

## 한국산 시식성 파리의 분자생물학적 종 구분법 연구 현황

박성환 · 신상언

고려대학교 의과대학 법의학교실,  
법의학연구소

접 수 : 2013년 10월 25일  
게재승인 : 2013년 11월 11일

책임저자 : 박성환  
(136-705) 서울특별시 성북구 인촌로 73  
고려대학교 의과대학 법의학교실  
전화 : +82-2-2286-1158  
FAX : +82-2-928-3901  
E-mail : kuforen@gmail.com

### Molecular Species Identification of Forensically Important Flies in Korea

Seong Hwan Park, Sang Eon Shin

Department of Legal Medicine, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

To estimate the postmortem interval (PMI) by using entomological evidence, species identification of forensically important flies is mandatory. However, the traditional species identification method, which relies on the key morphological features of adult flies, is not always available to investigators and has limitations to the immature samples. Because of these limitations, species identification using DNA sequences has long been an issue in the field of forensic entomology. In this review, I have briefly described the basic principles of molecular species identification and phylogenetic analysis and their applications in forensic entomology. I also recommend an experimental and statistical method to identify unknown fly samples obtained from the field.

**Key Words :** Forensic science, Entomology, Species specificity,  
Phylogenetic DNA barcode

## 서 론

법곤충학(forensic entomology)은 법적인 문제와 연관된 곤충학적 내용을 연구하는 학문이다. 법곤충학은 도시곤충학(urban entomology), 저장식품곤충학(stored product entomology), 법의곤충학(medicolegal entomology, forensic medical entomology)의 세 분야로 나눌 수 있다. 도시곤충학은 인간이 만든 건축물이나 인간이 살아가는 환경에 관계되는 곤충과 그 관련 생물들로 인한 법적인 문제를 다루는 학문이고, 저장식품곤충학은 식품에 오염되거나 혼입된 곤충으로 인해 일어나는 문제들을 다루며, 법의곤충학은 범죄사건에 관련된 곤충학적 증거를 활용하여 범죄수사에 도움을 주는 학문이다. 법의곤충학이 주로 관여하는 업무는 1) 사후경과시간(postmortem interval; PMI)이나 사망장소의 추정, 2) 돌연사 가능성이 있는 사건, 3) 명확한 원인을 모르는 교통사고, 4) 곤

충을 범죄에 악용하는 경우 등이 있다.<sup>1)</sup> 법곤충학의 이러한 다양한 업무 중에서도 가장 강조되는 것은 곤충학적 증거를 이용한 사후경과시간의 추정인데 시신의 부패단계별로 유인되는 곤충의 종류가 다르다는 점과 시신에 산란된 곤충, 특히 시식성 파리(necrophagous fly)의 알이 유충, 번데기로 자라는 속도가 온도 의존적이며, 종에 따라 다르다는 점을 주로 활용하고 있다.<sup>1)</sup> 따라서 파리 유충의 성장 속도에 대한 자료가 필요하며, 간편하게 곤충의 종을 구분할 수 있어야 곤충학적 증거를 수사에 활용할 수 있는데, 한국산 파리의 성장 속도에 대한 연구는 거의 없는 실정이고, 파리 종을 구분할 수 있는 전문가도 매우 부족한 현실이다. 파리의 종을 구분할 수 있는 곤충분류학자를 양성하는 것은 쉽지 않은 일이며, 숙련된 곤충분류학자라고 해도 현장에서 발견되는 검체의 대부분을 차지하는 유충 단계의 파리들의 종을 알기 위해서는 성충까지 사육을 시켜야 하는 번거로움이 있고, 사육 중 죽거나 이미 죽은 채로 발견된 개체들의 종을 확인하는 것은 불가능하므로 DNA를 이용한 종

구분방법이 오래전부터 연구되었다.<sup>2)</sup> 본 중설에서는 시식성 파리의 분자생물학적인 종 구분 방법에 대해 간략히 설명하고 실제 현장에서 채집된 검체를 어떻게 처리할 것인지에 대한 권고안을 제시하고자 한다.

