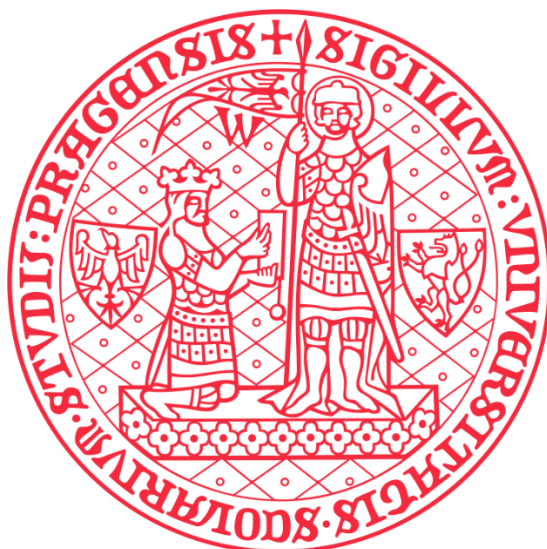


Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Zoologie



Mgr. Jakub Kadlec

Potravní vztahy a strategie ve hmyzích společenstvech na mršinách.

Trophic relationships and strategies in insect communities on
vertebrate carrions.

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Petr Šípek Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.1.2025

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Kadlec', written in a cursive style.

Mgr. Jakub Kadlec

Poděkování

V prvé řadě děkuji Petru Šípkovi jako svému školiteli za jeho trpělivé vedení, cenné rady a odbornou podporu, které pro mě byly neocenitelné.

Dále děkuji Šárce Mikátové a Petru Máslovi z již neexistujícího Nekrotýmu za příjemně strávený čas v terénu, všem z Osvinova za poskytnutí azylu při terénních experimentech a Pavlu Jakubcovi za pomoc se sepisováním manuskriptů.

Velký dík patří také mojí rodině a mé drahé E . Nemohu opomenout poděkovat i nejlepšímu řezníkovi s doktorátem Pavlu Justovi a celkově bandě z chráněné dílny Viničná 7.

A samozřejmě grantové agentuře UK za podporu výzkumu (GAUK 361715)

Prohlášení o podílu na publikacích

- I. **Kadlec, J.**, Mikatova, S., Maslo, P., Sipkova, H., Šípek, P., & Sladeczek, F. X. J. (2019). Delaying insect access alters community composition on small carrion: A quantitative approach. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(8), 729–740.

Podíl J. Kadlece: provedení terénních experimentů, determinace odchyceného hmyzu, sepisování rukopisu a korektury



Mgr. Petr Šípek Ph.D.

- II. Jakubec, P., **Kadlec, J.**, & Šípek, P. (2021). Standardized laboratory methodology for the evaluation of foraging strategies in necrophilous beetles: a case study of necrophila (*Calosilpha*) *brunnicollis* (Coleoptera: Silphidae). *Journal of Medical Entomology*, 58(1), 40–46.

Podíl J. Kadlece: koordinátor studie, laboratorní chov, design a provedení experimentů, sepisování rukopisu a korektury



Mgr. Petr Šípek Ph.D.

- III. **Kadlec, J.**, Jakubec, P., & Šípek, P. (2024). In vitro comparison of two food choice methodologies for necrophagous species of the genus *Thanatophilus* (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae). *Journal of Medical Entomology*, 61(3), 603–610.

Podíl J. Kadlece: koordinátor studie, laboratorní chov, design a provedení experimentů, sepisování rukopisu a korektury



Mgr. Petr Šípek Ph.D.

Abstrakt

Mršiny jakožto jeden z efemérních habitatů představují energeticky bohatý, avšak časově omezený zdroj potravy. Díky tomu jsou jednotlivé nekrobiotní druhy hmyzu pod silným konkurenčním tlakem. Pomocí cíleně manipulované sukcese jsme testovali vzájemné vztahy obou hlavních dominujících skupin na mršinách malých savců, tedy larev bzučivek (*Calliphoridae*) a hrobaříků (*Nicrophorini*). Při manipulativním vyloučení těchto skupin v rané fázi kolonizace dochází k výrazným změnám v celém společenstvu. Při kolonizaci starších mršin totiž nedochází k dominanci bzučivek či hrobaříků, ale naopak je patrný nárůst početnosti a diverzity u sukcesně pozdních a méně dominantních druhů. V návaznosti na téma manipulované sukcese jsme se zaměřili na studium individuálních potravních preferencí jednotlivých druhů mrchožroutů. Pro studium individuálních potravních preferencí jsme vytvořili metodiku testování, která umožňuje paralelní i sekvenční podávání jednotlivých typů potravy. Výsledky behaviorálních potravních testů ukázaly, že dělení na jednotlivé potravní guidly není diskrétní, ale představuje spíše kontinuální řadu. Námi testované druhy, které jsou obecně považovány za nekrofágní, se při našem experimentálním designu vyznačovaly mixovanými potravními preferencemi – všechny byly alespoň částečně dravé. Tato plasticita může sloužit jako pojistka pro období, kdy tyto druhy nejsou schopny nalézt žádnou vhodnou mršinu, anebo je tato již obsazena konkurenčními druhy. Námi demonstrované experimenty přinášejí konkrétní data o potravních preferencích testovaných jedinců a nabízejí unikátní vhled do biologie a ekologie druhů, v neposlední řadě je s demonstrovanou potravní plasticitou nekrofágních druhů brouků nutno počítat ve forenzních studiích.

Klíčová slova: sukcese, mršina, ekologie, nekrobiotní druhy, potravní strategie

Abstract

Carcasses, as one of the ephemeral habitats, represent an energy-rich but time-limited food resource. As a result, individual necrobiotic insect species are under strong competitive pressure. Using targeted manipulation of succession, we tested the interactions between the two main dominant groups on the carcasses of small mammals – blowfly larvae (Calliphoridae) and burying beetles (Nicrophorini). When these groups were experimentally excluded in the early phase of colonization, significant changes occurred in the entire community. In the colonization of older carcasses, neither blowflies nor burying beetles dominated; instead, there was an increase in abundance and diversity of successional late and less dominant species. Following the theme of manipulated succession, we focused on studying the individual feeding preferences of different carrion beetle species. To investigate these preferences, we developed a testing methodology that allows both parallel and sequential presentation of different food types. The results of behavioral feeding tests showed that the classification into distinct feeding guilds is not discrete but rather forms a continuous spectrum. The species we tested, which are generally considered necrophagous, exhibited mixed feeding preferences in our experimental design – all were at least partially predatory. This plasticity may serve as an insurance mechanism for periods, when these species are unable to find a suitable carcass or when available food source is already occupied by competitors. The experiments we conducted provide concrete data on the feeding preferences of the tested individuals and offer a unique insight into the biology and ecology of these species. Lastly, the demonstrated feeding plasticity of necrophagous beetles should be considered in forensic studies.

Keywords: succession, carcass, ecology, necrobiotic species, feeding strategies

Obsah

Úvod.....	1
Mršiny jako významný habitat	2
Sukcese, její typy a sukcesní modely.....	3
Klasifikace nekrobiotního hmyzu.....	11
Nekrofágní druhy	11
Predátoři	12
Parazitoidi	13
Omnivorní druhy	13
Náhodné druhy	14
Problémy s klasifikací jednotlivých druhů.....	14
Metody studia potravních preferencí hmyzu.....	15
Analýza obsahu střev.....	16
Analýza stabilních izotopů.....	18
Laboratorní testy a food choice experimenty	21
Shrnutí současných znalostí o podčeledi Silphinae	24
Shrnutí publikovaných článků.....	29
Kadlec, J., Mikatova, S., Maslo, P., Sipkova, H., Sipek, P., & Sladeczek, F. X. J. (2019). Delaying insect access alters community composition on small carrion: A quantitative approach. <i>Entomologia Experimentalis et Applicata</i> , 167(8), 729–740.....	29
Jakubec, P., Kadlec, J., & Šípek, P. (2021). Standardized laboratory methodology for the evaluation of foraging strategies in necrophilous beetles: a case study of necrophila (<i>Calosilpha</i>) <i>brunnicollis</i> (Coleoptera: Silphidae). <i>Journal of Medical Entomology</i> , 58(1), 40–46.....	31
Kadlec, J., Jakubec, P., & Šípek, P. (2024). In vitro comparison of two food choice methodologies for necrophagous species of the genus <i>Thanatophilus</i> (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae). <i>Journal of Medical Entomology</i> , 61(3), 603–610.....	34
Publikace zařazené do disertační práce.....	37
Článek I.....	37
Článek II.....	50
Článek III.....	58
Závěr	67
Literatura	69

Úvod

Lidská kultura byla od nepaměti fascinována smrtí – tajemstvím, kterému nikdo neunikne, a přesto ho nikdo z živých plně nepochopí. Smrt se stala ústředním motivem v umění, literatuře i filozofii. Malíř Hieronymus Bosch ve svých vizionářských obrazech zobrazoval peklo a posmrtný život s děsivými detaily. I dnes je smrt stále přítomná v populární kultuře – od filmů a hudby po videohry. Tato fascinace odráží naši touhu pochopit nevyhnutelné a smířit se s vlastní konečností.

Po smrti se z každého živého tvora stává jen rozkládající se hmota – mršina. Rozklad mrtvých těl hraje klíčovou roli ve všech ekosystémech, neboť umožňuje recyklaci živin a udržuje rovnováhu v přírodě. Mrchožrouti, jako jsou supi, lišky nebo hmyz, pomáhají urychlit rozklad. Bakterie a houby pak dokončují proces dekompozice, čímž uvolňují dusík, fosfor a další prvky zpět do půdy, kde slouží jako základní látky pro růst rostlin. Bez tohoto přirozeného koloběhu by se ekosystémy rychle zhroutily, protože by v nich chyběly základní živiny. Rozklad tak není jen symbolem konce, ale i neustálé obnovy života.

Tato disertační práce s názvem „**Potravní vztahy a strategie ve hmyzích společenstvech na mršinách**“, se zabývá částí toho komplexního tématu smrti a rozkladu mršin z pohledu sukcese a ekologie hmyzu. Cílem je ověřit vliv odstranění dominantních skupin hmyzu na vývoj hmyzího společenstva na mršinách a zkoumání potravní strategie vybraných druhů mrchožroutů, přičemž se obsah práce zejména opírá o terénní a food choice experimenty.

Mršiny jako významný habitat

Mršiny představují jeden z tzv. efemérních habitatů. Tedy habitatů, které se vyznačují krátkodobým trváním a nepredikovatelnou distribucí. Pokud jsou takové habitaty organického původu, (např. trus velkých obratlovců, plodnice hub nebo rozkládající se dřevo či různé plody), vyznačují se efemérní habitaty kromě krátkodobosti a prostorové nahodilosti, i velkým množstvím relativně rychle využitelné energie (Finn, 2001; Carter *et al.*, 2006). Na všech organických efemérních habitattech probíhá heterotrofní sukcese, která nevyhnutelně vede k jejich zániku. To představuje základní rozdíl od autotrofní sukcese, která naopak vede k více či méně stabilnímu stavu (Connell and Slatyer, 1977; Begon and Townsend, 2021).

Mezi efemérními zdroji představují mršiny jedinečný zdroj díky své vysoké nutriční hodnotě nicméně jsou pomíjivé a objevují se nepředvídatelně jak v čase, tak prostoru (Barton *et al.*, 2013; Benbow *et al.*, 2019). I přesto, že průběh rozkladu mršiny je kontinuální proces, závislý na celé řadě okolních podmínek, lze zde do jisté míry pozorovat klasické sukcesní střídání jednotlivých fází. Řada autorů se snažila průběh a sled jednotlivých fází rozkladu popsat a formálně klasifikovat. Různí autoři rozlišují tři až osm fází rozkladů (Méglin, 1894; Fuller, 1934; Payne, 1965; Anderson and VanLaerhoven, 1996), jejichž klasifikace je založena především na fyzickém stavu mršiny. Svoji roli ale hrají i hmyzí společenstva, jejichž složení se mezi jednotlivými fázemi výrazně liší (Obr.1).

Insect Family	Common Name	Stages of Decomposition (days postmortem)			
		Fresh (0-4)	Bloated (5-7)	Decay (8-13)	Dry (14-26)
Calliphoridae	blowflies	██████████	██████████	██████████	██████████
Muscidae	muscid flies	██████████	██████████	██████████	██████████
Silphidae	carrion beetles	██████████	██████████	██████████	██████████
Sarcophagidae	flesh flies	██████████	██████████	██████████	██████████
Histeridae	clown beetles	██████████	██████████	██████████	██████████
Staphylinidae	rove beetles	██████████	██████████	██████████	██████████
Nitidulidae	sap beetles	██████████	██████████	██████████	██████████
Cleridae	checkered beetles	██████████	██████████	██████████	██████████
Dermeestidae	dermestid beetles	██████████	██████████	██████████	██████████
Scarabaeidae	scarab beetles	██████████	██████████	██████████	██████████

Obr. 1. – Zastoupení jednotlivých čeledí hmyzu v průběhu rozkladných fází (Sharanowski *et al.*, 2008)

Rychlost rozkladu mršiny a střídání jednotlivých fází závisí na mnoha faktorech. Nejvýznamnějšími jsou velikost mršiny, okolní teplota, vlhkost a přítomnost hmyzu. Vyšší teplota a vlhkost, stejně jako aktivita hmyzu, mohou proces rozkladu výrazně urychlit. Větší mršiny se paradoxně rozkládají rychleji než menší, protože přitahují větší množství hmyzu, který intenzivněji spotřebovával biomasu těla (Hewadikaram and Goff, 1991).

Sukcese, její typy a sukcesní modely

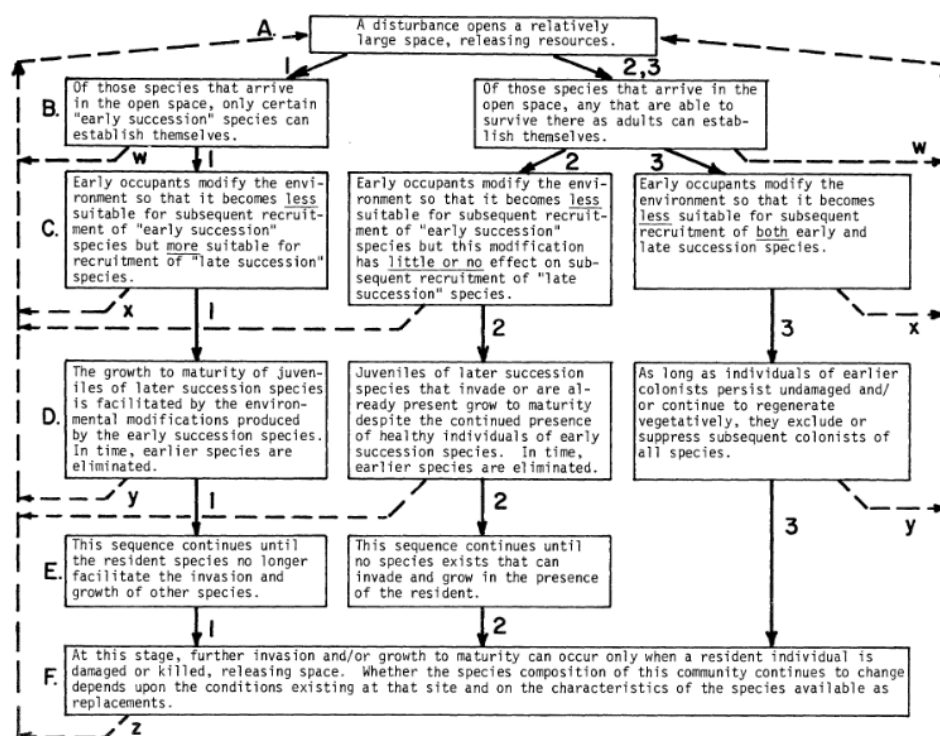
Sukcese je definována jako sled změn v ekologickém společenstvu, které jsou pozorovatelné v čase a prostoru (Connell and Slatyer, 1977; Begon and Townsend, 2021). Sukcese se dá klasifikovat na základě různých kritérií. Primární sukcese je proces, kdy se společenstva vyvíjejí na zcela novém a nezaplňném území, kde celý ekosystém vzniká zcela od začátku. Typickým příkladem je vznik ekosystémů na nově vzniklých vulkanických ostrovech nebo v místě čerstvě zaniklého ledovce (Benton, 1966). Na druhé straně k sekundární sukcesi dochází v oblastech, kde už existovalo nějaké společenstvo, které bylo narušeno, ale například semena rostlin jsou stále přítomna, tím pádem se proces vývoje a obnovy společenstva může odehrávat rychleji. Typickým příkladem může být zarůstání opuštěného pole, nebo regenerace lesa po požáru (Horn, 1974; Tilman, 1987).

Podle finálního stádia, ke kterému směřuje sukcese, ji můžeme rozdělit na dva základní typy. Autotrofní sukcese, která končí klimaxem a heterotrofní sukcese, která končí kompletním vyčerpáním zdroje (Connell and Slatyer, 1977; Begon and Townsend, 2021). Autotrofní sukcese začíná ekosystémem s nulovou nebo velmi nízkou biomasou a se zvyšující se úživností ekosystému se objevují komplikovanější organismy a složitější společenstva, většina organické hmoty je fixována v tělech autotrofních organismů. Podoba těchto společenstev může být stabilní nebo podléhat cyklickým disturbancím (Connell and Slatyer, 1977; Begon and Townsend, 2021). Naopak heterotrofní sukcese probíhá na efemérních či krátkodobých, energeticky vysoce vydatných zdrojích. Pojem heterotrofní sukcese tak popisuje vzájemné střídání jednotlivých sukcesních stádií během rozkladných procesů na substrátech jako je trus, mršiny, opadané ovoce či listí, plodnice hub nebo mrtvé dřevo. Pro všechny tyto a podobné substráty je společné to, že sukcese začíná vrcholem v dostupnosti zdrojů (Hanski and Koskela, 1977; Finn, 2001). Na rozdíl od autotrofní sukcese se tedy na začátku heterotrofní sukcese objevují pokročilé druhy schopné rychlého a efektivního využití živin. S postupující sukcesí se úživnost snižuje, množství biomasy klesá a konečným stádiem vývoje je fyzický rozklad, vyčerpání zdroje a následný zánik komunity (McIntosh, 1981; Begon and Townsend, 2021). Většina organické hmoty je fixována v tělech živočichů, bakterií či hub, které se podílejí na rozkladu.

Rozkladné procesy jsou zásadní ve všech ekosystémech, protože tvoří klíčový prvek v koloběhu hmoty a energie (Moore *et al.*, 2004; Benbow *et al.*, 2019). V suchozemských ekosystémech se rozloží 50–70 % primární produkce organické hmoty, v mořských ekosystémech je to až 90 %. Jen pro představu, odhaduje se, že celosvětově se každý rok rozloží více než 100 gigatun (10^{14} kg) organické hmoty. Tento proces je klíčový pro recyklaci živin a podporu životních cyklů v ekosystémech (Gessner *et al.*, 2010). V každém biotopu probíhá rozklad organické hmoty za jiných podmínek a s jinou efektivitou. Rychlost rozkladu je zejména závislá na velikosti zdroje, teplotě, přístupu kyslíku a z velké části na přístupu organismů (Begon and Townsend, 2021). Na rozkladných procesech zdroje se podílí široká škála organismů od obratlovců, přes drobné bezobratlé až po bakterie a houby (Bornemissza, 1957; Franklin, 1993). Jinak bude probíhat rozklad mršiny drobného hlodavce, pokud ho první objeví liška, hrobařík

(*Nicrophorus* sp. Fabricius, 1775) nebo bzučivky (Diptera: Calliphoridae). U trusu býložravců hrají podobně významnou roli např. velké druhy koprofágních brouků, které jsou schopny velké části zdroje relokovat. Jinými slovy ten, kdo se na mršině objeví jako první, je schopen do velké míry ovlivnit výslednou podobu společenstva. Tento efekt se nejvíce projevuje u druhů, které jsou schopny si zdroj monopolizovat. Schopnosti monopolizovat zdroj a tím eliminovat, či alespoň omezit ostatní rozkladače, může hrát v ekosystémech velmi výraznou roli. Své využití našla dokonce i v zemědělství. Příkladem bylo využití introdukovaných koprofágních brouků při snižování kalamitního množství dvoukřídleho hmyzu, který se líhnul z trusu skotu chovaného na farmách v Austrálii (Perri *et al.*, 2023).

Během sukcese dochází v průběhu času ke střídání jednotlivých kolonizujících druhů (nejen v případě heterotrofní sukcese), které spolu mohou vzájemně různým způsobem interagovat. Kromě neutrálního vztahu, kdy přítomnost jednoho druhu nemá vliv na následnou prezenci druhu dalšího, nastávají i situace kdy dřívější kolonizátoři zdroj zpřístupňují následným druhům, nebo naopak kolonizaci zdroje dalšími druhy svojí přítomností stěžují. Z tohoto předpokladu vychází i tzv. facilitační a inhibiční model sukcese (Connell and Slatyer, 1977) (Obr.2).



Obr.2. – Tři modely mechanismů sukcese druhů. (1) facilitační model (2) model bez vzájemného ovlivnění a (3) inhibiční model. Písmena **A–F** označují jednotlivé úrovně sukcese. Přerušované čáry představují přerušení procesu (disturbanci). Písmena **w–z** označují pravděpodobnost přerušení procesů z Connell and Slatyer (1977).

Základní myšlenkou **facilitačního modelu** je, že brzké a časné druhy sukcesní řady svojí činností mění zdroj tak, že jej mohou lépe osidlovat další druhy. Facilitace funguje jako hnací motor zejména u autotrofní sukcese. Příkladem jsou například pionýrské druhy rostlin, které se objevují na počátku autotrofní sukcese po ústupu ledovce a jejichž aktivitou vznikají příhodnější podmínky pro růst pokročilejších rostlin. Jejich aktivitou se snižuje pH, zvyšuje obsahu dusíku, vzniká první vrstva organického materiálu na matečné hornině (Worley, 1973; Walker, 1993; Schmidt *et al.*, 2008). Další ukázkou může být vzájemný pozitivní vliv stromů (facilitace) na růst bylin vyhledávajících stín v savanových biotopech (Carrión *et al.*, 2017). Podobně, Caldwell *et al.* (1991) popisuje vzájemnou facilitaci vytrvalých bylin rostoucích na severoamerických prériích. Díky svým dlouhým kořenům „vytahuje“ pelyněk trojzubý (*Artemisia tridentata* Nutt, 1841) vláhu z hlubších

vrstev půdy, což pomáhá růstu žitňáku (*Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link)), který má pouze mělké kořeny a jinak by neměl možnost se k vláze dostat.

Valiente–Banuet *et al.* (2006) ve své práci popsal zajímavý příklad facilitace, kdy ve Středomoří vytvářejí současné druhy rostlin specifické mikroklima, a tím umožňují přežití vlhkomilným terciálními relikty. K podobným výsledkům dospěli při svých experimentech na kaktusech saguaro Niering *et al.* (1963) a posléze i Steenbergh a Lowe (1969). Autoři ukázali, že nové semenáčky prospívají pouze pokud se v jejich blízkosti nachází velké rostliny, které je alespoň na čas zastíní.

S facilitací se můžeme setkat i u heterotrofní sukcese. Kadavery či trus bývají zásadně ovlivněny larvami bzučivek a dalšího dvoukřídlého hmyzu. Jejich aktivita rozrušuje zdroj potravy, zpřístupňuje nové části zdroje a zároveň umožňuje usazení i jiných druhů hmyzu (Sladeczek *et al.*, 2021; Dawson *et al.*, 2022). Dalším případem facilitace u heterotrofní sukcese je činnost velkých obratlovců, kteří při konzumaci kadaverů velkých mršin otevírají břišní dutinu a tím odhalí tkáň i menším druhům obratlovců i bezobratlým (Stahler *et al.*, 2002; Selva *et al.*, 2003; Wilmers *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2014). Podobně fungují v ekosystémech dřevokazné houby, které svojí aktivitou mohou zpřístupnit živiny pro ostatní druhy hub či různé členovce. Nemusí to ale platit vždy, neboť obzvláště u hub platí, že první kolonizátor často zabere celý zdroj jen pro sebe (Shigo, 1975; Rayner and Boddy, 1988; Lonsdale *et al.*, 2008).

Dominantní druhy mohou naopak zdroj monopolizovat, nebo i jinak znesnadnit ostatním organismům jeho využívání (tzv. **inhibiční model** sukcese). Díky jejich činnosti dochází ke zpomalení nárůstu počtu druhů ve srovnání se stavem, kdy v systému tyto druhy z nějakého důvodu chybí. Příkladem inhibice u autotrofní sukcese může být například zarůstání lokalit dominantním, konkurenčně silným druhem rostliny. Dominantní druh může ostatním rostlinám bránit v růstu buď fyzicky (přerůstání, zástin, nedostatek prostoru ke klíčení) (Abdul–Wahab and Rice, 1967), nebo chemicky jak je známo například u ořešáků, akátů či dalších dřevin (Muller, 1966; Mallik and Inderjit, 2002). U heterotrofních společenstev jsou příkladem výše zmíněné dřevokazné houby, kdy primární kolonizátor svým růstem

brání růstu ostatních druhů (Rayner and Boddy, 1988; Boddy, 2001; Heilmann–Clausen and Boddy, 2005). Vzájemnou inhibici můžeme pozorovat i mezi některými skupinami saproxylofágního hmyzu. Některé druhy totiž představují natolik silnou konkurenci, že se další, konkurenčně méně schopné nejsou schopny prosadit. Weslien *et al.* (2011) popisuje, jak přítomnost kozlíčka smrkového (*Monochamus sutor* (Linnaeus, 1758)) v pařezech smrků má negativní vliv na vývoj na vzácného kornatce velkého (*Peltis grossa* (Linnaeus, 1758)). Larvy kozlíčka se živí hluboko v bělovém dřevě a svojí činností snižují atraktivitu a kvalitu stanoviště pro dlouhověké larvy kornatce. Podobně byl zaznamenán i negativní vliv ve dřevě hnízdících severoamerických mravenců rodu *Aphaenogaster* Mayr, 1853 na přítomnost některých dřevokazných hub či termitů (Warren a Bradford 2011)

Na mršinách či v trusu mají výrazný inhibiční vliv larvy dvoukřídlých. Je to především díky jejich obrovské rychlosti kolonizace vysoké abundanci, ale i díky produkci amoniaku (Denno and Cothran, 1976; Hirschberger and Degro, 1996; Sladecek *et al.*, 2021; Matuszewski and Mađra–Bielewicz, 2022).

Extrémním případem inhibice u heterotrofní sukcese představují druhy schopné relokovat část nebo celý potravní zdroj. To bývá spojeno s aktivní ochranou relokované části zdroje, odstraněním ostatních rozkladačů a se zahrabáním monopolizované části (Bornemissza, 1979; Ridsdill–Smith *et al.*, 1986; Suzuki, 2000). Typickým příkladem relokujícího hmyzu jsou například hrobařici. Aktivita jediného páru může vést k úplné monopolizaci mršiny malého savce či ptáka. Hrobařici navíc aktivně odstraňují nakladená vajíčka a larvy dvoukřídlých. Po zahrabání, mechanické a chemické úpravě mršiny je zajištěno, že se v ní vyvíjí pouze potomci daného páru. Nicméně vliv hrobařků je omezen jejich relativně malou velikostí (10–35 mm). Ty největší druhy dokážou pohřbít a monopolizovat kadaver o hmotnosti maximálně 100 g. (Milne and Milne, 1976; Scott, 1998). Větší mršiny tak slouží primárně jako zdroj potravy pro dospělé jedince, kteří se na nich živí během svého aktivního života (Trumbo *et al.*, 2016).

