、*Chlororhinia*、*Polleniopsis* 等都是由他命名的；在他編著的“Manual of Myiology”中，將全世界麗蠅科的屬與亞屬編出類緣大綱，並整理前人的分類特徵，加入自己的見解，如頭部構造、鬃序與兩性生殖器等；在某些屬中，還將生物學與幼期做為特徵。

麗蠅科雄性外生殖器在 18 世紀末已被廣泛應用於分類；Siebold 於 1838 年就已描述了 *Calliphora* 與 *Onesia* 的生殖器官；Lowne(1890-1895)對 *Calliphora* 生殖器官的各部構造作出描述與命名。Rohdendorf(1926)關於綠蠅屬內分亞屬的討論及 Seguy(1928)對產於西歐的麗蠅亞科論著是麗蠅科內應用雄性外生殖器於系統分類的早期研究。之後，雄性外生殖器最為分類鑑別特徵已被廣泛採用。雌性生殖器與卵、幼蟲期研究雖然不如雄性外生殖器普遍，亦有助於了解類緣關係與生態習性。Keilin(1915, 1919)、Tompson(1920, 1921)、Patton 等(1921, 1935, 1936 等)、Knipling(1936, 1939)、James(1947)、Zimin(1948)等對卵、幼蟲、蛹分別進行描述與研究。到了現代，隨著電子顯微鏡的普遍，開始尋找各種超微型態特徵，如 Debang 與 Greenberg(1989)提出靠著掃描式電子顯微鏡找到蛹上的泡狀膜組織與卵上的卵裂中的杯狀構造(Plastron)，Tarek 與 Greenberg(1993)靠著三齡幼蟲倒數第二體節之最後一列腹部肉棘上的錐狀構造，來區分兩種極相似的金蠅屬麗蠅：*Chrysomya albiceps* 與 *Chrysomya rufifacies*。

台灣目前為止並沒有任何對麗蠅科之分類研究，僅林及陳於 1999 年出版之台灣雙翅目名錄中記載台灣現有 4 亞科 23 屬 46 種麗蠅。

二、生物學

麗蠅科是完全變態的昆蟲，個體發育經歷卵、幼蟲、蛹、成蟲四個階段，通常卵生，極少

數行卵胎生；一般來說，卵期 0.5 天、一齡 1 天、二齡 1 天、三齡 3 天、蛹期 4 至五天。雌蟲一次產 200 顆卵，一生可產四到五次。

以生態學的角度來看，麗蠅在食物鏈中屬於分解者，主要取食屍體和糞便等有機物質；事實上，麗蠅的食性非常廣泛，除了取食或寄生活植物體外，幾乎什麼都吃。麗蠅科中大部分的種類均會食屍，除了少數種類只在固定某種屍體中滋生外，通常可兼食糞或是行兼性寄生。在住宅區生存的麗蠅，也會於腐敗的蔬果或廚餘中滋生；此外，有些種類的麗蠅(如紅顏金蠅)會於腐敗物質中捕食周圍的別種蠅類幼蟲。寄生性的麗蠅有專吸幼鳥血液維生的原麗蠅屬麗蠅、能引起人畜蠅蛆症的多種綠蠅屬麗蠅；粉腹麗蠅屬的有些成員會寄生於活的蝸牛上，麻麗蠅屬的幼蟲則會附著於已死或快死的蝸牛之上，屬於食屍與寄生的過渡型。

麗蠅也有越冬的行為，這可以解釋為何到了特定季節在野外便看不到某些種類，其以幼蟲或蛹的型態於腐敗有機質或垃圾堆中越冬，美洲錐蠅的成蟲甚至有越冬遷徙的現象。麗蠅成蟲飛行能力很強，一天可飛數十公里。

三、法醫重要性

法醫昆蟲學(*forensic entomology*)，是近幾年興起的一門學科。廣義法醫昆蟲學是將昆蟲與節肢動物的相關研究應用在法律議題上，主要分為三大方面：(1)城市昆蟲學(*urban entomology*)，研究人類居住環境周圍與活動相關之昆蟲所帶來的問題，如白蟻侵蝕建築物及衛生害蟲傳播疾病等；(2)倉儲昆蟲學(*stored products entomology*)，討論食物中出現昆蟲或節肢動物所引發的法律問題；(3)法醫昆蟲學(*medicocriminal entomology*)，是靠觀察命案現場所發現的節肢動物，來推斷死後時間、致死原因和命案發生地點的科學。

早期將昆蟲學應用在犯罪調查上的研究很少，目前最早的例子是 13 世紀宋慈在“洗冤錄”

中所提到，因為染血的鐮刀附近有蠅類聚集而發現其為凶器，靠此偵破一殺人案。西方相關的研究則是在一個半世紀前由歐洲學者 Bergeret(1855)、Brouardel(1879)開始讓法醫昆蟲受重視，這項工作後來由 Megnin(1889)繼承，並致力於研究屍體上各種節肢動物的消長；到了 20 世紀，更多的學者致力於提倡法醫昆蟲學的知識，並提高其在法庭上的應用價值；如今，法醫昆蟲在美國與英國，以普遍成為辦案時參考的證據，俄國、加拿大、法國、日本等國家，也持續的有學者在進行法醫昆蟲相關的研究與累積資料。

目前為止，地球上已記錄的昆蟲種類已經超過 75 萬種，據估計，世界上昆蟲的種類超過 150 萬，約佔所有動物的四分之三，廣泛的分布在地球上的各個角落；而兇殺現場亦然。南加州的一項調查中指出，在腐爛的胎牛屍體中可發現 522 種動物，分別屬於三個不同的門，其中 84% 是昆蟲；在夏威夷相似的研究中記錄了 140 種節肢動物中有 83% 是昆蟲。可惜的是，檢察官調查死亡現場時，屍體周圍之動物相卻往往被忽略。會在屍體周圍出現的節肢動物在生態學上的地位可分為三大部分：(1)食屍性種類，以屍體組織為食，包括雙翅目（特別是麗蠅和肉蠅）和鞘翅目（*Silphidae* 及 *Dermestidae*）。對這些昆蟲齡期的檢定常可提供推測死後間隔時間的一項工具；(2)雜食性種類，包括了同時取食屍體及屍體上之昆蟲的種類，如螞蟻、黃蜂、及某些甲蟲。這類生物可能會減緩屍體的分解速度，因為他們會取食食屍性種類的動物；(3)寄生及捕食性種類。Smith 鑑定出此類動物之重要性為僅次於食屍性種類，包括鞘翅目（*silphid*、*staphylinids*、*histerids*）、雙翅目（麗蠅），以及會寄生在蠅類幼蟲的膜翅目。某些種類在早期幼蟲時為食屍性，在晚期則為捕食性。某些蹠類（*macrochelids*、*parasitids*、*parholaspids*、*uropodids*）也可能屬於這類中，因他會捕食其他的蹠類、昆蟲及線蟲；(4)偶然經過的，利用屍體為延伸棲地的節肢動物，如跳蟲、蜘蛛、蜈蚣、鼠婦及一些蹠類（*Acaridae*、

Lardoglyphidae、*winterschmidtidae*) 等。

法醫學犯罪調查中利用昆蟲的原因有以下幾點：(1)昆蟲通常最早發現屍體，根據實驗結果指出，螞蟻在三分鐘內就會出現於屍體週遭；(2)屍體在分解時其內和週遭的昆蟲相是可以預測的，在各種地形和海拔間，會被屍體引誘而來的昆蟲種類各有不同，可利用這種特性推斷出有用的資料；(3)可藉由蠅類的幼蟲來推斷 **Postmortem Interval** (死後間隔時間)，屍體上發現的蠅類幼蟲，只要有種類和生活史的相關資料，便可精準的推算出死後間格時間。會被屍體所吸引過來的昆蟲種類繁多，其中最具有法醫重要性的就是麗蠅科的昆蟲，因為麗蠅的分布非常廣泛，而且幾乎是除了螞蟻外最先到達案發現場的昆蟲。靠麗蠅各種類在各地的分布資料，比對案發現場所發現的種類，可以提供推斷死亡現場的資料；而完成地區性優勢種麗蠅在不同溫度下的發育資料，再調查環境及屍體溫度，便可推測屍體的死後間隔時間，其準確度可以達到以小時為單位，比傳統法醫學精確許多。因為法醫學要推斷死後時間只能靠量屍溫或是觀察屍斑的狀況來推測，其準確度是以天為單位；而且影響屍溫的因素實在太多了，如屍體泡水或曬到太陽，都會影響判斷結果；至於屍斑，老人或大量出血而死的人屍斑並不明顯，也無法用來推斷正確的死後時間。所以，靠麗蠅幼蟲來推斷死後間隔時間可以說是目前最精準的方法。然而，也有特殊狀況的存在，實驗結果指出，因藥物致死的屍體，其上的蛆類發生的比較晚，此外，在其上取食的幼蟲之發育時間會隨著藥物的不同而增長或減短。

四、粒線體 DNA 在法醫學及法醫昆蟲學之應用

粒線體 (mitochondrion)，是普遍存在於動物、植物細胞內的胞器。許多科學家均相信，粒線體是在遠古時代，一種好氧性細菌與某種真核細胞形成內共生關係後，不斷演化而得。粒線體為雙層膜的胞器，在細胞內佔有極重要的地位，負責了細胞內絕大部

分的能量代謝及調控細胞的呼吸作用；且其具有與細胞核不同之獨特的一套遺傳系統。

粒線體 DNA，為一段環狀的 DNA 序列；在細胞內每個粒線體均具有許多的 DNA 複製；粒線體 DNA 序列長度之大小，因生物種類之不同而有所差異；粒線體 DNA 與核 DNA 一樣，會因序列的突變所造成的差異，而導致功能上的不同，例如，帕金森氏症及愛滋海默症，有學者相信即是因人類粒線體 DNA 序列上的突變所造成 (Cooper, 1997)；此外，真核生物當精卵結合受精時，精子內的粒線體 DNA 會衰解，可遺傳至受精卵內的粒線體 DNA 全部來自卵子，因此粒線體 DNA 是來自於母系的遺傳。以人為例，將粒線體 DNA 與核 DNA 相比對，可知粒線體 DNA 與核 DNA 不論在大小、在每個細胞內的複製數目、結構、遺傳系統等特性均有顯著的差異 (Bulter, 2001)，其中人類的核 DNA 已於西元 2000 年完全定序完畢，而粒線體 DNA 則早於西元 1981 年，由 Anderson 等人定序完成 (Anderson *et al.*, 1981)，這項結果提供了在人類科學研究上，更廣泛的應用。為了紀念這個偉大的貢獻，因此科學界將 Anderson 等人所發表的序列，命名為 Anderson 序列，之後在進行各種人類的相關研究時，多以 Anderson 序列作為對照組，以進行序列之比對。

由於粒線體 DNA 為母系遺傳，因此粒線體 DNA 只由來自母方的一套 DNA 所組成，不會產生基因重組現象，與核 DNA 相比之下在實驗操作上較為單純；而在序列長短方面，粒線體 DNA 遠比核 DNA 來的短，易於分析操作；在細胞內的含量，粒線體 DNA 亦較核 DNA 來的豐富，在萃取上也遠比核 DNA 容易 (Bender, 2000)。粒線體 DNA 所具有之這三項優點，使得許多已發表的論文中，學者均以粒線體 DNA 做為材料，以進行各種不同領域的研究工作，如生物種類的鑑定，及演化學上的相關研究，例如親緣關係的推論、物種的起源、

親緣地理學、族群結構及動態，及分子演化學等各領域。例如在 1996 年所發表的一篇論文，即以粒線體 DNA 做為材料，以進行族群結構的研究。Azeredo-Espin 及 Madeira (1996) 發現在巴西有一種麗蠅 (*Phaenicia eximia*)，原本是一種食屍性的昆蟲，卻被發現轉而導致狗的蠅蛆症，因此他們採取了當地得了蠅蛆症的狗，及胎牛屍體上所獲得的兩個麗蠅小族群，萃取其粒線體 DNA，經定序後，將其所得序列，以電腦模擬可能的限制酶切位；所檢視之十二種限制酶中，四種限制酶：*EcoRI*、*EcoRV*、*HaeIII*、*MspI* 所得之酶切片段大小，在兩個小族群間有不同的結果。之後經南方氏墨點雜合分析法檢視，亦證實了所推測之結果。在此實驗中，他們認為：一、對資源的競爭可能會導致生物的行為改變，例如原本為食屍性的昆蟲，轉而引起狗的蠅蛆症；二、在他們所使用的粒線體 DNA 遺傳標記，可能與麗蠅的寄主專一性，有某種程度的關連，因此才可在這段序列上看到了兩族群間的差異；三、所得的結果可提供之後在研究演化學或遺傳學一個好用的遺傳標記 (Azeredo-Espin & Madeira, 1996)。前述粒線體 DNA 的三項優點，同樣可適用於法醫調查上。當一件命案發生後，法醫開始著手調查案情，首先需知道死者的身份。於西元 1980 年代中期，使用 DNA typing 的方式進行人類身份鑑定的工作已漸趨成熟，且已逐漸取代傳統以血型差異鑑定人類身份的方式。在使用 DNA typing 的方法鑑定死者身份時，常用的遺傳標記很多，如鑑定性別的 Amelogenon、Y chromosome 上的 STRs (short tandem repeats) 及其他的遺傳標記，而目前最重要且被廣泛使用的，則屬粒線體 DNA control region 上的兩個過變異區域 hypervariable region-1 (HV-1) 及 hypervariable region-2 (HV-2)。Bender 等人所發表的論文即以此兩片段的序列分析作為鑑定人類身份之用。在案例一中，他們在一個建築工地發現了一副骸骨，經周遭證物推測應為一個已失蹤九年的人。將此骸骨的粒線體

DNA 與疑似其姊姊的粒線體 DNA 進行比對，再以 Anderson 序列作為對照組，可發現同時出現了相同的序列差異，因此證實了此付骸骨即為所推測之人所有。在案例二中，他們發現了一些頭骨的碎片，經人類解剖學的知識輔助，可知應為一個八歲的小孩，將此頭骨的粒線體 DNA 與推測為其母親的人之粒線體 DNA 進行比對，再與 Anderson 序列做對照，發現兩者間並無太大相似之處（表五），因此推翻了之前所做的身份推測。由實驗中，他們得到了一個結論，即利用粒線體 DNA 的分析，即可作為命案中的死者及失蹤人口的身份鑑定之用 (Bender *et al.*, 2000)。在命案調查中，獲知死者身份後，接下來即需推測其可能的死亡時間，以做更進一步的案情判斷。法醫昆蟲學，即是利用命案現場所採集到之昆蟲，輔以相關的基礎生態資料，以推測具科學依據、較為可信之死後間隔時間 (postmortem interval, PMI)。前述粒線體 DNA 之優點，同樣可適用於法醫昆蟲學上鑑定種類之用，而使用分子方法鑑定昆蟲種類，最常使用之遺傳標記則為粒線體 DNA 上之細胞色素氧化酶次單元一 (cytochrome c oxidase subunit-I, CO-I) 及次單元二 (CO-II)。除此之外，細胞色素 b (cytochrome b) 也常被應用作為鑑定種類之遺傳標記。在法醫昆蟲學領域中採用粒線體 DNA 分析方法，有幾點優點：一、可將差異以 DNA 序列表示，利於將其儲存於電腦中，且以電腦進行種類比對時，較為容易；二、可同時瞭解粒線體 DNA 的演化情形；三、使用分子分析的方式，可提供不具有昆蟲學背景之法醫調查人員一種易於學習及應用的方法。麗蠅科，為雙翅目之昆蟲，會在屍體腐敗過程之早期即出現取食並產卵，且為屍體昆蟲相中數量相當多的一類，因此為重要的法醫昆蟲。Vincent 等人 (2000) 曾以歐洲六種具法醫重要性之麗蠅及嗜人錐蠅做為材料，分析其粒線體 DNA 之 CO-I 部分片段序列，可發現在所增幅出之 348

bp 大小的部分片段中，即出現許多序列上的差異；而此差異即可提供在幼蟲期的種類鑑定之用。此外，他們也發現了可由保存並不完善的樣品及空的蛹殼中萃取出 DNA 而進行分析，且他們亦證實了分子技術可在傳統分類方法無法得到一個確切結果時，提供一項很有力的工具 (Vincent *et al.*, 2000)。

利用各種食屍性昆蟲在生活史、生態習性上之差異，來推測死後間隔時間是目前新興、且較具科學可信度之方法，但若是無法直接由屍體上採集到所需的昆蟲標本，即遇到下列幾種狀況時：一、調查人員在推測的案發地點採集到蛆，卻沒有發現屍體；二、並非由屍體上直接採集到蛆，且屍體附近也有其他可能的食物來源存在；三、由屍體上採集到蛆，但這可能是從別的地方，不小心掉落到屍體上。在這幾種情形下，我們必須要再進一步確認所採集到的蛆，是否具有判定死後間隔時間的價值，因此 Wells 等人 (2001) 即利用解剖在屍體上所採集到的蛆，取其嗉囊萃取出 DNA，再以人類及麗蠅的特異性引子對進行增幅，由結果以確認所採集到的麗蠅，確實曾在此屍體上取食。在實驗中，他們證實了利用粒線體 DNA 的分析方法，可在已沒有與屍體直接接觸的蛆及屍體間，進行兩者間的關係重建，但卻無法排除所採集的蛆，在取食屍體之前是否已取食過其他食物。本研究即參考 Wells 等人 (2001) 的實驗方法並改良之，以期得到在不同齡期之麗蠅於取食不同食物後，其食物粒線體 DNA 再現性上之差異，所得之結果，希望能提供法醫鑑定上，一項更直接有力的證據。