## 본 론

### 1. 표준 DNA 표지자

동물 종의 구분을 위해 가장 많이 사용되는 DNA 표지자는 미토콘드리아 시토크롬 c 산화효소 I번 아단위 (cytochrome c oxidase subunit I; COI) 유전자인데 시토크롬 c 산화효소 (CO)는 세균과 진핵생물의 미토콘드리아에 존재하는 막 단백질로서 내호흡의 전자전달계의 최종 과정을 담당하는 효소이다.<sup>2)</sup> 이 효소에 이상이 발생하면 치명적인 대사장애가 유발되므로 이 효소를 부호화하는 유전자는 진화과정에서 돌연변이가 드물게 발생하고, 모든 종에서 비교적 보존적인 유사한 염기서열이 공유된다. 실제로 NCBI에서 BLAST로 비교를 해보면 초파리와 사람의 COI 유전자의 염기서열은 69% 가량의 유사성을 보이며, 사람과 침팬지 사이의 유사성은 91% 정도이다. 단백질의 서열을 비교하면 차이는 더욱 적어지는데 이는 많은 돌연변이가 실제 단백질 서열의 변화를 가져오지는 않는 것들(synonymous mutations)이기 때문이다. 인간과 침팬지의 COI 단백질 서열 중 아미노산의 98.8%가 일치하며, 사람과 초파리도 71.7%가 일치한다. COI 이외에 많이 사용되는 표지자들로 COII (cytochrome c oxidase subunit II), ITS2 (internal transcribed spacer 2), rDNA (ribosomal DNA) 등이 있다.<sup>2-4)</sup> 한편 COI 유전자의 앞부분 1/3 정도 부위를 DNA 바코드 영역(DNA barcoding region)이라고도 부르기도 한다.<sup>5)</sup> 생명의 바코드 계획 컨소시엄(Barcode of Life)에서는 이 부위를 중심으로 COI 염기서열을 데이터베이스에 축적하고 있으므로 COI의 전체 서열을 동정하는 것이 어려울 경우 이 부위를 우선하여 분석하는 것이 이미 알려진 염기서열과의 대조에 유리하다.

### 2. 분자생물학적 종 구분의 원리

DNA를 이용한 개인식별은 검체와 실제 인물의 유전자형(genotype)을 대조하여 일치하는지를 확인하는 반면, 종 구분의 경우 동종이라도 유전자형이 반드시 일치하지 않을 수도 있다는 점에서 큰 차이가 있다. 따라서 어느 정도의 불일치를 이종(異種) 혹은 동종(同種)을 판가름하는 기준으로 볼 것인지를 정하는 것이 매우 중요한데 사실상 이를 규정하는 일반적인 원칙은 없다는 점이 판정의 어려움 중 하나이다. 하지만 경험적으로는 표준표지자인 COI의 염기서열을 비교했을 때 동종끼

리는 대개 1-2% 이내 정도의 차이를 보이며, 이종 사이에서는 대부분의 경우 2% 이상의 차이를 보이고, 1% 이내의 차이를 보이는 경우는 드물다. 물론 예외가 존재하여 동종 사이에서도 20% 이상의 차이를 보이는 극단적인 경우가 간혹 발견되기도 하고, 최근에 종 분화가 일어난 자매종(sister species)의 경우에는 이종 사이에서도 1% 이내의 차이만이 관찰되기도 하므로 세심한 주의가 필요하다.<sup>6,7)</sup> 따라서 기존의 분류학적인 토대가 없이 생물들의 염기서열 차이만으로 동종인지 이종인지 여부를 곧바로 판가름하는 것은 불가능하며, 고전적인 분류학을 전공한 전문가에 의해 종이 확인된 개체들의 염기서열을 수집하고 분석하여 각 종마다 동종 내에서의 염기서열 다양성의 정도나 자매종 사이의 다양성과 유사성을 미리 조사해 두어야 한다.