Relokující koprofágní brouci mají velmi podobné chování jako hrobařici, ale díky možnosti rozdělit trus na menší části nejsou limitováni velikostí dostupného zdroje (Sladecek *et al.*, 2021). Navíc trus mohou přemísťovat i na značné vzdálenosti

ve formě kuliček (*Gymnopleurus* sp. Illiger, 1803; *Scarabaeus* sp. Linnaeus, 1758; *Sisyphus* sp. Linnaeus, 1758) nebo jej jen zahrabávají do tunelů pod zdrojem (*Copris* sp. Geoffroy, 1762; *Geotrupes* sp. Latreille, 1796; *Onthophagus* sp. Latreille, 1802).

I velcí predátoři mohou inhibovat ostatní členy nekrobiontních společenstev. Medvědi baribalové (*Ursus americanus* (Pallas, 1780)) ve velkém množství případů svoji kořist zahrabávají do sněhu či hlíny a aktivně ji brání, čímž znemožňují dalším druhům obratlovčích predátorů a mrchožroutů v získání zdroje (Allen *et al.*, 2014).

Vzájemný vliv jednotlivých druhů není černobílý. Působení určitého druhu tak pro jeden druh může působit inhibičně, zatímco jiný druh může facilitovat. Ve většině ekosystému probíhají vzájemné facilitace či inhibice současně na různých úrovních. Tento dynamický ekologický proces je klíčový pro porozumění průběhu sukcese v různých prostředích (Hirschberger and Degro, 1996; Allen *et al.*, 2014; Begon and Townsend, 2021; Sladecek *et al.*, 2021).

Jednou z možností, jak studovat facilitaci či inhibici na efemérních zdrojích je přístup využívající blokování sukcese, tedy zabránění přístupu pionýrských druhů. Blokováním vlivu raně sukcesních dominantních druhů se dá ukázat jejich vliv na společenstvo. Sladecek *et al.* (2021) využil tento princip při studiu sukcese hmyzích společenstev na trusu velkých obratlovců. Zajímavé je, že manipulace s oddálením přístupu hmyzu vedly k celkovému zvýšení početnosti koprofágního hmyzu, ale neměly vliv na celkovou diverzitu druhů. Aktivita pozdně sukcesních druhů koprofágních brouků, byla příznivě ovlivněna aktivitou pionýrských druhů dvoukřídlých. Naopak na pozdně sukcesní druhy dvoukřídlých měly pionýrské druhy dvoukřídlých negativní vliv. Autor si také všímá, že facilitace je výraznější mezi fylogeneticky vzdálenými liniemi (raně sukcesní dvoukřídlí a pozdně sukcesní brouci), zatímco inhibice je častější mezi blízce příbuznými liniemi (raně vs. pozdně sukcesní dvoukřídlí). Podobný efekt byl popsán v našem podnebném pásmu u výkalnic (*Scatophaga stercoraria* (Linnaeus, 1758)), které svojí činností omezovaly četnost výskytu a úspěšnost rozmnožování hnojníka černého (*Aphodius ater* (DeGeer, 1774)) (Hirschberger and Degro, 1996).

Jak již bylo řečeno, v případě mršin představují dominantní raně sukcesní skupinu bzučivky. Jejich larvy se na mršině objevují velmi brzy a ve velkém množství. Svým působením urychlují rozkladný proces, zvyšují vlhkost kadaveru a produkují amoniak. Díky tomu mají negativní vliv na ostatní druhy objevující se později v sukcesi (Denno and Cothran, 1976; Matuszewski and Mądra–Bielewicz, 2022). Zároveň, ale mohou svojí aktivitou zapříčinit rozrušením těla a zpřístupněním vnitřních orgánů nebo tekutin vytékajících z kadaveru. Toto zpřístupnění tkání společně se zvýšením teploty pomáhá facilitovat zdroj pro ostatní druhy objevující se později v průběhu sukcese například pro mrchožrouty, kožojedy či hlodáče (Coleoptera: Silphinae, Dermestidae, Trogidae) (Dawson *et al.*, 2022). Výskyt mrchožroutů *Necrophila japonica* (Motschulsky, 1862) zvyšuje uvolňování dimethyldisulfidu a dimethyltrisulfidu z těl mršiny a díky tomu jsou ke kadaverům přilákány další druhy nekrobiontního hmyzu (Ito *et al.*, 2023).

Klasifikace nekrobiotního hmyzu

I přes nepredikovatelnou časovou i prostorovou distribuci se na mršiny specializovala celá řada hmyzích druhů. Jelikož mršiny představují významný a velmi krátkodobý zdroj energie, tak druhy, které jej vyhledávají si navzájem silně konkurují. Silná konkurence vedla k adaptacím pro co nejrychlejší nalezení mršiny, k rozdílné sezónní aktivitě, ale i k různým potravním specializacím (Máslo, 2016).

Podle potravních preferencí dělíme nekrobiontní hmyz do několika potravních guild: na nekrofágní druhy, predátory a parazity, omnivorní druhy a druhy náhodně přítomné (Smith, 1986; Kočárek, 2003; Goff, 2009). Toto dělení vzniklo z potřeby lépe porozumět a klasifikovat jejich potravní biologii a je využíváno například v ekologických a forenzních studiích. Při ekologických studiích pomáhá lépe uchopit a začlenit jednotlivé druhy do širšího kontextu a uvědomit si jejich roli v průběhu sukcese hmyzího společenstva kadaveru. Diskrétní přiřazení jednotlivých druhů k jednotlivým skupinám není jednoznačné. Řada druhů vykazuje přechodové strategie a během vývoje či sezóny uchyluje k různým alternativním potravním strategiím (viz kapitola *Problémy s klasifikací jednotlivých druhů*).

Nekrofágní druhy

Nekrofágní druhy se živí přímo rozkládajícími se tkáněmi mršiny nebo tekutinami, které se uvolňují při rozkladu. Díky tomu mají největší vliv na degradaci biomasy mršiny (Amendt *et al.*, 2004; Ulrich *et al.*, 2007; Zanetti *et al.*, 2016; Tomberlin *et al.*, 2017). Do této skupiny můžeme zahrnout většinu larev dvoukřídlých, kteří se živí na mršině – bzučivky, masařky (Diptera: Sarcophagidae) a mouchy (Diptera: Muscidae) zároveň do této skupiny patří i řada druhů brouků ze skupiny mrchožroutovitých (Silphinae), (Kočárek, 2003; Watson and Carlton, 2003).

Povolný (1978, 1979) a Kočárek (2001) uvádějí podrobnější dělení nekrofágních druhů, které klasifikuje nekrofágy na základě preferovaného stádia dekompozice a detailněji se zaměřuje na nejčastěji konzumované tkáně. Nekrofágové se podle těchto prací dělí na vlastní nekrofágy živící se čerstvou mršinou (*Thanatophilus*

Leach, 1815, *Sciodrepoides* Hatch, 1933), dále saprofágy vyhledávající biochemicky aktivní mršinu (Coleoptera: Hydrophilidae, Leiodidae), dermatofágy osidlující vysychající zbytky svalů a kůže mršiny a keratofágy, kteří jsou schopni trávit peptidové řetězce keratinu, kolagenu nebo elastinu a díky tomu se živí na zbytcích kostry, srsti, peří, případně i rohoviny (např. Dermestidae, Trogidae) (Kočárek, 2003).

Predátoři

Predátoři se živí hlavně jedinci ostatních guild, kteří jsou přítomni na mršině, zejména nekrofágními larvami dvoukřídlých. Svojí činností dovedou výrazně ovlivňovat počty ostatních druhů. Počty predátorů jsou však přímo úměrné počtům jejich kořisti, nikdy jich nebude více než kořisti (Kočárek, 2003). Na mršině se vyskytuje relativně vysoký počet druhů dravých brouků vykazujících různé potravní preference. Tyto preference jsou závislé především na tělesné velikosti a konstituci kusadel. Drobné druhy s malými kusadly se živí pouze čerstvě vylíhnutými larvami či vajíčky dvoukřídlých, větší druhy potom predují larvy adekvátní velikosti. Zároveň se všichni predátoři cíleně vyhýbají velkým masám larev, které silně zvyšují vlhkost svého okolí a zároveň produkují toxický amoniak. Predátoři často loví v okolí či pod mršinou, kde je koncentrace larev nižší (Peschke *et al.*, 1987). Larvy posledního instaru bzučivek loví zejména velcí drabčící a mršníci. Drabčící rodu *Creophilus* Leach, 1819 jsou jako jedni z mála schopni kusadly prorazit pupária bzučivek a následně zkonzumovat kuklu nebo i lovit dospělé bzučivky (Peschke *et al.*, 1987). Dravé chování je známé i u ranných larválních instarů některých druhů masařek (Sarcophagidae) (Pape, 1987; Richet *et al.*, 2011).

Parazitoidi

Mezi parazitoidy parazitující na larvách nekrofágních dvoukřídlých patří především zástupci řádu blanokřídlí (Hymenoptera), převážně z čeledí Braconidae, Ichneumonidae, a Pteromalidae (Voss *et al.*, 2009; Horenstein and Salvo, 2012). Mezi parazitoidy počítáme i ektoparazitické larvy drabčků rodu *Aleochara* Gravenhorst, 1802 (dospělí brouci jsou draví). Čerstvě vylíhnuté larvy těchto drabčků aktivně vyhledávají vhodné pupárium dvoukřídlých, do kterého se pomocí silných kusadel prokoušou a následně se živí na povrchu kukly až do vlastního zakuklení (Maus *et al.*, 1998; Lin and Shiao, 2013). Ekologický vliv parazitoidů se příliš neliší od predátorů.

Omnivorní druhy

Omnivorní druhy kombinují predaci a nekrofáгии. Živí se jak rozkládající se tkání mršiny, tak jsou schopny lovit ostatní druhy hmyzu na mršině. Tato skupina je ze všech přechozích také druhově nejpočetnější, avšak zaleží na tom, jak přísně nastavíme hranici mezi omnivorií a nekrofágií. V extrémním případě, můžeme do této skupiny zařadit v podstatě jakéhokoliv nekrofágního brouka, jelikož většina z nich je schopna více či méně konzumovat larvy bzučivek či jiné menší druhy nekrofágních brouků (Steele, 1927; Jakubec *et al.*, 2021).

Do skupiny omnivorních druhů můžeme zahrnout i mravence nebo další blanokřídlé, pro které sice mršina netvoří primární zdroj potravy, ale jsou schopni ji konzumovat, stejně tak jako lovit hmyz přítomný na mršině (Smith, 1986; Kočárek, 2003; Goff, 2009). Relativní podíl jednotlivých složek potravy (tj. tkáně mršin nebo ulovený nekrofágní hmyz) se může u omnivorů měnit v průběhu života jedince, nebo též v průběhu rozkladu kadaveru. Detailní porozumění potravních návyků jednotlivých druhů omnivorů proto bývá relativně komplikované a metodologicky náročnější než u předchozích skupin.

Náhodné druhy

Řada druhů se na mršině vyskytuje spíše náhodou, využívá ji jako prostředí pro úkryt nebo jako zdroj vlhkosti či případně i náhodné loviště. Do této skupiny mohou spadat například potemníci (Tenebrionidae), suchozemští isopodní koryši nebo různé druhy pavouků (Wolff *et al.*, 2001; Amendt *et al.*, 2004).

Problémy s klasifikací jednotlivých druhů

Výše uvedená klasifikace, ale naráží na řadu problémů. Například mnoho druhů nekrobiontního hmyzu se v nepříznivých podmínkách uchyluje k alternativním potravním strategiím. Poinar (1985) popisuje zvláštní potravní chování u severoamerického druhu mrchožrouta *Heterosilpha aenescens* (Casey, 1886), který se běžně živí na mršinách či trusu šelem, ale za nedostatku potravy jeho larvy konzumují rostlinnou stravu, např. jahody. U nás se oportunistické chování objevuje např. u běžného obyvatele lesů, mrchožrouta znameňaného *Oiceoptoma thoracicum* (Linnaeus, 1758). U tohoto druhu bylo pozorováno, že se živí nejenom na mršinách, ale i na trusu či rozkládajících se plodnicích hub (Ratcliffe, 1996; Hastir and Gaspar, 2001; Sikes, 2005).

Důležité je také zmínit, že dospělci a larvy stejného druhu mohou preferovat jinou potravu. Pokud se při klasifikaci zaměříme jen na potravní chování dospělců, nemusí tato klasifikace reflektovat potravní chování larev a naopak. Například u mrchožrouta pobřežního (*Necrodes littoralis* (Linnaeus, 1758)) se často uvádí, že je nekrofágní. To se dá považovat za primární strategii pouze u larev, jelikož u dospělců je známo, že jsou schopni se živit dravě a lovit larvy dvoukřídlých (Charabidze *et al.*, 2016; Frątczak–Łagiewska and Matuszewskia, 2018). Obdobně je tomu u hrobaříků, jejichž larvy jsou stoprocentní nekrofágové, ale dospělci se chovají i dravě (Milne and Milne, 1976; Scott, 1998). Toto přizpůsobení potravního chování by navíc mohlo být velmi výhodné

pro výživu dospělců a larev, jelikož sdílejí stejnou niku a rozdílná preference potravy by snižovala vnitrodruhovou konkurenci. Navíc je pravděpodobné, že larvy i dospělci většiny druhů mrchožroutů se při nedostatku primární potravy a silné konkurenci bude uchylovat ke kanibalismu (Steele, 1927; Dorsey, 1940).

Potravní preference se mohou lišit i v rámci pohlaví u jednoho druhu. Jedním z možných vysvětlení rozdílných preferencí, by mohlo být přizpůsobení potravní strategie aktuálnímu reprodukčnímu stádiu, skutečným ekologickým podmínkám nebo nutričním hodnotám potravy. Studie prováděné na hrobařících ukazují, že kvalita a typ potravy má vliv na velikost snůšky u samic. To by mohlo vysvětlovat, proč samci a samice konzumují rozdílné zastoupení jednotlivých složek potravy (Trumbo and Robinson, 2004). Fox a Moya-Laraño (2009) dospěli k podobným závěrům při experimentech na zrnokazech (Coleoptera: Bruchinae).

Existenci alternativních potravních strategií jsme pozorovali jak při terénních pokusech, tak i v rámci vlastních food choice experimentů na mrchožroutech. Výsledky pozorování jsou popsány v rámci článků tvořících hlavní část této práce (Jakubec *et al.*, 2021; Kadlec *et al.*, 2024).

Metody studia potravních preferencí hmyzu

Pro rozdělení (nejen) nekrobiontního hmyzu do jednotlivých potravních guild je potřeba důkladně znát jeho potravní chování a preference. K tomu slouží různé metodické přístupy. Část dat o potravních preferencích jednotlivých druhů pochází z přímých pozorování v terénu, či jednoduchých etologických pokusů s uzavřením několika jedinců a potencionální potravy do boxu (Steele, 1927). Takováto pozorování jsou ale silně závislá na životní fázi jedince, okolních podmínkách či osobě pozorovatele. Velká část pozorování byla zpravidla přejímána ze starších prací, které nebyly prováděny ve standardizovaných podmínkách a nemusí tedy odpovídat realitě (Ratcliffe, 1972). Navíc přímá terénní pozorování pro řadu (převážně) vzácných druhů nejsou k dispozici. Terénní pozorování může zaznamenat i abnormální chování a jeho paušalizace může vést

k nesprávným závěrům. Například za predáční chování může být považováno zabití konkurenčních jedinců či druhů v rámci boje o zdroj. Například Steele (1927) uvádí, že největší druh hrobaříka (*Nicrophorus orbicollis* Say, 1825) zabíjel jedince menšího druhu (*Nicrophorus tomentosus* Weber, 1801), to ale není důkaz dravého chování, spíš se jedná o likvidaci konkurence. Stejně tak pokud pozorujeme larvy mrchožroutů na rostlinných zbytcích, neznamená to nutně, že jsou fytofágní (Poinar, 1985). Daleko přesnější informaci o potravním chování druhu nám poskytnou studie založené na systematickém experimentálním přístupu. V zásadě existují tři přístupy jak systematicky studovat složení stravy u bezobratlých – analýza obsahu střev, analýza stabilních izotopů a přímé laboratorní testování potravních preferencí (Ikeda *et al.*, 2007; Gómez and Kolokotronis, 2017; Charalabidis *et al.*, 2019).

Analýza obsahu střev

Analýzou zbytků nestrávené potravy ve střevech je možno provádět buď přímou determinací nestrávených zbytků potravy, nebo pomocí DNA barcodingu (či metabarcodingu), které mohou přinést konkrétnější informace o složení potravy. DNA barcoding je metoda, která slouží k rychlé, přesné a částečně automatizované identifikaci druhů za použití krátkých, standardizovaných genových oblastí. Nejčastěji používanou oblastí genomu pro obratlovce i bezobratlé je část genu cytochrom c oxidázy I (COI nebo COX1), která se nachází v mitochondriální DNA (Hebert and Gregory, 2005). Tato technika vychází z předpokladu, že porovnáním dané sekvence s referenční databází těchto úseků lze jednoznačně určit druh konkrétního organismu (Valentini *et al.*, 2009; DeSalle and Goldstein, 2019). DNA metabarcoding je rozvíjející se metoda, která umožňuje identifikaci více druhů ze směsného vzorku pomocí vysokokapacitního sekvenování. Oproti standartnímu DNA barcodingu se metabarcoding rychle prosazuje jako nákladově efektivní metoda pro rozsáhlé studie v prostředích, kde je tradiční morfologická identifikace druhů logisticky nebo finančně nepraktická (Shelton *et al.*, 2023).

Molekulární detekční metody závisí na schopnosti DNA odolávat trávicím procesům ve střevě testovaného jedince a na úspěšnosti polymerázové řetězové

reakce (PCR) při amplifikaci DNA kořisti z částečně natráveného materiálu (Zaidi *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Hoogendoorn and Heimpel, 2001; Greenstone *et al.*, 2007). Při testování potravních preferencí u různých hmyzích predátorů se ukázalo, že v některých případech lze obsah střev analyzovat i po více než dvou dnech od konzumace potravy. Problémem může být, že v některých případech se krátké sekvence důležité pro určení typu potravy zachovají ve střevech jen několik málo hodin. Tento problém se může objevit při vyhodnocování kořisti dravého hmyzu (Zaidi *et al.*, 1999; Greenstone *et al.*, 2007) nebo u určování hostitele krvesavých druhů (Alcaide *et al.*, 2009). Testováním přítomnosti tkání různých druhů obratlovců ve střevech vrubounovitých brouků a mrchožroutů (Silphinae a Scarabaeidae) pro potřeby forenzní entomologie se zabývalo několik autorů (Gómez and Kolokotronis, 2017; Smith, 2019; Toni *et al.*, 2023). Metody DNA metabarcodingu mohou být také použity například pro zjištění hostitelských rostlin housenek motýlů či mandelinek (Miller *et al.*, 2006; Jurado–Rivera *et al.*, 2008; Hausmann *et al.*, 2020).

Molekulární metody analýzy potravních reziduí v trávicím traktu přinášejí velmi přesné a jednoznačné informace o aktuálním složení potravy jedince. Nicméně z důvodu výše zmíněných limitací nemohou poskytnout informace o celkových poměrech různých složek potravy nebo jejich množství potřebném pro růst a vývoj. Nevýhodou metod založených na analýzách DNA je také jejich vyšší finanční náročnost a vyžadují pokročilé laboratorní dovednosti.

Analýza stabilních izotopů

Izotop daného prvku má stejné atomové číslo jako prvek samotný, ale jiný počet neutronů a tím i jinou atomovou hmotnost. Například přibližně 1 % všech atomů uhlíku jsou ^{13}C , zbytek ^{12}C , zatímco přibližně 0,4 % všech atomů dusíku jsou atomy ^{15}N a zbytek tvoří atomy ^{14}N . Stabilní izotopy se přirozeně vyskytují všude v našem okolí. Nerozpadají se (tj. nejsou radioaktivní), jejich zastoupení v těle organismů se mění např. v závislosti na stáří, konzumované potravě či geografickém regionu, což z nich dělá užitečné přírodní indikátory.

Existují dva přístupy k použití stabilních izotopů. První přístup využívá přirozeně se vyskytující rozdíly v množství izotopů ke sledování toků živin uvnitř biotopu, ke zjištění vzájemných interakcí druhů a jejich trofických vztahů nebo k určení konkrétní stravy jedince (Tayasu *et al.*, 1998; Markow *et al.*, 2000; Trimble and Sagers, 2004; Hood–Nowotny and Knols, 2007). Druhou možností jsou studie, kde jsou do systému přidávány a sledovány označené sloučeniny obohacené o určité izotopy (Hershey *et al.*, 1993; Unsicker *et al.*, 2005; Hood–Nowotny *et al.*, 2006).

Nejčastěji využívanými jsou izotopy vodíku (^2H), uhlíku (^{13}C), dusíku (^{15}N), kyslíku (^{18}O), vzácněji pak stroncia (^{84}Sr , ^{86}Sr) nebo síry (^{34}S) (Tayasu *et al.*, 1998; Markow *et al.*, 2000; Kiyashko *et al.*, 2004; Trimble and Sagers, 2004; Hood–Nowotny and Knols, 2007; Quinby *et al.*, 2020).

Stabilní izotopy lze použít i pro analýzu potravní biologie a tyto výsledky se dají používat k určení trofické guildy. Poměr stabilních izotopů uhlíku ($\delta^{13}\text{C}$) a dusíku ($\delta^{15}\text{N}$) v tělech organismů je dán složením jejich potravy a prostředím ve kterém se vyskytují. Tyto izotopy se kumulují v rámci potravního řetězce. Udává se, že zastoupení těchto izotopů je u konzumentů o 1‰ až 3‰ vyšší než v jejich potravě (Scheu and Falca, 2000; Ikeda *et al.*, 2007). Vysoký podíl izotopu ^{15}N je typický pro druhy dravé a dají se tak odlišit od omnivorů nebo herbivorů (Scheu and Falca, 2000). U dravých druhů se dá pomocí této analýzy určit jak vysoko se nacházejí v potravním řetězci a zároveň specifikovat jejich potravní chování (Ponsard and Ardit, 2000; Scheu and Falca, 2000; McNabb *et al.*, 2001).

Pro zachování maximální věrohodnosti výsledků a jejich vzájemnému porovnání je nezbytné dodržovat již publikované metodiky sběru dat a vyhodnocování, aby se předešlo nepřesnostem v měřeních a interpretaci dat (Post, 2002; Dalerum and Angerbjörn, 2005; Phillips *et al.*, 2014).

Výsledky izotopové analýzy může ovlivnit celá řada faktorů. Důležité je zaznamenat jaká tkáň či struktura je pro testy odebrána, pokud jsou odebírány krovky brouků, či jiné kutikulární struktury, zastoupení stabilních izotopů vypovídá pouze larvální potravě a potravní chování dospělce nemá na izotopy v těchto částech žádný vliv (Quinby *et al.*, 2020). Neúmyslné zahrnutí obsahu střev do vzorku analyzovaných jedinců při homogenizaci celého jedince může značně zkreslit výsledné poměry izotopů (Hocking *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2007, 2008; Feldhaar *et al.*, 2009)

Pokud jsou prováděny rozsáhlé studie u jednoho druhu a liší se zastoupení konkrétních složek potravy v rámci celého areálu výskytu, tak je pro přesnější interpretaci výsledků vhodné rozdělit areál na dílčí lokality (Kelly, 2000; Phillips *et al.*, 2014). Vzájemný poměr stabilní izotopů není závislý pouze na potravě, ale také na izotopovém pozadí prostředí a složení půdy. Především u detritofágních druhů, hraje izotopové složení půdy významnou roli (Tayasu *et al.*, 2002; Uchida *et al.*, 2004).

Poměr stabilních izotopů některých prvků v prostředí je také ovlivňován spalováním fosilních paliv (Francey *et al.*, 1999), hnojením (Pardo and Nadelhoffer, 2010) či jinými lidskými činnostmi. Lidskou činností ovlivněné izotopové pozadí se pak může odrazit například na poměrech izotopů u stejných rostlin a jejich konzumentů z různých lokalit (Hood–Nowotny and Knols, 2007).

Pokud se zaměříme na využití stabilních izotopů pro zařazení nekrobiontního hmyzu do konkrétních ekologických guild, musíme zmínit studie, které provedl Ikeda *et al.* (2007, 2008). Pro tento typ studií jsou důležité referenční skupiny. Ikeda zvolil jako nekrofágní skupinu čtyři druhy hrobaříků a jako dravou referenční skupinu střevlíky (Coleoptera: Carabidae). Naměřené hodnoty testovaných druhů pak porovnal s těmito referenčními skupinami. Ačkoli autoři zařadili všechny druhy do patřičných guild, nebyli schopni potvrdit dravé chování *Dendroxena sexcarinata* (Motschulsky, 1861). O tomto druhu, stejně jako o ostatních zástupcích tohoto rodu

se ví, že jsou stromovými predátory housenek (Koch, 1989; Sugiura, 2017). Vzhledem k tomu, že ve studii Ikedy nedosahoval žádný z mrchožroutů (Silphinae) hodnot $\delta^{15}\text{N}$ vyšší než použitý nekrofágní standart, Ikeda předpokládá, že všechny testované druhy jsou čistě nekrofágní.

Důvod nejednoznačných výsledků studie pravděpodobně spočívá ve výběru hrobaříků jako nekrofágní referenční standarty. Přestože larvy hrobaříků jsou skutečně striktně nekrofágní, dospělci jsou příležitostnými predátory muších larev a za určitých okolností se dokonce chovají kanibalisticky (Sikes, 2005; Dekeirsschieter *et al.*, 2011). Pro přesnější nastavení referenčních hodnot $\delta^{15}\text{N}$ by bylo vhodné používat čerstvě vylíhnutá imaga, nebo například jen část kutikuly z krovek imag, protože tyto hodnoty by lépe odrážely čistě nekrofágní potravní chování larev.

Výše zmíněný příklad demonstruje hlavní slabinu analýzy stabilních izotopů, je totiž silně závislá na lokalitě a také na stanovení vhodného referenčního druhu pro každou strategii. To může vést k nesprávnému vyhodnocení vzhledem k tomu, že referenční druhy zpravidla nejsou chovány v kontrolovaných laboratorních podmínkách.

Laboratorní testy a food choice experimenty

Třetí metoda analýzy potravního chování je založena na potravně preferenčních (tzv. food choice) laboratorních experimentech. Tento přístup byl v minulosti úspěšně využit pro studium potravních preferencí mnoha druhů živočichů včetně střevlíků nebo housenek motýlů (Singer, 2001; Honek *et al.*, 2011; Kulkarni *et al.*, 2016; Charalabidis *et al.*, 2019). Potravně preferenční experimenty mohou být založeny na jedincích chovaných v zajetí nebo na exemplářích odchycených volně z přírody.