五、研究方法

一、標本採集

誘集方法是將自製之陷阱中放入豬肉，用塑膠繩綁於離地約 30cm 處，放置於有遮蔭的地方避免過度日曬或雨淋，可使陷阱效果延長；於三到四天後將陷阱收回，因為如果無法在四天內將陷阱回收，陷阱內的幼蟲孵出後會取食其內之成蟲，最後造成無法回收任何完整之成蟲標本。成蟲帶回作成標本，幼蟲則飼養至成蟲期，觀察是否飼養出與所捕獲成蟲不同的種類。陷阱的製作方法是參考蠅類捕捉陷阱，經過幾次改良後的結果。此外，由於以陷阱誘集而來的大多是雌蟲（可能與雌蟲的產卵習性有關），可是麗蠅的分類主要是以雄蟲特徵為主，因此，將幼蟲帶回飼養的另一好處是可取得較多的雄蟲用來分類。

陷阱之製作方法為：使用市售的一公升透明塑膠罐兩個，下層側邊挖出兩個約 2cm x 1cm 之長方形開口供麗蠅進入，其中至入誘餌，如豬肉、豬肝、豬腦、魚肉、魚內臟、雞肉等；上層則於側面打數個小孔洞，保持空氣流動，並貼上一紙製漏斗，誘使麗蠅往上，收集起來。

樣區設定在北台灣，包括台北縣市與桃園、宜蘭。其中台北市以行政區域為單位，各選定數個樣本點進行陷阱誘集，地點如下：內湖區—大湖公園、南港區—南港公園、大安區—台大農業昆蟲館、信義區—虎山溪市民登山步道、北投區—唶哩岸及新北投山區、景美區—仙跡岩、文山區—木柵、指南宮、萬美街及臥龍街、士林區—外雙溪及陽明山、中山區—圓山及長春路；台北縣烏來鄉、大崎腳、樹林、永和烘爐地及汐止研究院路；桃園縣北橫山區及三峽；北宜公路沿線和宜蘭縣思源啞口等 24 處。

二、標本處理

1. 乾燥標本(成蟲)

將野外採集與自行飼養的成蟲，以三號蟲針插於前胸背板上，置於 50 度的烤箱中烘烤 2 週，附上採集資料之蟲籤後移至標本箱中保存。

2. 浸液標本

將各齡幼蟲、卵與蛹、蛹殼保存於裝有 75% 之酒精瓶內，並附上採及資料標籤。

雄性成蟲外生殖器的處理為：

將已乾燥或未乾燥之雄性成蟲腹部末兩節剪下，放入 50% 之 KOH 溶液中，以酒精燈加熱煮沸 2 分鐘。

將煮過之腹部至於解剖顯微鏡下，取出最後一節腹板及雄性外生殖器(包括肛板、射精囊小骨及陰莖)。

將取出之最後一節腹板及雄性外生殖器浸泡於 75% 酒精與甘油之 1:1 混合液中保存，並標明取自何標號標本。

3. 電顯標本

幼蟲及卵之電子顯微標本處理步驟：

脫水：以 50%(10 分鐘)、70%(10 分鐘)、80%(10 分鐘)、90%(10 分鐘)、95%(10 分鐘)、100%(15 分鐘)、100%(15 分鐘)之酒精進行脫水。

再置於 100% 之丙酮中 15 分鐘，處理兩次。

將處理好的標本進行臨界點乾燥。

鍍金。

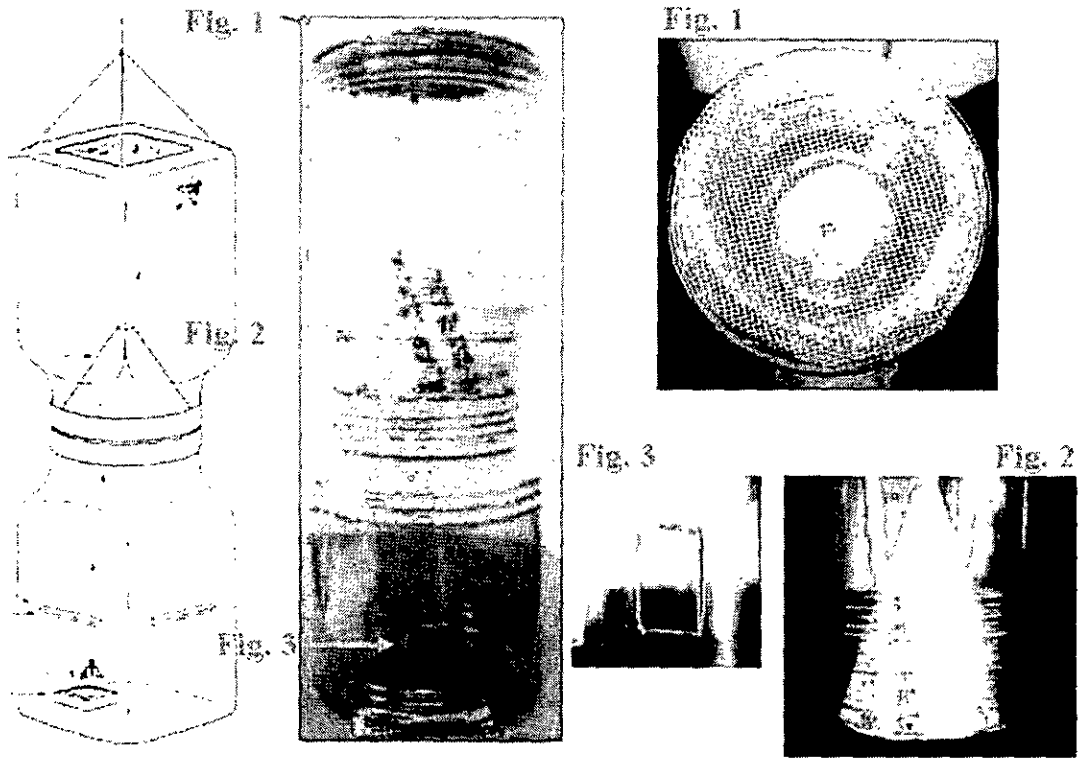
成蟲、蛹及蛹殼之電子顯微標本處理步驟：

將標本浸裝有溫水之離心管中，以超音波震盪器處理 1 分鐘，再將溫水更換為 75% 之酒精

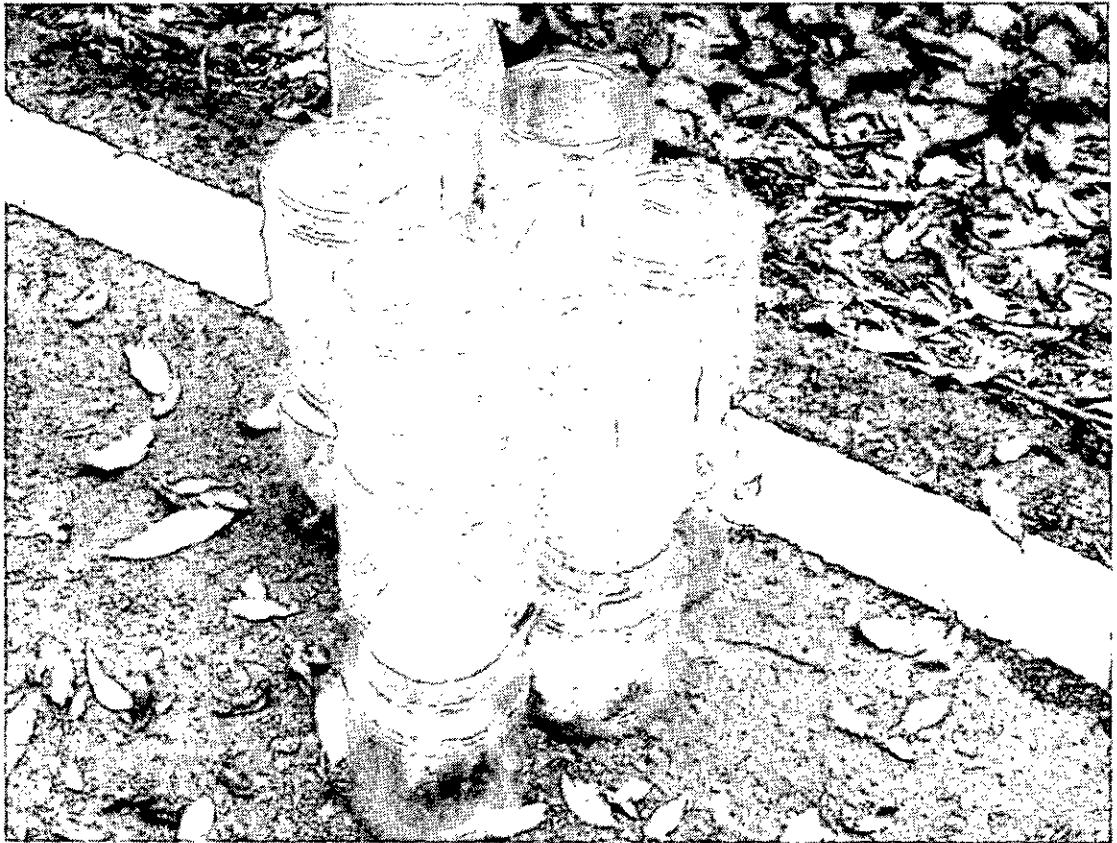
重複震盪 1 分鐘，以去除覆於蟲表之雜物。

將處理乾淨之標本置於乾燥箱中烘乾。

將完全乾燥之標本以雙面膠黏於電顯載物台上，進行鍍金。



圖、麗蠅誘引器之設計。



圖、麗蠅誘引器之成品

三、繼代飼養

以 Hung (1995) 之大頭金蠅大量飼養配方進行幼蟲之繼代飼養。將野外採集得之下層幼蟲，以新鮮豬肉餵飼至羽化為成蟲，經種類鑑定後，將同種雌雄配對，以豬肝誘其產卵，所孵化之幼蟲以配方餵食，繼代飼養於溫度 28°C、相對濕度 80 %、日夜光照比 12:12 的生長箱中。

四、粒線體 DNA 之分析

將野外所採集得之不同種麗蠅成蟲胸部取下，及繼代飼養之不同種麗蠅幼蟲，參照 Hung 等 (1999) 之方法萃取 DNA，方法簡述如下：加入適量 DNA extraction buffer，以研磨棒將蟲體磨碎，加入 1% *N*-lauroylsarcosine，於 55°C 水浴反應一小時，離心移去蟲體碎片後加入 1% CTAB、5M NaCl 於 65°C 水浴中反應，以等體積之 CI (Chloroform / Isoamyl alcohol) 萃取，

離心後取上層水溶液加入等體積之 PCI (Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol) 萃取兩次，以 2.5 倍體積之絕對酒精沈澱 DNA，以 TE buffer 回溶 DNA，保存於 -20°C。所萃取得之 DNA，進行 PCR 增幅反應，使用 Vincent 等 (2000) 所發表之論文中使用的引子 COI-2f、COI-3r，並參照基因庫內已發表之嗜人錐蠅 (*Cochliomyia hominivorax*) 之粒線體 DNA 細胞色素氧化酵素次單元一 (cytochrome oxidase subunit I, CO-I) 片段序列，自行設計引子對 CCO-1，及參照大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*) CO-I 片段設計 mega、mega specific 等兩種引子對，以此四種引子對進行反應。反應溶液包括：50 ng 之引子、100 ng DNA template、0.2 mM dNTPs、25mM MgCl₂、10x reaction buffer、2.5 U *Taq* polymerase，及滅菌水使總體積為 25 μ l。反應溫度如下：denature-94°C，annealing-60 或 56°C，extension-72°C，共進行 30 個循環。以洋菜膠電泳檢測所增幅出之片段大小，並將片段進行定序，以作序列之分析。

六、研究結果與討論

一、種類調查結果

根據 2001 年 10 月底至 2002 年 11 月底在北台灣地區所誘集到的各種麗蠅種類進行初步整

理：

各地採集種類及大約數量 (×表示尚未有記錄)

	大頭金蠅	紅顏金蠅	肥腦金蠅	瘦葉帶綠蠅	胖葉帶綠蠅	銅綠蠅	紫綠蠅	巴布亞綠蠅	印度綠蠅	
仙跡岩					×	×		×	×	1
萬美街					×			×	×	5
臥龍街					×			×	×	10
圓山				×	×	×		×	×	
外雙溪				×	×	×		×	×	1
烏來				×	×	×		×	×	1
北橫					×	×		×		50
北投					×	×		×	×	1555
汐止				×	×	×		×	×	11
樹林					×	×	×	×	×	51
北宜						×		×		11

二、目前已知優勢種類的各論

a) 大頭金蠅 *Chrysomya megacephala* (Fabricius)

海拔 2000 公尺以下的各生態地理區，蟲口數量高峰為 6 月到 10 月

地理分布：日本，韓國，印尼，馬來西亞，斐濟，越南，阿富汗，伊朗，西班牙，原蘇聯，非洲，澳洲，南太平洋群島

食性：以羊肉中孳生頻率最高(33%)，其次是新鮮的人糞(28%)，豬肉(14%)，動物內臟(3%)；在山間樹叢間掃網時(1992 八月至九月)，發現其對西南繡球花的花蜜極為喜歡

消長：春冬兩季活動高峰為上午 10~12 時，夏季則偏好上午 6~8 時涼爽時

經濟意義：在流行病學，微生物學，法醫昆蟲學方面有重要意義

分類特徵：

Male:

Body length: 8-10 mm

Head

Frontal vitta(鬃) dark brown and small triangular.

Parafrontals(側額) dark brown with fine black hairs.

Parafacial(側頰), face, and gena yellowish orange with fine orange hairs.

Gena about one-half the height of an eye.

Antennae orange; length of the 3rd segment about 3 times that of 2nd segments.

Arista reddish brown and long plumose.

Palpi orange; 1st row of postocular setae(眼後眶鬃) regular and black.

Thorax

Scutum and scutellum generally metallic green rarely blush or purplish, with grayish pollen.

Acrostichal bristles(中鬃) 0+1; dorsocentral bristles(背中鬃) 2+3; intra-alar bristles(翅內鬃) 0+1; presutural(溝前鬃) bristle 1.

Apicoscutellar bristles 1 pair; discoscutellar bristles ;lateroscutellar bristles.

Sternopleural bristles(腹側片鬃) 1+1.

Mesothoracic and metathoracic spiracles blackish brown, but posterior part of metathoracic spiracles brown.

Wings

Hyaline, but basal part infuscated; dorsal surface of stem vein(R) with a row of setae posteriorly; R1 bare; R4+5 with a row of short setae located dorsally.

Upper and lower squamae dark brown, but lateral half of upper squamae with whitish marginal cilia; dorsal surface of lower squamae with numerous hairs.

Legs

Black; fore femur with a pair of rows of long bristles on the posterodorsal(後背鬃) surface; a row of long bristles on the posteroventral(後腹鬃) surface.

Fore tibia with 3 or 4 short bristles on the anterodorsal(前背鬃) surface, 1 bristle at distal one-third of the pv. surface.

Mid tibia with 1 bristle at distal one-third of the ad., vd. And pd.

Hind tibia with 3 bristles and a row of short bristles on the ad. surface, 1 bristle and a row of short bristles on the pd. surface, 2 bristles on the av. surface.

Abdomen

Metallic green with golden iridescence; 2nd tergite darker than the others; 3rd and 4th tergites with bluish transversal band posteriorly; ventral surface of tergites slightly grayish dusted with golden hairs.

Marginal bristles present on 3rd and 4th tergites, but weak; 5th tergite with long hairs and bristles.

1st sternite with yellowish hairs; 2nd to 4th sternites with yellowish hairs and long black hairs; 5th sternite with deep incision posteriorly.

1st genital tergite metallic green with black hairs.

Female:

Body length: 8-10 mm

Frons about same the width of one eye at the vertex; frontal vitta reddish brown to dark brown with fine hairs; parafrontals dark brown with golden pollinosity and numerous hairs; 2 weak and 1 strong reclinate frontal-orbital bristle present.

b)肥軀金蠅 *Chrysomya pinguis* (Walker)

冬春季海拔 1000m 以下，夏秋季則在海拔 2000~3000m 生態地理區的路旁及闊葉林等處易發現；成蟲出現於 3 月~12 月，以八月為最高峰

地理分布：日本，韓國，印度，斯里蘭卡，菲律賓，馬來西亞，越南，印尼

食性：幼蟲在獸骨內發現頻率最高(25%)，其次為雞肉(16%)和豬肉(14%)；在野外喜歡新鮮牛糞和野菊花

消長：

暮春(5月)喜歡活動於 14~20 時

盛夏(7月)喜歡 06~07 時和 19~20 時

· 初秋(9月)則多在 12~17 時活動; 以蛹越冬

經濟意義: 法醫昆蟲

分類特徵:

Male:

Body length: 8-9.5 cm

Head

Eye large, closed each other; frons triangular.

Parafrontals(側額) dark brown, narrow and with numerous fine black hairs.

Parafacial(側頰) reddish to dark brown with fine hairs on the upper part; face blackish brown with grayish pollen.

Gena blackish brown with golden pollinosity and numerous black hairs, broad, and about one-half the height of an eye.

2nd antennae segment orange; 3rd segment orange, but anterior surface dark brown; length of the 3rd segment about 4 times that of 2nd segments.

Arista brown to dark brown and feathered to the apex.

Palpi orange and slender; 1st row of postocular setae(眼後眶鬃) regular and black.

Thorax

Scutum and scutellum generally metallic green, sometimes blue to purple, slightly grayish dusted.

Acrostichal bristles(中鬃) 0+1; dorsocentral bristles(背中鬃) 2+4; intra-alar bristles(翅內鬃) 0+2; presutural(溝前鬃) bristle 1.

Mesothoracic and metathoracic spiracles blackish brown, but posterior part of metathoracic spiracles brown.

Wings

Hyaline, but basal part infuscated; dorsal surface of stem vein(R) with a row of setae posteriorly; R1 bare; R4+5 with a row of short setae located dorsally.

Upper and lower squamae dark brown, but lateral half of upper squamae with whitish marginal cilia; dorsal surface of lower squamae with numerous hairs.