#### (1) 염기서열을 비교하는 방법

법의학적으로 중요한 파리 종군의 COI의 염기서열의 길이는 1539 염기이며, 이 중 바코드 영역만 분석해도 얻어지는 염기서열의 길이는 500 염기를 넘게 된다. 이렇게 긴 염기서열을 비교하는 가장 손쉬운 방법은 미국국립보건원의 NCBI 홈페이지에서 BLAST 검색을 해보는 것이다. 그러나 BLAST 검색은 NCBI Genbank에 등록된 염기서열들과의 대조 결과를 보여주는 것이므로 BLAST 검색에서의 일치만으로 종 확인이 정확하게 완료되었다고 확신하기가 어렵다. NCBI Genbank에 염기서열을 접수할 때 종의 동정이 정확한지 여부를 확인하는 절차가 없기 때문이다. 보다 정확한 종 확인을 위해서는 분류학 전문가에 의해 검증되고 확인된 검체로부터 획득된 염기서열들을 확보하고 검사대상이 된 염기서열을 이들 알려진 서열들과 대조를 해야 한다. 염기서열의 대조를 위해서는 비교 대상의 염기서열들 사이의 정렬(alignment)이 반드시 필요하다. 염기서열의 정렬이란 비교 가능한 부위, 즉 상동 위치(homologous site)끼리 일대일 대응이 되도록 염기서열들을 맞춰주는 것을 의미한다. 일단 정렬된 염기서열을 눈으로 일일이 검색해서 차이를 확인하는 것은 많은 시간과 노력이 필요하며, 오류의 가능성도 높다. 따라서 컴퓨터 소프트웨어를 이용한 분석이 이용되고 있다. 여러 가지 분석방법이 가능하겠지만 가장 일반적으로 이용되는 방식은 염기서열들 사이의 거리(차이)를 백분율로 나타내어 비교하는 방식(백분율 거리비교)과 계통분석(phylogenetic analysis)을 실시하여 실험대상의 검체의 염기서열이 이미 종이 확인된 염기서열들과 어떤 계통군을 형성하며 계통수(phylogenetic tree)에 나타나는지를 확인하는 방식이 있다.<sup>8,9)</sup> 백분율 거리비교와 계통분석은 동일한 염기서열 정렬 데이터를 이용하여 같은 소프트웨어에서 분석할 수 있으므로 둘 중 하나만 시행하지 않고 두 가지를 모두 시행하여 결과를 참고하는 것이 일반적이다.

## (2) MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 소프트웨어

MEGA는 앞 절에서 설명한 염기서열의 정렬, 백분율 거리의 계산, 계통분석을 모두 수행할 수 있는 최적의 소프트웨어이며 무료로 배포되고 있다.<sup>8-10)</sup> 뿐만 아니라 자동염기서열 분석기에서 생성된 ab1 형식의 파일을 불러와서 electropherogram을 확인하고 염기서열 정보를 편집할 수 있는 TraceEditor도 갖추고 있어서 ChromasPro 같은 전문적인 프로그램에는 미치지 못하지만, 기본적인 기능은 활용할 수 있다. MEGA 소프트웨어의 자세한 사용법은 소프트웨어를 다운로드 받으면 따라오는 Help 메뉴나 홈페이지의 설명서를 참고하면 익힐 수 있다.

## (3) 계통수의 생성

염기서열을 이용하여 계통수를 생성하고 판독하는 방법을 자세히 다루려면 두꺼운 교과서 수준의 분량이 필요하다. 계통수를 생성하기 위한 방식은 크게 거리기반방식(distance matrix based)과 특징기반방식(character based)의 두 가지로 나누며, 거리기반방식으로는 UPGMA, 근린결합(neighbor joining), 최소진화(minimum evolution) 방법들이 있고 특징기반방식으로는 최대단순분기도(maximum parsimony), 최대우도비(maximum likelihood), 베이지안 방법 등이 있다.<sup>11)</sup> 이 중 가장 완성도 높은 방식은 최대우도비 방법이므로 최근 계통분류를 다루는 대부분의 학술 논문에서는 이 방법을 사용하여 계통수를 사용하고 있으나 최대단순분기도 방법이나 근린결합방법도 아직 사용되고 있다. 최대우도비 방법의 가장 큰 단점은 복잡한 알고리즘 때문에 계통수를 생성하는 데에 시간이 오래 걸린다는 점인 데에 반해, 근린결합 방법은 신속한 계산이 가능하고, 생성된 계통수를 백분율 거리와 직관적으로 비교할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 베이지안 방법은 최대우도비 방법의 변형으로 볼 수 있으며, MrBayes 같은 특별한 소프트웨어