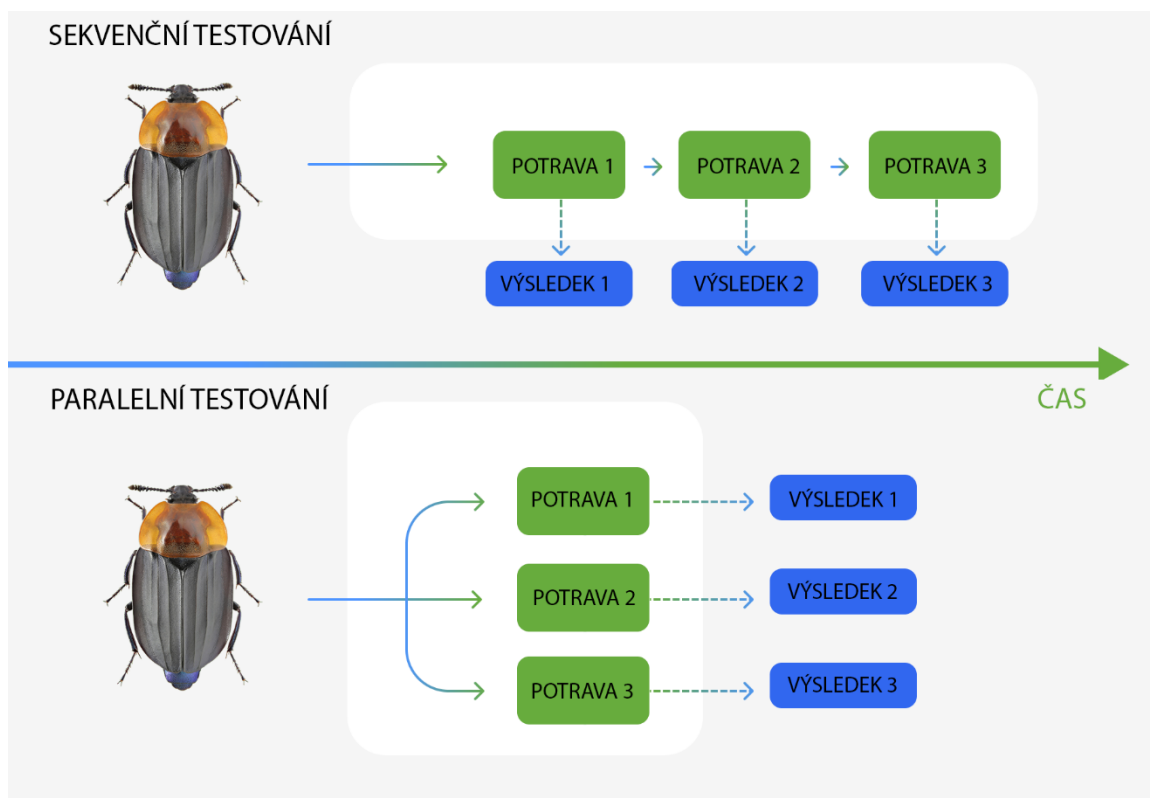
Samotné testy probíhají ve standardizované aréně, nejčastěji tvořené Petriho miskou nebo podobným průhledným plastovým boxem. Testovaným jedincům jsou podávány různé typy potravy. Potrava je podávána v dostatečném množství aby se jedinec mohl neomezeně krmit dle libosti (tzv. *ad libitum*) (Charalabidis *et al.*, 2019). Dno testovací arény je pokryto buď filtračním papírem (Young, 2009) nebo pokud to testovaný typ potravy dovoluje tak například čistou zeminou (Saska *et al.*, 2019). Někdy bývá pokusná aréna rozdělena na část sloužící jako úkryt testovaného jedince a druhou část, kde je podávána potrava. Oddělení krmné části arény od zbytku zabraňuje zahrabání potravy do substrátu (Fawki and Toft, 2005).

Nejčastěji jsou food choice experimenty prováděny u fytofágního hmyzu, kde se dá snadno zajistit standardizované množství potravy. Například u zrnožravých střevlíků stačí testovanému jedinci předložit adekvátní množství zvolených semen a poté jednoduchým spočítáním nebo zvážením zbývajících semen zjistit množství zkonsumované potravy (Brygadyrenko and Reshetniak, 2014; Petit *et al.*, 2014; Saska *et al.*, 2019). Obdobně jsou prováděny testy potravních preferencí u housenek motýlů, kdy jsou jim nabízeny buď celé listy a nebo kousky listů vhodné velikosti (Chew, 1980; Stamp and Bowers, 1990). Komplikovanější jsou food choice experimenty testující potravní preference dravých druhů. Při testech s dravými druhy je volba vhodné kořisti komplikovanější, mělo by se jednat o kořist přiměřené velikosti a zároveň běžně dostupnou. Pokud zvolíme paralelním systémem testování více druhů živé potravy (viz níže) je nutné zajistit, aby se nabízená kořist vzájemně mezi sebou nepožírala (Eubanks and Denno, 2000; Klecka and Boukal, 2012).

Steele (1927) provedl jednu z prvních behaviorálních studií zaměřených na potravní ekologii mrchožroutů. V této studii demonstroval, že dospělí hrobařci jsou schopni se živit larvami a v některých případech je i upřednostňovat před mršinami samotnými. Steele také poukázal na to, že tato strategie může sloužit k minimalizaci mezidruhové konkurence, která je na mršinách velmi častá. Qubaiová *et al.* (2021, 2022, 2023) testovala vliv typu předkládané potravy na délku vývoje jednotlivých druhů mrchožroutů. Její práce ukazují, že kvalita potravy silně ovlivňuje délku vývoje. Například chov na neoptimálním typu tkáně může prodloužit celkový vývoj mrchožrouta (*Thanatophilus sinuatus* (Fabricius, 1775) a *T. rugosus* (Linnaeus, 1758)) až o 30 %. I další práce zabývající se vývojem mrchožroutů ukazují výrazný vliv kvality potravy na úspěšný vývoj larev a velikost dospělců (Watahiki and Sasakawa, 2019; Gruszka and Matuszewski, 2021).

Food choice experimenty umožňují, kromě samotné potravní preference sledovat i množství a finální složení zkonsumované potravy u jednotlivých druhů, a to jak dospělců, tak i jejich vývojových stádií. Kromě samotného vlivu potravy na celkovou délku vývoje umožňují i studovat vliv potravy na celkový počet instarů (pakliže je u druhu variabilní), či na relativní rychlost růstu a délku růstové fáze jednotlivých instarů (Fawki and Toft, 2005; Young, 2009).

U food choice experimentů se dají aplikovat dva základní designy nabízení potravy. Sekvenční design testuje jednotlivé typy potravy postupně, naopak paralelní design umožňuje otestování více typů potravy naráz, přičemž testovaný jedinec si vybírá potravu sám v reálném čase (Obr.3).



Obr. 3. – Porovnání sekvenčního a paralelního způsobu testování

Nevýhodou food choice experimentů je nutnost zajistit před jejich zahájením dostatečný počet testovaných jedinců. Tito jedinci mohou být buď odchyceni ve volné přírodě, což však komplikuje odhad jejich stáří, nebo odchovaní v zajetí. Při chovu v zajetí vznikají další komplikace, například zajištění vhodných podmínek pro rozmnožování. Samotné experimenty jsou velmi časově náročné, zejména při sekvenčním testování, kdy jsou různé druhy potravy předkládány postupně a mezi jednotlivými testy je nutné zařadit pauzy pro vyhladovění jedinců (Fawki and Toft, 2005; Watahiki and Sasakawa, 2019; Gruszka and Matuszewski, 2021; Qubaiová *et al.*, 2021). Dostatečně dlouhé food choice experimenty umožňují dlouhodobé testování a tím i zjištění celkového poměru jednotlivých typů potravy, rozdíly v závislosti na pohlaví či reprodukční fázi jedince. Ačkoli jsou pak tyto experimenty poměrně časově náročné, nabízejí unikátní vhled do biologie a ekologie druhů, který je podložen robustním datasetem, navíc lze food choice experimenty provést i s omezeným rozpočtem.

Shrnutí současných znalostí o podčeledi Silphinae

Podčeď mrchořroutovitých brouků (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae) se skládá ze dvou dobře rozlišených tribů (Silphini a Nicrophorinii) a v současné době zahrnuje 16 recentních rodů s 206 existujícími druhy (Sikes and Venables, 2013; Newton, 2022). Mrchořrouti jsou nejhojněji zastoupeni v mírném pásmu, naopak v tropech se vyskytují poměrně vzácně. Nejčastěji je můžeme zahrnout mezi nekrofágní a dravé druhy, výjimečně jsou fytofágní. Velikost těla se pohybuje od 7 do 45 mm (nejčastěji 15–20mm) (Sikes, 2005, 2008). Mrchořrouti hrají v ekosystémech klíčovou roli díky svému podílu na koloběhu živin a vlivu na vývoj larev dvoukřídlých.

Silphinae tvoří malou monofyletickou skupinu (Sikes, 2016), která byla vždy řazena do nadčeledi Staphylinoidea (Peck, 2000). Otázka jejich přesnějšího zařazení v rámci této nadčeledi však dlouho zůstávala nevyřešená. Tradiční fylogenetické analýzy, založené na morfologických charakteristikách larev i dospělců, umístily mrchořrouty jako samostatnou čeleď Silphidae. Tato čeleď zahrnovala dvě podčeledi Silphinae a Nicrophorinae, a byla považována za sesterskou skupinu drabčíků (Coleoptera: Staphylinidae) (Beutel and Leschen, 2005; Grebennikov and Newton, 2009, 2012). První zmínky o tom, že mrchořrouti mohou být vnitřní skupinou drabčíků se však objevily již v práci Hache (1927), který je řadil jako sesterskou skupinu několika podčeledí včetně podčeledi Tachyporinae. Ve své době nebyla tato myšlenka příliš akceptována.

Modernější práce studující fylogenetické vztahy v rámci nadčeledi Staphylinoidea přinášely rozdílné výsledky. Část z nich řadí mrchořrouty jako sesterskou skupinu drabčíků (Beutel and Molenda, 1997; Grebennikov and Newton, 2012), zatímco jiné identifikují Silphinae jako jejich vnitřní skupinu (Ballard *et al.*, 1998; Hunt *et al.*, 2007; Grebennikov and Newton, 2009; Bocak *et al.*, 2014; McKenna *et al.*, 2015;). Recentní molekulárně fylogenetické studie, opakovaně ukazují mrchořrouty jako vnitřní linii čeledi Staphylinidae. Jako jejich nejčastější sesterskou linií byly identifikovány různé linie: podčeď Tachyporinae (Ballard *et al.*, 1998; Hunt *et al.*, 2007; Grebennikov and Newton, 2009; Song *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022), linie zahrnující Staphylininae + Scydmaeninae

nebo Scaphidiinae + Osoriinae (Mckenna *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018) či podčeled' Staphylininae (Cai and Li, 2021). Pro přehlednost jsou výsledky jednotlivých studií zmíněny níže v tabulce (Tab.1.)

Tab.1. – Studie zabývající se evolučním původem podčeledi Silphinae.

Analysis	Year	Datasets/ genes	Data description	Method(s)	Sister to <i>Silphinae</i>
Hatch	1927	1	morphology	NA	5 subfam. incl. <i>Tachyporinae</i>
Lawrence and Newton	1982	1	morphology	NA	n/a
Beutel and Molenda	1997	1	morphology	MP	All remaining <i>Staphylinidae</i>
Hansen	1997	1	morphology	MP	<i>Apateticinae</i>
Ballard et al.	1998	3	rDNA (12S), mtDNA (Cyt b),	MP	In polytomy with <i>Tachyporinae</i>
Korte et al.	2004	2	rDNA (18S, 28S)	MP, BI	n/a
Caterino et al.	2005	2	rDNA (18S) and morphology	MP, ML, BI	<i>Phloeocharinae</i>
Hunt et al.	2007	3	rDNA (18S), mt-rDNA (16S) and COI	MP, BI	<i>Tachyporinae</i>
Grebennikov and Newton	2009	1	rDNA (18S)	MP, NJ, BI	<i>Tachyporinae</i>
Lawrence et al.	2011	1	morphology	MP	<i>Tachyporinae</i> + <i>Staphylininae</i>
Grebennikov and Newton	2012	1	morphology	MP	All remaining <i>Staphylinidae</i>
Bocak et al.	2014	4	rDNA (18S, 28S), mtDNA (rrnL, COI)	ML	<i>Tachyporinae</i>
McKenna et al.	2015	2	rDNA (28S), CAD	BI, ML	<i>Tachyporinae</i>
Timmermans et al.	2016	16	mitogenomes	ML, BI	<i>Habrocerinae</i> and <i>Aleocharinae</i> (in part)
Zhang et al.	2018	95	protDNA (Amino Acids)	ML, BI	<i>Apateticinae</i> , <i>Scaphidiinae</i> , and <i>Osoriinae</i>
Kypke (PhD diss: fig4)	2018	993	genomics	ML	<i>Oxytelinae</i>
Kypke (PhD diss: fig. 5)	2018	1,033	genomics	ML	many subfamilies
McKenna et al.	2019	4,818	genomics	ML	<i>Staphylininae</i>
McKenna et al.	2019	89	DNA	ML	<i>Apateticinae</i> , <i>Scaphidiinae</i> , and <i>Osoriinae</i>
Lü et al.	2019	6	nDNA (CAD, Wg, 28S, 18S), mtDNA	ML	<i>Tachyporinae</i>
Cai and Li	2021	13	mtDNA (protein coding genes only)	ML	<i>Staphylininae</i>
Song et al.	2021	16	mitogenomes	BI	<i>Tachyporinae</i> (in part)
Zhao et al.	2022	16	mitogenomes	ML	<i>Tachyporinae</i> (in part)

Metody: NA = Non–Algorithmic; MP = Maximum Parsimony, ML = Maximum Likelihood, BI = Bayesian Inference. Upraveno dle Sikes *et al.*(2024).

Jak již bylo řečeno, podčeled' Silphinae byla tradičně dělena do dvou hlavních linií (ve světle moderních fylogenetických poznatků, je nejjednodušší je klasifikovat na úrovni tribů). Jedna tato linie zahrnovala pravé hrobaříky (rod *Nicrophorus*) a druhá všechny ostatní rody s výjimkou rodu *Ptomascopus* Kraatz, 1876, který byl v řadě analýz vnímán jako sesterský rod ke všem zbývajícím zástupcům podčeledi. Toto členění více méně potvrzují i analýzy Kinga *et al.* (2015) a Mahlerové *et al.* (2024), s tím, že rod *Ptomascopus* je dnes považován za sesterskou skupinu rodu *Nicrophorus* (Mahlerová *et al.*, 2024) (Obr.4).

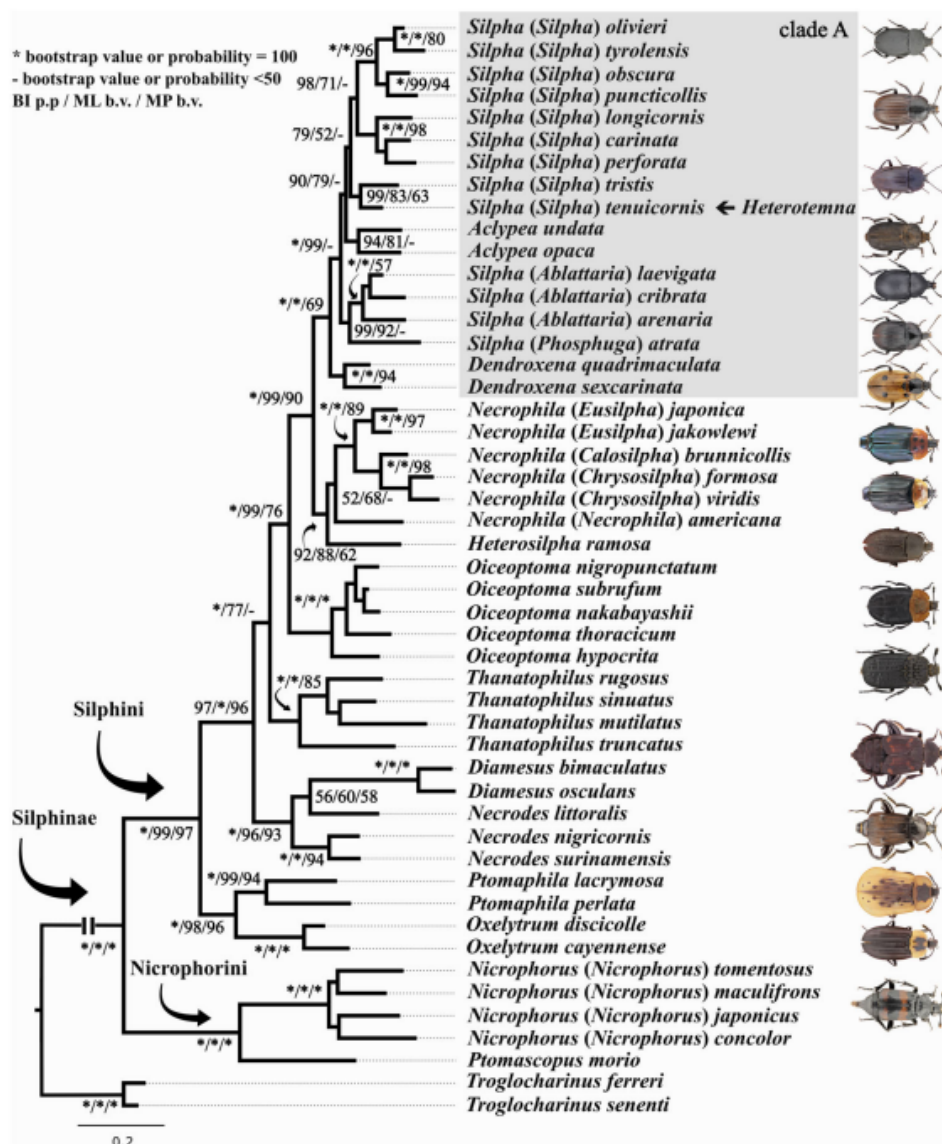
U hrobaříků (tribus Nicrophorini) se vyvinula rodičovská péče, která se v primitivní formě objevuje i u rodu *Ptomascopus* (Suzuki and Nagano, 2006), kde ale nedosahuje takové úrovně jako u vlastních hrobaříků rodu *Nicrophorus*.

Hrobařici mohou díky pokročilé rodičovské péči obstát v silné konkurenci na mršinách a zároveň zvýhodnit svoje potomstvo (Trumbo and Robinson, 2004). Díky své velikosti jsou hrobařici limitováni velikostí využitelného kadaveru a preferují menší mršiny savců či ptáků do váhy cca 100 g, které jsou schopni transformovat do potravní koule zahrabané pod zem. Larvy se vyvíjejí na této potravní kouli, kterou zformovali jejich rodiče a zároveň jsou během prvních dvou instarů krmeny samicí, často i samcem. Jelikož nemají přístup k jiné potravě dá se usuzovat, že larvy jsou čistě nekrofágní (Milne and Milne, 1976; Trumbo *et al.*, 2016). Naopak dospělci jsou omnivorní a jsou schopni jak konzumovat mršinu tak se chovat dravě pokud narazí na mršinu na vhodnou potravu a nebo likvidují konkurenci (Steele, 1927; Milne and Milne, 1976).

Praví mrchožrouti (tribus Silphini) jsou oproti hrobaříkům považováni primárně za nekrofágní a často navštěvují i velké mršiny (obvykle >300 g) (Sikes, 2005). K této ekologické specializaci je pravděpodobně vedla intenzivní konkurence na mršinách, zejména ze strany dvoukřídlého hmyzu a hrobařníků. Dvoukřídlí bývají prvními kolonizátory kadaveru, kde kladou velké množství vajíček a jejich larvy se snaží rychle využít dostupné zdroje. Mrchožrouti naopak k mršině obvykle přilétají později, aby se vyhnuli konkurenci a zároveň mohli využít tekutějšího stavu mršiny. Zdá se, že larvy dvoukřídlých mohou sloužit jako potenciální zdroj potravy pro larvy i dospělé mrchožroutů (Hatch, 1927; Ratcliffe, 1972).

Kromě nekrofágie se v tribu Silphini objevují i další potravní strategie. Nejčastěji se dospělci i larvy uchylují k predaci. Specializovaná forma dravého chování se vyvinula například u mrchožroutů rodu *Abllataria* Reitter, 1885 a *Phosphuga* Leach, 1817, kteří se živí plži (Symondson, 2004). Tomu je přizpůsobena morfologie dospělců i larev, zároveň jsou schopni vylučovat slabý roztok čpavku. Tímto roztokem pak rozpouští svoji kořist při konzumaci (Schildknecht and Weis, 1962). Fylogenetická blízkost obou rodů napovídá, že tato potravní strategie pravděpodobně vznikla pouze jednou (Mahlerová *et al.*, 2024). Dalšími specializovanými predátory v rámci tribu jsou dospělci mrchožroutů rodu *Dendroxena* Motschulsky, 1858 u nichž se vyvinula specializace na lov housenek motýlů (Ikeda *et al.*, 2008; Sikes, 2008).

Kromě nekrofágní či dravé potravní strategie se u mrchožroutů vyskytuje i herbivorie u rodu *Aclypea* Reitter, 1885. I zde se jedná o odvozenou strategii, která v rámci skupiny vznikla pouze jednou (viz obr. 4) v relativně nedávné době (Anderson and Peck, 1984).



Obr.4. – Fylogenetický strom podčeledi Silphinae. Upraveno dle Mahlerová et al. (2024)

Rekonstrukce ancestrální potravní strategie pro celou linii zahrnující Nicrophorini a Silpnini ukazuje, že jejich společný předek by mohl být nekrofágní (Ikeda et al., 2008). Nekrofágní potravní specializace předka by mohla být odvozena od saprofágie, popřípadě od kombinace dravého a saprofágního způsobu života. Tento závěr je podpořen fylogenetickou polohou mrchožroutů uvnitř čeledi

Staphylinidae (Leschen, 1993; Ikeda *et al.*, 2008). Pokud se zaměříme pouze na tribus Silphini, tak nekrofágie je primární potravní strategií a specializované dravé chování se vyvinulo až sekundárně. Problémem pro stanovení přesné ancestrální potravní strategie je neznalost konkrétní sesterské větve k celé podčeleďi Silphinae a výskyt mixovaných potravní strategií. Například dva druhy mrchožroutů (*Necrodes littoralis*, *Calosilpha brunnicollis* (Kraatz, 1877)) jsou v Ikedově práci považováni za čistě nekrofágní, ač jiné publikace popisují jejich dravé chování (Charabidze *et al.*, 2016; Jakubec *et al.*, 2021). Pro ověření potravních strategií je vhodné využití food choice experimentů.

Díky své atraktivitě, relativně nízkému počtu druhů, komplexní ekologii včetně unikátní rodičovské péče (v rodu *Nicrophorus*) a významu pro forenzní vědy, patří mrchožroutovití mezi populární skupiny pro studium mnoha biologických problémů. Zástupci skupiny také slouží jako modely pro studium chování (Trumbo *et al.*, 2016), ekologie (Anderson, 1982), ochránářské biologie (Holloway and Schnell, 1997), forenzní entomologie (Gruszka and Matuszewski, 2021) či evoluce letu u hmyzu (Ikeda *et al.*, 2012).

Shrnutí publikovaných článků

Kadlec, J., Mikatova, S., Maslo, P., Sipkova, H., Sipek, P., & Sladeczek, F. X. J. (2019). Delaying insect access alters community composition on small carrion: A quantitative approach. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(8), 729–740.

V této studii jsme se věnovali studii sukcese hmyzích společenstev na mršině drobných hlodavců. Použili jsme manipulativní design, kdy jsme pomocí pletivových krytů bránily přístupu hmyzu na mršinu v počátečních stádiích rozkladu. Cílem studie bylo zjistit, jaký vliv má odstranění raně sukcesních druhů na celé společenstvo, tj. zda tyto druhy facilitují nebo inhibují pozdně sukcesní druhy.

Terénní část výzkumu byla realizována v letech 2014 a 2015 poblíž obce Osvinov na rozhraní Krušných a Doupovských hor. V roce 2014 byly jako pokusné kadavery použity komerčně dostupné laboratorní myši o hmotnosti přibližně 25 g. Experiment byl proveden v rámci sezóny ve třech opakováních (jaro, léto, podzim). V roce 2015 byla stejná série pokusů zopakována s využitím potkanů o hmotnosti přibližně 500 g. Všechny kadavery byly zakryty proti přístupu obratlovců, pokusné mršiny byly navíc po dobu tří dnů chráněny proti přístupu hmyzu jemným pletivem. Experimentální design zahrnoval postupné odkrývání kadaverů a jejich sběr v předem stanovených intervalech, čímž se minimalizoval vliv počasí. Při sběru kadaveru byl zaznamenán veškerý hmyz nacházející se jak přímo na něm, tak i v substrátu pod ním.

Z našich výsledků vyplývá, že zabránění přístupu hmyzu v počátečních fázích rozkladu mršiny má signifikantní vliv na složení hmyzího společenstva, a to jak na druhy dominantní, jako jsou například hrobařici nebo larvy dvoukřídlého hmyzu, tak i na druhy kompetitivně slabší.

Blokace iniciálních fází sukcese měla značný vliv na početnost jinak dominantních larev bzučivek, jejich počty na kontrolních kadaverech byly výrazně vyšší než na experimentálních mršinách. Podobný efekt měla blokace i na zastoupení

hrobaříků na mršinách myší, naopak na kadaverech potkanů se jejich počty neměnily.

Naše výsledky ve shodě s očekáváním naznačují, že larvy bzučivek jsou konkurenčně dominantnější a jejich schopnost monopolizace zdroje je výrazně vyšší než u hrobaříků. Hrobaříci mají tendenci se vyhýbat tvorbě potravní koule za přítomnosti larev bzučivek a zároveň preferují čerstvě uhynulé obratlovce. Míra kolonizace a monopolizace mršin hrobaříky se výrazně mění v průběhu sezóny. Největší procento obsazených mršin bylo v jarních měsících, v průběhu celého roku byli hrobaříci schopni monopolizovat 25 % pokusných mršin. Domníváme se, že je to dáno jak zvýšenou konkurencí ze stran dvoukřídlých v letním období, tak vyšší rychlostí rozkladu, která poskytuje méně času pro nalezení vhodné mršiny.

Přestože naše studie nebyla navržena tak, aby porovnávala vliv velikosti mršiny, některé podstatné rozdíly v hmyzích společenstvech mezi kadavery myší a potkanů byly, jak se dalo očekávat, pozorovatelné. Větší kadavery hostily celkově vyšší diverzitu i abundanci hmyzu než malé myší mršiny. Vliv blokace byl výraznější u potkaních mršin, kde celková abundance hmyzu klesla až na polovinu množství nacházejícího se na kontrolních kadaverech. Na obou velikostech kadaverů tvořily dominantní složku společenství larvy bzučivek. Hrobaříci byli častější na menších mršinách, naopak ostatní druhy mrchožroutů preferovaly mršiny větší, pravděpodobně kvůli dostupnosti většího množství potravy. Ze stejného důvodu byla na větších mršinách i vyšší koncentrace predátorů.

Jakubec, P., Kadlec, J., & Šípek, P. (2021). Standardized laboratory methodology for the evaluation of foraging strategies in necrophilous beetles: a case study of necrophila (*Calosilpha*) *brunnicollis* (Coleoptera: Silphidae). *Journal of Medical Entomology*, 58(1), 40–46.

V této studii jsme navrhli a testovali laboratorní metodiku pro zjištění potravních preferencí nekrofágního hmyzu. Pro testy jsme použili mrchožrouta *Necrophila* (*Calosilpha*) *brunnicollis* jehož populaci pocházející z West Tianmushan Nature Reserve, provincie Če-ťiang, JV Čína jsme měli v chovu. Tento druh je rozšířen od pevninské Číny, Bhútánu až na východ Ruska, Japonsko a Jižní a Severní Koreu (Růžička *et al.*, 2015). Jak dospělce, tak larvy tohoto brouka lze mezi dubnem a srpnem lze najít na mrtvolách velkých obratlovců již brzy po jejich smrti. Jedná se tedy o druh potenciálně významný pro forenzní studie.

Abychom otestovali potravní preference *N. brunnicollis*, připravili jsme dva druhy potravy, se kterými se brouci mohou v přírodě setkat. Jako analogii svalových tkání mršiny jsme zvolili kousky kuřecích prsou. Ta byla vybrána, protože dobře reprezentují svalovou tkáň, kterou konzumují nekrofágní druhy a běžně se používá jako náhradní potrava v různých studiích (Taki and Watanabe, 2009; Qubaiová *et al.*, 2021, 2022, 2023). Kuřecí prsa jsou také jednotné ve struktuře na rozdíl od jiných druhů mas. Jako alternativní potravu jsme předkládali larvy bzučivky rudohlavé (*Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758)). Larvy bzučivky byly vybrány jako zástupci jedné z nejhojnějších a dominantních čeledí nekrofágního hmyzu, se kterými se můžeme setkat na mršinách (nejenom) v Číně (Kuusela and Hanski, 1982; Gruner *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2019). V rámci standardizace experimentálního designu jsme vždy nabízeli kousek kuřecího masa a několik larev, každé o váze 0,5 g. Larvy bylo nutno nejdříve usmrtit mrazem, protože hrozilo, že začnou konzumovat nabízené maso.