Legs

Black; fore femur with a pair of rows of long bristles on the posterodorsal(後背鬃) surface; a row of long bristles on the posteroventral(後腹鬃) surface.

Fore tibia with 3 or 4 short bristles on the anterodorsal(前背鬃) surface, 1 bristle at distal one-third of the pv. surface.

Mid tibia with 1 bristle at distal one-third of the ad., vd. And pd.

Hind tibia with 3 bristles and a row of short bristles on the ad. surface, 1 bristle and a row of short bristles on the pd. surface, 2 bristles on the av. surface.

Abdomen

Metallic green with golden iridescence; 2nd tergite darker than the others; 3rd and 4th tergites with bluish transversal band posteriorly; ventral surface of tergites slightly grayish dusted with golden hairs.

Marginal bristles present on 3rd and 4th tergites, but weak; 5th tergite with long hairs and bristles.

1st sternite with yellowish hairs; 2nd to 4th sternites with yellowish hairs and long black hairs; 5th sternite with deep incision posteriorly.

1st genital tergite metallic green with black hairs.

Female:

Body length: 8-10 mm

Frons about same the width of one eye at the vertex; frontal vitta reddish brown to dark brown with fine hairs; parafrontals dark brown with golden pollinosity and numerous hairs; 2 weak and 1 strong reclinate frontal-orbital bristle present.

c)紅顏金蠅 *Chrysomya rufifacies* (Macquart)

最高至海拔 1500m，成蟲季從 6 月~11 月，高峰在 9 月

地理分布：日本，越南，東洋區，澳洲區，澳洲，南太平洋群島，古北區南緣

食性：喜歡臭魚肉，幼蟲會捕食其他蠅類幼蟲

經濟意義：幼蟲可致人畜蠅蛆症，有法醫重要性

分類特徵:

Male:

Body length: 7-9 mm

Head

Frons slightly separated, Frontal vitta(鬃) black, frontal bristles short and weak.

Parafrontals(側額) blackish brown and silvery pollinose with numerous fine black hairs.

Parafacial(側頰) blackish brown with silvery pollinosity and whitish hairs.

Face and epistoma brown.

Gena about one-third the height of an eye.

2nd antennae segment dark brown and reddish apically; 3rd segment dark brown, reddish posteriorly and with grayish pollen.

Length of 3rd segment about 3 times that of 2nd segment.

Arista dark brown and long plumose.

Palpi orange; 1st row of postocular setae(眼後眶鬃) regular and black.

Thorax

Scutum and scutellum metallic green with golden iridescence, without grayish pollen.

Acrostichal bristles(中鬃) 0+1; dorsocentral bristles(背中鬃) 3+3; intra-alar bristles(翅內鬃) 0+1; presutural(溝前鬃) bristle 1.

Mesothoracic spiracles creamy white, metathoracic spiracles dark brown.

Wings

Hyaline, but basal part infuscated; dorsal surface of stem vein(R) with a row of setae posteriorly; R1 bare; R4+5 with a row of short setae located dorsally and ventrally extending more than half way from the basal node to r-m.

Upper squamae white, posterior half brownish, and with whitish maginal cilia, lower squamae dark brown but anterior part whitish, maginal cilia whitish anteriorly and brownish posteriorly, dorsal surface of lower squama with numerous brownish hairs, but anterior part with whitish hairs, halter brown.

Legs

Black to blackish brown; fore femur with a pair of rows of long bristles on the postero-dorsal(後背鬃) surface; a row of

long bristles on the posteroventral(後腹鬃) surface.

Fore tibia with 3 or 4 short bristles on the anterodorsal(前背鬃) surface, 1 bristle at distal one-third of the pv. surface.

Mid tibia with 1 bristle at distal one-third of the ad., vd. And pd; 2 short bristle on the pv. surface.

Hind tibia with a row of row of short bristles on the ad. surface, 1 bristle at distal one-third of the av. and pd. surface respectively.

Abdomen

Metallic green; 2nd tergite darker than the others; 3rd and 4th tergites with dark transversal bands posteriorly; 3rd to 5th tergites with obscure bluish median longitudinal stripes; ventral surface of tergites with whitish hairs.

Marginal bristles poorly developed.

Sternites dark brown with greenish pollinose and numerous hairs.

1st, 2nd and anterior part of 3rd and 4th sternites with whitish hairs, the other parts with black hairs, 5th sternite with deeply concave posteriorly.

1st genital tergite metallic green with black hairs.

Female:

Body length: 8-9 mm

Frons a little narrow than one eye; frontal vitta dark brown and broad; parafrontals golden to silvery pollinosity with fine black hairs on the upper part and whitish hair on the lower part; 1 reclinate frontal-orbital bristle present.

1000m 以下的各生態地理區，季節分布為 4~12 月，密度高峰為 5~8 月

地理分布: 日本，韓國，菲律賓，印尼，馬來西亞，新加坡，泰國，印度，斯里蘭卡，印度，澳洲區

食性: 用兔血孳生率最高，其次是獸骨，垃圾，而在野外以不同誘餌試驗，發現成蟲最喜歡新鮮的人糞，其次是腐敗的魚

消長:

暮春本種成蟲出現於上午 8~12 時

夏天活動時間可到 12 個小時，但高峰為 7~9 時和 17~18 時

秋季高峰在 10~16 時

冬季僅出現於 11~12 時，且數量極少

e) 巴布亞綠蠅 *Lucilia papuensis* (Macquart)

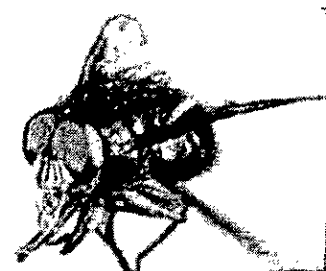
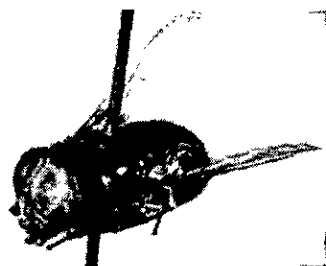
海拔 2800m 以下各生態地理區，成蟲分布季為 3 月~11 月，高峰期為八月

地理分布: 日本，韓國，印度，斯里蘭卡，泰國，馬來西亞，印尼，菲律賓，非洲，巴布亞新幾內亞，澳洲區

食性: 喜歡腐敗的動物質和新鮮人糞，會訪花，用雞腸誘集效果最好

以下由左至右分別是大頭金蠅(*Chrysomya megacephala*)、肥軀金蠅(*Chrysomya pinguis*)、紅顏金蠅(*Chrysomya rufifacies*)、瘦葉帶綠蠅(*Hemipyrellia ligurriens*)、巴布亞綠蠅(*Lucilia papuensis*)

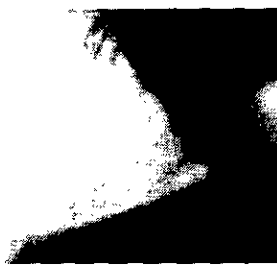
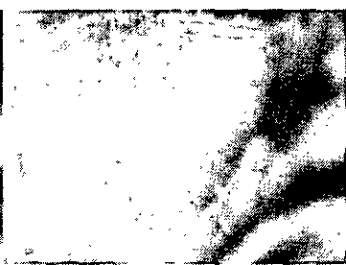
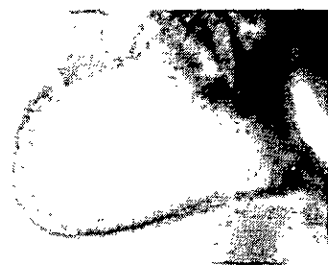
•外觀



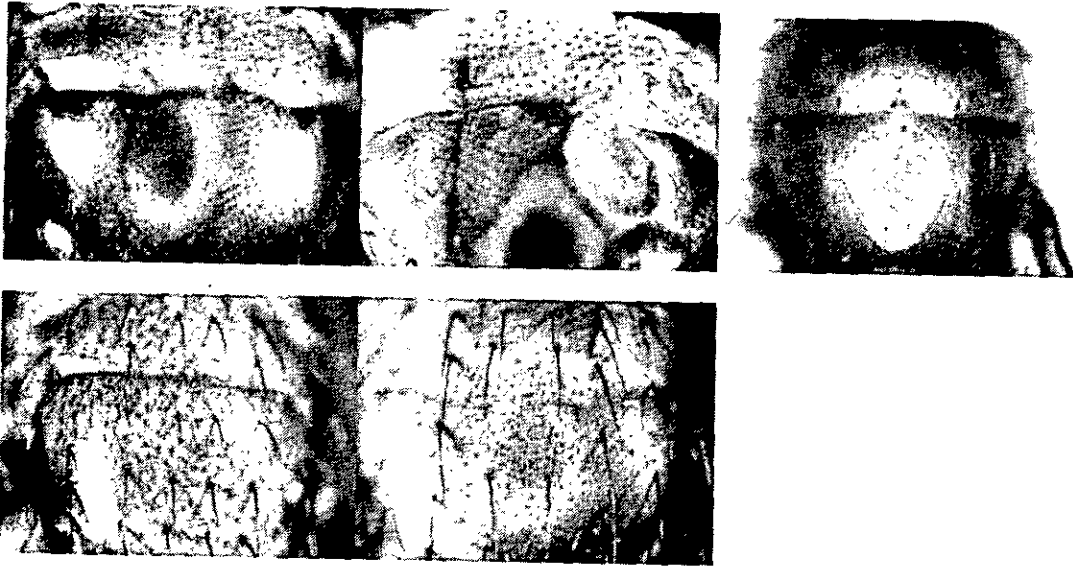
•雄蟲頭部正面



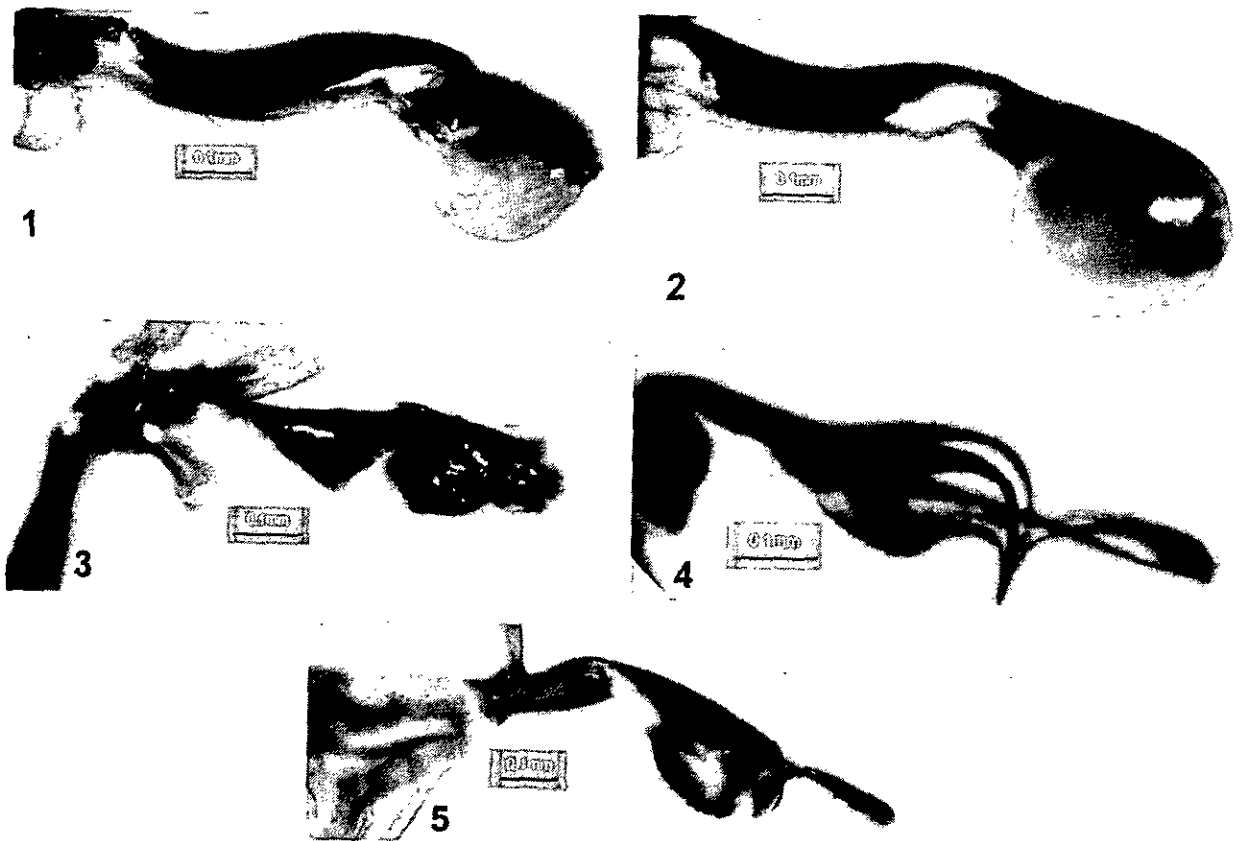
•腋瓣



•前胸背版



•雄性外生殖器



三、形態學研究

麗蠅科的形態分類，依生活史各期可分為卵、幼蟲、蛹、成蟲四期。成蟲的形態分類特徵大致可分為4部分：1. 頭部 (Head)； 2. 胸部 (Thorax)； 3. 足 (Leg)； 4. 雄性外生殖器 (male

terminalia)。

一直以來，麗蠅科的形態學與分類學的重心多偏重於雄性成蟲之外生殖器；雌性成蟲與卵、各齡幼蟲與蛹等幼生期階段的文獻記載多為零散或屬附記性質、隨著新興學科—法醫昆蟲學的發展，只能對雄性成蟲進行分類是不夠的；因此，本文除了列出傳統上重要的各個重要特徵外，將利用掃描式電子顯微鏡觀察前胸背板上的微毛與其他超微構造，並尋找蛹與卵上的超微形態特徵，並做有系統的整理，以利於分類描述，甚至快速鑑定。

(一) 術語 (Terminology)

compound eye 複眼

arista 觸角芒

antenna 觸角

gena 頰

vibrissa 鬚

parafacials 側顏

palp 小顎鬚

postocular setae 眼後鬃列

postorbitalia 後眶部

intrapostocular ciliae 後眶纖毛

ocellar bristle 內頂鬃

vertical bristle 外頂鬃

anterior edge of epstoma 口前緣

mesothoracic spiracle 前氣孔

metathoracic spiracle 後氣孔

calypter 腋瓣

anterior tuft of suprasqual ridge 腋瓣上剛毛簇

posterior tuft of suprasqual ridge 腋瓣下剛毛簇

acrostichal bristles 中鬃

dorsocentral bristles 背中鬃

apicoscutellar 小盾端鬃

discoscutellar 小盾心鬃

humeral 肩後鬃

intra-alar 翅內鬃

super-alar 翅前鬃

lateroscutellar 小盾基鬃

notopleural 背側片鬃

epaulet 毛肩片

costa 前緣脈

subcostal sclerite 亞前緣骨片

ventral seta 腹鬃

anterovertral seta 前腹鬃

anterodorsal seta 前背鬃

posterodorsal seta 後背鬃

posteroventral seta 後腹鬃

femur 腿節

tarsi 脛節

tibia 跗節

1st genital tergite 第九背板

2nd genital tergite 第七八合腹節

inner forceps 肛尾葉

outer forceps 側尾葉

ejaculatory apodeme 射精囊小骨

5th sternite 第五腹板

phallosome 陽體

basiphallus 基陽體

aedeagus 陰莖

paraphallus 側陽體

hypophallus 下陽體

acrophallus 端陽體

(二.) 傳統形態學

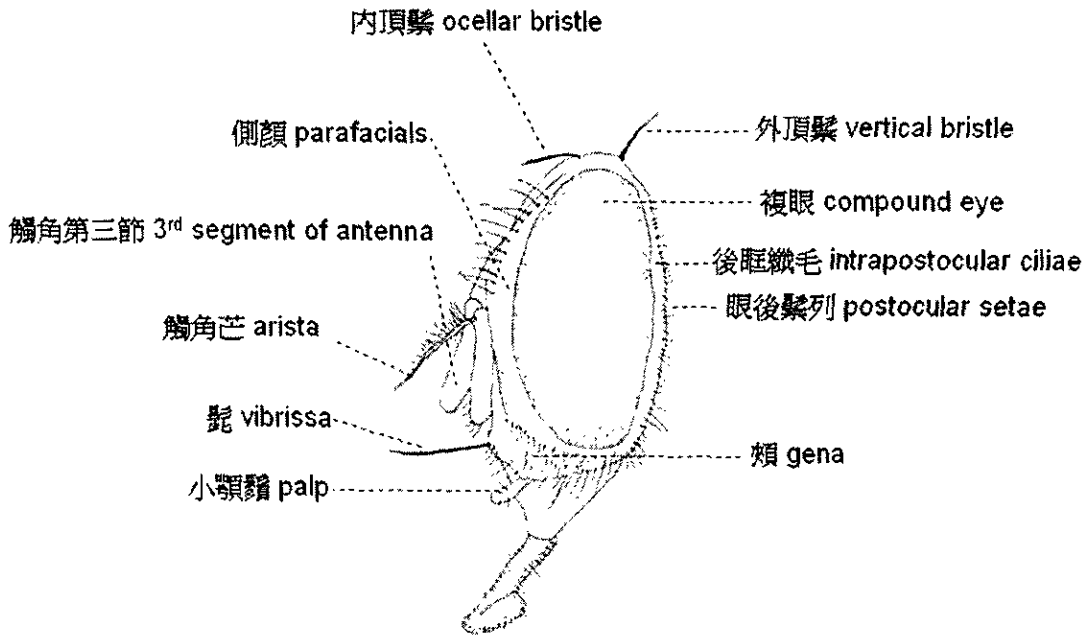
(1.) 頭部 (Head)