를 설치해야만 사용할 수 있다.<sup>12)</sup> 계통수를 생성하면서 계통수의 신뢰성을 통계학적으로 검증하는 장치를 활용할 수 있는데 이것이 부트스트랩(bootstrap)이다. 부트스트랩의 통계학적 원리는 다소 복잡하여 지면 관계상 다루기 어려우나, 단순히 설명한다면 계통수 상에서 가지(branch)가 분기하는 지점(internal node)에 백분율 숫자로 표시되는 통계량이다. 이 숫자가 100에 가까울수록 계통수를 생성하는 데에 이용된 염기서열 데이터에 기반하여 보았을 때 그 지점의 가지의 갈라짐(달리 말하면 그 지점에 의해 묶이는 두 가지의 관계)의 신빙성이 높다는 의미이다. 베이지안 방법을 제외하면 앞서 설명한 모든 계통분석 방법은 MEGA 소프트웨어에서 수행할 수 있다.

## (4) 계통수의 판독

계통분석(phylogenetic analysis)은 종간의 관계를 연구하는 분야로서 생물들의 명칭을 정하고 분류하는 분류학과 밀접한 상관관계에 있다. 그러나 본래의 분류학은 생물들의 유사성과 차이점을 이용하여 생물을 분류하긴 하지만 같은 분류군이 반드시 같은 조상을 공유한다는 개념을 가진 것은 아니었다. 이에 비해 계통분석은 생물 종들 사이의 혈연관계를 기본 가정으로 놓고 시작한다는 점이 다르며, 따라서 때로는 분류학과 계통분석이 서로 일치하지 않는 경우도 있다. 계통수는 기본적으로 점(마디; node)들을 연결한 선(가지; branch)으로 이루어진 그림이다. 점(node)은 어떤 생물 종이 위치하거나 가지가 갈라지는 지점을 의미하며, 생물 종이 위치하는 곳을 바깥마디(external node)라고 하고, 가지가 갈라지는 곳을 안마디(internal node)라고 한다. 어떤 두 종이 하나의 마디에 의해 서로 연결되어 있다면 이는 두 종이 그 마디에서 두 가지로 갈라지는 시점 이전까지는 공통 조상을 공유했다는 의미이다(Fig. 1).<sup>11)</sup>