Jednotlivé vzorky potravy byly, při vyhladovělému jedinci nabízeny současně (paralelně). Tato metoda simuluje situaci, kdy mrchožrout najde v jednu chvíli rozkládající se tkáň, tak i larvy bzučivek. Pokusná aréna byla tvořena skleněnou Petriho miskou o průměru patnáct centimetrů a výšce tři centimetry, vyloženou kruhovým filtračním papírem. Do této arény byl vložen dvacet čtyři hodin vyhladovělý jedinec mrchožrouta a oba typy potravy. Po dobu dvaceti čtyř hodin měl testovaný jedinec přístup k oběma druhů nabízené potravy. Celý experiment

proběhl za stabilní teploty a vlhkosti vzduchu (17–20 °C a 75–85 % vlhkost vzduchu). Po skončení experimentu byl testovaný jedinec usmrcen a byly odebrány zbytky nezkonsumované potravy. Vše bylo usušeno ve skříňové sušárně po dobu 12 hodin při 50 °C, aby se dosáhlo dokonalého vysušení vzorků. Po zvážení usušených zbytků larev a masa bylo vypočítáno množství reálně zkonsumované potravy.

Pro výpočet skutečné spotřeby potravy byl stanoven konverzní faktor (Waldbauer, 1964; Soo Hoo and Fraenkel, 1966). Pro tyto účely bylo vybráno 25 vzorků kuřecího masa a 25 vzorků larev, každý vzorek o čerstvé hmotnosti cca 0,5g. Čerstvé vzorky jsme zvážili (s přesností na 0,001g) a poté jsme vzorek vysušili identickým postupem sušení, jaký byl aplikován na experimentální vzorky a opětovně zvážili. Čistá váha zkonsumované potravy byla vypočtena jako rozdíl mezi sušinou podávané potravy a sušinou jejích zbytků (Waldbauer, 1964; Soo Hoo and Fraenkel, 1966). Spotřeba potravy konkrétního jedince byla vypočtena jako poměr hmotnosti zkonsumované potravy a hmotnosti testovaného jedince.

Kuřecí maso představovalo v průměru přibližně 70–75 % z celkového příjmu potravy dospělců *N. brunnicollis*. Nicméně nemalou součástí jeho stravy tvořily i larvy bzučivek. Mezi padesáti testovanými jedinci byla pozorována vysoká individuální variabilita v potravní preferenci. Třináct testovaných jedinců (26 %) preferovalo výhradně kuřecí maso, zatímco u jiných jedinců tvořily larvy až 58 % jejich potravy.

Ačkoliv jsme byli limitováni počtem exemplářů, naše data ukazují na potenciální (byť statisticky neprůkazný) rozdíl mezi potravními preferencemi samců a samic. Zatímco u samic tvořily larvy bzučivek 25 % hmotnosti zkonsumované potravy u samců to bylo jen 20 %.

Naše výsledky představují první kvantifikaci potravního chování *N. brunnicollis* a jsou v rozporu s výsledky, které publikoval Ikeda *et al.*, (2007, 2008). Ten na základě analýzy stabilních izotopů klasifikuje druh *N. brunnicollis* jako čistě nekrofágní. Díky použití food choice testů jsme byli schopni demonstrovat, že minimálně tento druh lze umístit na souvislou stupnici mezi nekrofágií a predací.

Pozorovaná flexibilita potravní strategie by mohla být i výhodná pro omezení konkurence mezi larvami a dospělci, neboť obě stádia sdílejí stejný zdroj potravy.

Navíc predací larev dvoukřídlých dochází k redukci kompetitorů. Jedinci na vrcholu potravního pyramidu svojí aktivitou (aktivní likvidace konkurence) snižují početnost jedinců, kteří jsou na nižších úrovních a tím chrání primární zdroj potravy. Toto chování mohlo vést ke zvýhodnění vlastního potomstva (Borer and Gruner, 2009). Flexibilita potravního chování, ale může být spojena i s rozdíly mezi pohlavími, věkem jedince nebo jeho připraveností se množit.

Na základě našich výsledků je tedy možné se domnívat, že řada druhů nekrofágního hmyzu (alespoň tedy brouků) ve skutečnosti vykazuje flexibilní potravní strategie. Toto je třeba brát v úvahu nejen při posuzování jejich ekologické role, ale i v rámci forenzních studií.

Kadlec, J., Jakubec, P., & Šípek, P. (2024). In vitro comparison of two food choice methodologies for necrophagous species of the genus *Thanatophilus* (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae). *Journal of Medical Entomology*, 61(3), 603–610.

Práce myšlenkově navazuje na předchozí studii (Jakubec *et al.*, 2021) a zaměřuje se na potravní preference tří druhů mrchožroutů rodu *Thanatophilus*. Zvolili jsme jeden africký druh (*T. micans* Fabricius, 1794) a dva sympatrické evropské druhy běžně se vyskytující v průběhu celé sezóny (*T. sinuatus* a *T. rugosus*). Jedinci rodičovské generace obou evropských druhů byli odchyceni na mršinách umístěných na různých stanovištích v okolí Prahy. Dospělci první generace *T. micans* byli odchyceni ve východní Africe (Keňa, Naivasha env.). Oproti předchozí studii, kde jsme použili pouze paralelní design testování, jsme v této práci testovali potravní preference druhů pomocí kombinace paralelních a sekvenčních food choice testů. Tato kombinace nám poskytuje přesnější odhad potravní preference i množství spotřebované potravy.

Při sekvenčním testování je jedinci nabízen po dobu 24 hodin pouze vzorek jednoho typu potravy. Následující test druhého typu potravy je proveden až po dvaceti čtyř hodinovém hladovění. Tento design umožňuje testovat potravní chování jedince v podmínkách, kdy je vyhladovělý a nemá možnost výběru.

Pro každý experimentální druh jsme testovali padesát jedinců v paralelním a padesát jedinců v sekvenčním designu. Mezi jednotlivými koly testů byly v obou designech dvaceti čtyř hodinové pauzy na vyhladovění jedince.

V této práci byly použity stejné experimentální arény a vzorky potenciální potravy jako v předchozí studii, s tím rozdílem, že larvy bzučivek *Calliphora vomitoria*, byly předkládány nejenom mrtvé, ale i živé.

Většina zkoumaných jedinců všech druhů mrchožroutů z rodu *Thanatophilus* preferovala kuřecí maso před larvami bzučivek. Zastoupení kuřecího masa ve zkonsumované potravě se pohybovalo od 82,54 % u *T. micans* a 88,81 % u *T. sinuatus* až do 94,3 % u *T. rugosus*. Nicméně alespoň někteří jedinci každého druhu byli schopni zabít nebo alespoň zkonsumovat mrtvé larvy bzučivek. Na rozdíl

od *N. brunnicollis* (Jakubec *et al.*, 2021), jsme u zástupců rodu *Thanatophilus* pozorovali vyšší podíl jedinců, kteří žádné larvy (mrtvé ani živé) nekonzumovali. Při porovnání potravního chování v rámci paralelního a sekvenčního experimentálního designu jsme zaznamenali rozdíly v množství zkonsumované potravy. Například mrchožrouti *T. rugosus* během paralelních experimentů zkonsumovali v průměru o 30 mg potravy více než během sekvenčního testování. Nicméně celkové preference se nelišily. U všech třech druhů bylo nejvíce preferovanou potravou maso a nejméně preferované byly živé larvy.

Náš experiment ukázal, že oba evropští mrchožrouti *T. rugosus* a *T. sinuatus* jsou v dospělosti silně nekrofágní. Oproti tomu africký mrchožrout *T. micans* loví larvy o něco častěji, což může být způsobeno i jeho relativně větší velikostí.

Z našich výsledků vyplývá, že mrchožrout *Necrophila (Calosilpha) brunnicollis* je oproti mrchožroutům rodu *Thanatophilus* dravější a konzumuje větší množství larev bzučivek (Jakubec *et al.*, 2021). Zatímco většina jedinců *N. brunnicollis* zkonsumovala v průběhu experimentu alespoň nějaké larvy, u zástupců rodu *Thanatophilus* tomu tak nebylo. Nižší míra predace (i konzumace mrtvých larev bzučivek), může být zapříčiněna velikostí brouků. Zatímco druh *Necrophila (Calosilpha) brunnicollis* vážil v průměru 320,7 mg (SD = 58,65 mg), tak testovaní jedinci rodu *Thanatophilus* byli výrazně menší. *T. micans* vážil v průměru 59,63 mg, (SD = 16,98 mg), *T. sinuatus* 36,06 mg, (SD = 10,00 mg) a *T. rugosus* pouze 30,84 mg, (SD = 6,72 mg). Tomu by napovídá i fakt, že predáčnické chování jsme zaznamenali častěji u největšího druhu (*T. micans*), naopak nejmenší ze tří testovaných druhů (*T. rugosus*) lovil larvy jen v minimu případů.

Oproti původnímu předpokladu, jsme mezi druhy *T. sinuatus* a *T. rugosus* nezaznamenali žádný rozdíl v potravních preferencích. To je poměrně překvapivé. Oba druhy žijí sympatricky, často se vyskytují ve stejnou část sezony a diverzifikace potravních strategií by byla jednou z možností, jak omezit potenciální vzájemnou kompetici o zdroje.

Porovnání obou designů ukázalo, že díky sekvenčnímu designu, můžeme lépe kvantifikovat maximální spotřebu dané potravy. Na druhou stranu paralelní design umožňuje lépe nasimulovat reálnou situaci v přírodě. Proto jsou obě tyto metodiky vhodné pro další testování potravních preferencí nekrobiotního hmyzu.

Oba typy experimentálního přístupu (sekvenční i paralelní) jsou ekologicky relevantní, protože v přírodních podmínkách mohou mrchožrouti nacházet kadavery připomínající sekvenční provedení, například když objeví čerstvé tělo bez larev. Mohou také najít kadaver v pokročilém stádiu rozkladu, kde se v jednu chvíli nachází jak masa larev, tak i rozkládající se tkáně, tento typ kadaveru připomíná paralelní testování. Nejběžnějším scénářem, ale pravděpodobně bude paralelní výskyt rozkládající se tkáně a larev současně (Kalinová *et al.*, 2009; Šípková and Růžicka, 2009).

Publikace zařazené do disertační práce

Článek I.

Kadlec, J., Mikatova, S., Maslo, P., Sipkova, H., Sipek, P., & Sladeczek, F. X. J. (2019). Delaying insect access alters community composition on small carrion: A quantitative approach. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(8), 729–740.



Delaying insect access alters community composition on small carrion: a quantitative approach

J Kadlec¹, S Mikatova¹, P Maslo¹, H Sipkova², P Sipek¹ & FXJ Sladecek^{3,4*} 

¹Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Vinicna 7, 128 44, Praha 2, Czech Republic,

²Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 129, 165 21,

Praha 6, Czech Republic, ³Department of Zoology, Faculty of Science, University of South Bohemia in Ceske Budejovice,

Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic, and ⁴Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Institute of

Entomology, Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

Accepted: 26 March 2019

Key words: Calliphoridae, carrion, Coleoptera, competition, Diptera, insect community, *Nicrophorus*, Silphidae, species coexistence

Abstract

We present a study of interactions in the highly competitive insect communities inhabiting the carrion of small mammals. Via manipulation in a fully quantitative design, we delayed community development by excluding insect colonization in mouse and rat carcasses for 3 days, to study the role of early competitively dominant colonizers [burying beetles (*Nicrophorus* spp.; Coleoptera: Silphidae) and blowfly larvae (Diptera: Calliphoridae)] in the course of heterotrophic succession on small cadavers. Earlier studies demonstrated that in the case of large mammalian carrion, exclusion of insects' access to the carcass in the early stages of decomposition altered the successional trajectory and species assemblages. However, the effect of such manipulation in easy monopolizable small vertebrate carrion remained unknown. Our results demonstrate that delaying insect access to carrion significantly lowered blowfly larvae abundances, while it simultaneously had no effect on colonization and carrion burial by burying beetles. Higher abundances of blowfly larvae seem to deter necrophagous beetles, whereas they are not harmful to the larvae of flesh flies, at least in larger rat carcasses. Predatory beetle species preferred the lower abundances of blowfly larvae, presumably due to better accessibility of their prey. Our results therefore suggest that in the course of the entire season, larvae of blowflies are the dominant competitors in small carcasses, and significantly affect the assembly of other insect groups, whereas burying beetles may exhibit a more temporal pattern of dominance.

Introduction

Animals avoid competition by differentiation in their food utilization (Bergallo & Rocha, 1994; Schneider et al., 2004; Schiesari et al., 2009), spatial patterns (Siemers & Schnitzler, 2004), and temporal patterns (Corbet, 1964; Lowman, 1985). Among animals, insect communities are the most popular model to test, especially due to their species richness and easy experimental manipulations. In insects, coexistence has been studied mostly in herbivore communities (Volf et al., 2015). However, communities inhabiting ephemeral habitats represent another excellent model

for studying species coexistence, due to their temporal instability and spatial limitations (Finn & Gittings, 2003).

Ephemeral habitats – such as animal dung (Lee & Wall, 2006), carcasses (Sharanowski et al., 2008), rotten fruit (Łukasik & Johnson, 2007), and fruiting bodies of fungi (Yamashita & Hijii, 2007) – are patches of high-energy substrate that are temporally limited and randomly distributed in time and space (Finn, 2001). They are therefore subjected to a high degree of competition due to their limited occurrence and size (Putman, 1983; Wilson & Wolkovich, 2011; Sladecek et al., 2013). Temporal segregations are usually considered to play a prime role in determining coexistence of species inhabiting ephemeral habitats.

Invertebrate communities inhabiting carrion are probably the most studied because of practical implications of successional patterns for forensic entomology (Schoenly & Reid, 1987; Anderson & VanLaerhoven, 1996). However,

*Correspondence: Frantisek Xaver Jiri Sladecek, Branisovska 31, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic.
E-mail: franzsladecek@gmail.com

mutual interactions between insect groups in carrion are generally unknown or only speculative (Aleksandrowicz et al., 2005; Ikeda et al., 2006). Even though the temporal displacements in carrion-inhabiting species are well known, only few studies implemented a more mechanistic approach to test the potential competition of individual species or at the level of trophic guilds. The majority of such studies analysed just the effect of various species of burying beetles (*Nicrophorus* sp.; Coleoptera: Silphidae) on other members of the carrion community (Ohkawara et al., 1998; Kocarek, 2001; Ikeda et al., 2006). In the case of small cadavers (<100 g of body weight; Trumbo, 1992), primary competition should occur between burying beetles and the rest of the community, especially blowfly larvae (Diptera: Calliphoridae) because burying beetles are able to hide carrion underground, thereby excluding other insects (Suzuki, 2000). Burying beetles, however, do not use carcasses that are fully colonized by blowfly larvae and their adults are known to leave already buried carrion infested with large numbers of fly larvae (Milne & Milne, 1976; Wilson, 1983). Both blowflies and burying beetles tend to colonize very fresh carcasses (Smith, 1986), being the first and competitively dominant insect colonizers of small carrion, although there is some evidence that both groups may also colonize older carrion (Lang et al., 2006; Sipkova & Ruzicka, 2009; Yang & Shiao, 2012). Several studies indicated that under certain circumstances, burying beetles are able to utilize more than 50% of accessible small carcasses (Beninger & Peck, 1992; Trumbo & Bloch, 2000). Ants may represent another competitor for burying beetles, as the utilization of carcasses by burying beetles is less successful in the presence of ants (Scott, 1998). Another conflict is presumed between necrophagous dipteran larvae and necrophagous carrion beetles (Silphidae: Silphinae) (Blackith & Blackith, 1990; Scott, 1998). Finally, competition occurs between blowflies and other flies, for example, flesh flies (Sarcophagidae) and house flies (Mus-

cidae) (Blackith & Blackith, 1990; Matuszewski et al., 2010).

It has been demonstrated that the exclusion of insects' access to the carcass in the early stages of decomposition alters the successional trajectory and species assemblages,

and thus potentially reflects the relations between constituent species (e.g., Pechal et al., 2014). Yet these studies were based either on a limited number of large carcasses, that is, a limited number of replications (Payne, 1965; Matuszewski et al., 2014; Pechal et al., 2014), or their design did not allow a completely unbiased quantitative investigation of the entire insect community presented, for

example, they focused just on the effect on adult activity (Kocarek, 2003; Matuszewski et al., 2010; Pechal et al., 2014).

Here we present a fully quantitative study focusing on the potential interactions within the whole-insect community inhabiting small vertebrate carrion. Unlike the majority of former studies that used either cumulative traps (Kocarek, 2003; Matuszewski et al., 2010) or sampled only a small proportion of the actual insect community (Pechal et al., 2014), we used passage traps which allowed us to investigate the real, actual community composition presented on carrion at various time points after carrion exposition (e.g., the community presented on 3-day-old carrion). In addition, and contrary to the abovementioned studies, we carried out a fully quantitative design, using a multitude of vertebrate carcasses and replications. In our approach, we manipulated the carrion development by excluding insect colonization during the period crucial for establishment and activity (carrion burial and oviposition) of early-successional and competitively dominant insects. We thereby aimed to investigate the effect on community composition, abundance, and their interactions among the competing taxa, both within and among trophic guilds. The use of two size categories of carrion (mouse and rat) enabled us to compare carcasses having a presumably different role for the initial colonizer, as burying beetles should easily manipulate the smaller (mouse) carrion (Trumbo, 1992), whereas blowfly larvae should be the primary dominant competitors on bigger (rat) carcasses (Pechal et al., 2014). To sum up, we aimed to test (1) whether the delayed insect access to cadavers of small vertebrates will alter the carrion insects' community composition, (2) whether delayed insect access for 3 days will affect the competitively dominant insects groups (burying beetles and blowflies), and (3) how the exclusion of these

Table 1 Expected effect of delayed insect access to cadavers of small vertebrates on abundance of insect community

Group	Feeding strategy/ guild	Expected result
Ants (Formicidae)	Omnivorous	0
Blowflies (Calliphoridae)	Necrophagous	–
Flesh flies (Sarcophagidae)	Necrophagous	+
Burying beetles (Necrophorinae)	Omnivorous	–
Necrophagous beetles (Silphinae, Cleridae, etc.)	Necrophagous	+
Predatory beetles (Staphilinidae, Histeridae, etc.)	Predatory	+
Skin beetles (Dermestidae)	Necrophagous	+

0, without changes of abundance; +, increase of abundance; –, decrease of abundance.

competitively dominant groups will alter remaining insect guilds on carrion. Expected changes in the respective insect guilds are listed in Table 1.

Materials and methods

Study site

This study was carried out in meadows near the village Osvinov (50°21'19"N, 13°1'59"E), situated on the border of the Doupov and the Ore Mountains, Czech Republic, Central Europe. The study site is at 600 m above sea level in a moderately warm region with a total annual rainfall of 700 mm and average summer temperature of 15.5 °C (Tolasz et al. 2007).

Insect sampling

The study was carried out in 2014 and 2015. In 2014, we used laboratory mouse (*Mus musculus* L.) carrion (25 g), and in 2015, we used rat [*Rattus norvegicus* (Berkenhout)] carcasses (500 g). These carrion types differ significantly in the possible successional trajectories. Whereas mouse carrion is frequently monopolized (buried) by early-successional burying beetles, the carrion of a fully grown rat cannot be (Smith & Heese, 1995; Smith & Merrick, 2001). We used carcasses defrosted at ambient temperature without insect access.

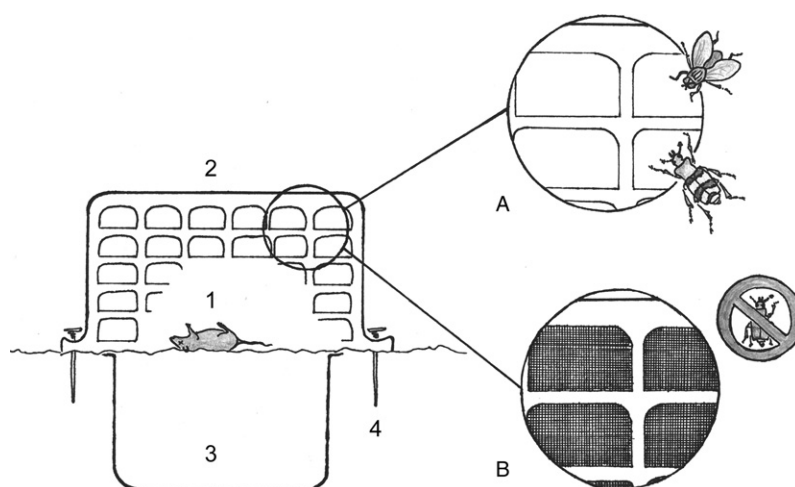
In 2014, we sampled in three seasons, covering the main period of carrion-inhabiting insect activity (Kocarek, 2001): spring (17–31 May), summer (7–23 July), and autumn (23 September–7 October). During 2015, we sampled in three matching seasons: spring (9–23 May), summer (31 July–14 August), and autumn (23 September–7 October).

We used passage traps (Figure 1) for insect sampling, which were designed to allow free insect movement until

the sampling time. Thus, they do not accumulate insects from earlier-successional stages as do the conventional pit-fall traps, only the community present at the time of sampling is captured. The passage trap (Figure 1A) consisted of a tray (18.9 × 13.5 × 6.5 cm) filled with soil buried into the ground to the level of the surrounding terrain. The carcass was placed on the substrate in the tray and covered by a perforated plastic basket (27.9 × 20.9 × 12.5 cm) with 1.5 × 9.3 cm openings to protect the carcass from possible vertebrate scavengers and simultaneously allowing insect access. The basket was firmly attached to the ground with 15-cm nails. This type of coverage was used in the control carcasses and the exposed treatment carcasses, whereas a basket with openings filled with a fine mesh (1.9 × 1 mm) preventing insect colonization was used for the exclusion of early-successional insects (Figure 1B). The sampling design consisted of treatment and control carcasses. The treatment carcasses were covered with insect-proof baskets for 3 days at the study site. After this period, the mesh-filled covers (Figure 1B) were replaced with open ones (Figure 1A), allowing insect colonization. It has been demonstrated, at least in the case of small carcasses, that the first 3 days of carrion succession represent a period with the highest activity and oviposition rate of primary insect colonizers (burying beetles and blowflies) (Kalinova et al., 2009; J Kadlec, S Mikatova & P Maslo, pers. obs.).

After replacing the covers, the treatment carcasses were exposed to insect colonization for an additional 1–5 days, and sampled on the days 1, 2, 3, 4, or 5 after uncovering. Control carcasses (i.e., carcasses covered with open-hole baskets only) were exposed to the insects throughout the whole experiment and placed at the study site simultaneously with treatment carcasses. Therefore, for a treatment carcass covered for 3 days and exposed for 1 day, there was one control carcass exposed for 4 days. Each

Figure 1 Experimental trap design: (1) carcass; (2) perforated plastic cover basket with holes, (A) allowing insect access, or (B) filled with fine mesh for exclusion of insects; (3) a tray with soil, and (4) nails to secure the trap in the soil (drawing by S. Mikatova).



successional pair of treatment and control carcass was replicated 49 in each season.

The four replicates were established during four successive days (each on 1 day) to minimize the effect of weather variation on the insect activity (Figure S1). In total 240 carcasses of two types (mouse, rat) were set during three seasons (spring, summer, autumn) and four replications in each season. Each replication consisted of five treatment and five control carcasses.

Sample processing and species classification

On the sampling day, the whole trap, including the rodent carcass and the bottom tray filled with substrate, was placed in a labelled plastic zip lock bag and brought to the field laboratory for processing. First, insects from the substrate and surface of the carcass were sampled. Subsequently, the carcass was carefully dissected and searched for remaining insects inside. Then the rest of the sample was floated in water and sieved through a fine monofilament fabric. This method enabled the recording of almost all insects in the sample. Adult insects were fixed in ethanol (70%) and larvae were placed into Pampel's solution (Svacha & Danilevsky, 1986) to prevent the hardening of their soft tissues. Insects were then taken to the laboratory for identification. All adult beetles were identified to species level. The dipteran larvae were identified to family level and instars (Table S1). Singleton records were excluded from the further analyses. The content of a single trap represented one sample in further analyses.

For the purpose of whole-community analyses, the sampled species were classified into the main ecological groups present in communities of carrion-inhabiting insects. The groups are represented by trophic guilds (necrophagous, predatory beetles) or by higher taxonomic ranks with different behaviour (burying beetles, blowflies, flesh flies, and ants). Burying beetles were excluded from the necrophagous beetle guild due to their breeding behaviour and the fact that their adults consume both larvae and decaying flesh (Wilson, 1983; Trumbo, 1992). Blowflies and flesh flies were evaluated separately, because there is a difference in oviposition (blowflies lay eggs whereas flesh flies lay first instars) and larval behaviour (Blackith & Blackith, 1990). The early-successional dominant guilds are represented by burying beetles (Silphidae: *Nicrophorus* spp.) and the larvae of blowflies (Diptera: Calliphoridae). Burying beetles can easily monopolize smaller carcasses (up to 200 g), by burying them underground (Trumbo, 1992), and they are able to feed directly on carrion (both larvae and adults) or they can prey on dipteran larvae (only adults; Scott, 1990, 1998). The predominant competitively inferior guilds were: Necrophagous beetles, which feed solely on carrion (Silphidae: Silphinae, Leiodidae) (Sustek, 1981; Kocarek,

2003), predatory beetles, which feed primarily on other insects (Staphylinidae, Histeridae) (Amendt et al., 2004; Byrd & Castner, 2009), larvae of flesh flies (Sarcophagidae), and ants (Hymenoptera: Formicidae; Table S1).

Statistical analysis

Generalized linear models with mixed effects (GLMM) were used to test the differences in the abundance of the whole-insect community and the abundance of trophic groups per carcass between treatment and control carcasses. A unique GLMM with Poisson distribution of errors was fitted for either the abundance of the entire insect community or each individual trophic group. These GLMMs were fitted in R v.2.15.2. (Pinheiro et al., 2017), using the 'glmer' function in the package lme4 (Bates et al., 2014). Temporary insect exclusion (control or treatment) was used as the explanatory variable. Successional gradient, seasonal gradient, and affinity to a replication (successional line placed on the same day) were treated as factors with random effect. All analyses were performed separately for both types of carcasses.

Trends in abundance development of fly larvae during exposure for each treatment and carrion type combination were computed using generalized linear models with Poisson distribution of errors computed in CANOCO v.5 (Ter Braak & Smilauer, 2012) as species response curves. This was done to analyse whether the treatment carcasses already hosted the maximum potential number of blowfly and flesh fly larvae, to overcome the potential problem that the treatment traps were exposed to insects for a shorter time than the control (5 days in treatment, 8 days in control traps), which may have resulted in the abundances of dipteran colonizers not reaching their peaks.

To test the effect of delaying insect access to carrion at the species level, we used the canonical correspondence analysis (CCA) computed in CANOCO v.5. Insect exclusion (control/treatment) was used as the environmental variable. Prior to these analyses, the species data were log ($x + 1$) transformed. Seasonal gradient, affinity to a replication, and successional gradient were used as covariates where seasonal gradient and affinity to a replication were used as block covariates. Significance was tested with a Monte Carlo permutation test (999 permutations). Analyses were performed separately for both types of carcasses.

Results

Insect density and community composition

In 2014, we set up 120 traps baited with mouse carcasses, of which 82 traps (41 controls, 41 treatments) were evaluated and 38 traps (19 controls, 19 treatments) were destroyed or damaged by vertebrate scavengers. In 2015,

we set up 120 traps baited with rat carcasses, of which 100 traps (50 controls, 50 treatments) were evaluated and 20 traps (10 controls, 10 treatments) were destroyed or excluded. We excluded treatment carcasses with missing respective controls and vice versa. The term ‘carcass’ is hereafter used for the whole sample including insects from the dead body and those from the soil in the tray.