通常頭部兩性間差別明顯；麗蠅雌雄的分別，絕大部分是靠頭部複眼的離眼 (dolichoptic)、合眼 (holoptic)來區分，複眼緊鄰且佔整個頭部面積比例較大者通常為雄性，稱為合眼，反之則為雌性，離眼，少有例外。

麗蠅頭部的分類特徵可看複眼的顏色與佔臉部比例的大小、側顏的寬窄與其上毛之顏色；複眼後緣與眼後鬃列 (postocular setae) 之間為後眶部 (postorbitalia)，上有細小纖毛列，稱後眶纖毛 (intrapostocular ciliae)，為大部分麗蠅科所具備的科徵之一。顏面下端一根特別明顯的毛稱為髭 (vibrissa)，著生位置與口前緣 (anterior edge of epstoma) 的關係有時會因種而異；觸角 (antenna) 通常長大，第三節最發達，與第二節的比例為重要特徵，有時甚至達六倍以上；觸角芒 (arista) 通常呈長羽狀，少數成短羽狀或端段裸露，在某些屬中則為櫛齒狀；本科口器均為舐舔式，唇瓣 (labella) 非常發達。



圖、大頭金蠅(*Chrysomya megacephala*)之雌雄判別。左邊是雄性、合眼，右邊雌性、離眼。



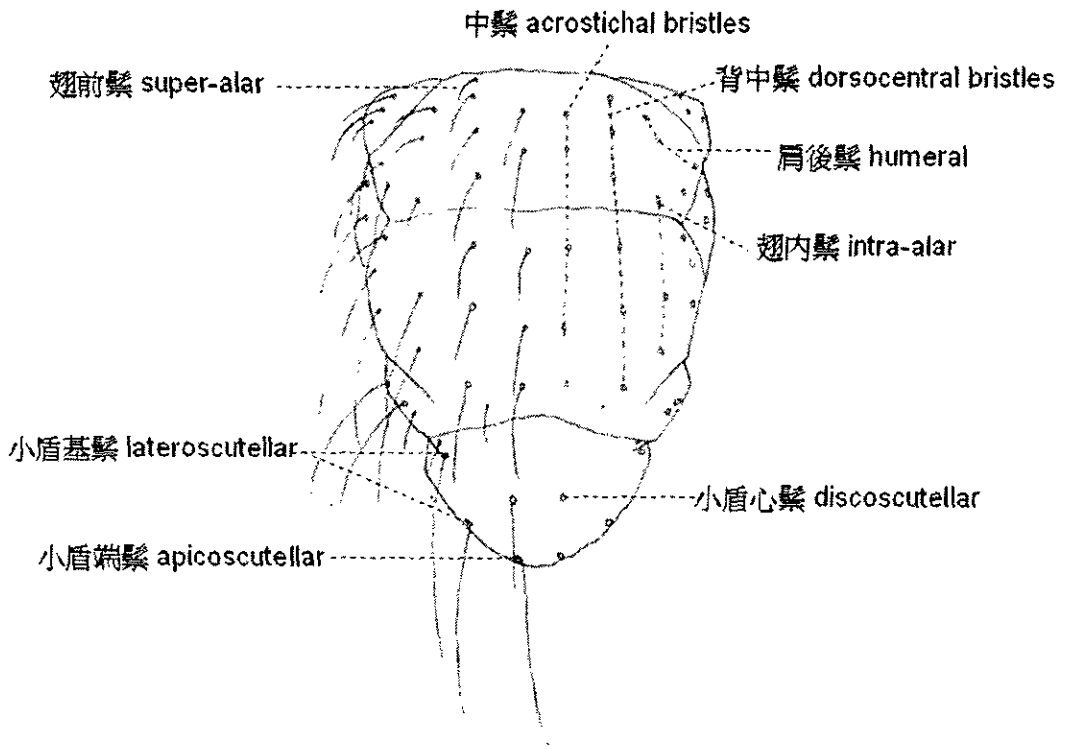
圖、麗蠅成蟲頭部側面各部特徵

(2.) 胸部 (Thorax)

胸部的分類特徵主要為前胸背板和中胸背板上的鬃位 (bristle position) 數，後背中鬃 (postscutal dorsocentral setae) 如果為 3 個鬃位，則大多均很發達，如為 4—5 個鬃位，則前方的往往較弱而不易觀察；前中鬃 (prescutal acrostical setae) 列間距的寬窄可作為屬或種的特徵。胸小盾片上的小盾鬃 (scutellar seta) 如簡記為 1:3，表示小盾端鬃 (discal scutellar seta) 1 對，小盾緣鬃 (marginall scutellar seta) 3 對，通常是指小盾基鬃 (basal scutellar seta)、小盾側鬃 (lateral scutellar seta)、小盾端鬃 (apical scutellar seta) 各一對組成，此外，小盾端鬃是否交會也是個重要的特徵。翅基部有一膜質構造，稱為腋瓣 (calypter)，腋瓣膜質部的顏色和其上是否覆有微毛等均為屬級特徵；腋瓣邊緣著生有兩簇重要的剛毛，稱為腋瓣上剛毛簇 (anterior tuft

of suprasqumal ridge) 與腋瓣下剛毛簇 (posterior tuft of suprasqumal ridge)，這些毛簇雖不易觀察，但非常重要，是屬或族徵。

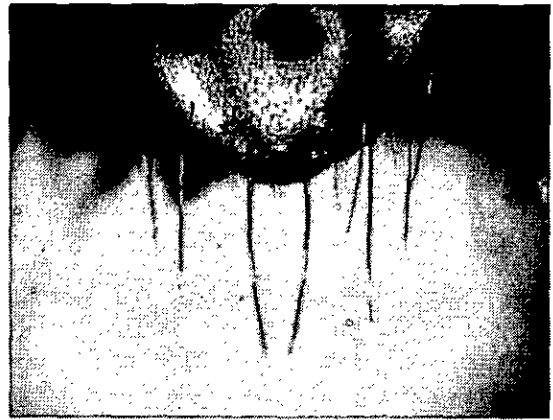
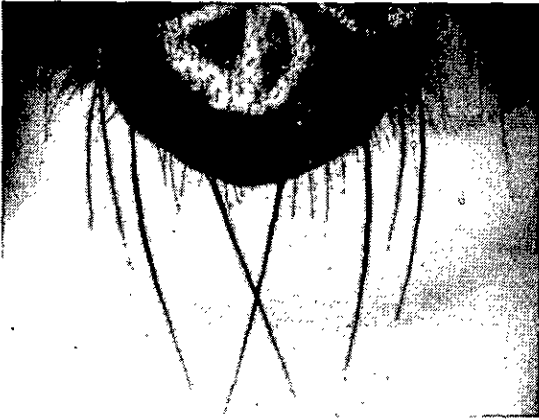
一般人對麗蠅的印象就是有著肥大身軀，帶著綠、藍、紫等金屬光澤的中大型蒼蠅；可是，有些麗蠅並不具有金屬光澤，反而跟同為姊妹群的肉蠅科形態非常類似，這時，可以觀察胸背板上的一列毛列之數目來分辨，具有兩根剛毛者為麗蠅，具有四根者則為肉蠅。



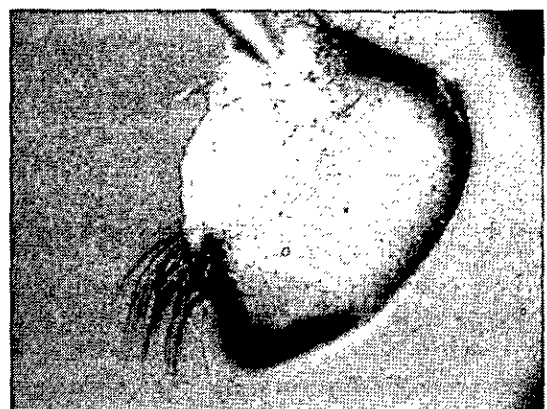
圖、麗蠅成蟲胸部各鬃毛列



圖、左圖為綠蠅屬的紫綠蠅 (*Lucilia porohyrina*) 之胸背版，可見鬃毛列相當發達；右圖為大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)，鬃毛列不發達。



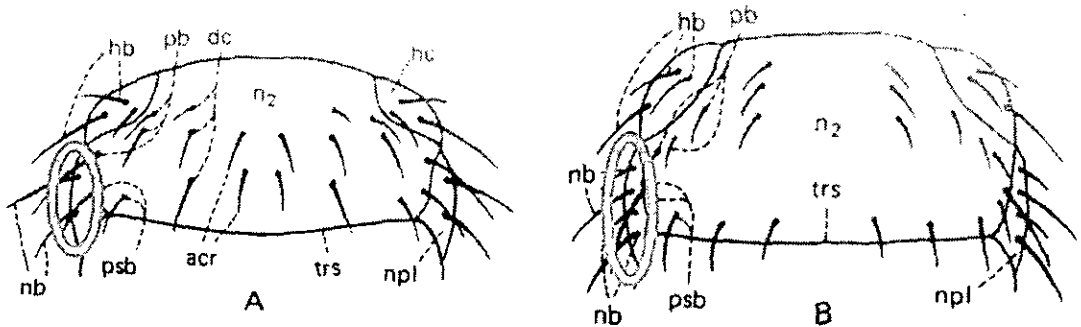
圖、左圖為紫綠蠅 (*Lucilia porohyrina*) 的胸小盾片，小盾端鬃彼此交會；右圖中的紅顏金蠅 (*Chrysomya rufifacies*) 則無此現象。



圖、腋瓣；左圖為大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)，腋瓣呈土黃色，上滿佈微毛；右圖為紅顏金蠅 (*Chrysomya rufifacies*)，腋瓣為白色、無毛。



圖、腋瓣上、下剛毛簇；左圖為紅顏金蠅 (*Chrysomya rufifacies*)，不具腋瓣上、下剛毛簇；右圖為紫綠蠅 (*Lucilia porohyrina*)，箭頭處可看到此兩簇剛毛。



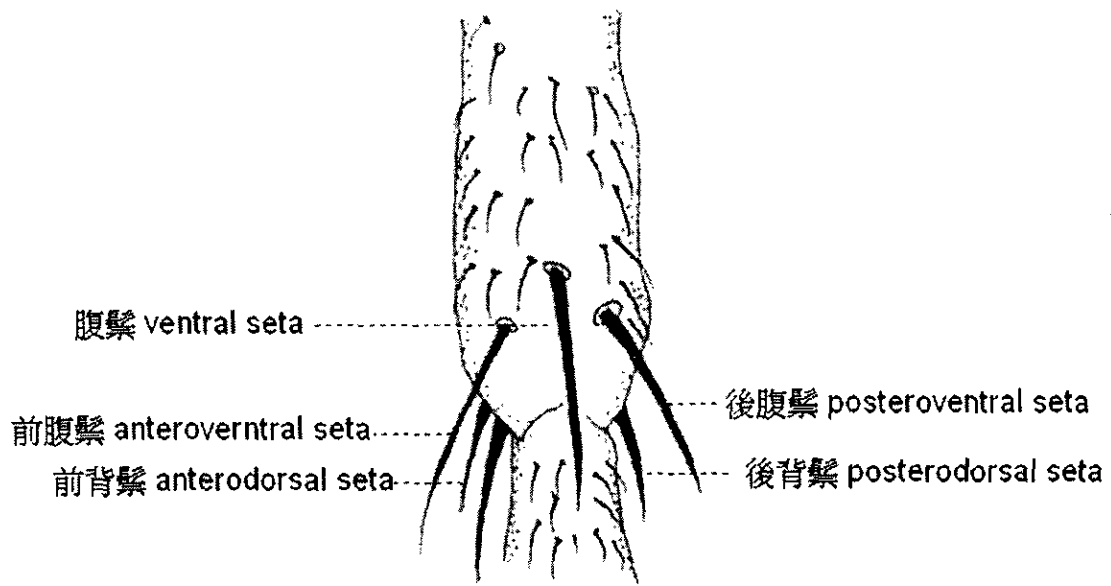
圖、麗蠅 (A) 此處有兩根剛毛，肉蠅 (B) 則具四根。(據 Borror et al., 1989)

(4.) 足 (Leg)

足部分類特徵主要是看各鬃毛的有無和排列，鬃序簡記時按前腹鬃 (anteroverntal seta)

(可含腹鬃 ventral seta)、前背鬃 (anterodorsal seta)、後背鬃 (posterodorsal seta)、後腹鬃

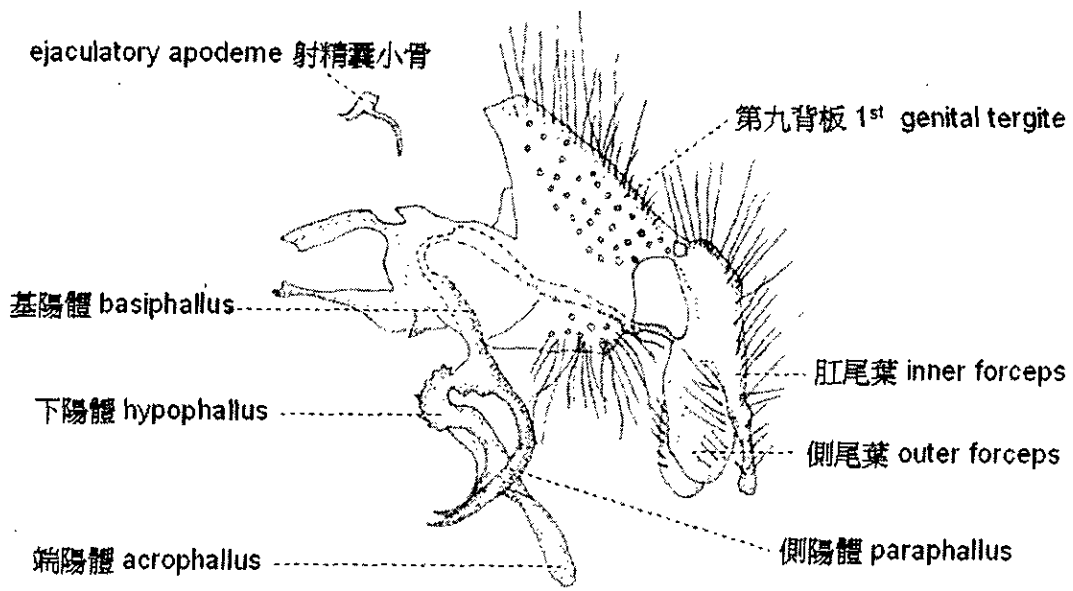
(posteroventral seta) 順序排列記數。



圖、成蟲足部各鬃毛。

(5) 雄性外生殖器 (male terminalia)

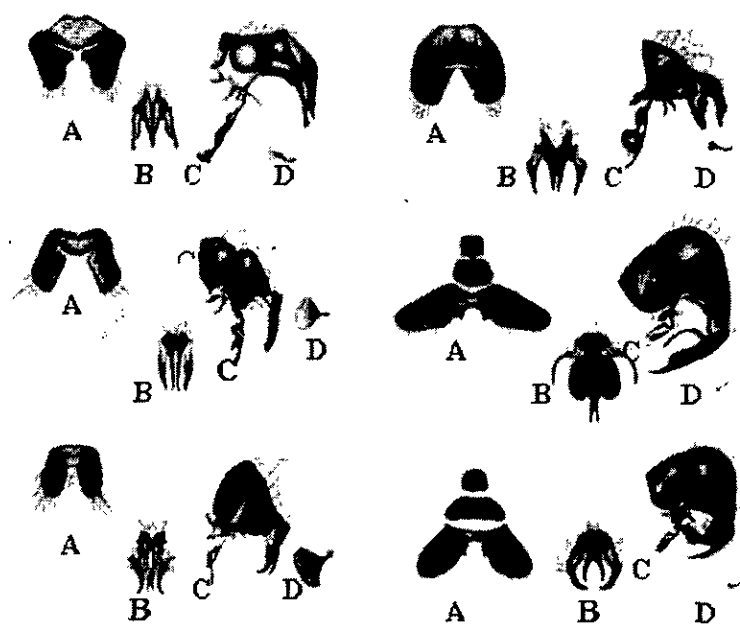
麗蠅的雄性外生殖器分為兩部分—陽體 (phallosome) 和把握器；把握器由一片肛尾葉 (inner forceps) 和兩片側尾葉 (outer forceps) 組成，陰莖則是由射精囊小骨 (ejaculatory apodeme)、陰莖內骨、基陽體(basiphallus)、側陽體 (paraphallus)、下陽體 (hypophallus) 和端陽體 (acrophallus)所組成；其中端陽體和側陽體的比例、側陽體彎入的角度、下陽體和側陽體組成的空腔形狀與下陽體腹面的角度都是重要的分類特徵。而解剖雄性外生殖器時主要是看最後一片(第五)腹板 (5th sternite) 的形狀、把握器形狀、陰莖樣式、射精骨的形狀等；在兩種麗蠅間，要以上的各構造均相似是不可能的，這也是為何雄性外生殖器一直為麗蠅科最重要的分類特徵。