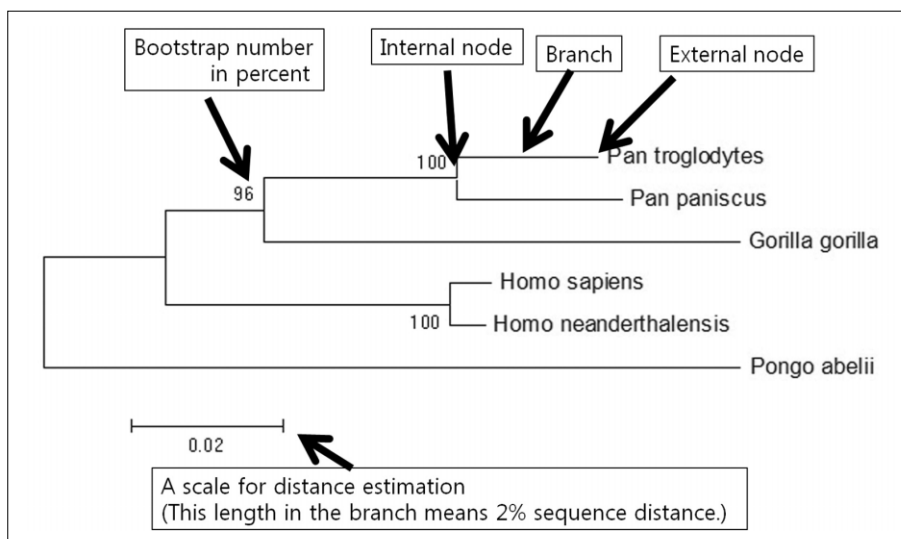


Fig. 1. An example of a neighbor-joining phylogenetic tree, using COI sequences of modern human (*Homo sapiens*), Neanderthal man (*Homo neanderthalensis*), chimpanzee (*Pan troglodytes*), bonobo (*Pan paniscus*), gorilla (*Gorilla gorilla*), and orangutan (*Pongo abelii*), illustrates the key features of a phylogenetic tree such as nodes, branches, bootstrap numbers, and the scale.

### 3. 주요 연구결과들

1994년 Sperling 등이 법의학적으로 중요한 파리 3종의 COI, COII, tRNA-leucine 염기서열을 비교하여 종의 구분이 가능함을 주장하였으며,<sup>2)</sup> 그 후 많은 연구자들에 의해 시식성 파리 종의 COI 염기서열이 분석되었다.<sup>13-31)</sup> 전체 숫자를 헤아리기 어려울 정도로 많은 수의 염기서열들이 NCBI Genbank에 등록되고, 논문으로도 발표되었으나 그 중 부정확한 검체를 분석한 것들이 많아서 단순히 기존 데이터와의 비교만으로 종의 구분을 하는 것은 매우 부정확할 수 있다는 점이 분자생물학적인 종 확인법의 가장 어려운 점이다. 따라서 신뢰할만한 전문성을 가진 파리 분류학자에 의해 종이 확인된 검체의 DNA 염기서열을 확보하는 것이 필수적이라고 할 수 있다. 대부분 종들은 표준 표지자인 COI 염기서열 분석만으로 확인이 가능하지만 분자생물학적 방법으로 구분이 어렵거나 이미 발표된 염기서열의 오류로 인해 혼돈이 초래되고 있는 주요 파리

종들로는 *Lucilia illustris*, *L. caesar*, *L. ampullacea*, *L. porphyrina*, *Hemipyrellia ligurriens* 등이 있다.<sup>14, 32, 33)</sup>

### 4. 한국산 파리에 대한 연구

4과 29종의 한국산 시식성 파리에 대해서 미토콘드리아 COI 유전자의 전체 염기서열이 동정 되었다. 이 중 검정파리과 파리의 염기서열 대부분은 NCBI Genbank에 등록되었으며,<sup>23, 24)</sup> 집파리과와 쉬파리과의 염기서열도 제출되어 등록을 기다리고 있다(Table 1). 그 외에 핵 DNA 표지자를 발굴하기 위해 abd-a, ubx, dfd, scr, bcd, abd-b 항상성상자(homeobox) 염기서열이 다수 종에 대하여 분석이 되었으며,<sup>34-37)</sup> 이 중 bcd 염기서열을 이용한 검정파리과 파리에 대한 multiplex genotyping kit의 특허가 승인되었다. COI 다음으로 많이 사용되는 표지자인 ITS2에 대한 분석은 현재 연구가 진행 중이다.