In total, 65 915 individuals of carrion-inhabiting insects were collected; of these, 2 543 individuals were found on mouse carcasses (259 beetles of 11 species, 2 156 flies of two families, 128 ants of two species) and 63 372 individuals on rat carcasses (1 188 beetles of 28 species, 62 180 flies of three families, four ants of a single species) (Tables 2 and S1). In both carrion types, Calliphoridae were the

most abundant dipteran group with 1 670 and 61 652 individuals in mice and rats, respectively. Silphidae were the most abundant beetle group with 206 individuals in mouse carrion and 686 individuals in rats. In total, 10 mouse carcasses of the controls were buried and eight of the treatment, where a not a single rat carcass was buried.

Changes at the community level and in trophic guild composition
The abundance of the whole carrion-inhabiting community was generally lower in treatment carcasses with insect exclusion in both carrion types (mouse: $z = -7.33$; rat: $z = -98.11$, both $P < 10^{-6}$; Figure 2). Maximum abundance of insects was 346 individuals on a single control mouse carrion, and 253 individuals on treatment mouse

Table 2 Effect of treatment on abundance of main insect guilds in both carrion types

Guild	Mouse			Rat		
	Abundance in treatment	Abundance in control	Effect of treatment	Abundance in treatment	Abundance in control	Effect of treatment
Ants	88	40	↑*	0	4	↓
Blowflies	580	1090	↓*	18039	43613	↓*
Flesh flies	296	190	↑*	217	311	↓*
Burying beetles	45	76	↓*	9	8	↓
Necrophagous beetles	70	59	↑*	515	248	↑*
Predatory beetles	6	3	↑	185	223	↓*

*Significant difference.

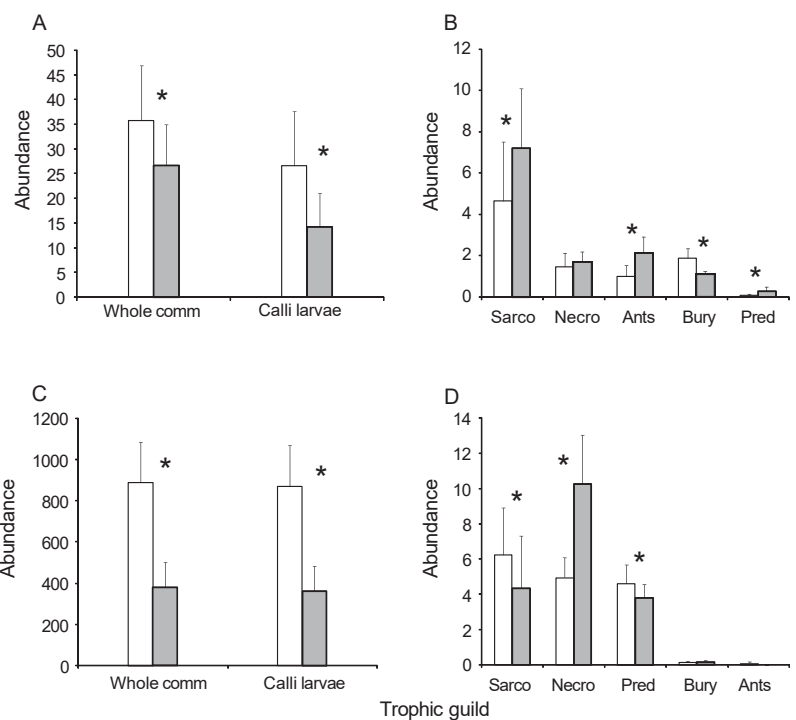


Figure 2 Mean (+ SEM) abundance (no.

specimens) of carrion-inhabiting insect trophic guilds on (A, B) mouse and (C, D) rat control (white bars) and treatment (grey bars) carcasses. An asterisk (*) indicates a significant difference between treatment and control (GLMM: $P < 0.05$). Whole comm: all insect in a sample; Calli larvae: larvae of blowflies; Sarco: larvae of flesh flies; Necro: necrophagous beetles; Bury: burying beetles of the genus *Nicrophorus*; Pred: predatory beetles.

carrion. Maximum insect abundance on single control rat carrion was 5 377 individuals and on treatment rat carrion 4 888 individuals. Mean abundance of insects on treatment carrion reached only 75% (mouse) or 43% (rat) of the abundance on the control carrion.

Blowfly larvae displayed lower abundances in both carrion types in treatment traps (mouse: $z = -12.28$; rat: $z = -99.73$, both $P < 10^{-6}$). In both control and treatment mouse carcasses, blowfly larvae reached their maximum density on days 7 and 3 after exposure, respectively, with relative abundances ranging from 50 to 90% in controls and from 0 to 80% in treatment traps. However, after reaching their maximum, the relative blowfly abundances remained very high in control carcasses (around 80%), whereas they decreased in treatment carcasses (down to

50%; Figure 3). Blowfly larvae in both control and treatment rat carcasses represented always more than 90% of the community abundance. However, in treatment carcasses they represented only 20% of the overall community on the 1st days after exposure.

Burying beetles were less abundant in treatment mouse carcasses ($z = -2.79$, $P = 0.005$), whereas they reached similar abundances in both control and treatment rat carcasses ($z = 0.26$, $P = 0.80$). Burying beetles reached their maximum numbers in control mouse carcasses on days 7 and 8 after exposure; they formed 81 or 56% of the insect community without Calliphoridae (Insects without Calliphoridae = IwC). In treatment carcasses they reached lower numbers, with a maximum on day 3 after exposure (19% of IwC). In rat carcasses, burying beetles occurred

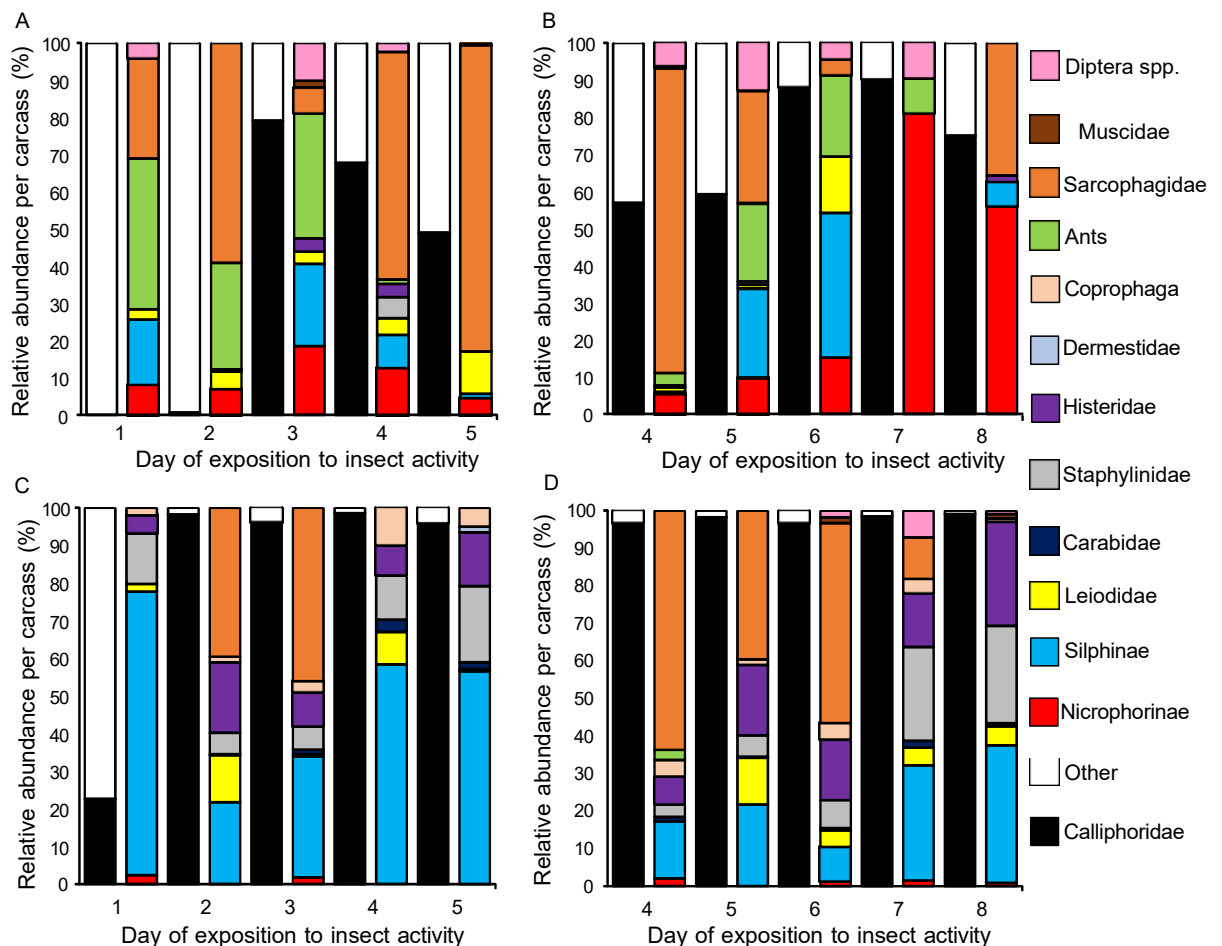


Figure 3 Relative abundances (%) of carrion-inhabiting insect groups on mouse (A) treatment and (B) control, and on rat (C) treatment and (D) control. Each panel comprises five pairs of bars (two bars per carrion age in days); the first bar in each pair represents the percentage of blowfly larvae (Calliphoridae; black) and the rest of the insect community (insects without Calliphoridae, IwC; white), the second bar represents the percentage of insect groups within the IwC category. Diptera spp. = members of other than specified dipteran families (e.g., Tipulidae).

rarely, at most they formed 2% of lWC in control and 3% of lWC in treatment carcasses.

Necrophagous beetles were more abundant in treatment rat carcasses, ($z = 9.44$, $P < 10^{-6}$), whereas they reached similar abundances in both control and treatment mouse carcasses ($z = 0.97$, $P = 0.33$). Necrophagous beetles reached their maximum 54% of lWC in control mouse carcasses after day 6 of exposure, but they represented only 25% of lWC at most on treatment mouse carcasses. The maximum relative abundance of necrophagous beetles on rat carcasses was recorded on day 8 after exposure in controls (42% of lWC) and on day 1 of exposure in treatment carcasses (77% of lWC).

Larvae of flesh flies were more abundant in treatment mouse carcasses ($z = 4.77$, $P < 10^{-5}$), but more abundant in control rat carcasses ($z = -4.07$, $P < 10^{-4}$). In both control (day 4) and treatment (day 5) mouse carcasses, flesh flies reached a maximum of 82% lWC. However, in treatment carcasses, flesh flies formed a substantial part of lWC community for several days. This situation was directly opposite for rat carcasses, where flesh flies reached a maximum of 63% of lWC in control and 46% in treatment.

Abundance of predatory beetles was, by marginal significance, higher in treatment mouse carcasses ($z = 1.97$, $P = 0.049$) but lower in treatment rat carcasses ($z = -1.95$, $P = 0.051$). Predators reached an overall lower abundance in mouse carrions compared with rat carrions. In control mouse carcasses they reached a maximum of 2% lWC and on treatment mouse carcasses they reached a maximum of 9% of lWC. In control rat carrions they reached 54% lWC on day 8 after exposure and on treatment rat carrions they reached 36% of lWC after day 5 of exposure.

Ants were more abundant in treatment than in control mouse carcasses ($z = 4.13$, $P < 10^{-4}$; Figure 2). Due to the presence of ants only in a single sample (control), it was not possible to fit the GLMM for them in the rat treatment and control. In mouse control carcasses ants reached their maximum percentage of the community (22% lWC) on day 6 after exposure and formed 41% of lWC on day 1 after exposure in treatment mouse carcasses. In control rat carcasses, they reached their maximum (3%) on day 4 after exposure. Ants were not recorded in the treatment rat carcasses (Figure 3).

The results of GLMs fitting larval abundance development during exposure clearly showed that larvae of Caliphoridae reached their optimum during our sampling time in all treatment*carrion type combinations, thus validating the results of GLMMs. The same applies for Sarcophagidae, with an exception of the mouse treatment carrion, in which their numbers were even rising towards the endpoint of our sampling, thus again supporting the

difference between mouse control and treatment carcasses (Figure S2).

Species level

There was a significant difference in species composition between treatment and control carcasses in both carrion types: mouse: $F = 2.1$, $P = 0.024$, first canonical axis explains 3.1 of 24% explainable variability (Figure 4A and B); rat: $F = 1.8$, $P = 0.004$, first canonical axis explains 2.6 of 17.1% explainable variability (Figure 4C and D).

Competitively dominant guilds displayed a general preference for control carcasses, which is reflected primarily by blowfly third instars and partly by larvae of burying beetles in mouse carrion. Adult burying beetles were represented similarly in both control and treatment carcasses (Figure 4).

The competitively inferior guilds displayed more complicated patterns. In mouse carcasses, half of the necrophagous beetle species displayed a preference for treatment [e.g., *Sciodrepoides watsoni* (Spence), *Thanatophilus rugosus* (L.)], whereas half of the species did not display any preference [e.g., *Thanatophilus sinuatus* (Fabricius), *Catops grandicollis* Erichson]. The larvae of flesh flies (Sarcophagidae), most predatory species, and all ant species displayed a preference for treatment mouse carcasses.

In necrophagous beetles, most species preferred treatment rat carcasses. Notable is the occurrence of necrophagous beetle larvae (*Thanatophilus* sp.) and *Dermestes frischeri* Kugelann in treatment rat carcasses. Larvae of flesh flies (Sarcophagidae) preferred control rat carcasses. Only a few species of predatory beetles had a clear preference for control rat carcasses, whereas the rest of the species either preferred treatment (ca. half of the species) or were equally abundant in both control and treatment carcasses (so, no preference; Figure 4).

In mouse carrion, *S. watsoni* preferred treatment traps, but on rat it was more abundant on control carrion. *Nicrophorus humator* preferred control in both types of carrion, but a closely related *Nicrophorus vespillo* (L.) was without preferences in mouse carrion and prefer treatment rat carrion. The two species of *Thanatophilus* carrion beetles showed different preferences: both *T. rugosus* and *T. sinuatus* preferred treatment rat carrion, but only *T. rugosus* preferred treatment mouse carrion.

Discussion

In this study, we demonstrated that delayed insect access to carrion of small vertebrates affects the establishment of a carrion insect community. This was evident both among competitively dominant and inferior insects. The competitively dominant early-successional guild of blowfly larvae

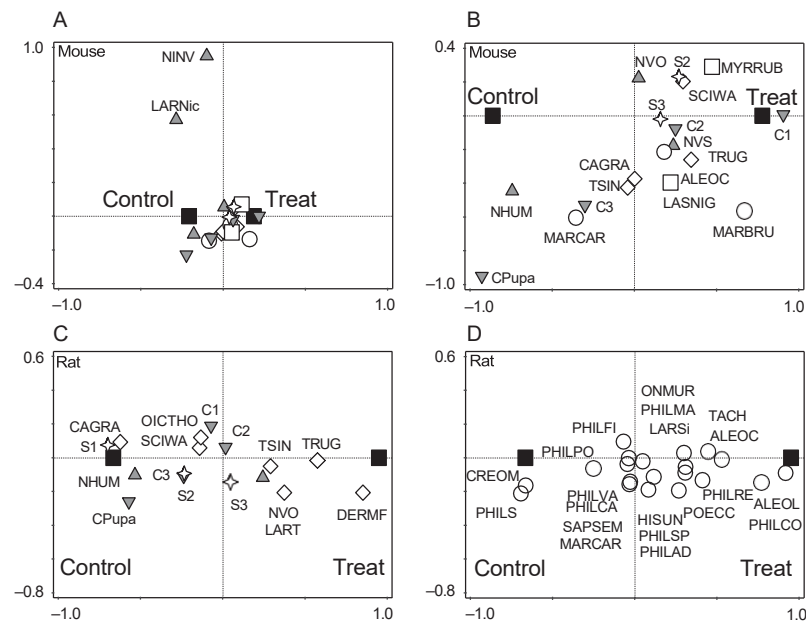


Figure 4 Canonical correspondence analysis (CCA) ordination diagrams of carrion-inhabiting insect species preferences for treatment (Treat) and control mouse and rat carcasses: (A) mouse carrion including *Nicrophorus investigator* (NINV) and *Nicrophorus* sp. larvae (LARNic); (B) mouse carrion without NINV and LARNic; (C) rat carrion: necrophages and omnivores; and (D) rat carrion: predators. Grey symbols represent early-succession dominant guilds, white symbols represent competitively inferior groups, and black symbols represent the predictor variables (Control/Treat). Up-triangle = burying beetles; down-triangle = larvae of blowflies; diamonds = necrophagous beetles; circles = predators; stars = larvae of flesh flies; squares = ants. For abbreviations see Table S1.

was more associated with control carcasses, whereas the competitively inferior guilds displayed more intricate and cadaver-type-dependent patterns of preferences including both positive and negative reactions to carcasses with delayed insect access throughout. The second competitively dominant guild of burying beetles displayed some preference for control carcasses (larvae), whereas adults did not display any preference at all. This study is the first to employ a quantitative sampling design, picturing the real community structure of individual carcasses to investigate the patterns of carrion insect community, and to perform a replicable and detailed study of carrion-inhabiting insects.

Establishment of early-successional competitively dominant guilds
Blowflies (Calliphoridae) displayed a strong preference for control carcasses in both size categories of small carrion. Blowflies tend to colonize very fresh carrion (Smith, 1986), although there is some evidence that blowflies can also colonize older meat (Lang et al., 2006; Yang & Shiao, 2012). This was also supported by our study, in which blowflies established themselves on treatment carcasses as well. However, our results demonstrated that the colonization of older carcasses was sub-optimal for them, as they

never reached the abundances observed in control carrion. Similar to Pechal et al. (2014), colonization progress was faster and maximum abundance was reached more quickly on insect-excluded carcasses. This flexibility could, however, facilitate their coexistence with burying beetles on very small carrion, as blowflies could oviposit on carrion which was already unsuitable for breeding by burying beetles (mouse; Trumbo, 1990). Pechal et al. (2014) observed that blowfly larvae make carrion inaccessible to insects throughout the early stages of its decomposition – our observations suggest that in the case of smaller carrion, other insect species are able to coexist with them as well. It is important to note, however, that Pechal et al. (2014) used large carrion (pig), which has a different successional trajectory, and recorded only adult insects flying in the proximity of the carcass.

Surprisingly, adult burying beetles were equally associated with all types of carcasses (control/treatment, mouse/rat). This can be caused by their bimodal behaviour, which depends both on the age and mating readiness of the beetles, and the condition of the carrion. For their breeding, burying beetles monopolize smaller and fresh carrion without fly eggs or maggots (Milne & Milne, 1976; Trumbo, 1992). However, newly emerged beetles could

prefer carcasses with substantial abundance of fly larvae upon which they prey (Wilson, 1983; Trumbo, 1992).

Effect of insect exclusion on competitively inferior insects

The delay of insect activity on small mammal carcasses significantly affected the abundances of blowfly larvae. In contrast, neither colonization nor nesting activity of burying beetles differed between control and treatment carcasses. Our results could therefore suggest that blowfly larvae are competitively more dominant, as burying beetles' monopolization capability seems to be not as high as that of the blowflies, and they themselves tend to avoid nesting in the presence of blowfly larvae (Milne & Milne, 1976; Wilson, 1983). It is important to note that the behaviour of burying beetles is under strong influence of temporal segregation, and colonization and monopolization rates may thus have a strong seasonal pattern as indicated also in our study (data not shown).

The primary impact of blowfly larvae on other insect groups relates to their huge abundances, as one blowfly female can lay around 200 eggs in a single batch, so only a few batches of eggs represent thousands of larvae (Mackerras, 1933; Smith, 1986). In addition, blowfly larvae also emit ammonia, which at a higher concentration is toxic to beetles and helps to exclude them at the early stages of decomposition (Villet, 2011). A carcass colonized by blowfly larvae becomes moister than a carcass without them. This excess of moisture also seems to repel the majority of other insects (Byrd & Castner, 2009).

Necrophagous beetles displayed significant preference for treatment rat carcasses, which simultaneously hosted a much smaller community of blowfly larvae than the control carcasses (with mean abundance of 800–1 000 individuals in control and 400 individuals in treatment carcasses). Notable is the occurrence of skin beetles (*D. frischii*) only in treatment rat carcasses. Skin beetles utilize the dry remains (Amendt et al., 2004), they naturally should favour the smaller abundance of blowflies which makes the carcasses less humid.

The relationship between the larvae of blowflies and flesh flies is probably related to the size of individual carcasses and thus potential competition for space. This could explain the conflicting preference of flesh flies for treatment mouse carcasses and control rat carcasses. Flesh flies colonize carcasses later than blowflies and lay live larvae in lower numbers than Calliphoridae, but have faster life cycles (Gill, 2005). Flesh fly larvae are already present when blowfly eggs are still un-hatched (Blackith & Blackith, 1990). They are also known to kill their potential larval competitors (Matuszewski et al., 2010). Flesh flies therefore probably do not directly mind the presence of blowflies given there is enough space to coexist.

The response of predatory species to delayed insect access is peculiar. In mice, predators as a guild and most separate predatory species were associated with treatment carcasses. This preference could be explained either by predators following their prey (and also the presence of smaller larvae) or by simply a better accessibility of food due to lower density of blowfly larvae. A similar explanation might also affect the patterns of ant species in mice (Braack, 1987). In rats, predators as a guild seemed to follow numerically their main prey, the fly larvae. On the other hand, the treatment carcasses hosted a predatory community that included almost half of all predatory species, including also species whose larvae are known to be parasitoids of flies (e.g., rove beetles of the genus *Aleochara*; Greene, 1997). Such parasitoid species might prefer carcasses with lower blowfly larval abundances, where the larval collective defence is less effective, and thus the oviposition on an individual larva might be more effective (Peschke & Fuldner, 1987; Rivers et al., 2011).

In general, the majority of the conflicting interactions between blowfly larvae and competitively inferior insects are probably avoided or softened by the distinct seasonality in carrion-inhabiting insects (Hanski, 1987; Blackith & Blackith, 1990; Centeno et al., 2002).

Effect of carrion type

Although our study was not designed to compare the effect of carrion size, some substantial differences in insect communities between mice and rat carrion were observed, as was to be expected (Matuszewski et al., 2016). Bigger carrion (rats) hosted higher overall insect abundances and more insect species. The effect of treatment was more prominent on rat carrion, on which the abundance of the whole community was less than half of control abundance. The most dominant group on both carrion types were Calliphoridae larvae. We observed different effects of the treatment on flesh flies: on mouse cadavers their abundance increased after insect exclusion, but on rat cadavers it decreased. This could be attributed to a high abundance of competitively strong blowfly larvae on bigger carrion. Burying beetles were more abundant on mouse carrion, whereas the remaining representatives of the Silphidae family preferred rat carrion, presumably because there was a larger amount of prey material available (Blackith & Blackith, 1990). Similarly, predators (Histeridae, Staphylinidae) were more common on larger cadavers.

Comparison of carrion and other ephemeral habitats

In carrion, the competitively dominant species seem to have both negative (blowflies) and indifferent (burying

beetles) effects on competitively inferior species, represented predominantly by beetles. Our results are thus in contradiction with those from the dung-inhabiting communities. Although a negative impact of fly larvae on beetles has been documented in temperate communities (Hirschberger & Degro, 1996), it is generally accepted that large dung-relocating beetles have a sharp negative influence on fly larvae (Bornemissza, 1979; Ridsdill-Smith et al., 1986). The same negative impact of burying beetles on fly larvae has always been predicted in the carrion community (Suzuki, 2000), whereas our results show that such impact is fairly limited. This can be caused by the size of the beetles, limiting the utilization of large carrion by burying beetles, who can only bury a small carrion, whereas dung beetles are able to use a broader spectrum of dung size. In some periods of the year, burying beetles are able to monopolize most of small carrion in nature (spring, summer), but overall they are able to bury only 25% of carrion during a year. The potential competition between fly larvae and beetles is probably a competition for space both in dung and carrion (Hirschberger & Degro, 1996). However, until more data are available, we cannot conclude whether larvae of coprophilous flies use the same methods for competing with beetles as larvae of blowflies do, for example, using chemical substances such as ammonium (Villet, 2011).

Acknowledgements

We thank Ing. Pavlina Bastova and Ing. Miroslav Basta for allowing us to carry out this study on their property. We also thank Dr. Radka Musilova and Karel Janousek for accommodation and material support during field experiments. We also acknowledge Dr. Hana Sulakova and Dr. Pavel Jakubec for help with insect identification, and Marek Romasek for language correction. This work was supported by the Grant Agency of Charles University in Prague (243-227304), by Charles University Research Centre program No. 204069, Grant Agency of University of South Bohemia (152/2016/P), Czech Academy of Sciences (MSM200961902), and financial support from the Institute of Entomology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences (RVO//:60077344).

References

- Aleksandrowicz O, Komosinski K, Sklodowski J, Huruk S, Berseviskis A & Tarasiuk S (2005) On the Fauna of Carrion Beetles (Coleoptera, Silphidae) of Mazurian Lakeland (North-Eastern Poland). Protection of Coleoptera in the Baltic Sea Region. Agricultural University Press, Warsaw, Poland.
- Amendt J, Krettek R & Zehner R (2004) Forensic entomology. *Naturwissenschaften* 91: 51–65.
- Anderson GS & VanLaerhoven SL (1996) Initial studies on insect succession on carrion in southwestern British Columbia. *Journal of Forensic Science* 41: 617–625.
- Bates D, Maechler M, Bolker B & Walker S (2014) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package v.1: 1–23. Available at: <http://lme4.r-forge.r-project.org/>
- Beninger CW & Peck SB (1992) Temporal and spatial patterns of resource use among *Nicrophorus* carrion beetles (Coleoptera: Silphidae) in a *Sphagnum* bog and adjacent forest near Ottawa, Canada. *Canadian Entomologist* 124: 79–86.
- Bergallo HG & Rocha CFD (1994) Spatial and trophic niche differentiation in two sympatric lizards (*Tropidurus torquatus* and *Cnemidophorus ocellifer*) with different foraging tactics. *Australian Journal of Ecology* 19: 72–75.
- Blackith RE & Blackith RM (1990) Insect infestations of small corpses. *Journal of Natural History* 24: 699–709.
- Bornemissza GF (1979) The Australian dung beetle research unit in Pretoria. *South African Journal of Science* 75: 257–260.
- Braack LEO (1987) Community dynamics of carrion-attendant arthropods in tropical African woodland. *Oecologia* 72: 402–409.
- Byrd JH & Castner JL (2009) *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Centeno N, Maldonado M & Oliva A (2002) Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina). *Forensic Science International* 126: 63–70.
- Corbet PS (1964) Temporal patterns of emergence in aquatic insects. *Canadian Entomologist* 96: 264–279.
- Finn JA (2001) Ephemeral resource patches as model systems for diversity-function experiments. *Oikos* 92: 363–366.
- Finn JA & Gittings T (2003) A review of competition in north temperate dung beetle communities. *Ecological Entomology* 28: 1–13.
- Gill GJ (2005) *Decomposition and Arthropod Succession on Above Ground Pig Carrion in Rural Manitoba*. Technical Report TR-06-2005, Canadian Police Research Center, Ottawa, ON, Canada.
- Greene GL (1997) Occurrence of *Aleochara* spp. (Coleoptera: Staphylinidae) parasitoidism of filth fly pupae in western Kansas. *Journal of the Kansas Entomological Society* 70: 70–72.
- Hanski I (1987) Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. *Ecological Entomology* 12: 257–266.
- Hirschberger P & Degro HN (1996) Oviposition of the dung beetle *Aphodius ater* in relation to the abundance of yellow dung fly larvae (*Scatophaga stercoraria*). *Ecological Entomology* 21: 352–357.
- Ikeda H, Kubota K, Kagaya T & Abe T (2006) Niche differentiation of burying beetles (Coleoptera: Silphidae: Nicrophorinae) in carcass use in relation to body size: estimation from stable isotope analysis. *Applied Entomology and Zoology* 41: 561–564.