圖、麗蠅雄性外生殖器側面之各部構造。



圖、肥軀金蠅 (*Chrysomya pinguis*) 的雄性外生殖器側面觀。



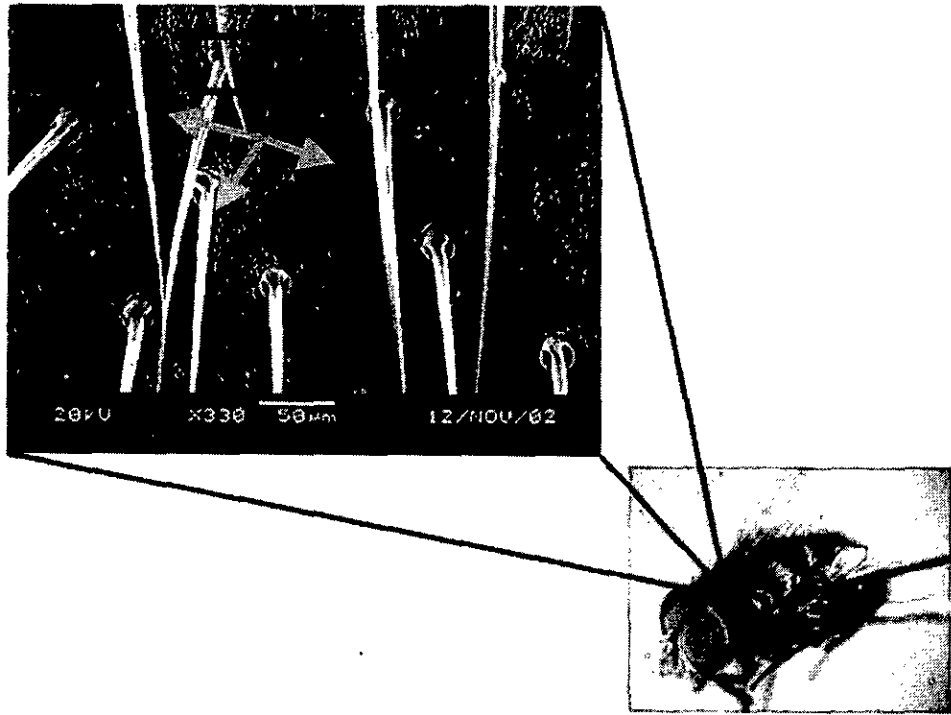
圖、八種麗蠅之雄性外生殖器比較。靠觀察最後一節腹板 (A)、把握器 (B)、陰莖 (C)、射精骨 (D) 即可分辨出大部分麗蠅種類的異同。(據 Kano & Shinonaga, 1968)

(三) 超微形態特徵

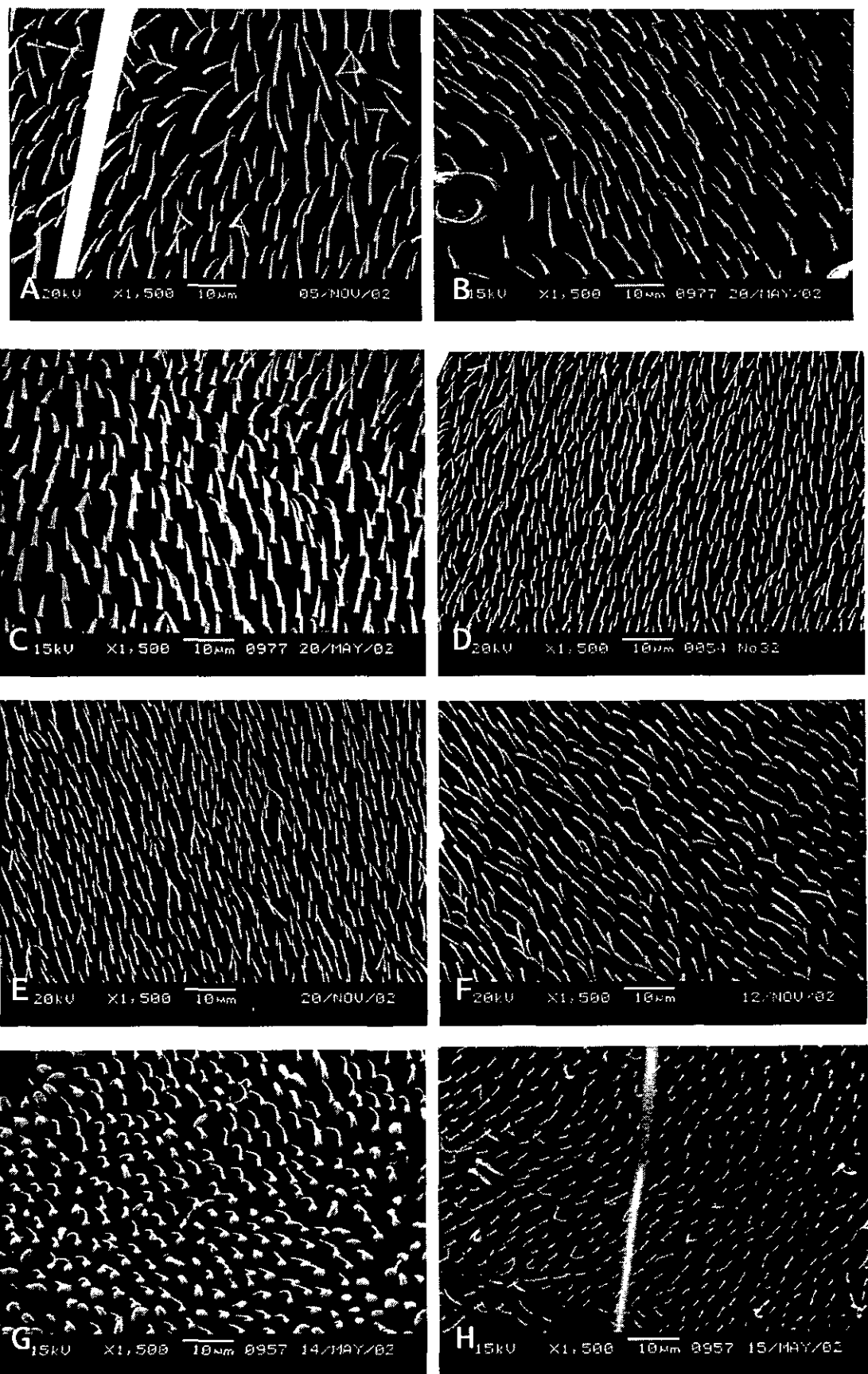
(1) 成蟲前胸背版

將麗蠅成蟲之前胸背板以電子顯微鏡放大至 300 倍以上，可以看到兩個新的超微形態特徵，就是整片密佈在背板上的微毛，與前胸背板上剛毛基部之絲狀的構造。把圖中框起來的部分放大到 1000 倍以上，即可看到前胸背板微毛列式 (thoracic micro-chaetotaxy)，比較各種麗蠅的前胸背板為毛列式，可以發現各個種類間微毛的長度、密度，甚至形狀都有明顯的差異；把各種之長度、密度加以記錄並統計、量化，可得到每種的長度與密度範圍，並能加以利用到辨別種類上，可望成為一好用之特徵。

胸背板基部的特殊構造，在不同種類間的形狀、數目均具有明顯的差異，在同種間不論公母卻很一致且穩定，而且不需經過額外的量化，可以快速的辨別種類。



圖、330 倍之麗蠅前胸背板；框起來處為前胸背板微毛列式，胸背板剛毛基部特殊構造則為箭頭所指處。



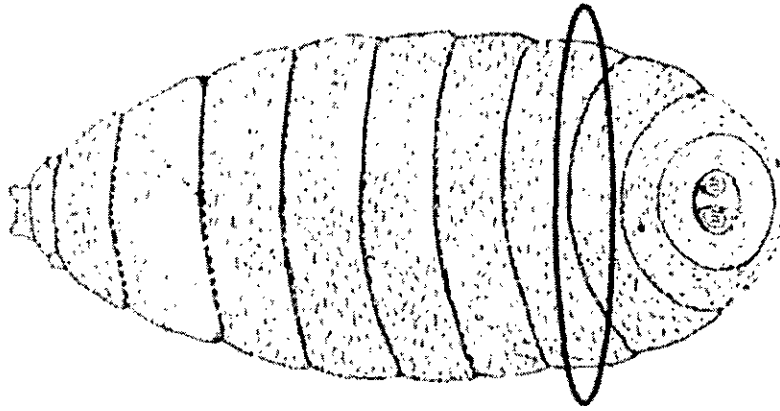
圖、前胸背板微毛列式； A.大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)， B.肥軀金蠅 (*C. pinguis*)， C.紅顏金蠅 (*C. rufifacies*)， D.瘦葉帶綠蠅 (*Hemipyrellia ligurriens*)， E.胖葉帶綠蠅 (*H. pulchra*)， F.銅綠蠅 (*Lucilia cuprina*)， G.巴布亞綠蠅(*L. papuensis*)， H. 紫綠蠅 (*L. porphyrina*)。



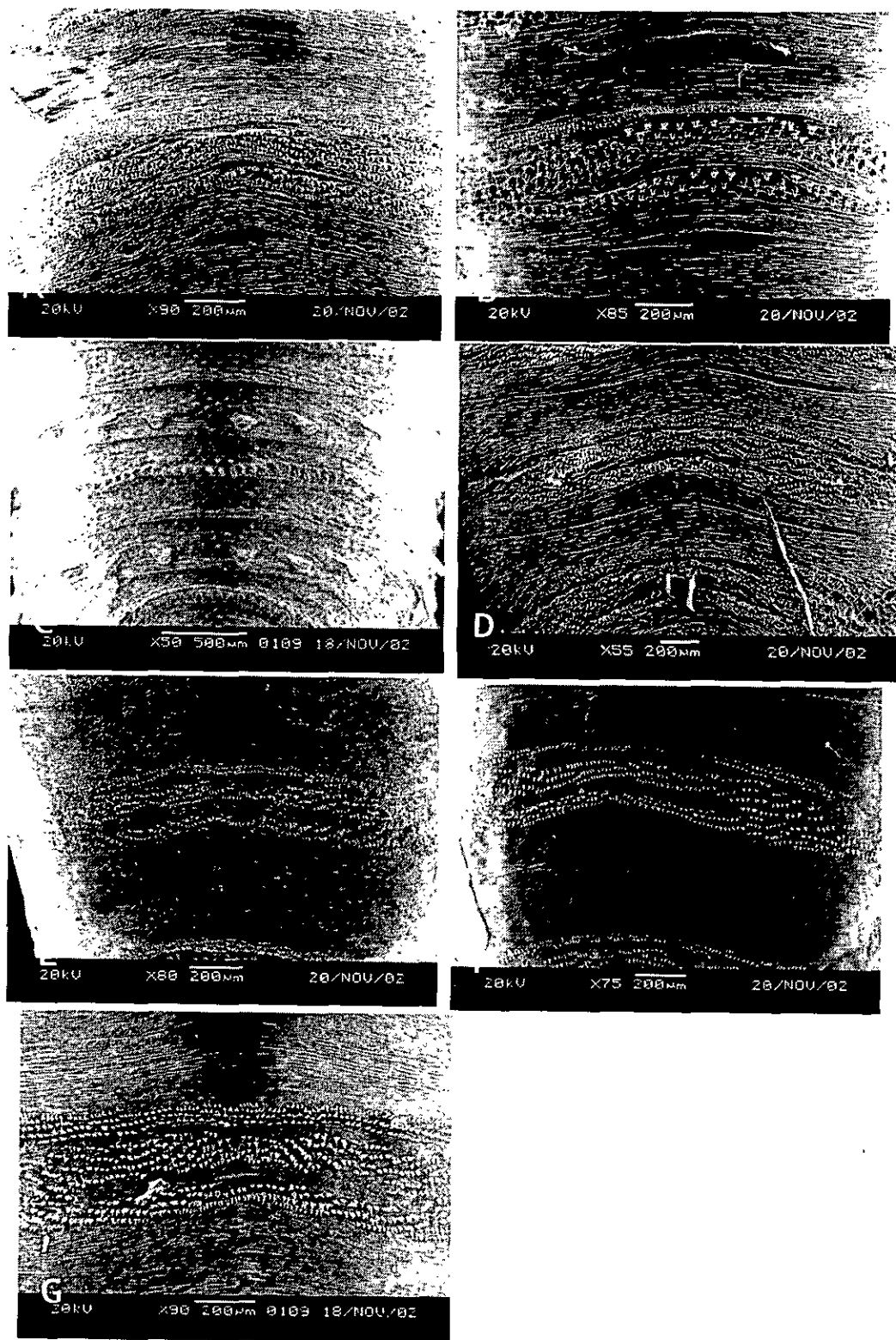
圖、胸背板剛毛基部特殊構造；A.大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)， B.肥軀金蠅 (*C. pinguis*)， C.紅顏金蠅 (*C. rufifacies*)， D.瘦葉帶綠蠅 (*Hemipyrellia ligurriens*)， E.胖葉帶綠蠅 (*H. pulchra*)， F.銅綠蠅 (*Lucilia cuprina*)， G. 紫綠蠅 (*L. porphyrina*)， H.印度綠蠅 (*Caiuca indica*)。

(2) 蛹殼上第五六腹節節間腹面突起

本來是三齡幼蟲的特徵，可是三齡幼蟲在解剖顯微鏡下並不能清楚照出明顯特徵，且由於麗蠅幼蟲體內脂肪和未消化的食物很多，造成脫水上的困難而不易以電子顯微鏡觀察；由於終齡幼蟲表皮上的特徵會遺留在蛹殼上，於是使用電子顯微鏡觀察蛹殼上第五六腹節節間腹面突起，發現此一突起之形狀、密度和每一點刻之大小在種間均有差異。



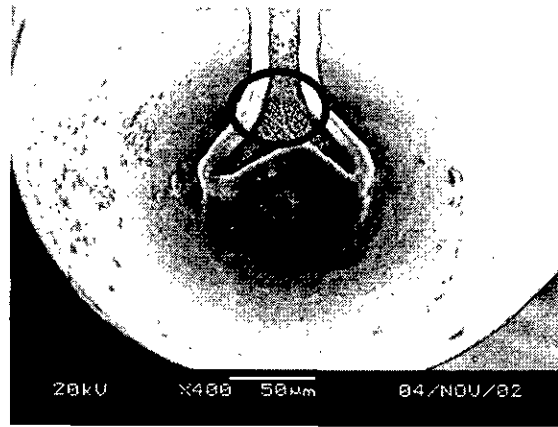
圖、麗蠅的蛹與幼蟲分節一樣，均為（由左至右），頭一節，胸三節與腹部10節；圈起來的部分為蛹殼上第五六腹節節間腹面突起。(范等, 1997)



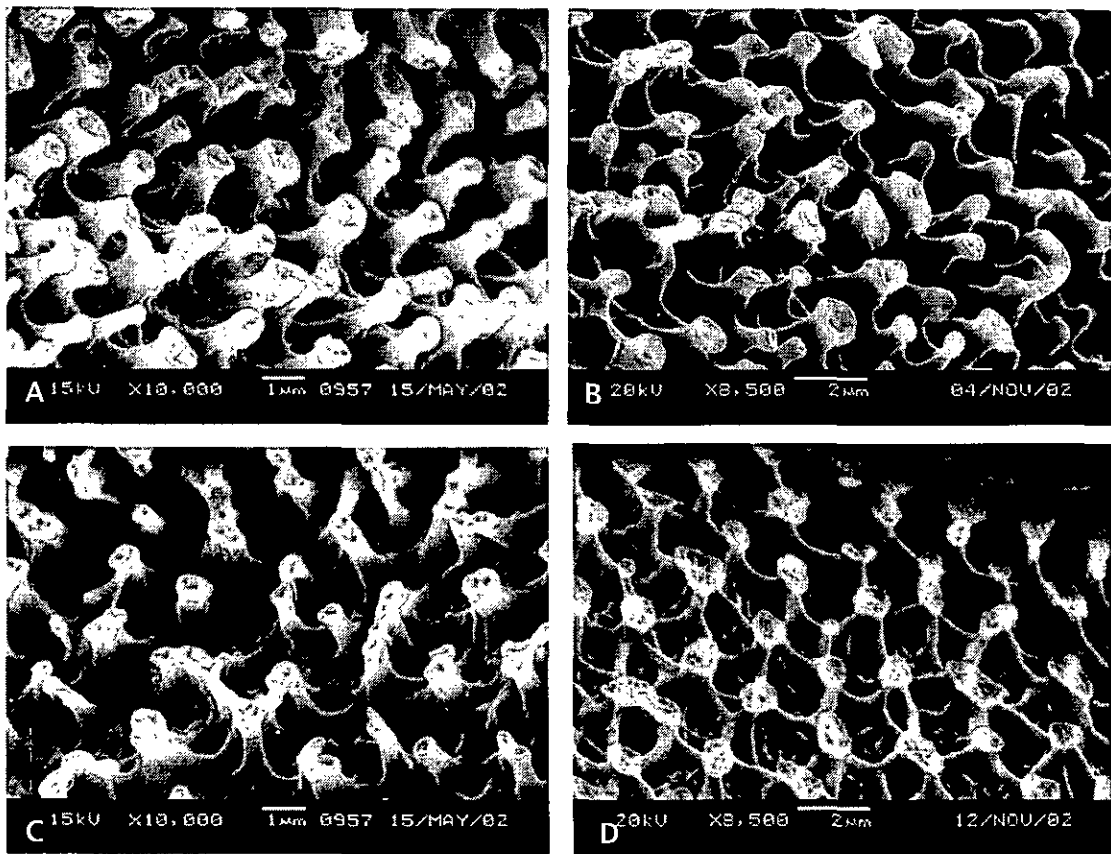
圖、蛹殼上第五六腹節節間腹面突起；A.大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)，B.肥軀金蠅 (*C. pinguis*)，C.紅顏金蠅 (*C. rufifacies*)，D.瘦葉帶綠蠅 (*Hemipyrellia ligurriens*)，E.胖葉帶綠蠅 (*H. pulchra*)，F.銅綠蠅 (*Lucilia cuprina*)，G.紫綠蠅 (*L. porphyrina*)。

(3) 卵裂中之杯狀組織 (plastron)

卵的一端有一開口，稱為卵門，幼蟲即由卵門孵化而出；卵門上有一條裂縫，稱做卵裂，將卵裂中放大到 1000 倍，即可看到杯狀組織。



圖、卵門與其上的卵裂；將圈起處放大 1000 倍即可看到杯狀組織。



圖、卵裂中之杯狀組織； A.大頭金蠅 (*Chrysomya megacephala*)， B.肥軀金蠅 (*C. pinguis*)， C.紅顏金蠅 (*C. rufifacies*)， D.瘦葉帶綠蠅 (*Hemipyrellia ligurriens*)。