Table 1. List of Forensically Important Fly Species Commonly Collected in Korea

| Family        | Subfamily     | Species                             | Genbank           |
|---------------|---------------|-------------------------------------|-------------------|
| Fanniidae     |               | <i>Fannia prisca</i>                | JX861413-7        |
| Muscidae      | Azelinae      | <i>Hydrotaea dentipes</i>           | JX861420-JX861429 |
|               |               | <i>Hydrotaea occulta</i>            | JX861430          |
|               |               | <i>Ophyra chalcogaster</i>          | JX861452-JX861456 |
|               |               | <i>Ophyra leucostoma</i>            | JX861457-JX861459 |
|               |               | <i>Ophyra nigra</i>                 | JX861460-JX861468 |
|               |               | <i>Muscina angustifrons</i>         | JX861436-JX861444 |
|               |               | <i>Muscina stabulans</i>            | JX861449-JX861451 |
|               |               | <i>Muscina pascuorum</i>            | JX861445-JX861448 |
|               | Muscinae      | <i>Musca domestica</i>              | JX861431-JX861435 |
|               | Phaoniinae    | <i>Phaonia aurea</i>                | JX861481&JX861482 |
| Calliphoridae | Calliphorinae | <i>Adrichina grahami</i>            | EU880180-EU880182 |
|               |               | <i>Calliphora lata</i>              | EU880183-EU880187 |
|               |               | <i>Calliphora vicina</i>            | EU880188-EU880192 |
|               |               | <i>Triceratopyga calliphoroides</i> | EU880176-EU880179 |
|               | Chrysomyinae* | <i>Chrysomya megacephala</i>        | KF037969          |
|               |               | <i>Chrysomya pinguis</i>            | FJ195381          |
|               |               | <i>Phormia regina</i>               | JN257239&FJ360867 |
|               | Luciliinae    | <i>Hemipyrellia ligurriens</i>      | EU880206&EU880207 |
|               |               | <i>Lucilia ampullacea</i>           | EU925394          |
|               |               | <i>Lucilia caesar</i>               | EU880193-EU880196 |
|               |               | <i>Lucilia illustris</i>            | EU880197-EU880205 |
|               |               | <i>Phaenicia sericata</i>           | EU880208-EU880212 |
| Sarcophagidae | Sarcophaginae | <i>Sarcophaga haemorrhoidalis</i>   | JX861406-JX861408 |
|               |               | <i>Boettcherisca peregrina</i>      | JX861409-JX861412 |
|               |               | <i>Helicophagella melanura</i>      | JX861418&JX861419 |
|               |               | <i>Parasarcophaga albiceps</i>      | JX861469-JX861473 |
|               |               | <i>Parasarcophaga harpax</i>        | JX861474&JX861475 |
|               |               | <i>Parasarcophaga similis</i>       | JX861476-JX861480 |

\*Because the COI sequences of Korean Chrysomyinae flies were not submitted to NCBI Genbank yet, the listed accession numbers are those of conspecifics of which sequences are consistent with Korean counterparts.

**Table 2.** Universal Primer Sequences for COI\*

| Name | Sequence                        | Binding site              |
|------|---------------------------------|---------------------------|
| F1   | 5'-CCTTTAGAATTGCAGTCTAATGTCA-3' | tRNA-cysteine             |
| F2   | 5'-GGAGGATTGGAAATTGATTAGTTCC-3' | 220-245 on COI            |
| F3   | 5'-CTGCTACTTTATGAGCTTTAGG-3'    | 1000-1022 on COI          |
| R1   | 5'-CCTAAATTTGCTCATGTTGACA-3'    | 2-23 on COII <sup>†</sup> |
| R2   | 5'-CAAGTTGTGAAGCATC-3'          | 1327-1343 on COI          |
| R3   | 5'-CCAAAGAATCAAAATAAATGTTG-3'   | 688-710 on COI            |

\*COI: Cytochrome c oxidase subunit I ; <sup>†</sup>COII: Cytochrome c oxidase subunit II

## 5. 현장에 대한 가이드라인

### 1) DNA 추출

파리의 유충이나 성충으로부터 DNA를 추출하는 데에 특별한 어려움은 없으며, 조직에서 DNA를 추출하는 일반적인 방법을 사용한다. 알, 구더기, 번데기로부터 DNA를 추출하기 전에는 반드시 자를 놓고 근접사진을 촬영해야 하며, 특히 구더기의 경우 몸의 길이와 후기문의 형태를 기록으로 잘 남겨두어야 한다. 될 수 있는 대로 검체를 파괴하는 것보다는 전체 형태를 유지하면서 DNA를 추출하거나 검체의 일부분만을 이용하는 것이 권장된다. 파리 성충의 전체적인 형태를 유지하면서 DNA를 추출하기 위해서는 저자들이 다른 논문을 통해 제안한 비파괴적 방법(nondestructive method)을 따르거나 응용할 것을 권한다.<sup>38)</sup> 비파괴적으로 DNA를 추출하고 남은 파리 검체는 다시 7-80% 에탄올 용액에 보관한다. 파리 성충을 파괴하면서 DNA를 추출하기 전에는 분류학적으로 중요한 부위들의 해부현미경 소견을 기록으로 남겨두는 것이 원칙이지만 전문적인 파리분류학자가 아니면 실행이 어렵다.