- Kalinova B, Podskalska H, Ruzicka J & Hoskovec M (2009) Irresistible bouquet of death – how are burying beetles (Coleoptera: Silphidae: *Nicrophorus*) attracted by carcasses. *Naturwissenschaften* 96: 889–899.
- Kocarek P (2001) Diurnal activity rhythms and niche differentiation in a carrion beetle assemblage (Coleoptera: Silphidae) in Opava, the Czech Republic. *Biological Rhythm Research* 32: 431–438.
- Kocarek P (2003) Decomposition and Coleoptera succession on exposed carrion of small mammal in Opava, the Czech Republic. *European Journal of Soil Biology* 39: 31–45.
- Lang MD, Allen GR & Horton BJ (2006) Blowfly succession from possum (*Trichosurus vulpecula*) carrion in a sheep-farming zone. *Medical and Veterinary Entomology* 20: 445–452.
- Lee CM & Wall R (2006) Cow-dung colonization and decomposition following insect exclusion. *Bulletin of Entomological Research* 96: 315–322.
- Lowman MD (1985) Temporal and spatial variability in insect grazing of the canopies of five Australian rainforest tree species. *Austral Ecology* 10: 7–24.
- Łukasik P & Johnson T (2007) Arthropod communities and succession in baobab, *Adansonia rubrostipa*, fruits in a dry deciduous forest in Kirindy Forest Reserve, Madagascar. *African Entomology* 15: 214–220.
- Mackerras MJ (1933) Observations on the life-histories, nutritional requirements and fecundity of blowflies. *Bulletin of Entomological Research* 24: 353–362.
- Matuszewski S, Bajerlein D, Konwerski S & Szpila K (2010) Insect succession and carrion decomposition in selected forests of Central Europe. Part 1: Pattern and rate of decomposition. *Forensic Science International* 194: 85–93.
- Matuszewski S, Konwerski S, Frańczak K & Szafałowicz M (2014) Effect of body mass and clothing on decomposition of pig carcasses. *International Journal of Legal Medicine* 128: 1039–1048.
- Matuszewski S, Frańczak K, Konwerski S, Bajerlein D, Szpila K et al. (2016) Effect of body mass and clothing on carrion entomofauna. *International Journal of Legal Medicine* 130: 221–232.
- Milne LJ & Milne M (1976) The social behavior of burying beetles. *Scientific American* 235: 84–89.
- Ohkawara K, Suzuki S & Katakura H (1998) Competitive interaction and niche differentiation among burying beetles (Silphidae, *Nicrophorus*) in Northern Japan. *Entomological Science* 1: 551–559.
- Payne JA (1965) A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology* 46: 592–602.
- Pechal JL, Benbow ME, Crippen TL, Tarone AM & Tomberlin JK (2014) Delayed insect access alters carrion decomposition and necrophagous insect community assembly. *Ecosphere* 5: 1–21.
- Peschke K & Fuldner D (1987) Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere* 114: 241–265.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D & R Core Team (2017) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package v.3.1-131. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Putman RJ (1983) Carrion and Dung: The Decomposition of Animal Wastes. Edward Arnold, London, UK.
- Ridsdill-Smith TJ, Hayles L & Palmer MJ (1986) Competition between the bush fly and a dung beetle in dung of differing characteristics. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 41: 83–90.
- Rivers DB, Thompson C & Brogan R (2011) Physiological trade-offs of forming maggot masses by necrophagous flies on vertebrate carrion. *Bulletin of Entomological Research* 101: 599–611.
- Schiesari L, Werner EE & Kling GW (2009) Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. *Freshwater Biology* 54: 572–586.
- Schneider K, Migge S, Norton RA, Scheu S, Langel R, et al. (2004) Trophic niche differentiation in soil microarthropods (Oribatida, Acari): evidence from stable isotope ratios (¹⁵N/¹⁴N). *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1769–1774.
- Schoenly K & Reid W (1987) Dynamics of heterotrophic succession in carrion arthropod assemblages: discrete seres or a continuum of change? *Oecologia* 73: 192–202.
- Scott MP (1990) Brood guarding and the evolution of male parental care in burying beetles. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 26: 31–39.
- Scott MP (1998) The ecology and behavior of burying beetles. *Annual Review of Entomology* 43: 595–618.
- Sharanowski BJ, Walker EG & Anderson GS (2008) Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. *Forensic Science International* 179: 219–240.
- Siemers BM & Schnitzler HU (2004) Echolocation signals reflect niche differentiation in five sympatric congeneric bat species. *Nature* 429: 657–661.
- Sipkova H & Ruzicka J (2009) Carrion succession stage preference among necrophagous beetles (Coleoptera: Silphidae) in central Europe. *Klapalekiana* 45: 213–219.
- Sladeczek FXJ, Hrcek J, Klimes P & Konvicka M (2013) Interplay of succession and seasonality reflects resource utilization in an ephemeral habitat. *Acta Oecologica* 46: 17–24.
- Smith KGV (1986) A Manual of Forensic Entomology. The Trustees of the British Museum (Natural History), London, UK.
- Smith RJ & Heese B (1995) Carcass selection in a high altitude population of the burying beetle, *Nicrophorus investigator* (Silphidae). *Southwestern Naturalist* 40: 50–55.
- Smith RJ & Merrick MJ (2001) Resource availability and population dynamics of *Nicrophorus investigator*, an obligate carrion breeder. *Ecological Entomology* 26: 173–180.
- Sustek Z (1981) Key to identification of insects: carrion beetles of Czechoslovakia (Coleoptera, Silphidae). *Zprávy Československé Společnosti Entomologické při ČSAV, Klíč k Určování Hmyzu* 2: 1–47.
- Suzuki S (2000) Carrion burial by *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera: Silphidae) prevents fly infestation. *Entomological Science* 3: 269–272.
- Svacha P & Danilevsky ML (1986) Cerambycid larvae of Europe and Soviet Union (Coleoptera, Cerambycidae). Part I. *Acta Universitatis Carolinae – Biologica* 30: 1–176.

- Ter Braak CJF & Šmilauer P (2012) *Canoco Reference Manual and User's Guide: Software for Ordination, v.5.0*. Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA.
- Tolasz R, Miková T, Valerianová A & Vozenilek V (2007) Climate Atlas of Czech Republic. ČHMÚ, UPOL, Prague, Czech Republic. (In Czech)
- Trumbo ST (1990) Reproductive success, phenology and biogeography of burying beetles (Silphidae, *Nicrophorus*). *American Midland Naturalist* 124: 1–11.
- Trumbo ST (1992) Monogamy to communal breeding: exploitation of a broad resource base by burying beetles (*Nicrophorus*). *Ecological Entomology* 17: 289–298.
- Trumbo ST & Bloch PL (2000) Habitat fragmentation and burying beetle abundance and success. *Journal of Insect Conservation* 4: 245–252.
- Villet MH (2011) African carrion ecosystems and their insect communities in relation to forensic entomology. *Pest Technology* 5: 1–15.
- Volf M, Hřeček J, Jůlkunen-Tiitto R & Novotný V (2015) To each its own: differential response of specialist and generalist herbivores to plant defence in willows. *Journal of Animal Ecology* 84: 1123–1132.
- Wilson DS (1983) The effect of population structure on the evolution of mutualism: a field test involving burying beetles and their phoretic mites. *American Naturalist* 121: 851–870.
- Wilson EE & Wolkovich EM (2011) Scavenging: how carnivores and carrion structure communities. *Trends in Ecology and Evolution* 26: 129–135.
- Yamashita S & Hijii N (2007) Resource use pattern of a mycophagous beetle, *Neopallodes inermis* (Coleoptera, Nitidulidae), on soft fungi, *Collybia* spp. (Agaricales). *Annals of the Entomological Society of America* 100: 222–227.
- Yang ST & Shiao SF (2012) Oviposition preferences of two forensically important blow fly species, *Chrysomya megacephala* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae), and implications for postmortem interval estimation. *Journal of Medical Entomology* 49: 424–435.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Short schema of sampling design; Days 7–12 not displayed. Rep = replication.

Figure S2. Generalized linear mixed model (GLM) curves of successional trends in Calliphoridae and Sarcophagidae inhabiting (A, C) control and (B, D) treatment (A, B) mouse and (C, D) rat carrions. All GLMs presented are quadratic with Poisson distribution of errors. All models are significant.

Table S1. Summary of sampled insect species and their total numbers for each carrion and treatment type. Abb.: abbreviation of a species or genus, as labelled in CCA ordination diagrams (Figure 4); Trophic guild: ants = Hymenoptera (Formicidae), blowflies = Calliphoridae, burying beetles = Silphidae (*Nicrophorus* sp.), flesh flies = Sarcophagidae, Necrophagous beetles = representatives of beetles who feed solely on carrion, Predatory beetles = species who feed primarily on other insects; Comp. = competitive dominance as dom. (dominant) or infer. (inferior); abundance = number of individuals on mouse/rat control/treatment carcasses.

Článek II

Jakubec, P., **Kadlec, J.**, & Šípek, P. (2021). Standardized laboratory methodology for the evaluation of foraging strategies in necrophilous beetles: a case study of necrophila (*Calosilpha*) *brunnicollis* (Coleoptera: Silphidae). *Journal of Medical Entomology*, 58(1), 40–46.

Standardized Laboratory Methodology for the Evaluation of Foraging Strategies in Necrophilous Beetles: A Case Study of *Necrophila (Calosilpha) brunnicollis* (Coleoptera: Silphidae)

Pavel Jakubec,^{1,3} Jakub Kadlec,² and Petr Šípek²

¹Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, CZ-165 00 Praha-Suchbát, Czech Republic, ²Faculty of Science, Charles University, Viničná 1594/7, Prague 128 43, Czech Republic, and ³Corresponding author, e-mail: jakubecp@fzp.czu.cz

Subject Editor: Jason Byrd

Received 12 May 2020; Editorial decision 9 July 2020

Abstract

Precise data regarding feeding habits of necrobiont species are a key element of food web and evolutionary ecology. They can also be used to assess the utility and value of those species for forensic entomology, where obligatory necrophagous species in particular are considered good bioindicators of postmortem or preappearance interval. However, the feeding habits of many species are known only from anecdotal field observations, often reduced to vaguely defined categories—predatory, necrophagous, or omnivorous. To address this issue, we designed a simple, in vitro behavioral experiment allowing the quantification of food preferences. Next, we applied it on *Necrophila (Calosilpha) brunnicollis* (Kraatz, 1877), which is a common carrion beetle of East Asia with unresolved food preferences. The results suggest that this species is preferentially necrophagous, thus valuable for forensic research. Importantly, however, our experimental design allowed us to reveal that it also readily feeds on larvae of Diptera, although they compose a minor proportion of its diet. This methodology can be applied to other species, and it could provide evidence for future decision making in forensic research.

Key words: forensic entomology, food choice, gender, necrophagy, Silphidae

The utility of necrophagous beetles (Coleoptera) in forensic entomology is a well-established fact, although this group has been overlooked and underutilized. They seem especially promising as bioindicators for postmortem interval (PMI) or preappearance interval (PAI) estimation (Midgley et al. 2010, Matuszewski 2011). The major spark of interest in the group started relatively recently when more data on the developmental biology of early colonizing and necrophagous species became available (Midgley and Villet 2009a; Velásquez and Vilorio 2009, 2010; Ridgeway et al. 2014). When considering potential candidates as well as an efficient use of our time and resources, we should focus on the most promising species first. Such a candidate species should be one with a well-established taxonomic status, along with a possibility of unequivocal morphological or molecular identification. Furthermore, the species should be common, widely distributed, and we should be able to clearly identify its feeding strategy. The last point is especially important: because obligatory necrophagous species represent the most promising bioindicators for forensic entomology (Amendt et al. 2004), the identification of their feeding habits is crucial for correct research prioritization.

Carrion-visiting (necrobiont) insects are commonly divided according to their foraging ecology into four main guilds: necrophages, predators, parasites/parasitoids, and omnivores (VanLaerhoven 2010, Villet 2011). Although some species are restricted to a single feeding strategy, many of them are more plastic and may alter the food source according to the existing ecological circumstances (Merritt and De Jong 2016). Necrophages feed directly on dead tissue or utilize dry remnants including skin derivatives as hairs or feathers. Among beetles, the families Silphidae, Dermestidae, and Trogidae host the highest numbers of necrophagous forms (Merritt and De Jong 2016). The family Silphidae, despite its misleading English name ‘carrion beetles’, is not in its entirety necrophagous, and other foraging strategies such as predation, herbivory, and omnivory are represented (Ratcliffe 1996, Sikes 2008). Larvae of some groups, such as sexton beetles (*Nicrophorus* sp. (Fabricius, 1775) (Silphidae)), are primarily necrophagous, whereas adults are opportunistic and they can feed on both carrion and live fly larvae (Sikes 2008).

The bulk of our knowledge of feeding habits relies on anecdotal observations without a quantitative approximation of exact feeding

habits of a given species. An interesting way how to solve this problem was shown by Ikeda et al. (2007, 2008), while studying foraging habits of Japanese silphids. They performed stable isotope analysis where they compared specific isotopic ratios in several species of carrion beetles with those of sexton beetles (scavengers) and carabid beetles (predators) and matched the food habits with the respective species position on a phylogenetic tree. These analyses have shown that among Silphidae, necrophagy could be a plesiomorphic state and other feeding habits seen in extant species occurred due to coadaptation and speciation events (Ikeda et al. 2008, King et al. 2015). The transition from necrophagy to predaceous feeding in Silphinae was also related with the change in other life-history traits, e.g., the loss of flight capability or modification of egg/clutch size (Ikeda et al. 2008). However, the situation might not be as clear as it may seem—e.g., in the genus *Necrodes* (Leach, 1815) (Silphidae), which represents an early lineage of Silphinae (King et al. 2015), there is a number of records indicating a mixed, if not a primarily predaceous strategy (Ratcliffe 1972, King et al. 2015). Also, a number of silphids commonly considered as true necrophages, which was also established in the works of Ikeda et al. (2007, 2008), including the representatives of *Necrophila* (Kirby & Spence, 1828) (Silphidae) have been observed feeding on maggots at times in preference to carrion even in larval stages (for details, see King et al. 2015). The problem of the stable isotope analysis is that it relies heavily on comparison with other species, which is in practice circular reasoning. Thus, in order to find the feeding habits of the focal species, we have to study their feeding behavior directly.

For our study, we selected the carrion beetle, *Necrophila* (*Calosilpha*) *brunnicollis* (Kraatz, 1877), a member of the subfamily Silphinae that occurs throughout east Asia including Japan, China, and the Korean Peninsula (Růžička et al. 2015). The species was reported as necrophagous (Ikeda et al. 2008, Růžička et al. 2015); thus, it belongs on the list of potential bioindicators for forensic entomology. The ecology of *N. brunnicollis* is relatively unknown and most of the available information comes from collectors in the form of locality labels under museum specimens. The species is frequently encountered in broad-leaved and mixed temperate forest or bamboo growth with an occurrence period from April to October (Kamimura et al. 1964, Nagano and Suzuki 2003, Růžička et al. 2015, Ueda 2015). The peak flight period is in July, as observed in southern Kantō District, Japan (Nagano and Suzuki 2003); however, due to its broad range, the seasonal occurrence patterns may vary geographically (Růžička et al. 2015). According to anecdotal field observations, *N. brunnicollis* is regularly attracted into baited pitfall traps with meat or can be encountered on large vertebrate carcasses (Růžička et al. 2015), although occasionally it has also been found on other rotting substrate or on mushrooms (Růžička et al. 2015). The association with dead vertebrates was confirmed by ratios of carbon and nitrogen stable isotopes (Ikeda et al. 2007, 2008). Both these studies reported the isotope ratio in *N. brunnicollis* to be remarkably similar to other necrophagous species in the analysis. On the other hand, due to the abovementioned contradicting information on foraging habits in Silphidae, these conclusions need to be tested. Especially because the species represents a potentially very valuable bioindicator for forensic entomology in East Asia.

By creating a standardized methodology for food choice tests suitable for carrion beetles, we aimed 1) to test the in vitro food preferences of *N. brunnicollis*, 2) to quantify the relative contribution of both main dietary components (decayed meat, fly maggots) in the total food intake of the species, and 3) to use the results to assess the suitability of *N. brunnicollis* for forensic studies.

Materials and Methods

Experimental Specimens

The experiment was performed with mature beetles, obtained from a laboratory breeding colony at the Czech University of Life Sciences Prague. They represented the second generation of adults bred in the laboratory under standardized climatic and light conditions and also on the same food source which consisted of fish meat (*Scomber scombrus* Linnaeus, 1758), which is commonly used diet of laboratory bread silphids (Midgley and Villet 2009b, Ridgeway et al. 2014, Novák et al. 2018, Jakubec et al. 2019). Parent generation was collected with baited pitfall traps placed in different habitats in West Tianmushan Nature Reserve (1,165–1,470 m a.s.l.; GPS: 30°20′35.16″–30°20′56.76″N 119°25′27.84″–119°25′53.76″E), China, Zhejiang Province, Lin'an County between the 5 and 6 July 2017.

The experimental group consisted of 50 randomly selected beetles, 23 males and 27 females. The species identity and sex was confirmed by observation of morphological features of living and immobilized individuals under microscope and using a specialized identification key (Růžička et al. 2015). To immobilize observed specimens, we placed each beetle inside a Petri dish (9 cm in diameter) and pinned it down with a hand-held cotton pad. This allowed us to study each animal for long periods of time without the need to use carbon dioxide or chilling (Champion de Crespigny and Wedell 2008).

In an attempt to control and minimize the effect of intrinsic factors on the food choice of our experimental animals, we used beetles that were of approximately the same age and were allowed to mate freely. To further equalize the starting physiological conditions of the animals, they were isolated and fed ad libitum with chicken breasts for 48 h and then starved for another 24 h.

Food Preference Experiment

To test the food preferences, we prepared two types of food presumably consumed by *N. brunnicollis* in the wild: pieces of chicken breasts (approximate weight of 0.5 g) and larvae of blue bottle fly [*Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758) (Calliphoridae)]. Chicken breasts were selected because they well represent the muscle tissue that is consumed by necrophagous species. It is also highly uniform in structure, unlike fish meat that was used during the breeding, conveniently providing us with almost constant measurements of dry weight, thus allowing for accurate measurements of food consumption over a period of time. The blue bottle fly larvae were selected as the representatives of the one of the most abundant necrophagous insect families encountered on carrion in China (Wang et al. 2019). At the beginning of the experiment, the maggots were freeze-killed to prevent them from consuming the meat and also to stop their movement, which could increase their attractiveness for the experimental beetles.

The behavioral experiments were conducted in glass Petri dishes (150 mm diameter, 30 mm height), each containing a sheet of moistened filter paper and two pieces of potential food, chicken breasts and a fly larva. The food was arranged at random on a circle at a distance of 2 cm from the edge of the Petri dish. The experiment was conducted under ordinary room conditions (17–20°C and 75–85% air humidity). Beetles were weighed right before they were placed in the middle of the Petri dish using analytical scales to record their accurate starved weight. Afterward they were allowed to feed on both types of food for 24 h. The remaining food was afterward removed and dried in a cabinet dryer for 12 h at 50°C to achieve a constant net dry weight.

To calculate the actual food consumption, the conversion factor was estimated from a random sample of 25 pieces of chicken meat and fly maggots, respectively. We measured their wet mass and their constant net dry mass, obtained by an identical drying procedure as applied to the experimental samples (at 50°C until reaching constant weight). The net dry weight of consumed food was calculated as the difference between the dry weight of introduced food and the dry weight of its remains (Waldbauer 1964, Soo Hoo and Fraenkel 1966). The relative consumption rate was calculated as the weight of the food consumed over the period of 24 h relative to the weight of the adult at the beginning of the experiment, as suggested by Farrar et al. (1989).

Statistical Analysis

To understand the foraging ecology of *N. brunnicollis*, we have investigated five questions (1–5): first, we looked into 1) differences in the weight of males versus females. The null hypothesis was that the difference between mean weight of males and females is zero, which we tested with a two-tailed *t*-test. 2) Does *N. brunnicollis* exhibit a preference for either of the two food types (chicken or maggots)? Our null hypothesis was that the amount of food consumed is the same for both items that were offered to each individual. A paired one-tailed *t*-test was performed to test this hypothesis. If the alternative hypothesis was true and chicken was consumed in higher amounts than the fly larvae, we were also interested in 3) the amount of fly larvae consumed and if it is significantly higher than zero. To test this, we used a one-sided Wilcoxon signed rank test. 4) Next, we aimed to evaluate the consumption of food over a 24-h period and how it changes with weight and sex of an individual. To analyze this, we used multiple linear regression. The dependent variable was the amount of food consumed (TFC; meat and larval mass combined) and our explanatory variables were the weight of an individual and its sex. The weight of the individual was centered (we subtracted mean weight from every individual weight value) to allow a more meaningful and intuitive interpretation of the results. Four models with different levels of complexity were created and compared by using their Akaike information criterion values with a correction for small samples (AICc; Hurvich and Tsai 1989). The most complex model (tod1) represented the TFC as a function of the weight of an individual in the interaction with the gender of our experimental animal. The second most complex model (tod2) presumed that the effect of the gender was additive rather than in an interaction with the weight. The third and fourth models (tod3 and tod4) disregarded the gender or weight of the experimental animal altogether and left only the other factor as the single explanatory variable. The model with the lowest value of AICc was considered as the best description of the phenomenon.

Finally, we aimed to 5) investigate the factors responsible for amount of consumed chicken meat and larvae specifically. We used mixed effect linear regression. The dependent variable was the weight of consumed chicken meat or larvae in milligrams. The explanatory fixed effect variables were the weight of an individual, its sex, and type of food consumed. As random effect, we used the identity of experimental animal to deal with the hierarchical structure of the data. We used centered values of weights as in the previous analysis. Four models with different levels of complexity were created and compared by using their AICc. The most complex model (cod1) represented the weight of consumed chicken meat and larvae as a function of the weight of an individual in the interaction with the gender of our experimental animal and an additive effect of food type. The second most complex model (cod2) presumed that the effect of the

gender was additive rather than in an interaction with the weight. The third and fourth models (cod3 and cod4) disregarded the gender or weight of the experimental animal altogether and left only the other factor and food type as the explanatory variable. The model with the lowest value of AICc was considered as the best description of the phenomenon.

The assumption of normality of data was confirmed by visual evaluation. If the data did not pass this test, the hypothesis was tested by the nonparametric alternative or we used a distribution other than Gaussian. Model validation and deviations from its assumptions were done by a visualization of the corresponding residual plots. The significance level was set at 5%. Data management and all analyses were carried out using the R statistical program (R Core Team 2020). Graphical outputs were created using ggplot2 and sjPlot packages (Wickham 2009, Lüdtke 2018).

Results

Food Consumption

In total, we recorded the behavior of 50 adult individuals of *N. brunnicollis* (27 females, 23 males). The individuals were highly variable in their recorded weight, which ranged from 227.5 to 428 mg, with the mean weight 320.7 mg (SD = 58.65 mg). Females were slightly heavier (mean = 327.78 mg, SD = 54.69 mg) than males (mean = 314.73 mg, SD = 62.21 mg); however, the difference was not statistically significant when tested by the two-tailed *t*-test (*t* value = -0.78916, df = 47.94, *P* = 0.434).

The average amount of food, chicken meat and fly larvae, consumed over a 24-h period was 149.61 ± 57.88 mg, which is approximately $46.9 \pm 17.5\%$ of the body mass of the individual. Chicken meat was the main component of the diet (112.569 ± 47.422 mg), but the fly larvae were consumed as well (37.042 ± 31.886 mg). The difference between the consumption of chicken meat and fly larvae was highly significant (*t* value = 9.4691, df = 47, *P* < 0.001). However, we found that the consumption of larvae was significantly greater than zero (Wilcoxon signed rank test; *P* < 0.001), so the beetles cannot be considered purely necrophagous. Females were observed to consume more larvae (42.64 ± 31.49 mg) than males (32.27 ± 32.03 mg). This difference was also noticeable when comparing the proportion of consumed larvae and chicken meat. Larvae represented 25.4% ($\pm 18.9\%$) of all the food the females consumed, whereas in males, it was only 20.4% ($\pm 8.6\%$). However, the maximum recorded proportion of larvae consumed was comparable, 57.6% for females and 57.94% for males.

Food Choice

According to the values of AICc, we found the best model of total food consumption to be the linear regression with interaction between weight of the individual and its sex (tod1; see Table 1). Total food consumption of the experimental individuals regardless of their sex increased linearly (*t* value = 3.597, *P* value 0.0007), with their weight (Fig. 1). The model did not confirm that sex by itself has a significant positive or negative effect on TFC, although the interaction between sex and weight was significantly different from zero (*t* value = -2.203, *P* = 0.032). As shown in Fig. 1, below average weight males tend to eat more than below average weight females. In contrast, females of above average weight consumed more food than above average males.

To predict the amount of chicken meat and larvae consumed by adults of *N. brunnicollis*, we used mixed effect linear regression with sex and weight of an individual as fixed explanatory variable and

the identity of the experimental individual as random effect. This model was proposed based on its value of AICc and its parsimony (see Table 2). Males and females did not differ significantly in their response to offered food choices (t value = -0.183 , $P = 0.855$), and they both consumed significantly more of chicken meat than fly larvae (t value = -9.629 , $P < 0.001$). Also, body weight was positively correlated with increased amount of consumed food of both types (t value = 2.829 , $P < 0.001$; see Fig. 2).

Discussion

Food Consumption

Despite our limited experimental sample, we observed a significant difference in diet composition between males and females (see Fig. 3). Although maggots accounted for 25.4% ($\pm 18.9\%$) of total consumed food mass in females, males consumed about 5% less 20.4% ($\pm 18.6\%$). This could be caused by a number of reasons including the sexual size dimorphism that this species is known for (Růžička et al. 2015). However, in our samples, we did not observe any significant sexual size dimorphism (SSD) to support the hypothesis that the difference in diet could be explained only by SSD. But we need to take into account that specimens were raised under laboratory conditions as a second generation and due to suboptimal conditions the SSD could have been suppressed (as females are more sensitive to the environmental stress and they respond to it by smaller growth; Teder and Tammaru 2005). Another possible explanation for the sexually biased diet composition could be the different requirements of the

females and males due to their different reproductive roles. Although such a bias is common in many mammals and birds (Zwolak 2018), in insects it is rarely encountered, known for several blood-feeding Diptera and some Hymenoptera (Shine 1989, Roswell et al. 2019).

Food Choice

In the case of *N. brunnicollis*, we were able to confirm that the species is a carrion feeder by preference, as chicken flesh represented approximately 70–75% of the total food intake. However, the remaining—considerable—part of its diet in our experiments were fly maggots. There was a high individual variability among the 50 experimental beetles in the proportion of maggots consumed: from 13 who fed exclusively on chicken to some individuals (of both sexes) in which maggots made up to 58% of their food intake.