四、分子分類

(一) 基因組 DNA 萃取及 PCR 增幅反應

取大台北地區進行陷阱誘捕所採集得之六種麗蠅(大頭金蠅、紅顏金蠅、肥軀金蠅、銅綠蠅、紫綠蠅及瘦葉帶綠蠅)進行粒線體 DNA 之分析。萃取成蟲不同分節之基因組 DNA，以自行設計之 CCOI-F/CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，結果如圖所示。由成蟲頭部、胸部(不包括翅及足)、雙翅、六足及腹部所萃取得之基因組 DNA 進行 PCR 增幅反應，其中大頭金蠅、紅顏金蠅、肥軀金蠅、紫綠蠅、銅綠蠅及瘦葉帶綠蠅之雄性成蟲不論於頭部、胸部、雙翅、六足及腹部均可增幅出預期之 1588 bp 之片段，且大頭金蠅、紅顏金蠅、肥軀金蠅及紫綠蠅之雌成蟲亦可增幅出預期之 1588 bp 大小之片段，顯示麗蠅各個不同分節、不同性別均可進行 DNA 分析，且所得結果相當穩定，因此利用 DNA 分析方法可適用於鑑定目前尚無法利用傳統形態特徵進行種類鑑定之雌成蟲。

取已建立實驗室內飼養族群之大頭金蠅、紅顏金蠅、肥軀金蠅及紫綠蠅進行幼蟲期之粒線體 DNA 檢測，萃取整粒卵、一齡、二齡、三齡幼蟲、蛹、蛹殼之基因組 DNA，以 CCOI-F、CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，所得之結果如圖四所示。由圖可看出，大頭金蠅、紅顏金蠅、肥軀金蠅及紫綠蠅單粒卵、單隻一齡、二齡、三齡幼蟲、蛹及蛹殼萃取之 DNA 均可增幅出預期之 1588 bp 片段大小之 PCR 產物，與成蟲所增幅出之片段大小相符，因此以 DNA 方式進行麗蠅幼蟲的種類鑑定是可行的，且當傳統形態分類方法難以區辨或無法鑑定種類時，利用此分子方式可提供一個快速且準確的輔助方法。

取實驗室內飼養之大頭金蠅雄成蟲予以分為不同分節，及單粒卵、一齡幼蟲、二齡幼蟲、三齡幼蟲一日齡各一隻、蛹及蛹殼，萃取基因組 DNA 並以 TE buffer 進行二倍連續稀釋後以

CCOI-F/CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應。由雄成蟲頭部、胸部、單翅、雙翅、單足、雙足、三足、四足、五足、六足、腹部所萃取之 DNA 均可增幅出預期之 1588 bp 大小之片段，可進行 PCR 增幅反應的 DNA 最大稀釋倍數分別為 2^{17} 、 2^{17} 、 2^{10} 、 2^8 、 2^{12} 、 2^{11} 、 2^{15} 、 2^{12} 、 2^{11} 、 2^{15} 、 2^{16} ，以核酸濃度測定儀測定原始溶液之 DNA 濃度分別為 207.6、377.1、115.1、42.8、34.2、181.0、173.9、54.6、70.3、83.5 與 389.7 ng / λ ，換算可供 PCR 反應之最低 DNA 濃度分別為 0.0016、0.0029、0.1124、0.1672、0.0084、0.0884、0.0053、0.0133、0.0343、0.0025、0.0059 ng / λ ，而 DNA 總量分別為 16608、56565、3453、3424、1026、5430、5217、4368、5624、6680、58455 ng，以胸、腹部可萃取之 DNA 總量最多，而單翅、單足亦可進行 PCR 增幅反應以進行 DNA 分析。

單粒卵、一齡幼蟲、二齡幼蟲、三齡幼蟲、蛹及蛹殼所萃取之 DNA 均可增幅出預期之 1588 bp 大小之片段，可進行 PCR 增幅反應的最大稀釋倍數分別為 2^0 、 2^2 、 2^5 、 2^5 、 2^{10} 、 2^0 ，以核酸濃度測定儀測定原始溶液之 DNA 濃度分別為 26.5、14.9、18.1、235.6、393.3 與 91.9 ng / λ ，換算可供 PCR 反應之最低濃度分別為 26.5、3.725、0.5656、7.3625、0.3841、91.9 ng / λ ，而 DNA 總量則分別為 1325、745、905、42408、70794 及 1838 ng，因此利用 DNA 分析方法亦可做為難以分辨種類之卵期及一齡幼蟲一個快速的鑑定方法。

取不同方法保存之麗蠅進行基因組 DNA 之萃取，以核酸濃度測定儀分析所萃取之 DNA 濃度及總量，結果如表五所列，以乾燥方法保存 14 年、12 年、1 年及三個月之大頭金蠅，以 phenol / chloroform 法進行基因組 DNA 萃取所得總量分別為 22447、7338、20719、48598 ng，約為新鮮樣本之 15.83、5.18、16.62、34.28 %，保存時間越短，即樣本越新鮮，所能萃取之 DNA 總量越多，而其中大部分以腹部可萃取之 DNA 總量最多，胸部次之，頭部第三，

但因標本狀況及 DNA 萃取操作上之誤差，使萃取之 DNA 總量有所差異。以酒精浸泡保存 9 年及 1.5 年之肥軀金蠅與大頭金蠅，所能萃取之 DNA 總量分別為 13622、26102 ng，約為新鮮樣本之 9.61、18.41%，以頭部、胸部及腹部可萃取之 DNA 總量最多。

(二) 麗蠅粒線體 DNA 細胞色素氧化酶次單元一 (Cytochrome c Oxidase subunit I, COI) 之序列分析

利用自行製作之陷阱於大台北地區進行誘捕而採集得之具法醫重要性麗蠅共六種：大頭金蠅、紅顏金蠅、肥軀金蠅、銅綠蠅、紫綠蠅及瘦葉帶綠蠅，取其頭部進行基因組 DNA 萃取後，以自行設計之引子對 CCOI-F、CCOI-R 分別進行 PCR 增幅反應，所得之 PCR 產物進行純化後與質體進行接合，轉殖入大腸桿菌勝任細胞 TOP10，進行大量複製，選取轉殖成功之大腸桿菌，萃取菌體內的質體並送交生技公司進行定序，將定序完成之序列仔細確認後登錄於 GenBank 上，登錄序號分別為大頭金蠅—AY092761、紅顏金蠅—AY092760、肥軀金蠅—AY092759、銅綠蠅—AY097335、紫綠蠅—AY097336 及瘦葉帶綠蠅—AY097334，序列如附錄一至六所列，其中大頭金蠅、紅顏金蠅及紫綠蠅已有美國學者登錄當地族群之序列，台灣地區之族群序列可提供後續進行序列分析之參考；銅綠蠅為首次登錄之完整 COI 片段，肥軀金蠅及瘦葉帶綠蠅則為首次登錄之 DNA 序列資料。

將定序完成之六種麗蠅 COI 片段序列以軟體 DNASTAR、GeneDoc version 2.6.002 進行序列排序及分析，同時加入採集自出雲山之海南綠蠅 (*L. hainanensis*) 及南嶺綠蠅 (*L. bazini*)，及基因庫內已登錄之大頭金蠅、紅顏金蠅及紫綠蠅美國族群的序列，由序列之相似度可發現大頭金蠅台灣及美國族群序列相似度高達 97%，而紅顏金蠅及紫綠蠅則同樣高達 97%，大頭金蠅與肥軀金蠅相似度則高達 95% 以上，而外型亦極為相似之海南綠蠅及南嶺綠蠅

粒線體 DNA COI 區域之序列相似度高達 94%，顯示分子資料與形態資料是互相吻合的。將所得之序列資料輸入 MacClade 建立資料矩陣，並以 PAUP* 進行親緣關係分析，以果蠅 *Drosophila yakuba* 做為外群，以最簡約法則及最大概似度準則分別進行啟發式 (heuristic) 搜尋，並以 bootstrap 方法重複 1000 次所得之值做為評估所得之各群組關係之支持度。如圖十一所示，由最簡約法則及最大概似度準則所得之親緣關係樹之樹型相同，列於分支之上的數字為以最大概似度準則所得之 bootstrap 值，普遍高於 50，且多高達 95 以上，顯示各群組關係支持度高；由此樹型圖亦可發現，金蠅屬被歸為同一群，而綠蠅屬（包括帶綠蠅屬）則被歸為另一群，美國及台北兩地族群之大頭金蠅、紅顏金蠅及紫綠蠅之群組關係並不因地理差異而有所變更，顯示此細胞色素氧化酶次單元一之區域為高度保守區，若將其應用作為研究不同地區族群之遺傳差異可能較不適合。

由所得之樹型圖亦可發現，大頭金蠅、肥軀金蠅被歸為同一群，與傳統形態所得之結果相符；同樣的海南綠蠅與南嶺綠蠅亦出現相同的結果，顯示以粒線體 DNA COI 區域之分子標示方法所得之親緣關係可驗證以傳統形態特徵方法所得之結果，彼此間並無相互違背，因此分子資料與表現型之形態特徵結果是可以相輔相成的。

（三）專一性引子對設計及分子檢索表建立

將定序完成之大台北地區具法醫重要性麗蠅 COI 片段以軟體 DNASTAR 及 GeneDoc 進行序列排序，由所得之結果選取針對各種類之特異性片段進行專一性引子的設計，共獲取六組專一性引子，針對金蠅屬的為 Chr-S89F，針對紅顏金蠅的為 Cr-S102F，針對肥軀金蠅 Cp-S491F，針對銅綠蠅及瘦葉帶綠蠅的為 Lc/Hl-S398F，針對瘦葉帶綠蠅的為 Hl-S355R，針對紫綠蠅的為 Lpo-S1228F，以 Chr-S89F、Cr-S102F、Cp-S491F、Lc/Hl-S398F、Lpo-S1228F 作

為正向引子，配合 CCOI-R 作為反向引子，及以 CCOI-F 作為正向引子，HI-S355R 作為反向引子分別進行 PCR 增幅反應，所得之 PCR 產物進行電泳分析以確認所設計之專一性引子可實際應用於種類鑑定之用。由圖可看出，使用 Chr-S89F/CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，可將金蠅屬麗蠅（大頭金蠅、紅顏金蠅、肥軀金蠅，Lane 1-3）先區別出來，而增幅出之片段大小約為 1500 bp，與預期之片段大小相符；為使用 Cp-S491F/CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，經電泳分析發現只有肥軀金蠅出現預期約 1100 bp 大小之片段，同時若使用 Cr-S102F/ CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，亦可發現只有紅顏金蠅可增幅出 PCR 產物，其大小約為 1400 bp，亦與預期之大小相符；使用 Lpo-S1228F/ CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，發現只有紫綠蠅可增幅出預期 300 bp 左右之片段；使用 Lc/HI-S398F/CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，則可增幅出銅綠蠅及瘦葉帶綠蠅兩種，PCR 產物約為 1200 bp，與預期相符。

由所設計之專一性引子對進行六種具法醫重要性麗蠅之種類鑑定，可整理出一套分子檢索表，亦即萃取其基因組 DNA 後，以 PCR 增幅反應為基礎，再以電泳分析進行檢測。將未知種麗蠅之基因組 DNA 以 Chr-S89F/CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應並以電泳方式檢測，若有出現約 1500 bp 大小之片段，即為金蠅屬麗蠅，若沒有，則非金蠅屬麗蠅；將金蠅屬麗蠅分別使用 Cr-S102F/CCOI-R 及 Cp-S491F/CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，若可增幅出 1400 或 1100 bp 大小之片段，則分別為紅顏金蠅及肥軀金蠅，若均無法增幅出預期大小之片段，則為大頭金蠅；非金蠅屬之麗蠅，使用 Lc/HI-S398F/CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，若可增幅出預期之 1100 bp 大小之片段，則為銅綠蠅或瘦葉帶綠蠅，反之，則不是這兩個種類，使用 Lpo-S1228F/CCOI-R 引子對進行 PCR 增幅反應，若有出現預期之 300 bp 大

小之片段，則證實此種麗蠅為紫綠蠅，若無，則為海南綠蠅或南嶺綠蠅，藉以此種引子對之分子檢索表進行麗蠅之種類鑑定，可得到快速易辨之鑑定方法，因只需檢測電泳結果有、或沒有 PCR 產物，即可得知結果，有別於傳統以 RAPD 或 RFLP 等分子標示方法進行昆蟲種類之快速鑑定時，需經由對照圖譜才可進行分析，在學習及操作上均簡化且容易許多。

Table. The genomic DNA contents and the minimum concentrations for PCR reaction from different immature stages and different segments of male adults of *Chrysomya megacephala*

Immature stages or body segments	Original DNA const. (ng / λ)	Highest dilution n	Minimum DNA const. for PCR (ng / λ)	Total DNA amount (ng)	Ratio (A260/A280)
eggs	26.5	2 ⁰	26.500	1325	1.273
1 st larvae	14.9	2 ²	3.7250	745	1.100
2 nd larvae	18.1	2 ⁵	0.5656	905	1.181
3 rd larvae	235.6	2 ⁵	7.3625	42408	1.823
pupae	393.3	2 ¹⁰	0.3841	70794	1.398
puparium	91.9	2 ⁰	91.900	1838	1.356
Male head	207.6	2 ¹⁷	0.0016	16608	1.743
Male thorax	377.1	2 ¹⁷	0.0029	56565	1.636
1 male wing	115.1	2 ¹⁰	0.1124	3453	1.182
2 male wings	42.8	2 ⁸	0.1672	3424	1.042
1 male leg	34.2	2 ¹²	0.0084	1026	1.119
2 male legs	181.0	2 ¹¹	0.0884	5430	1.616
3 male legs	173.9	2 ¹⁵	0.0053	5217	1.522
4 male legs	54.6	2 ¹²	0.0133	4368	1.543
5 male legs	70.3	2 ¹¹	0.0343	5624	1.670
6 male legs	83.5	2 ¹⁵	0.0025	6680	1.626
Male abdomen	389.7	2 ¹⁶	0.0059	58455	1.409

Table. The genomic DNA contents from different segments of blow fly adults which preserved by different methods

Species	Segments	Date (yy/mm/dd)	Preservation methods	DNA total amount (ng)	Ratio A260/A280
<i>Chrysomya megacephala</i>	head	2002/05/14	fresh	16608	1.743
	thorax		fresh	56565	1.636
	2 wings		fresh	3453	1.182
	6 legs		fresh	6680	1.626
	abdomen		fresh	58455	1.409
				total : 141761	
<i>C. megacephala</i>	head	1988/03/17	dried	3573	1.430
	thorax		dried	3795	1.299
	2 wings		dried	1486	1.026
	6 legs		dried	1995	1.208
	abdomen		dried	11598	1.346
				total : 22447	
<i>C. megacephala</i>	head	1990/12/12	dried	1258	1.061
	thorax		dried	1899	1.235
	2 wings		dried	1243	0.903
	6 legs		dried	1345	0.918
	abdomen		dried	1593	1.133
				total : 7338	
<i>C. pinguis</i>	head	1993/04/21	95% ETOH	633	0.866
	thorax		95% ETOH	8808	1.412
	2 wings		95% ETOH	484	0.939
	6 legs		95% ETOH	643	0.925
	abdomen		95% ETOH	3054	1.210
				total : 13622	

(to be continued)

Table . (continued)

Species	segments	Date (yy/mm/ dd)	Preserv ation methods	DNA total amount (ng)	Ratio A260 /A280
<i>C. megacephala</i>	head	2000/10 /30	95% ETOH	7488	1.641
	thorax		95% ETOH	2268	1.130
	2 wings		95% ETOH	36	0.450
	6 legs		95% ETOH	1150	0.944
	abdomen		95% ETOH	15160	1.525
				total : 26102	
<i>C. megacephala</i>	head	2001/06 /17	dried	533	1.574
	thorax		dried	7784	1.537
	2 wings		dried	175	1.455
	6 legs		dried	485	1.065
	abdomen		dried	11742	1.327
				total : 20719	
<i>C. megacephala</i>	head	2002/02 /17	dried	6520	1.357
	thorax		dried	18120	1.713
	2 wings		dried	2104	1.160
	6 legs		dried	1310	1.499
	abdomen		dried	20544	1.336
				total : 48598	

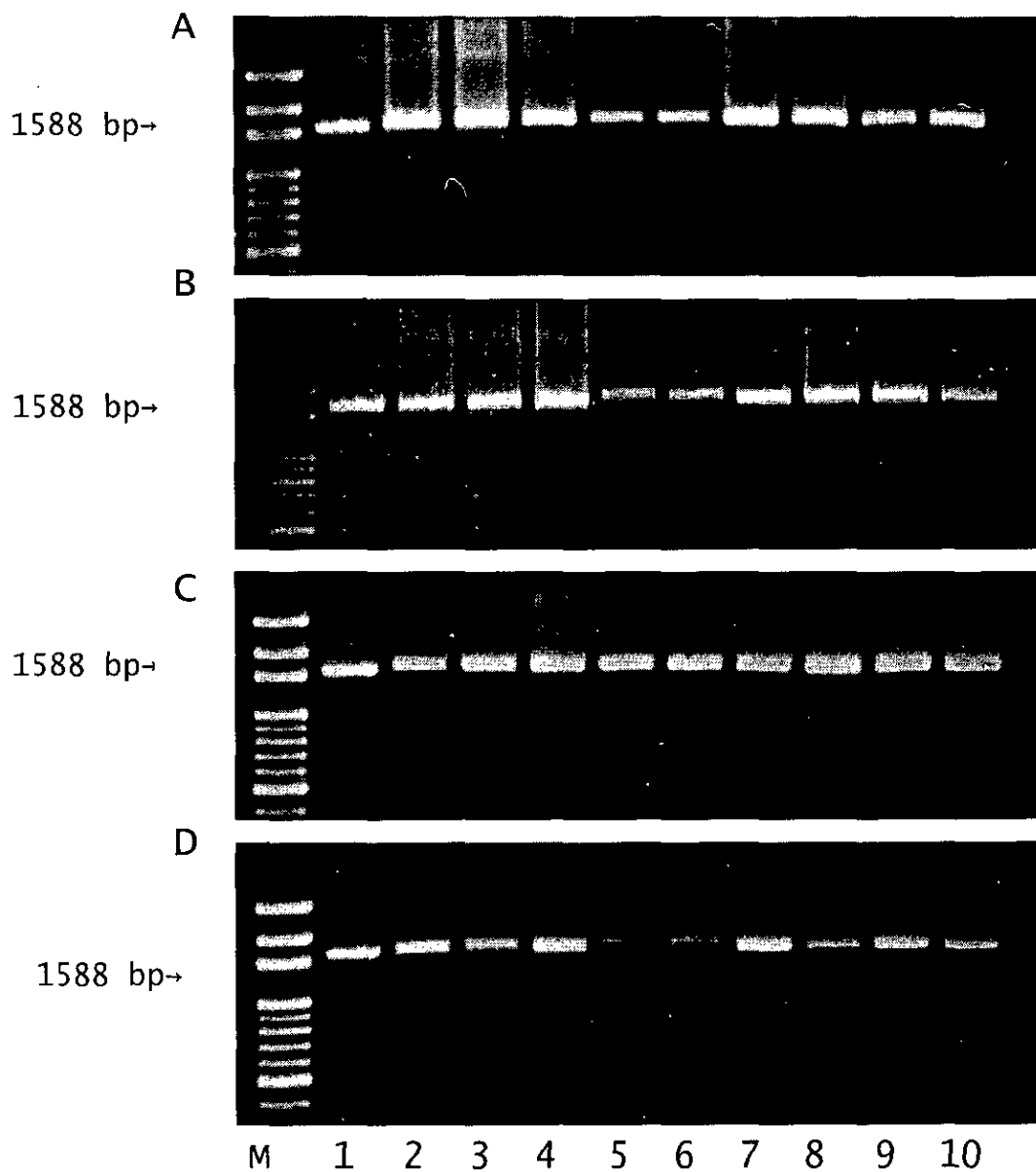


Fig. PCR products amplified from adults of *Chrysomya megacephala* (A), *C. rufifacies* (B), *C. pinguis* (C) and *Lucilia porphyrina* (D) by using CCOI-F/ CCOI-R primer pair. M: 100 bp DNA ladder. Lane 1, 3, 5, 7, 9: males; 2, 4, 6, 8, 10: females. 1-2: head; 3-4: thorax; 5-6: two wings; 7-8: six legs; 9-10: abdomen.