### 2) PCR 증폭 및 염기서열 동정

저자들이 실제 사용하는 시발체의 염기서열은 표에 나열되어 있으며, 세 쌍의 시발체로 세 번의 PCR을 통해 염기서열을 동정하면 전체 COI 염기서열을 얻을 수 있다 (Table 2). 그러나 종 식별을 위해 반드시 전체 염기서열이 필요한 것은 아니고, DNA 바코드 부위인 1번 세트만을 분석해서 대조해도 무방하다. PCR 및 염기서열 분석과정은 일반적인 분자생물학적 실험방법을 따르면 되므로 자세한 사항을 생략한다.

### 3) 염기서열의 대조

앞서 2항에서 기술한 내용을 바탕으로 계통수를 작성하고 염기서열간의 거리(distance)를 산출하여 기존의 염기서열과의 비교를 통해 종(species)을 판단한다. 대조에 사용할 염기서열들은 Table 1에 표시된 NCBI Genbank Accession No를 참고한다.

## 결론

전술한 바와 같이 한국산 시식성 파리의 COI 염기서열에 대한 분석은 거의 완료된 상태이며, 개체 수가 부족한 종에 대한 보충, 한국에서는 드물지만 전 세계적으로는 흔하면서 한국의 근연관계종과의 구분에 중요한 파리들의 염기서열 확보가 필요한 실정이다. 그러나 COI 이외의 다른 표준 표지자에 대한 분석은 거의 이루어지지 않은 형편이므로 그 부분에 대한 연구가 시급하다. 또한, 현재까지 획득된 염기서열을 이용하여 복잡한 계통분석을 하지 않고도 쉽게 종을 확인할 수 있도록 종 특이적 다형성에 기반을 둔 종 식별키트의 개발이 필요하다고 생각된다.

## 참고문헌

- Gennard DE. Forensic entomology : an introduction. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2012.
- Sperling FA, Anderson GS, Hickey DA. A DNA-based approach to the identification of insect species used for post-mortem interval estimation. J Forensic Sci 1994;39:418-27.
- Singh B, Wells JD. Molecular systematics of the Calliphoridae (Diptera: Oestroidea): evidence from one mitochondrial and three nuclear genes. J Med Entomol 2013;50:15-23.
- Zaidi F, Wei Sj, Shi M, et al. Utility of multi-gene loci for forensic species diagnosis of blowflies. J Insect Sci 2011;11:1-12.
- Boehme P, Amendt J, Zehner R. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. Parasitol Res 2012;110:2325-32.
- Cognato AI. Standard percent DNA sequence difference for insects does not predict species boundaries. J Econ Entomol 2006;99:1037-45.
- Wells JD, Lunt N, Villet MH. Recent African derivation of *Chrysomya putoria* from *C. chloropyga* and mitochondrial DNA paraphyly of cytochrome oxidase subunit one in blowflies of forensic importance. Med Vet Entomol 2004;18:445-8.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief Bioinform 2008;9:299-306.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. Comput Appl Biosci 1994;10:189-91.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007;24:1596-9.
- Graur D, Li W-H. Fundamentals of molecular evolution. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2000.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian infer-