The high individual variability in the amount of consumed maggots may indicate that at least some adults of *N. brunnicollis* are quite opportunistic in their foraging ecology. This could be explained by adaptation of the foraging strategy based on the reproductive stage, actual ecological conditions, or nutritional values of the food and could be very beneficial because the adults and larvae share the same niche. Adults could apply the top-down regulation on competitors to give advantage to their progeny. Top-down regulation is known to have strong effects on heterotrophic food webs, and it can result in lower rates of decomposition; therefore, the species responsible for regulation gets a bigger share of the resources (Srivastava et al. 2009). Carrion is a very competitive environment as it represents a very scarce, but

Table 1. Model comparison describing relationship between total amount of consumed food (regardless of food type) and the weight and sex of the studied beetle

Model	Variables	df	R^2	P value	df residuals	Delta AICc
tot1	Weight×sex	5	0.232	0.007	52.36	0.0
tot3	Weight	3	0.150	0.005	53.92	0.2
tot2	Weight+sex	4	0.151	0.022	54.47	0.5
tot4	Sex	3	0.001	0.863	58.46	8.3

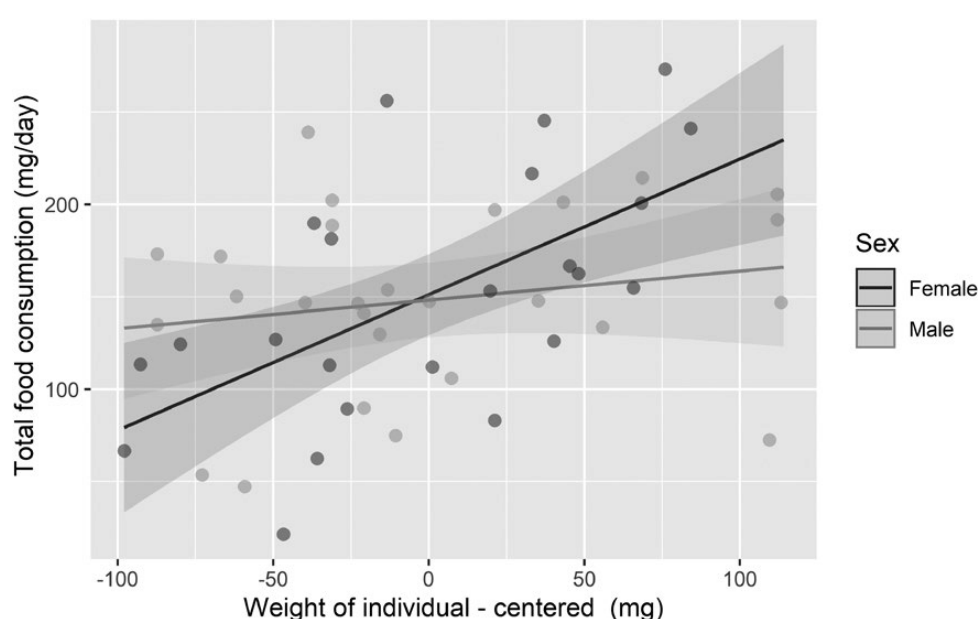


Fig. 1. Regression models of changes in total food consumption based on weight and sex of *C. brunnicollis*. Dots represent consumption of individual animals. The lines show median, and shaded area shows SE of the model for each sex (dashed line for males, solid line for females). Weight values were centered, so that zero represents individuals of average weight.

nutritionally rich niche, which is attractive for a large spectrum of competitors such as the larvae of Diptera (Schoenly 1991). Among necrobiont species, a strong top-down regulation effect was observed in *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1842) (Diptera: Calliphoridae) (VanLaerhoven 2010). Therefore, despite limited evidence for parental care in Silphinae, this would be good evolutionary strategy allowing the coexistence of several competing life stages of holometabolous insects in one niche.

Sexton beetles use a similar strategy by preferring small carcasses that they are able to hide and protect by active removal of eggs and larvae of Diptera and extensive parental care (Eggert et al. 1998, Sikes 2005). In Silphinae, this topic is not as well studied as in Nicrophorinae, but records of adults of *Necrodes littoralis* (Linnaeus, 1758) and *Necrodes surinamensis* (Fabricius, 1775) (Silphinae) preying on Diptera are available (Ratcliffe 1972, King et al. 2015). Moreover, Matuszewski and Mądra-Bielewicz (2019, preprint) observed that *Nec. littoralis* is capable of creating a heat-producing biofilm from their oral and anal secretion on the surface of the flesh, which probably accounts for a faster development and lower mortality of their larvae. Therefore, although indirect, there are signs of cooperation and care about the progeny in Silphinae, and coupled with our in vitro observation, they may call for attention when classifying the foraging habits of carrion beetles.

Table 2. Model comparison describing relationship between amount of consumed food and beetles' weight, sex, and consumed food type

Model	Variables	df	R ² C	Delta AICc
cod2	Weight+sex+food type+ID	6	0.524	0
cod1	Weight×sex+food type+ID	7	0.504	0
cod4	Sex+food type+ID	5	0.507	1.9
cod3	Weight+type+ID	5	0.485	3.7

Identity (ID) of beetle was used as random effect. R²C was calculated as suggested by Nakagawa and Schielzeth (2013).

Furthermore, our results represent the first quantification of the feeding behavior of *N. brunnicollis*. Unsurprisingly, they contrast somewhat with those published by Ikeda et al. (2007, 2008), as our approaches differ in their goals. We tried to place our focal species on a continuous scale between necrophagy and predatory behavior, whereas their goal was to place the studied species into discrete categories. Clearly, we cannot agree that the species is purely necrophagous as an adult; however, we do confirm that necrophagy is the main foraging mode for nutrient intake in *N. brunnicollis*.

Another reason why our results differ from those of Ikeda et al. (2007, 2008) could be due to methodology. They classified *N. brunnicollis* as a necrophagous species based on the ratios of stable carbon and nitrogen isotopes. The authors compared $\delta^{15}\text{N}$ content of *N. brunnicollis* with the values obtained from wild-caught representatives of 4 sexton beetle species (*Nicrophorus tenuipes* Lewis, 1887, *Nic. maculifrons* Kraatz, 1877, *Nic. quadripunctatus* Kraatz, 1877, and *Nic. investigator* Zetterstedt, 1824), which they used as 'necrophagous standards' and values obtained from ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as 'predatory beetle standards'. The authors homogenized the entire body of the beetles and avoided the use of teneral adults, as those 'reflect only the larval feeding' strategy. Although they identified *N. brunnicollis* as a purely necrophagous species, they were not able to confirm the predaceous habits of *Dendroxena sexcarinata* (Motschulsky, 1861) (Silphidae) (a species which, along with its congeners, is known to be an arboreal predator of caterpillars) or the well-known (more or less opportunistic) predation of fly maggots in *Necrodes* (Heymons et al. 1928, Ratcliffe 1972, Šustek 1981, Fratzak and Matuszewski 2014, Charabidze et al. 2016). In fact, Ikeda et al. were not able to identify any silphids to have their $\delta^{15}\text{N}$ significantly higher than sexton beetles, suggesting that no species examined in that study mainly feeds on fly maggots on vertebrate carcasses. The reason for the ambiguous results of the analysis may lie in the selection of the necrophagous standard reference group. Although immature sexton beetles are indeed obligatorily necrophagous, the adults are well

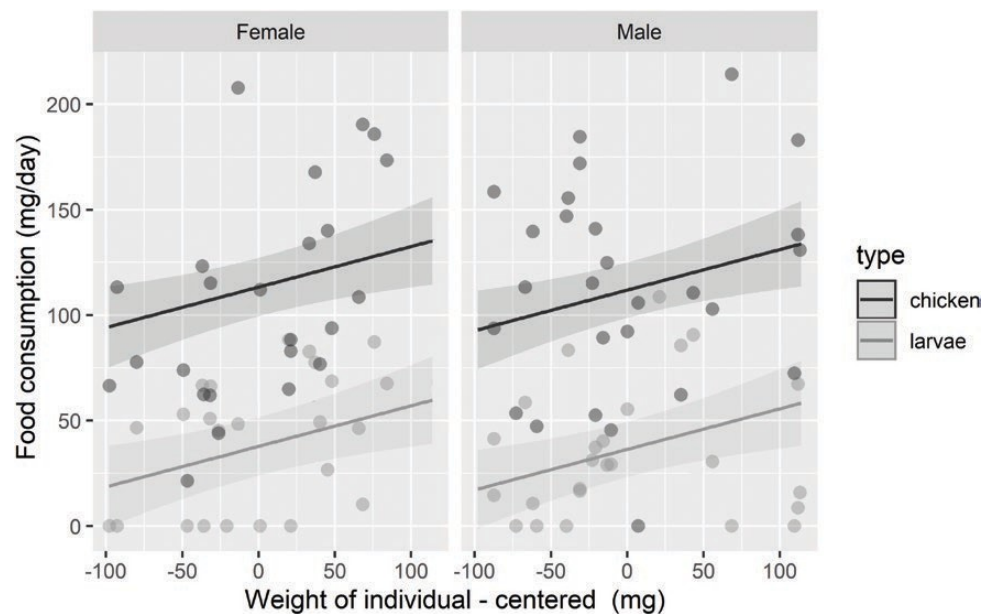


Fig. 2. Regression models of changes in weight of consumed chicken meat and fly larvae on weight and sex of *C. brunnicollis*. The lines show median, and shaded area shows SE of the model for each food type (solid line for chicken meat, dashed line for fly larvae). Weight values of experimental individuals were centered, so that zero represents individuals of average weight.

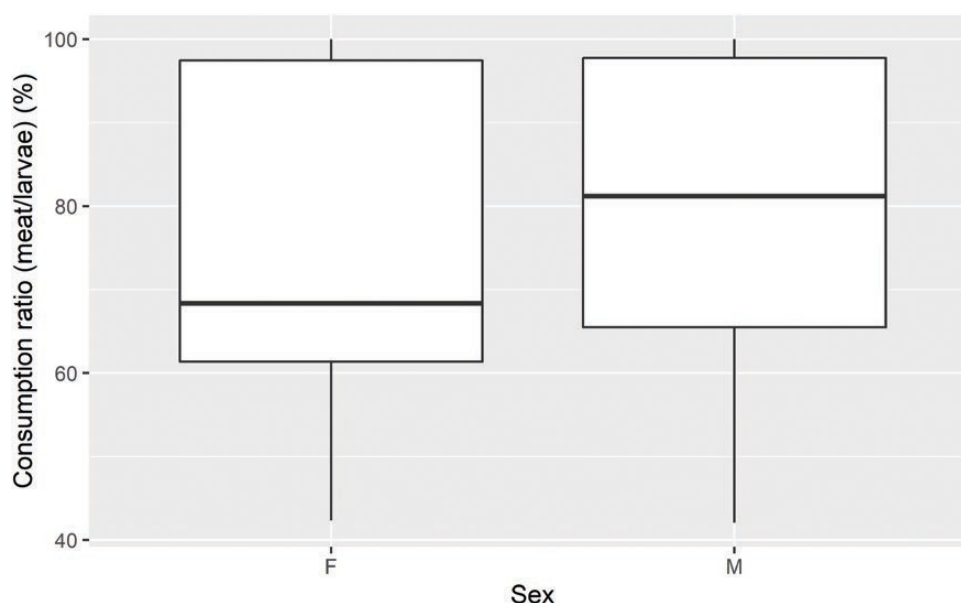


Fig. 3. Boxplot graph of consumption ration between poultry meat and larvae for females (F) and males (M). Horizontal lines within the boxes indicate median values; upper and lower boxes indicate the 75th and 25th percentiles, respectively; whiskers indicate the values with the 1.5 interquartile ranges.

known to be occasional predators of fly maggots, and even cannibalistic under some circumstances (Sikes 2005, Dekeirsschieter et al. 2011). Therefore, more accurate reference values for necrophagous species could be obtained by using immature stages or only the cuticle of adult beetles instead of their entire body.

Forensic Entomology

The understanding of foraging ecology is one of the key stones in unveiling a species' ecological role. Although carrion beetles are being increasingly considered as valuable markers in forensic entomology, their foraging ecology remains understudied and to some extent controversial, as the majority of the relevant data come from anecdotal field observations. The knowledge of feeding strategy can be used by forensic entomologist to place the species into the right guild as well as to assess and evaluate the succession patterns observed on bodies. The results of our experiment support the view of adult specimens of *N. brunnicollis* as necrophagous individuals that are able to opportunistically hunt other invertebrates. From this, we can assume that its arrival is not dependent on the presence of fly larvae during the process of succession unlike predatory or parasitic species (Lin and Shiao 2013, Zhang et al. 2019). Therefore, its PAI should be correlated only with the time of death thus giving independent PMI estimation.

Only few species have been investigated extensively using comprehensive approaches, as was discussed earlier. Here, we provide to our knowledge the first standardized laboratory food choice test targeting the foraging ecology of carrion beetles. This test allows the quantification of predatory-necrophagous behavior on a scale, avoiding misleading dichotomies. This methodology can be applied to other species, and it could provide evidence for more accurate decision making in forensic research.

Acknowledgments

We are obliged to Li-Zhen Li, Liang Tang, and Zi-Wei Yin (all Shanghai Normal University, Shanghai, China) and the Administration of the West Tianmushan Nature Reserve for allowing the fieldwork in Zhejiang. The project was supported by the Ministry of the Interior of the Czech Republic (grant

no. VI20192022130). J.K. was supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (SVV 260 571/2020), and P.S. was supported by the institutional funds of the Faculty of Science, Charles University. Marek Romášek kindly revised the English manuscript.

References Cited

- Amendt, J., R. Krettek, and R. Zehner. 2004. Forensic entomology. *Naturwissenschaften* 91: 51–65.
- Champion de Crespigny, F. E., and N. Wedell. 2008. The impact of anaesthetic technique on survival and fertility in *Drosophila*. *Physiol. Entomol.* 33: 310–315.
- Charabidze, D., B. Vincent, T. Pasquerault, and V. Hedouin. 2016. The biology and ecology of *Necrodes littoralis*, a species of forensic interest in Europe. *Int. J. Legal Med.* 130: 273–280.
- Dekeirsschieter, J., F. Verheggen, G. Lognay, and E. Haubruge. 2011. Large carrion beetles (Coleoptera, Silphidae) in Western Europe: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15: 435–447.
- Eggert, A.-K., M. Reinking, and J. K. Müller. 1998. Parental care improves offspring survival and growth in burying beetles. *Anim. Behav.* 55: 97–107.
- Farrar, R. R., J. D. Barbour, and G. G. Kennedy. 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 593–598.
- Fratczak, K., and S. Matuszewski. 2014. Instar determination in forensically useful beetles *Necrodes littoralis* (Silphidae) and *Creophilus maxillosus* (Staphylinidae). *Forensic Sci. Int.* 241: 20–26.
- Heymons, R., H. v. Lengerken, and B. Marg. 1928. Studien über die Lebenserscheinungen der Silphini (Coleopt.). III. *Xylodrepa quadripunctata* L. *Z. Morphol. Oekol. Tiere* 10: 336–352.
- Hurvich, C. M., and C. L. Tsai. 1989. Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika* 76: 297–307.
- Ikeda, H., K. Kubota, T. Kagaya, and T. Abe. 2007. Flight capabilities and feeding habits of silphine beetles: are flightless species really "carrion beetles"? *Ecol. Res.* 22: 237–241.
- Ikeda, H., T. Kagaya, K. Kubota, and T. Abe. 2008. Evolutionary relationships among food habit, loss of flight, and reproductive traits: life-history evolution in the Silphinae (Coleoptera: Silphidae). *Evolution* 62: 2065–2079.
- Jakubec, P., M. Novák, J. Qubaiová, H. Šuláková, and J. Růžička. 2019. Description of immature stages of *Thanatophilus sinuatus* (Coleoptera: Silphidae). *Int. J. Legal Med.* 133: 1549–1565.
- Kamimura, K., T. Nekane, and N. Koyama. 1964. Seasonal and altitudinal distribution of beetles in Mt. Jōnen, the Japan Alps, with descriptions of new

- species, I (Studies on the insects of high mountains, III). Sci. Rep. Kyoto Prefect. Univ. 15: 17–38.
- King, J. E., M. Riegler, R. G. Thomas, and R. N. Spooner-Hart. 2015. Phylogenetic placement of Australian carrion beetles (Coleoptera: Silphidae). *Austral Entomol.* 54: 366–375.
- Lin, S. W., and S. F. Shiao. 2013. Life history data on the fly parasitoids *Aleochara nigra* Kraatz and *A. asiatica* Kraatz (Coleoptera: Staphylinidae), and their potential application in forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 232: 46–55.
- Lüdecke, D. 2018. sjPlot: data visualization for statistics in social science. <https://strengexjacke.github.io/sjPlot/>.
- Matuszewski, S. 2011. Estimating the pre-appearance interval from temperature in *Necrodes littoralis* L. (Coleoptera: Silphidae). *Forensic Sci. Int.* 212: 180–188.
- Matuszewski, S., and A. Mądra-Bielewicz. 2019. Heat production in carrion biofilm formed by communally breeding carrion beetles. *bioRxiv*, doi:10.1101/854349, 1 December 2019, preprint: not peer reviewed.
- Merritt, R. W., and G. D. De Jong. 2016. Arthropod communities in terrestrial environments, pp. 65–92. In M. E. Benbow, J. K. Tomberlin, and A. M. Tarone (eds.), *Carrion ecology, evolution, and their applications*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Midgley, J. M., and M. H. Villet. 2009a. Effect of the killing method on post-mortem change in length of larvae of *Thanatophilus micans* (Fabricius 1794) (Coleoptera: Silphidae) stored in 70% ethanol. *Int. J. Legal Med.* 123: 103–108.
- Midgley, J. M., and M. H. Villet. 2009b. Development of *Thanatophilus micans* (Fabricius 1794) (Coleoptera: Silphidae) at constant temperatures. *Int. J. Legal Med.* 123: 285–292.
- Midgley, J. M., C. S. Richards, and M. H. Villet. 2010. The utility of Coleoptera in forensic investigations, pp. 57–68. In J. Amendt, M. L. Goff, C. P. Campobasso, and M. Grassberger (eds.), *Current concepts in forensic entomology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Nagano, M., and S. Suzuki. 2003. Spatio-temporal distribution and food searching strategy differentiations between two silphid beetles, *Eusilpha japonica* and *E. brunnicollis* (Coleoptera, Silphidae). *Elytra* 31: 199–208.
- Nakagawa, S., and H. Schielzeth. 2013. A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol. Evol.* 4: 133–142.
- Novák, M., P. Jakubec, J. Qubaiová, H. Šuláková, and J. Růžička. 2018. Revisited larval morphology of *Thanatophilus rugosus* (Coleoptera: Silphidae). *Int. J. Legal Med.* 132: 939–954.
- R Core Team. 2020. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ratcliffe, B. C. 1972. The natural history of *Necrodes surinamensis* (Fabr.) (Coleoptera: Silphidae). *Trans. Am. Entomol. Soc.* 98: 359–410.
- Ratcliffe, B. C. 1996. The carrion beetles (Coleoptera: Silphidae) of Nebraska. *Bull. Univ. Nebraska State Mus.* 13: 1–100.
- Ridgeway, J. A., J. M. Midgley, I. J. Collett, and M. H. Villet. 2014. Advantages of using development models of the carrion beetles *Thanatophilus micans* (Fabricius) and *T. mutilatus* (Castelneau) (Coleoptera: Silphidae) for estimating minimum post mortem intervals, verified with case data. *Int. J. Legal Med.* 128: 207–220.
- Roswell, M., J. Dushoff, and R. Winfree. 2019. Male and female bees show large differences in floral preference. *PLoS One* 14: e0214909.
- Růžička, J., J. Qubaiová, M. Nishikawa, and J. Schneider. 2015. Revision of Palearctic and Oriental *Necrophila* Kirby et Spence, part 3: subgenus *Calosilpha* Portevin (Coleoptera: Silphidae: Silphinae). *Zootaxa* 4013: 451–502.
- Schoenly, K. G. 1991. Food web structure in dung and carrion arthropod assemblages, null models and Monte Carlo simulation: applications to medical/veterinary entomology. *J. Agric. Entomol.* 8: 227–250.
- Shine, R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *Q. Rev. Biol.* 64: 419–461.
- Sikes, D. S. 2005. Silphidae, pp. 749–757. In R. G. Beutel and R. A. B. Leschen (eds.), *Handbook of zoology, volume IV (Arthropoda: Insecta), Part 38 Coleoptera, beetles. Volume 1: Morphology and systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga Partim)*. Walter De Gruyter, London, United Kingdom.
- Sikes, D. S. 2008. Carrion beetles (Coleoptera: Silphidae), pp. 749–758. In J. L. Capinera (ed.), *Encyclopedia of entomology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Soo Hoo, C. F., and G. Fraenkel. 1966. The selection of food plants in a polyphagous insect, *Prodenia eridania* (Cramer). *J. Insect Physiol.* 12: 693–709.
- Srivastava, D. S., B. J. Cardinale, A. L. Downing, J. E. Duffy, C. Jouseau, M. Sankaran, and J. P. Wright. 2009. Diversity has stronger top-down than bottom-up effects on decomposition. *Ecology* 90: 1073–1083.
- Šustek, Z. 1981. Keys to identification of insects 2: carrion beetles of Czechoslovakia (Coleoptera: Silphidae). *Zprávy Čs. Spol. Entomol. pfi ČSAV* 2: 1–47.
- Teder, T., and T. Tammaru. 2005. Sexual size dimorphism within species increases with body size in insects. *Oikos* 108: 321–334.
- Ueda, A. 2015. Tools for evaluating forest habitat using carrion silphid (Silphidae) and scarabaeoid dung beetles (coprophagous group of Scarabaeoidea) as indicators: effects of bait type, trap type, and trap number on beetle captures. *Bull. For. Prod. Res. Inst.* 14: 1–14.
- VanLaerhoven, S. L. 2010. Ecological theory and its application in forensic entomology, pp. 493–517. In J. H. Byrd and J. L. Castner (eds.), *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Velásquez, Y., and A. L. Viloria. 2009. Effects of temperature on the development of the Neotropical carrion beetle *Oxelytrum discicollis* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae). *Forensic Sci. Int.* 185: 107–109.
- Velásquez, Y., and A. L. Viloria. 2010. Instar determination of the neotropical beetle *Oxelytrum discicollis* (Coleoptera: Silphidae). *J. Med. Entomol.* 47: 723–726.
- Villet, M. H. M. 2011. African carrion ecosystems and their insect communities in relation to forensic entomology. *Pest Technol.* 5: 1–15.
- Waldbauer, G. P. 1964. The consumption, digestion and utilization of solanaceous and non-solanaceous plants by larvae of the tobacco hornworm, *Protoparce sexta* (Johan.) (Lepidoptera: Sphingidae). *Entomol. Exp. Appl.* 7: 253–269.
- Wang, M., J. Chu, Y. Wang, F. Li, M. Liao, H. Shi, Y. Zhang, G. Hu, and J. Wang. 2019. Forensic entomology application in China: four case reports. *J. Forensic Leg. Med.* 63: 40–47.
- Wickham, H. 2009. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag, New York, NY.
- Zhang, Y., Y. Wang, C. Liu, J. Wang, G. Hu, M. Wang, L. Yang, and J. Chu. 2019. Development of *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) at constant temperatures in China. *J. Med. Entomol.* 56: 368–377.
- Zwolak, R. 2018. How intraspecific variation in seed-dispersing animals matters for plants. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 93: 897–913.

Článek III.

Kadlec, J., Jakubec, P., & Šípek, P. (2024). In vitro comparison of two food choice methodologies for necrophagous species of the genus *Thanatophilus* (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae). *Journal of Medical Entomology*, 61(3), 603–610.

Behavior, Chemical Ecology

In vitro comparison of two food choice methodologies for necrophagous species of the genus *Thanatophilus* (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae)

Jakub Kadlec¹, Pavel Jakubec^{2,*}, Petr Šípek¹

¹Faculty of Science, Charles University, Viničná 1594/7, Prague 128 43, Czech Republic, ²Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, CZ-165 00 Praha-Suchbát, Czech Republic

*Corresponding author, mail: jakubecp@fzp.czu.cz

Subject Editor: Jason Byrd

Received on 5 September 2023; revised on 11 January 2024; accepted on 29 January 2024

To accurately model the food webs, we need to acquire precise data on food ecology of the interacting species. This allows better understanding of the trophic interactions and for the necrophagous species this information could be used in medico-legal investigations. For this reason, we recently proposed standardized laboratory methodology to assess the foraging strategies based on parallel testing of 2 food items (meat, dead larvae) (Jakubec et al. 2021). The original methodology had 2 shortcomings. It was not suited for testing living larvae, which could prove predatory behavior of the species. The methodology was also based on parallel experimental design, where the food items are tested together, which could underestimate the maximum consumption of the tested subject for some items. To test if these concerns are valid, we improved original methodology allowing testing living larvae as well as a new sequential experimental setup, where consumption of each item is tested individually in a random order, thus theoretically giving an unbiased maximum consumption estimate. These methodologies were tested head-to-head on 3 forensically relevant species from the genus *Thanatophilus* (*Thanatophilus micans* (Fabricius 1794)(Fabricius 1794), *Thanatophilus rugosus* (Linnaeus, 1758), and *Thanatophilus sinuatus*(Fabricius, 1775)). The experiments have confirmed that all 3 species are almost strictly necrophagous, although they were capable of predation, despite the presence of preferred food (meat). The comparison also showed that the sequential design has indeed improved capability to quantify the maximal consumption of the given food item. Thus, we suggest following this methodology in future studies.

Key words: necrophagy, behavior, Silphinae, forensic entomology, food choice

Introduction

Various necrobiont insects play an essential role in the field of forensic entomology, e.g., in the estimation of postmortem interval and other crime-related circumstances (Amendt et al. 2004, Lutz et al. 2018). According to their dominant foraging strategy, necrobiont insects are commonly divided into 4 ecological guilds: predators, necrophages, omnivores, and parasites/parasitoids (VanLaerhoven 2010, Villet 2011). However, the feeding strategies of individual necrobiont species tend to be more complex and may vary according to the developmental stage, sex, reproductive cycle, food availability, or other ecological conditions (Merritt and De Jong 2016, Jakubec et al. 2021, Qubaiová et al. 2022). For example, red-breasted carrion beetle *Oiceoptoma thoracicum* (Linnaeus, 1758) shows significant

food plasticity, but probably only in the adult stage (Heymons and von Lengerken 1931, Qubaiová et al. 2022). Therefore, complete understanding of the foraging ecology of each necrobiont species is a necessary condition for their use in forensic entomology.

The carrion beetles (Silphinae) are a rather small subfamily of rove beetles (Staphylinidae) that are distributed worldwide and currently contains 206 valid species (including 17 extinct) (Cai et al. 2022, Newton 2023). According to the English name we could assume that all beetles of this family feed on dead animal tissue (necrophagy), however they exhibit wide range of feeding strategies such as omnivory, herbivory, or predation (Ratcliffe 1996, Sikes 2008). As already stated, our knowledge of feeding strategies of this family is mostly based on direct observation of random individuals,

and quantitative food preferences studies are scarce [see Jakubec et al. (2021)].

Here, we investigate the foraging ecology of 3 species from the genus *Thanatophilus* Leach, 1815, a Holarctic and Afrotropical genus, which contains 24 described valid species (Newton 2023). Members of this genus share not only a general appearance but also, they have a very similar ecology. All known species are supposed to be generalists, e.g., feeding both on carrion as well as on larvae in all active stages of development (Mroczkowski 1955, Šustek 1981, Ratcliffe 1996). Adults are usually attracted to carrions of larger vertebrates, including humans (Kočárek 2003, Dekeirsschietter et al. 2011). They mostly prefer earlier stages of decomposition, and first larvae occur in a few days after death (Midgley and Villet 2009a, Matuszewski and Szałałowicz 2013, Ridgeway et al. 2014). *Thanatophilus sinuatus* (Fabricius, 1775) has a very wide trans-Palearctic distribution (e.g., Europe, Asia, and North Africa) and is very common especially on the European continent (Dekeirsschietter et al. 2011, Jakubec and Růžicka 2015, Růžicka 2015). This species co-occurs often with the second very common European species *Thanatophilus rugosus* (Linnaeus, 1758) (Jakubec et al. 2019). The last species, *Thanatophilus micans* (Fabricius, 1794) is the most common and widespread carrion beetle (Silphinae) in Africa (Midgley and Villet 2009a, Villet 2011).

All 3 species were already investigated from a forensic context and their developmental biology and morphology is known (Midgley and Villet 2009a, 2009b, Ridgeway et al. 2014, Novák et al. 2018, Jakubec et al. 2019, Montoya-Molina et al. 2021a, 2021b, Qubaiová et al. 2021, 2023). We suppose that according to their phylogenetic placement (they form a branch at the base of Silphini tribe), their primary feeding preferences will be closer to that of the ancestral stage for the whole tribe (King et al. 2015, Růžicka et al. 2023). However, there is no literature that would give us any clues on how these species will differ from each other in terms of feeding ecology and preferences.