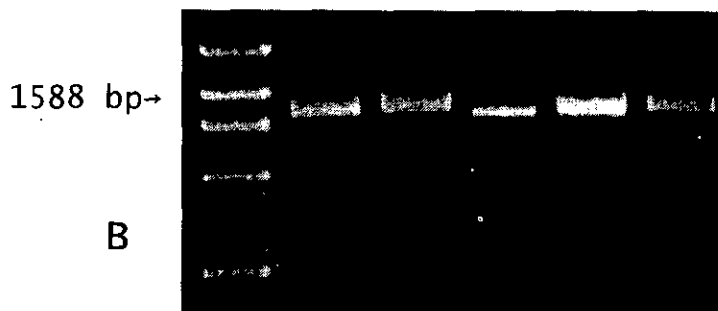
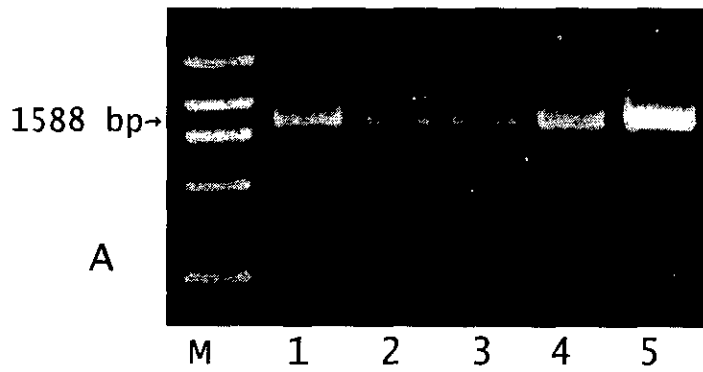


Fig. PCR products amplified from male adults of *L. cuprina* (A) and *Hemipyrellia ligurriens* (B) by using CCOI-F/CCOI-R primer pair. M: 100 bp DNA ladder. Lane 1-5: head, thorax, two wings, six legs, and abdomen.

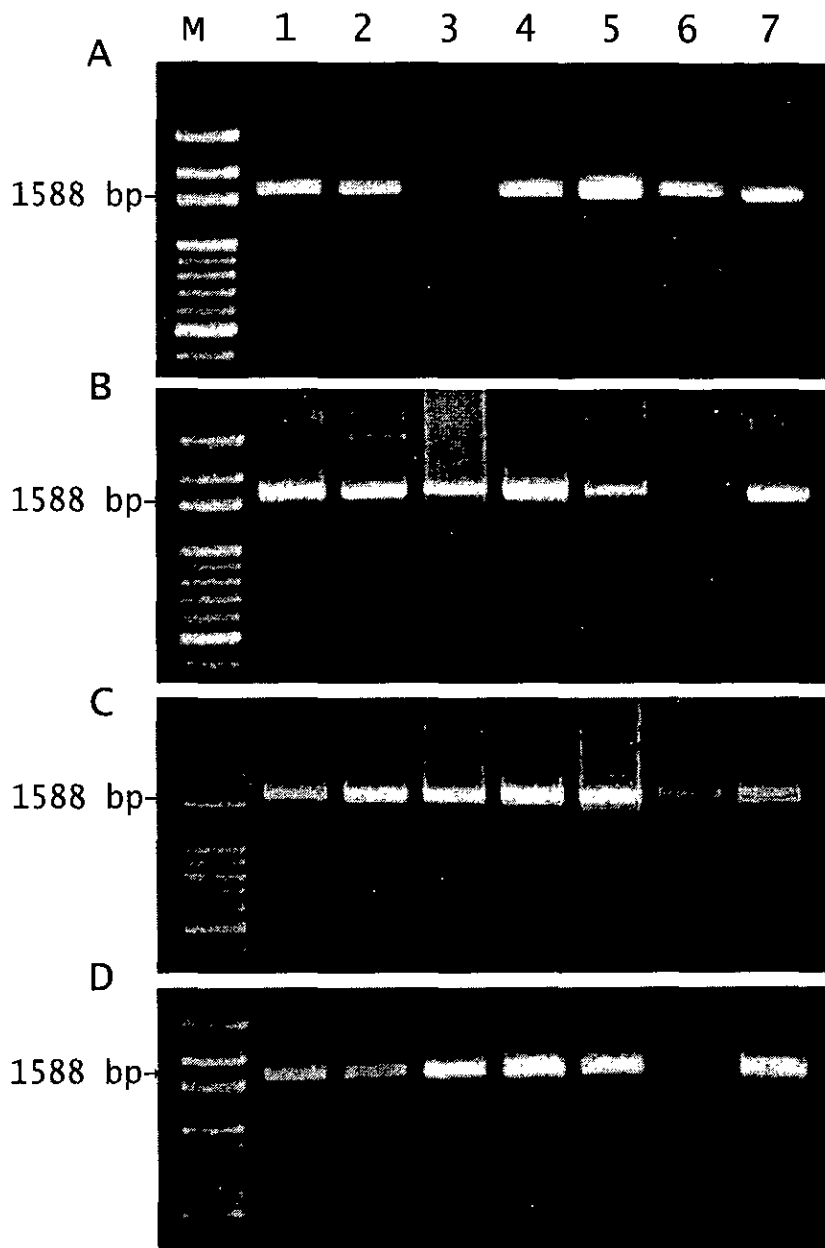


Fig. PCR products amplified from immature stages and head of male adults of *Chrysomya megacephala* (A), *C. rufifacies* (B), *C. pinguis* (C), and *Lucilia porphyrina* (D) by using CCOI-F/CCOI-R primer pair. M: 100 bp DNA ladder. Lane 1-7: egg, 1st, 2nd, 3rd, pupa, puparium and male head, respectively.

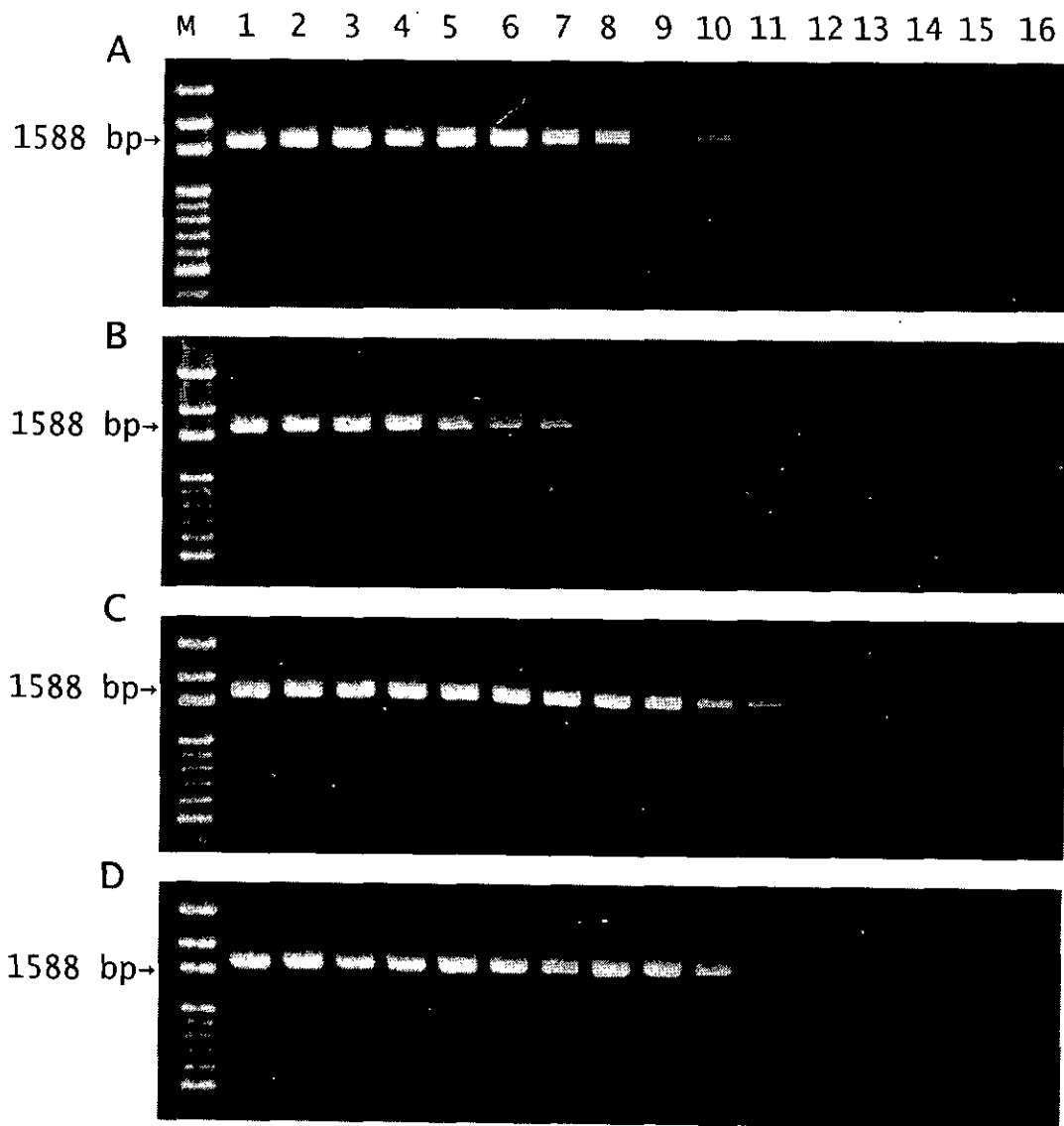


Fig. PCR products from sequential dilution of genomic DNA from males of *C. megacephala* by using CCOI-F/CCOI-R primer pair. A: one wing; B: two wings; C: one leg; D: two legs; M: 100 bp DNA ladder; Lane 1-16: sequential dilution from 1X to $2^{-15}X$.

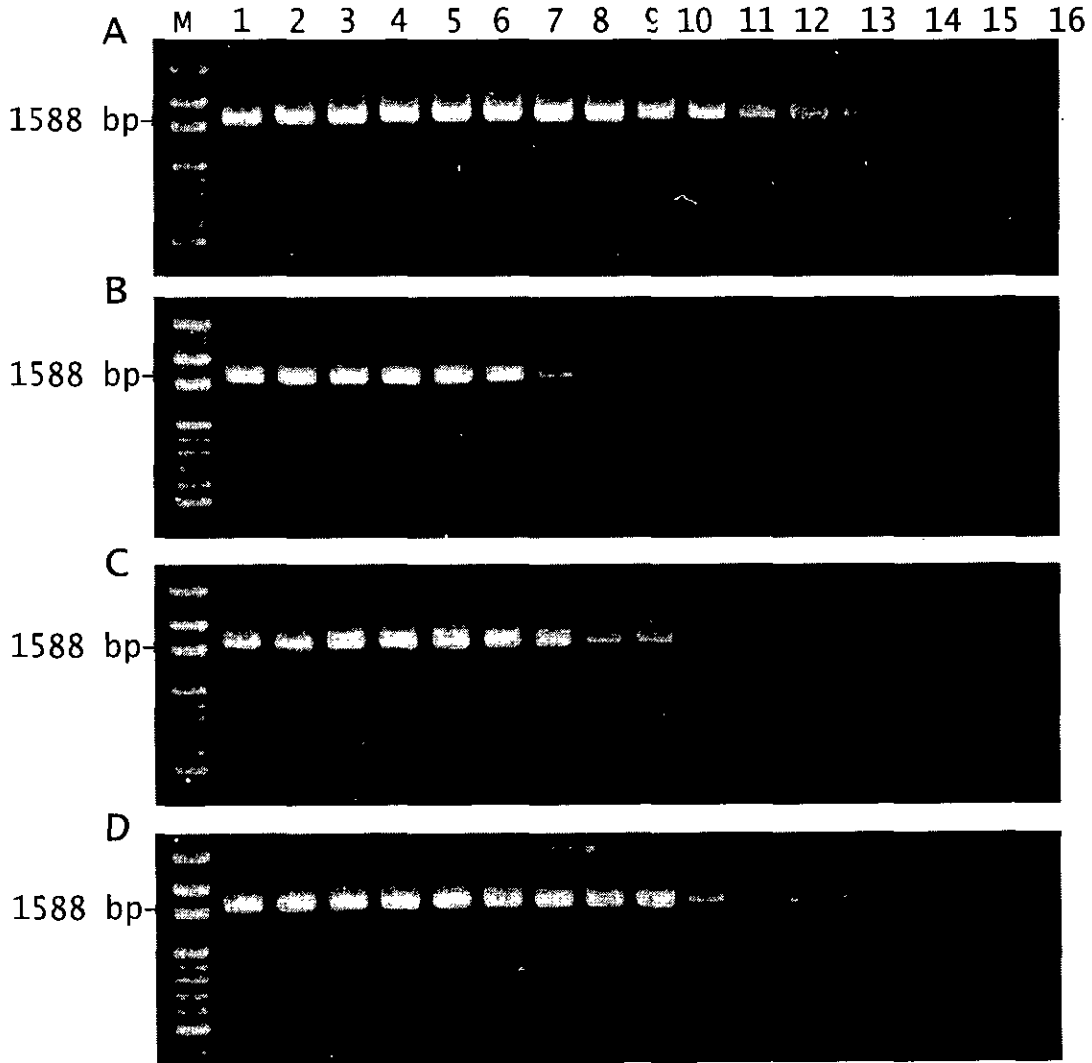


Fig. PCR products from sequential dilution of genomic DNA from males of *C. megacephala* by using CCOI-F/CCOI-R primer pair. A: three legs; B: four legs; C: five legs; D: six legs; M: 100 bp DNA ladder; Lane 1-16: sequential dilution from 1X to 2⁻¹⁵X.

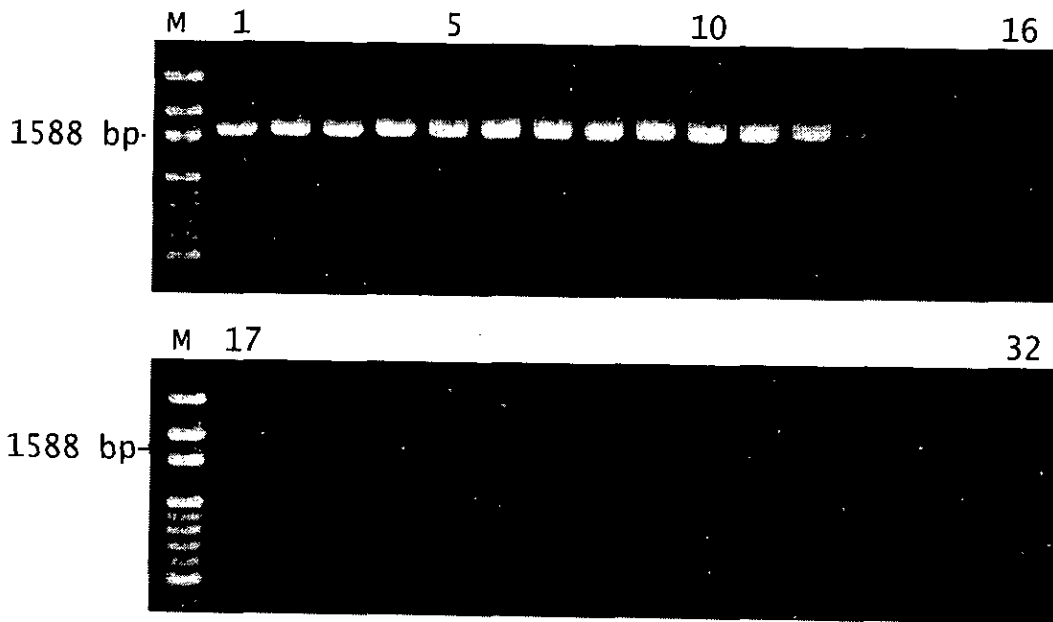


Fig. PCR products from sequential dilution of genomic DNA from male abdomen of *C. megacephala* by using CCOI-F/CCOI-R primer pair. M: 100 bp DNA ladder; Lane 1-32: sequential dilution from 1X.to 2^{-31} X.