- ence of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001;17:754-5.
13. Cainé LM, Real FC, Saloña-Bordas MI, et al. DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. *Forensic Sci Int* 2009;184:e21-3.
  14. Chen WY, Hung TH, Shiao SF. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *J Med Entomol* 2004;41:47-57.
  15. Debry RW, Timm AE, Dahlem GA, et al. mtDNA-based identification of *Lucilia cuprina* (Wiedemann) and *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) in the continental United States. *Forensic Sci Int* 2010;202:102-9.
  16. GilArriortua M, Salona Bordas MI, Cainé LM, et al. Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae). *Forensic Sci Int* 2013;228:132-6.
  17. Guo YD, Cai JF, Li X, et al. Identification of the forensically important sarcophagid flies *Boettcherisca peregrina*, *Parasarcophaga albiceps* and *Parasarcophaga dux* (Diptera: Sarcophagidae) based on COII gene in China. *Trop Biomed* 2010;27:451-60.
  18. Harvey ML, Dadour IR, Gaudieri S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Sci Int* 2003;131:134-9.
  19. Jordaens K, Sonet G, Richet R, et al. Identification of forensically important *Sarcophaga* species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene. *Int J Legal Med* 2013;127:491-504.
  20. Kavitha R, Nazni WA, Tan TC, et al. Molecular identification of blow flies recovered from human cadavers during crime scene investigations in Malaysia. *Malays J Pathol* 2012;34:127-32.
  21. Meiklejohn KA, Wallman JF, Dowton M. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *Int J Legal Med* 2011;125:27-32.
  22. Meiklejohn KA, Wallman JF, Dowton M. DNA barcoding identifies all immature life stages of a forensically important flesh fly (Diptera: Sarcophagidae). *J Forensic Sci* 2013;58:184-7.
  23. Park SH, Zhang Y, Piao H, et al. Use of cytochrome c oxidase subunit i (COI) nucleotide sequences for identification of the Korean Luciliinae fly species (Diptera: Calliphoridae) in forensic investigations. *J Korean Med Sci* 2009;24:1058-63.
  24. Park SH, Zhang Y, Piao H, et al. Sequences of the cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene are suitable for species identification of Korean Calliphorinae flies of forensic importance (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci* 2009;54:1131-4.
  25. Saigusa K, Matsumasa M, Yashima Y, et al. Practical applications of molecular biological species identification of forensically important flies. *Leg Med (Tokyo)* 2009;11 Suppl 1:S344-7.
  26. Saigusa K, Takamiya M, Aoki Y. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. *Leg Med (Tokyo)* 2005;7:175-8.
  27. Stevens J, Wall R. Species, sub-species and hybrid populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Proc Biol Sci* 1996;263:1335-41.
  28. Stevens JR, Wall R, Wells JD. Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Mol Biol* 2002;11:141-8.
  29. Wallman JF, Donnellan SC. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Sci Int* 2001;120:60-7.
  30. Wells JD, Pape T, Sperling FA. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *J Forensic Sci* 2001;46:1098-102.
  31. Wells JD, Sperling FA. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation and partial sequencing of the cytochrome oxidase b subunit gene I: a tool for the identification of European species of blow flies for postmortem interval estimation. *J Forensic Sci* 2000;45:1358-9.
  32. Wells JD, Wall R, Stevens JR. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *Int J Legal Med* 2007;121:229-33.
  33. Sonet G, Jordaens K, Braet Y, et al. Why is the molecular identification of the forensically important blowfly species *Lucilia caesar* and *L. illustris* (family Calliphoridae) so problematic? *Forensic Sci Int* 2012;223:153-9.
  34. Piao HG, Chung U, Shin SE, et al. DNA-based identification of necrophagous fly species using abdominal-B (Abd-B) homeobox sequence. *Korean J Leg Med* 2012;36:74-84.
  35. Park SH, Park CH, Zhang Y, et al. Using the developmental gene bicoid to identify species of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Biomed Res Int* 2013; doi: 10.1155/2013/538051. Epub 2013 Mar 18.
  36. Zhang Y. Identification of carrion flies by ultrabithorax (Ubx) and abdominal-A (abd-A) homeobox. Seoul: Korea University; 2007.
  37. Park SH. Molecular identification of necrophagous fly species by sequence analysis of Dfd and Scr homeoboxes. Seoul: Korea University; 2007.
  38. Kim SY, Park SH, Piao H, et al. Vouchering of forensically important fly specimens by nondestructive DNA extraction. *ISRN Entomology*. 2013;Article ID 286182.