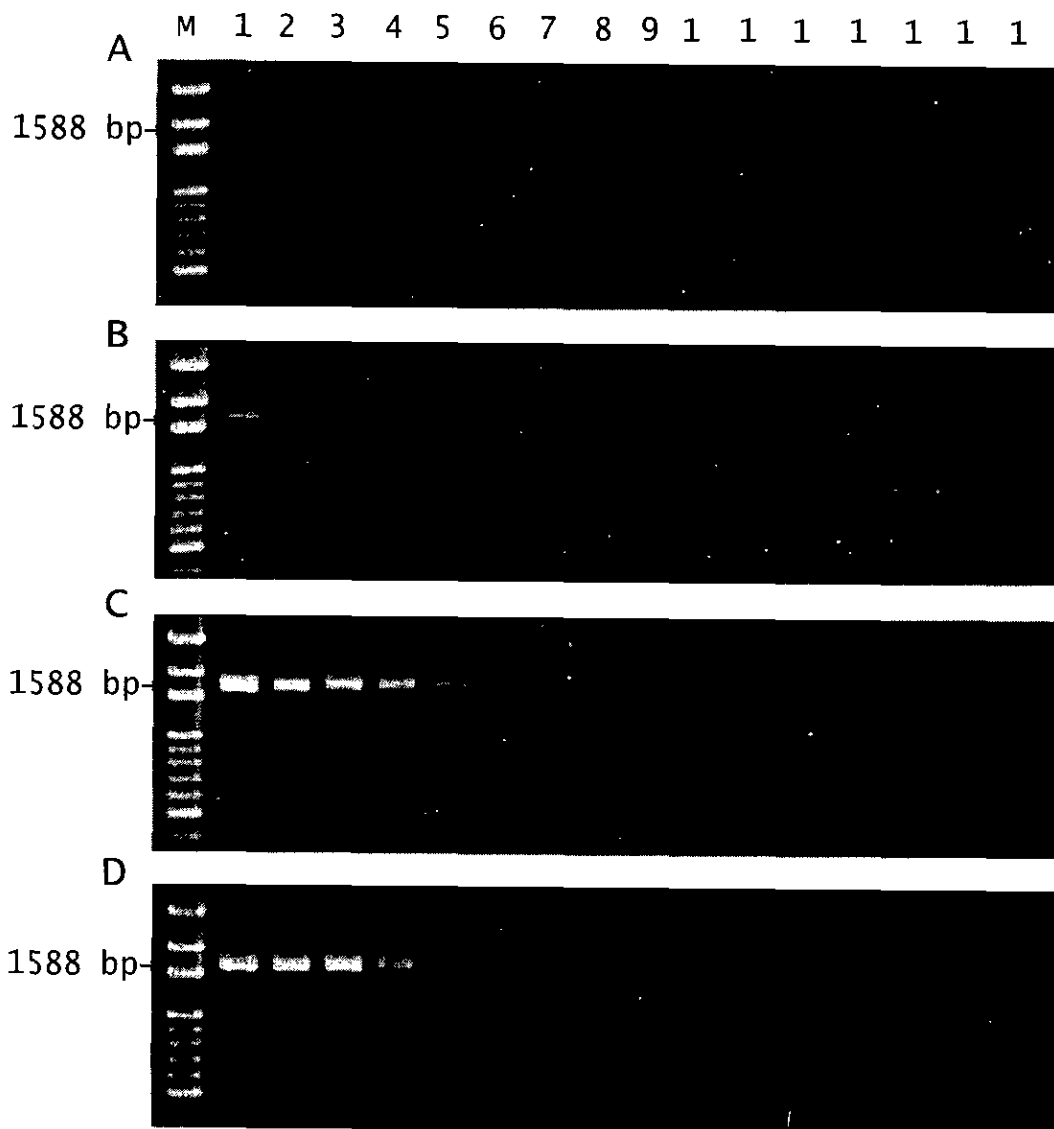


Fig. PCR products from sequential dilution of genomic DNA from immature stage of *C.*

megacephala by using CCOI-F, CCOI-R primer pair. A: one egg; B: 1st larva; C: 2nd larva; D: 3rd larva; M: 100 bp DNA ladder. Lane 1-16: sequential dilution from 1X-2⁻¹⁵X.

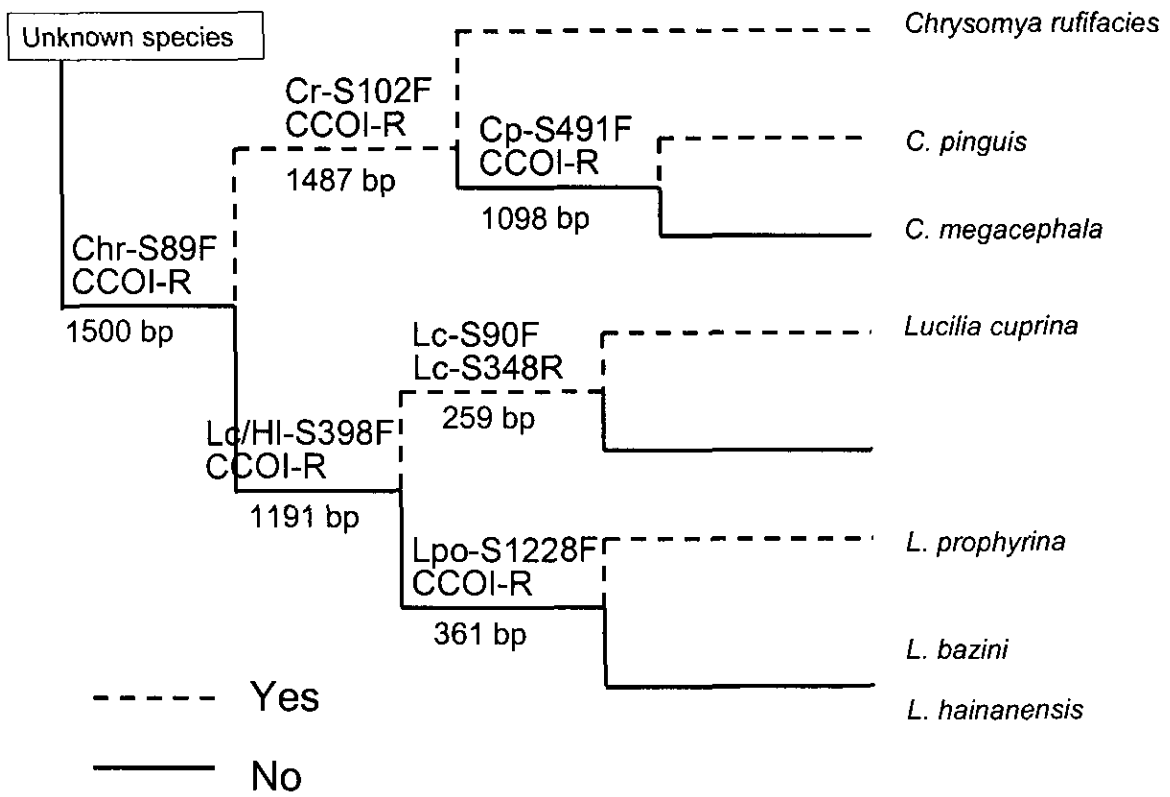


Fig. The primer key of eight forensically important blow flies from Taiwan. The straight black line refer that it can get PCR product with expect size; the dash line refer that it can't get PCR product with expect size.

七、計畫成果自評

1. 本計畫在經費及人力有限的情況下，已初步建立並完成台灣地區第一個麗蠅昆蟲專業分類及鑑定的資料，目前實驗室已建立形態之鑑定能力；並已建立幼蟲飼養設施，且已成功培養常態性之常見麗蠅實驗室品系，並可以提供任何刑案現場及驗屍所採得之主要昆蟲樣本作飼養或分析，以提供北部地區以昆蟲（特別是麗蠅樣本）判定死後間隔時間之一般性協助。
2. 傳統分類及分子鑑定資料將於近期彙整發表。粒線體 DNA COI 序列資料已於 Genbank 上完成登錄作業。

Species	Date (yy/mm/dd)	Collecting localities	Collectors	GenBank accession no.
<i>Chrysomya megacephala</i>	2000/11/14	Chingmei, Taipei City	W.Y.Chen	AY092761
<i>C. rufifacies</i>	2000/11/14	Chingmei, Taipei City	W.Y.Chen	AY092760
<i>C. pinguis</i>	2001/02/25	Hsintien, Taipei County	W.Y.Chen	AY092759
<i>Calliphora vomitoria</i>	2001/04/02	Mt.Chuyun Shan, Kaohsiung County	C.Y. Zhang	AY097333
<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	2001/02/27	Chingmei, Taipei City	W.Y.Chen	AY097334
<i>Lucilia cuprina</i>	2001/11/24	Chingmei, Taipei City	C.Y. Zhang	AY097335
<i>L. porphyrina</i>	2001/02/08	Hsintien, Taipei County	W.Y.Chen	AY097336
<i>L. bazini</i>	2001/04/02	Mt.Chuyun Shan, Kaohsiung County	C.Y. Zhang	Not submitted
<i>L. hainanensis</i>	2001/03/30	Mt.Chuyun Shan, Kaohsiung County	C.Y. Zhang	Not submitted

3. 完成之初步成果，已分別於今年的 10 及 11 月於澳洲國際雙翅目學會及台中台灣昆蟲學會年會發表：

Chen, Wei-Yun, Chun-Yen Zhang, Ting-Hsuan Hung, and Shiuh-Feng Shiao. 2002. Morphological and molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) from Taiwan. 5th International Congress of Dipterology. (29 Sept.- 4 Oct., Brisbane, Australia)

張駿彥、蕭旭峰。2002。麗蠅科之新超微形態特徵（雙翅目：麗蠅科）。台灣昆蟲 22 (4)。台灣昆蟲學會年會論文宣讀。(2002年11月21-23日，台中)

4. 對於鄰近地區如中國大陸或東南亞等地之標本，已進行商借或索取，期望將來能更進一步建立甚至是亞洲地區的法醫昆蟲參考資料。
5. 誘集方法之設計基本上雖能大量誘集優勢種類麗蠅，但也有漏失少量非優勢甚至是較稀有種類的可能；在某些特殊狀況下，這些種類也有可能成為關鍵；然而要完整建立台灣地區之麗蠅昆蟲相，得採用較費人力、物力的傳統採集法方可順利達成。
6. 本計畫雖已擴充去年度台北市採集範圍至台北縣、桃園及宜蘭地區，但限於經費與人力限制，無法作更廣泛性調查；因此有待將來更廣泛調查經費的支援配合。
7. 法医昆蟲的研究在台灣尚屬起步階段；通常以國外的經驗，須累積多年的資料，方能更精確且更能符合實用要求；建議將來以多年期計畫支助研究。

八、參考文獻

- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden, and I. G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Azeredo-Espin, A. M. L., and N. G. Madeira. 1996. Primary myiasis in dog caused by *Phaenicia eximia* (Diptera: Calliphoridae) and preliminary mitochondrial DNA analysis of the species in Brazil. *J. Med. Entomol.* 33: 839-843.
- Beard, C. B., D. M. Hamm, and F. H. Collins. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol. Biol.* 2: 103-124.
- Bender, K., P. M. Schneider, and C. Rittner. 2000. Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci. Int.* 113: 103-107.
- Benecke, M. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (Diptera, Coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. *Forensic Sci. Int.* 98: 157-168.
- Benecke, M., and J. D. Wells. 2001. DNA techniques for forensic entomology. pp: 341-352. *In*: J. H. Byrd, and J. L. Castner, eds. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press, Boca Raton.
- Brown, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. pp: 95-130. *In*: R. J. MacIntyre, ed. *Molecular evolutionary genetics*. Plenum press, New York.
- Bulter, J. M. 2001. Forensic DNA typing: biology & technology behind STR markers. Academic Press. UK. 322pp.
- Catts, E. P., and M. L. Goff. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 253-272.
- Cooper, G. M. 1997. *The Cell: a molecular approach*. The American Society for Microbiology press. Washington DC., U. S. A. 673pp.
- Fan, Z. 1997. Fauna Sinica, Insect Vol. 6, Diptera: Calliphoridae. Science Press, Beijing. 707 pp.
- Gleeson, D. M., and S. Sarre. 1997. Mitochondrial DNA variability and geographic origin of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), in New Zealand. *Bull. Entomol. Res.* 87: 265-272.
- Greenberg, B., and D. Singh. 1995. Species identification of Calliphoridae (Diptera) eggs. *J. Med. Entomol.* 32: 21-26.
- Gunatilake, K., and M. L. Goff. 1989. Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. *J. Forensic Sci.* 34:714-716.
- Hung, T. C. 1995. *The life table and mass rearing of Chrysomya megacephala* (Fabricius). Master's thesis, National Taiwan University. 77pp. (in Chinese)
- Hung, T. H., M. L. Wu, and H. J. Su. 1999. Detection of fastidious bacteria causing citrus greening disease by nonradioactive DNA probes. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65: 140-146.
- Kano, R., and S. Shinonaga. 1968. Fauna Japonica: Calliphoridae (Insecta: Diptera). Biogeographical Soc. of Japan, Natl. Sci. Mus., Tokyo. 181 pp.
- Keh, B. 1985. Scope and applications of forensic entomology. *Ann. Rev. Entomol.* 30:137-54.

- Lin, F., and C. Chen, 1999. The name list of Taiwan Diptera. Institute of zoology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan. pp. 114-115.
- Liu, D., and B. Greenberg. 1989. Immature stages of some flies of forensic importance. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 80-93.
- Lord, W. D., J. A. DiZinno, M. R. Wilson, B. Budowle, D. Taplin, and T. L. Meinking. 1998. Isolation, amplification, and sequencing of human mitochondrial DNA obtained from human crab louse, *Phthirus pubis* (L.), blood meals. *J. Forensic Sci.* 43: 1097-1100.
- Malgorn, Y., and R. Coquoz. 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae an interest in forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 102: 111-119.
- Meskin, I. 1991. The egg of the highveld blowfly, *Calliphora croceipalpis* (Diptera), with a key to the eggs of five other Highveld species. *J. Entomol. Soc. Sth. Afr.* 54:185-190.
- Replogle, J., W. D. Lord, B. Budowle, T. L. Meinking, and D. Taplin. 1994. Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism analysis: preliminary analysis of human crab louse (Anoplura: Pediculidae) excreta. *J. Med. Entomol.* 31: 686-690.
- Shewell, G.E. 1987. Manual of Nearctic Diptera Vol. 2. Biosystematics research center Ottawa, Ontario. pp. 1133-1145.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Smith, S. M., P. Fuerst., and K. L. Mecklenburg. 1996. Mitochondrial DNA sequence of cytochrome oxidase II from *Calliphora erythrocephala*: Evolution of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89: 28-36.
- Sperling, F. A., G. S. Anderson, and D. A. Hickey. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.* 39: 418-427.
- Taylor, D. B., Allen, L. Szalanski, and R. D. Peterson II. 1996. Identification of screwworm species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Med. Vet. Entomol.* 10: 63-70.
- Taylor, D. B., and R. D. Peterson II. 1994. Population genetics and gene variation in primary and secondary screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 626-633.
- Taylor, D. B., and R. D. Peterson II. 1995. Population genetics and gene variation in secondary screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 690-694.
- Taylor, D. B., R. D. Peterson II, and G. E. Moya-Borja. 1996. Population genetics and gene variation in screwworms (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochem. Genetics* 34: 67-76.
- Upton, M. S. 1991. Methods for collecting, preserving, and studying insect and allied forms. *Aust. Entomol. Soc. Miscell. Pub. No.3.* 86pp.
- Vargas, M. E. I. and A. M. L. Azeredo-Espin. 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: calliphoridae), from Brazil. *Biochem. Genet.* 33: 237-256.
- Vincent, S., J. M. Vian, M. P. Carlotti. 2000. Partial sequencing of the cytochrome oxydase b subunit gene I : a tool for the identification of European species of blow flies for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.* 45: 820-823.
- Vogt, W., and T. L. Woodburn. 1983. The analysis and standardization of trap catches of *Lucilia cuprina* (Diptera). *Bull.*

- Welch J. 1988. Effect of trap placement on detection of *Cochiomyia hominivorax* (Diptera). J. Econ. Entomol. 81:241-245.
- Wells, J. D., and F. A. H. Sperling. 1999. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomol. 36: 222-226.
- Wells, J. D., and F. A. H. Sperling. 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). Forensic Sci. Int: *in press*.
- Wells, J. D., F. Introna, G. D. Vella, C. P. Campobasso, J. Hayes, and F. A. H. Sperling. 2001. Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. J. Forensic Sci. 46: 685-687.
- Xue, W., and C. Chao. 2000. *Flies of China*, Vol. 2. Liaoning Science and Technology Press, Shenyang. pp. 1367-2425.
- Zehner, R., S. Zimmermann, and D. Mebs. 1998. RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. Int. J. Legal Med. 111: 323-327.
- Zhang, D. X., and G. M. Hewitt. 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. Biochem. Syst. Ecol. 25: 99-120.