Traditional assessments of necrobiont insects foraging ecology are frequently based on anecdotal observation without proper experimental tests and species are placed into arbitrary simplified categories (see Jakubec et al. 2021). In the case of carrion beetles, one of the major forensically important groups (Midgley et al. 2010), complex feeding strategies have been observed (Sikes 2008). Adults of many carrion beetle genera feed both on the dead animal tissue and the fly larvae, and the proportion of both may vary significantly according to the species or sex (Fuller 1934, Jakubec et al. 2021). Surprisingly, species of the genera *Necrodes* Leach, 1815, *Necrophila* Kirby & Spence, 1828, *Thanatophilus* and *Oiceoptoma* Leach, 1815, which are traditionally considered necrophagous, have been reported to prefer larvae over carrion as adults (King et al. 2015), while their larvae prefer to feed on the carrion itself and only occasionally prey on dipteran larvae (Hatch 1927, Heymons and von Lengerken 1931, Dorsey 1940, Ratcliffe 1972). While the phylogenetic hypothesis indicates the evolutionary transition from necrophagy to predatory habits of the adult Silphinae (King et al. 2015), we know little about the differences in feeding strategies between species or developmental stages and their subsequent suitability for forensic investigations.

Apart from direct field observations, which may, or may not, be indicative of the actual feeding strategy, there are basically 3 systematic approaches on how to investigate the diet composition of an invertebrate: (i) analysis of gut content, either analyze the undigested food residue or via metabarcoding of gut content; (ii) via analysis of stable isotopes, and (iii) by direct laboratory assessment of consumed food in combination with food choice experiments.

The first approach may be demanding for financial funds and laboratory skills and has not yet been applied in Silphinae. Although it may bring accurate information on the actual composition of a diet of an individual, it cannot tell anything about the ratios of different prey items or quantity of each food item required for growth and development.

The second approach, the analysis of stable isotopes, was performed in a series of studies by Ikeda et al. (2006, 2007, 2008). The authors tested niche separation (Ikeda et al. 2006) and foraging strategies of Japanese carrion beetles related to their dispersal ecology. The results show isotopic differences (e.g., differences in the ratio of ^{13}C and ^{15}N) among carrion beetles with and without wings. The disadvantage of stable isotope analysis is that it is strongly dependent on locality as well as establishing an appropriate benchmark species for each strategy. This may lead to circular reasoning, given the benchmarks are not reared under controlled laboratory conditions [see discussion in Jakubec et al. (2021)].

The third approach, is based on performing experimental laboratory food choice studies. These experiments are the standard for investigations of the feeding habits of many taxa including ground beetles, or caterpillars (Singer 2001, Honek et al. 2011, Kulkarni et al. 2016). They rely on standardized laboratory rearing of larval and adult insects combined with food choice experiments, to assess quantity and food composition of individual species. One of the first behavioral studies investigating foraging ecology of silphids was performed by (Steele 1927) who demonstrated that adults of 4 burying beetles (Silphinae: *Nicrophorus* Fabricius, 1775) were able to feed on larvae and preferred them over carrion. This was even pointed out as a possible strategy to minimize interspecific competition experienced by their developmental stages. However, this is not universal for all adult silphids as was shown by Jakubec et al. (2021). They found that the diet of *Necrophila* (*Calosilpha*) *brunnecollis* (Kraatz, 1877) is composed mostly of carrion and although fly larvae are consumed, they play a significantly smaller role in their diet.

While performing food choice tests, the different types of food can either be offered at one time (e.g., parallel food choice test) or it can be offered in sequence separated by a starvation period (sequential food choice test). Parallel approach is much closer to natural situations when a carrion beetle usually finds larvae and carrion at one place and time. The sequential model enables us to assess whether a given food item is exploited in suboptimal conditions. Both designs enable us to directly observe individual behavior and to measure the amount of food consumed or time spent on feeding in direct relation to the growth and development stage. Although these experiments are relatively time consuming, they offer a unique insight into species biology and ecology that is backed with robust data and can be done with a limited budget.

To assess the food preferences and to quantify the amount of food consumed by each species, we utilized the methodology of Jakubec et al. (2021), i.e., food choice testings together with measuring the amount of consumed food, and the evaluation of sequential versus parallel design. Our methodology enables us to test the in vitro food preferences of different carrion beetles and to quantify the relative contribution of all main dietary components (decayed meat, live or dead fly larvae) in the total food intake of the species.

Materials and Methods

Experimental Animals

The experiment was performed with mature beetles of 3 species *T. sinuatus*, *T. rugosus*, and *T. micans*. All beetles represent the second generation of adults bred in laboratory under standardized

climatic and light conditions and on the same food source which consisted of chicken liver. Parental generation of the first 2 species was collected from carrion placed on different habitats in the vicinity of Prague, Czech Republic. Adults of the first generation of *T. micans* were collected in eastern Africa (Kenya, Naivasha env. Crescent Island Game Sanctuary 10. 7. 2020). To control and minimize the effect of intrinsic factors on the food choice of our experimental animals, we used beetles that were of approximately the same age and were allowed to mate freely. To further equalize the starting physiological conditions of the animals, they were isolated and fed ad libitum with chicken breasts for 24 h and then starved for another 24 h.

Experimental Feeding

To test the food preferences of *Thanatophilus* species, we choose 3 potential foods: chicken breasts and live or dead blue blowfly larvae *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Calliphoridae). Living larvae were prevented from feeding by gluing their mouth parts with a small drop of superglue. Chicken breasts were selected because they best represent the muscle tissue that is consumed by necrophagous species. They are also highly uniform in structure and density, unlike chicken livers which were used during breeding. Therefore, allowing accurate calculation of food consumption over a period of time. The blue blowfly larvae were selected as the representatives of one of the most abundant necrophagous insects' families.

The behavioral experiments were conducted in glass Petri dishes (150 mm diameter, 30 mm height), each containing a sheet of moistened filter paper. For experiments 2 groups of 50 beetles from each species were prepared, only for *T. micans* we used 53 and 52 beetles for parallel and sequential experiment, respectively.

The first group was used for parallel food choice experiment where all 3 types of food were served in Petri dish at the same time. The food was arranged randomly in a circle at a distance of 2 cm from the edge of the Petri dish. This distance allowed beetle to run freely around the edge of the dish, so the choice of the food had to be deliberate.

The second group was used for sequential choice experiment. Each beetle was randomly assigned a starting food type and only that food type was offered at the time. The setup of the dish was the same as in the case of parallel experiment, only without 2 other choices that beetle could explore. The beetles were allowed to feed for 24-h period followed by 24-h period of starvation. In the second round they were provided with randomly selected food type other than the starting one and allowed to feed for another 24 h followed by 24-h starvation. The same procedure was applied with the last remaining food type. The random assignment of the food type was to eliminate the effect of food order on experimental results.

The experiment was conducted in a climatic chamber under standardized conditions (24 °C, 75% relative air humidity, and 12/12 photoperiod). At the end of both experiments, beetles and the remaining food were removed and put into freezer. Freezer-killed beetles and remaining food were dried in a cabinet dryer for 12 h at 50 °C to achieve a constant dry weight.

Food Consumption

To calculate the actual food consumption, the conversion factor was estimated from a random sample of 50 pieces of chicken meat (0.5 g each) and 2 × 50 fly larvae (half of the larvae were killed by freezing at the beginning of the experiment and used as the dead larvae food source and the other half of the larvae were used as

the live food source and killed at the end of the experiment). A wet mass and constant dry mass, obtained by the identical drying procedure as applied to the experimental adult beetle samples (50 °C until reaching constant weight) was recorded. We used a Mettler Toledo AE 240 analytical balance with a weighing accuracy of 0.01 mg. The net dry weight of consumed food was calculated as the difference between the dry weight of introduced food and the dry weight of its remaining food after the experiment (Waldbauer 1964, Soo Hoo and Fraenkel 1966). The relative consumption was calculated as the weight of the food consumed over the period of 24 h relative to the dry weight of the adult beetle (Farrar et al. 1989).

Data Analysis

The collected data were analyzed by single mixed-effect regression model (LMM) using function lmer from the Rpackage (lmerTest), which contained data from both experimental setups. The model residuals were analyzed using DHARMA package (Harting 2019) and we did not find any significant violation of normality. To limit the effect of the weight difference between the 3 species on the food preference, expressed as amount of consumed food as well as to allow comparison between the 2 experimental setups, we calculated consumption (C) for each individual species:

$$C = \frac{m_f}{m_i} \quad (1)$$

where m_f denotes dry weight of the food consumed by the individual, while m_i denotes the dry weight of that individual. The C represented our response variable. Explanatory fixed effect factors were food type, species, and experimental setup, these terms were allowed to vary independently in order to express their interactions. Explanatory random effect factor was specimen identity. Posthoc analysis using Tukey's contrast with adjusted P values by Bonferroni method was done to compare difference at the treatment levels (Rpackage multcomp). Model validation and deviations from its assumptions were done by a visualization of the corresponding residual plots. The significance level was set at 5%.

Further we calculated mean proportion of the consumed meat across parallel experiment for each species, so the values could be compared not only within our dataset, but also with other species. We used Kruskal-Wallis rank sum test to find if the proportions differ between the species and follow-up pairwise Wilcoxon rank sum test with Bonferroni correction to reveal relationships between the species. Data management and all analyses were carried out using the R statistical program (R Core Team 2020). Graphical outputs were created using ggplot2 and sjPlot packages (Wickham 2009, Lüdtke 2020).

Results

In total we tested 52, 50, and 50 individuals of *T. micans*, *T. sinuatus*, and *T. rugosus*, respectively, in the sequential experiment and 53, 50, and 50 individuals in the parallel experiment. In the sequential experiment the species differed in their dry body weight (DBW), the dry weight of biggest species *T. micans* averaged around 59.63 mg (SD = 16.98 mg), followed by *T. sinuatus* (mean = 36.06 mg, SD = 10.00 mg) and *T. rugosus* (mean = 30.84 mg, SD = 6.719 mg) (Table 1). The size differences were not an issue for our analysis as we did not compare the net consumption, but calculated the consumption, which is independent to the weight of the individual.

Our results suggest that there was significant bias in consumption across all species towards the chicken meat, which was preferred over dead and/or living fly larvae (dead larvae: t value = -13.552,

P value < 0.001, living larvae: t value = -15.414, P value < 0.001) across both experiments (Table 2). The chicken meat was consumed at average exceeding 100% of the DBW per day. The consumption of smaller individuals of *T. rugosus* and *T. sinuatus* even exceeded 300% of DBW and 1 individual consumed 366% of its DBW. On the other end, the lowest consumption observed for all species were slightly below 60% of their DBW and consumption of any individual never reached lower than 56% of their DBW (Fig. 1).

We observed a difference in maximum and minimum consumption for meat between the experimental designs as well. While the higher values were observed exclusively in sequential design; low values were observed almost exclusively in parallel design. These differences were shown to be significant with parallel design recording on average lower consumption (t value = 3.843, P value < 0.001) (Table 2).

The LMM analysis of the consumption showed differences between the species in some treatments (see Table 2). The most notable was the difference in consumption of meat between *T. micans* and the rest of the species, which was significantly lower for the *T. micans* (*T. rugosus*: t value = 3.804, P value < 0.001, *T. sinuatus*: t value = 2.844, P value = 0.005). Subsequent post hoc analysis did not find significant difference between consumption of meat between *T. sinuatus* and *T. rugosus* (t ratio = 2.303, P value = 0.3411). We also observed significant differences in consumption of dead larvae

between *T. rugosus* and *T. micans* (t ratio = -3.65, P value = 0.03) as well as *T. rugosus* and *T. sinuatus* (t ratio = 4.486, P value = 0.01) in favor of the *T. rugosus* in both cases. These differences were observed only in sequential trial and were not confirmed in parallel setup (see Table 2, Fig. 2).

The mean proportion of consumed meat at the parallel experiment differed between the species (Kruskal-Wallis rank sum test: df = 2, χ^2 = 32.802, P value > 0.001). *T. rugosus* showed the highest affinity towards the meat as on average it consumed 94.3% (SD = 11.27, min = 60.68, max = 100%) of meat. *T. sinuatus* was the second with mean proportion of meat at the diet of 88.81% (SD = 14.32, min = 57.41, max = 100%) and the *T. micans* consumed the lowest amount of meat in proportion to other 2 food sources, namely, 82.54% (SD = 7.57, min = 63.57, max = 99.40%). Pairwise Wilcoxon rank sum test with Bonferroni correction revealed that *T. micans* differs from both *T. rugosus* (P value > 0.001) and *T. sinuatus* (P value = 0.005), although we did not find difference between last the 2 species (P value = 0.2322).

Discussion

According to our results we can conclude that the majority of the tested individuals of carrion beetles from genus *Thanatophilus* preferred chicken meat over fly larvae. Consumption of chicken meat

Table 1. Summary table for average values of the consumption and dry body weight of all 3 species. The numbers in brackets express standard deviation and number of measured individuals, shown only for the DBW as the value is constant across all other columns

Species	Exp. setup	Dry body weight (mg)	Consumption (mg)		
			Meat	Dead larvae	Alive larvae
<i>T. micans</i>	Parallel	63.85 (17.57, 53)	60.38 (11.08)	10.60 (5.21)	4.23 (5.72)
<i>T. micans</i>	Sequential	59.63 (16.98, 52)	71.74 (5.86)	9.37 (5.37)	6.81 (8.71)
<i>T. rugosus</i>	Parallel	32.84 (7.76, 50)	41.06 (12.26)	2.70 (5.8)	2.11 (4.62)
<i>T. rugosus</i>	Sequential	30.84 (6.71, 50)	56.61 (18.17)	12.63 (10.51)	6.42 (7.33)
<i>T. sinuatus</i>	Parallel	34.34 (9.76, 50)	40.05 (10.93)	4.39 (7.95)	4.16 (5.18)
<i>T. sinuatus</i>	Sequential	36.06 (10.00, 50)	57.45 (15.93)	4.11 (5.09)	8.18 (10.92)

Table 2. Estimated parameters of LMM, their standard errors, degrees of freedom, and test statics for the consumption. Intercept of the model is set to represent the consumption of chicken meat by *T. micans* as measured with parallel experimental design. Parameters that seemed to have significant effect on the consumption are highlighted in bold

Parameter	Estimate	Std. error	df	t value	P value
Intercept	1.04740	0.04582	895.873	22.857	<0.001
Living larvae	-0.98628	0.06399	598.000	-15.414	<0.001
Dead larvae	-0.86717	0.06399	598.000	-13.552	<0.001
<i>T. rugosus</i>	0.25017	0.06577	895.873	3.804	<0.001
<i>T. sinuatus</i>	0.18707	0.06577	895.873	2.844	0.005
Experiment	0.25024	0.06511	895.873	3.843	<0.001
Living larvae: <i>T. rugosus</i>	-0.23774	0.09184	598.000	-2.589	0.010
Dead larvae: <i>T. rugosus</i>	-0.35839	0.09184	598.000	-3.902	<0.001
Living larvae: <i>T. sinuatus</i>	-0.12798	0.09184	598.000	-1.394	0.164
Dead larvae: <i>T. sinuatus</i>	-0.25521	0.09184	598.000	-2.779	0.005
Living larvae: Sequential exp.	-0.18924	0.09092	598.000	-2.081	0.038
Dead larvae: Sequential exp.	-0.26202	0.09092	598.000	-2.882	0.004
<i>T. rugosus</i> : Sequential exp.	0.33112	0.09323	895.873	3.552	<0.001
<i>T. sinuatus</i> : Sequential exp.	0.23998	0.09323	895.873	2.574	0.01
Living larvae: <i>T. rugosus</i> : Sequential exp.	-0.26222	0.13018	598.000	-2.014	0.04
Dead larvae: <i>T. rugosus</i> : Sequential exp.	0.01825	0.13018	598.000	0.140	0.889
Living larvae: <i>T. sinuatus</i> : Sequential exp.	-0.19790	0.13018	598.000	-1.520	0.129
Dead larvae: <i>T. sinuatus</i> : Sequential exp.	-0.23000	0.13018	598.000	-1.767	0.07

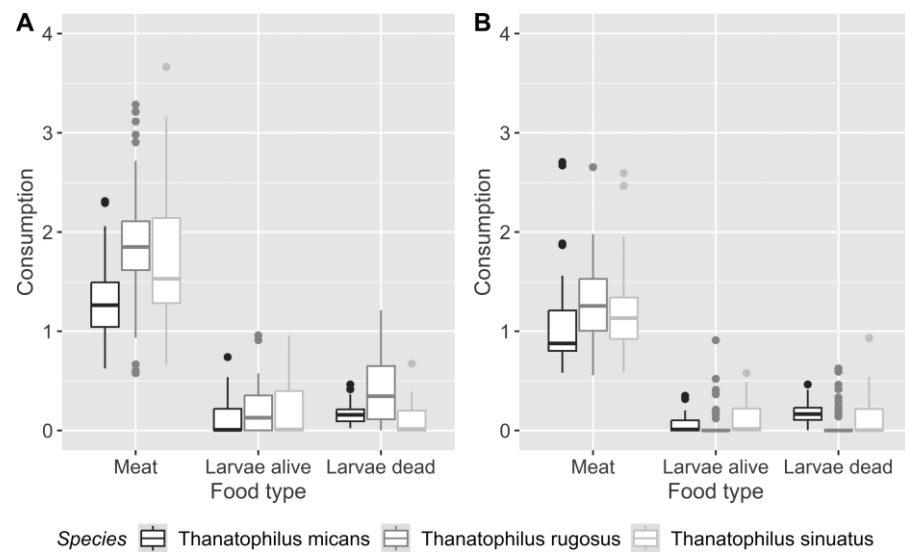


Fig. 1. Boxplots of daily consumption of 3 experimental species expressed as ratios of their dry body mass across 3 food types at 2 different experimental setups A) sequential B) parallel. Horizontal lines within the boxes indicate median values; upper and lower boxes indicate the 75th and 25th percentiles, respectively. Whiskers indicate the values within the 1.5 interquartile ranges. Small dots are outliers.

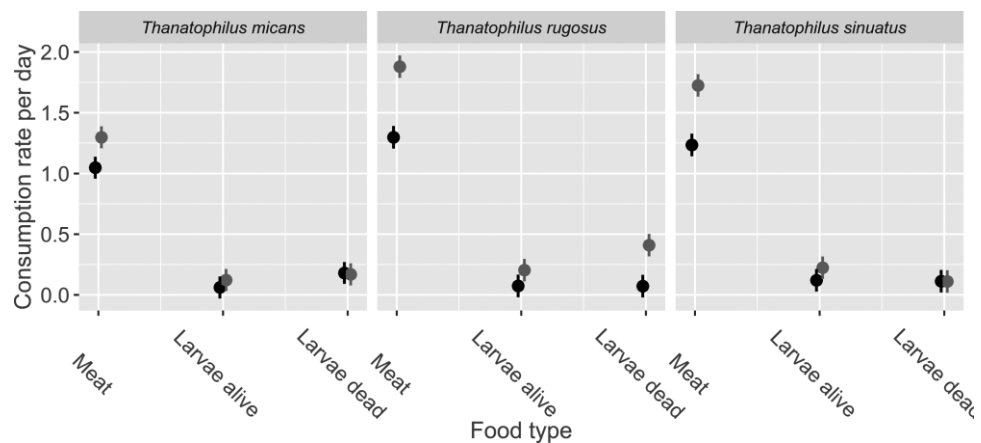


Fig. 2. Predicted values of the parameters from the LMM model across different species. Black and grey dots and whiskers represent parallel and sequential experiments, respectively.

ranged from 94.3% in *T. rugosus* to 82.54% in *T. micans*; while *T. sinuatus* consumed 88.81% of meat. However at least some beetles in each species were able to kill or consume blowfly larvae. If we compare these results with our previous study on *Necrophila (Calosilpha) brunnicollis* (Jakubec et al. 2021) under similar conditions, *N. brunnicollis* was shown to be more predaceous and consumed larger amounts of dead or alive larvae. Almost every beetle consumed some blowfly larvae in the experiment. In the current study we observed a higher proportion of beetles, which did not consume any larvae (dead or alive) at all (Fig. 1), which could indicate high specialization of the adults to feed on carrion meat especially if it is devoid of skin, fur or feathers. Alternatively, the beetles might be limited by their smaller size compared to the offered prey subjects (third larval instar of *C. vomitoria*). However, given the beetles are active on cadavers during early and advanced stages of decomposition, the third stage larvae of blowflies are the most likely prey they encounter during that period (Matuszewski et al. 2008), at least the European species. The prey-predator size ratio may play a role, as fly larvae predation was more frequent in the largest species

(*T. micans*), especially in comparison with *T. rugosus* (Fig. 1), which is significantly smaller in size. This could suggest that the *T. micans* size advantage could affect its ability to handle the prey faster, thus allowing more efficient predation.

We did not observe any difference in consumption of meat between European *Thanatophilus* species (Fig. 1). This might be interesting, as diversification of feeding habits between both sympatric species would be expected in order to avoid competition as adults of both species are often observed syntopically in open fields (Kočárek 2003, Matuszewski et al. 2013). Both species also have diurnal activity and occur mainly during spring and summer (Dekeirsschieter et al. 2011). The ecological niche separation of both species is therefore still unclear, however at least some studies indicate, that there might be a difference in habitat choice. According to Frątczak-Łagiewska and Matuszewski (2018), *T. sinuatus* prefers open fields while *T. rugosus* prefers forests (Frątczak-Łagiewska and Matuszewski 2018). This might also be a consequence of slightly different developmental biology as *T. rugosus* is a more cold adapted species (Montoya-Molina et al. 2021b, 2021a).

T. micans is most widespread carrion beetle occurring in Africa and can be found from South Africa to the Ivory Coast at the west and Middle East at the north-east (GBIF.Org User 2023). The species is known for its ability locate and colonize carrion in hours after death (Midgley and Villet 2009a). Based on our rearing experience, *T. micans* has probably a year-round activity, as we did not notice any kind of diapause or estivation behavior under laboratory conditions. We suppose that the size difference (compared to *T. rugosus*) results in higher preference for larvae, as larger beetles have more power and bigger mandibles (Table 1).

We found differences between parallel and sequential design in the amount of food consumed at each of the experiment, however contrary to our prior expectations, the overall pattern of preference stayed the same (Fig. 2). The most preferred food item was meat, followed by dead larvae, and the least preyed upon were living larvae across all 3 species. Both types of approach are ecologically relevant, because in natural conditions carrion beetles can find situations resembling the sequential design (when they approach fresh carcass without fly larvae), or they can find a mass of larvae in the end of active decay stage of carcass. Although the most common scenario would probably be parallel occurrence of decaying tissue and larvae at the same time (equaling the parallel model).

Therefore, we recommend parallel experimental design in place of previously suggested laboratory methodology (Jakubec et al. 2021), when the goal is to uncover the food preference among differed food items. Also, it offers several other key advantages, including reduced time requirements for execution and decreased labor intensity compared to sequential design. The only downside of parallel design is that it is not able to precisely quantify the maximal consumption of each food item. If that is your priority, then you should consider the sequential methodology provided here.

According to our results, most of the tested beetles consumed all types of offered food, even if they were provided enough meat they tried to kill and eat fly larvae (Fig. 1). This indicates, that carrion beetles retain a certain plasticity in their food behavior. This can help them to find enough food in different condition and different stages of decomposition. Another reason explaining fly larvae consumption can be competition—beetles killing their competitors to protect the main food source (meat).

In our study, we did not find any difference between preference for dead or alive larvae. The same pattern was observed over both designs, therefore we do not think that this might have affected the results, although it is possible evaluating a larger sample size could show some significant differences.

The genus *Thanatophilus* is currently considered as monophyletic (Růžička et al. 2023), although we are lacking any specific phylogenetic study that would target and cover substantial portion the taxa of this genus. Despite these gaps in our understanding of the phylogeny, our results show broadly similar preferences in all studied species, although *T. micans* consumed a lower proportion of meat compared to the other 2 species. This support general conclusion that larger species consume less food per unit of weight than smaller species (Gillooly et al. 2001). Further when compared with another silphid species, *Necrophila (Calosilpha) brunnicollis* and its food ecology (Jakubec et al. 2021), we can see a similar food preference pattern. In *N. brunnicollis*, consumption of meat was on average 75%, while the values for *Thanatophilus* species in our study ranged between 82.5% and 94.3%. Apart from phylogeny there are many other factors such as ecological history or underlying biology of the species, that might have played a role in the origin of foraging plasticity we observed. More work will be required to evaluate the

degree to which phylogeny or other factors play a role in the variation of food ecology between these species.

The use of chicken meat as a food source for *Thanatophilus* species was based on our previous study (Jakubec et al. 2021), as we aimed at the comparability between them. This meat is often utilized in other forensic studies for breeding or attracting necrophagous species (beetle and flies) (Byrd and Tomberlin, 2019). However, some studies point out that compared to other food sources this has often negative effect on survival or developmental rate of the larvae of necrophagous beetles (Qubaiová et al. 2021, 2022, 2023). The use of fly larvae as a prey for *Thanatophilus* species was based on evidence pointing towards improved rearing success in silphids (Byrd and Tomberlin, 2019). We used the last instar larvae of *C. vomitoria* as it represents the relatively longest living stage and is less prone to succumb to environmental stress such as desiccation. The choice of species of flies was limited to those which are commercially bred. We believe this specific choice does not affect the general results, although we encourage further research in this direction.

Our experiment has shown that all 3 species are almost strictly necrophagous as adults, thus they are strongly associated with the carrions of vertebrates. However, all of them are capable of predation on larvae, and actively consume them even in the presence of their preferred food source (meat). The comparison of standardized parallel methodology for evaluation of foraging strategies of necrophagous beetles [see (Jakubec et al. 2021)] with improved sequential design showed that the latter has an improved capability to quantify the maximal consumption of the given food item. Thus, we suggest to follow this methodology in future research in foraging ecology of necrophagous beetles.

Acknowledgments

We would like to thank Hana Šípková (Prague, Czech Republic) for the assistance during field collection of the focal species.

Author contributions

Jakub Kadlec (Conceptualization [equal], Investigation [lead], Writing—original draft [equal], Writing—review & editing [equal]), Pavel Jakubec (Conceptualization [equal], Formal analysis [lead], Methodology [lead], Visualization [lead], Writing—original draft [equal], Writing—review & editing [equal]), and Petr Šípek (Conceptualization [equal], Resources [lead], Supervision [lead], Writing—review & editing [equal])

Funding

This project was supported by the grant SVV 244-260434 to Jakub Kadlec, Petr Šípek was supported by institutional support of the Charles University.

References

- Amendt J, Krettek R, Zehner R. Forensic entomology. *Naturwissenschaften*. 2004;91(2):51–65. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0493-5>
- Byrd JH, Tomberlin JK. Laboratory-rearing of forensic insects. In: Byrd JH, Tomberlin JK, editors. *Forensic entomology, utility of arthropods in legal investigations*. 3rd ed., CRC Press; 2019. p. 87–102.
- Cai C, Tihelka E, Giacomelli M, Lawrence JF, Ślipiński A, Kundrata R, Yamamoto S, Thayer MK, Newton AF, Leschen RAB, et al. Integrated phylogenomics and fossil data illuminate the evolution of beetles. *R Soc Open Sci*. 2022;9(3):211771.
- Dekeirsschieter J, Verheggen F, Lognay G, Haubruge E. Large carrion beetles (Coleoptera, Silphidae) in Western Europe: a review. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 2011;15:435–447.

- Dorsey CK. A comparative study of the larvae of six species of Silpha (Coleoptera: Silphidae). *Ann Entomol Soc Am.* 1940;33(1):120–139. <https://doi.org/10.1093/aesa/33.1.120>
- Farrar RR, Barbour JD, Kennedy GG. Quantifying food consumption and growth in insects. *Ann Entomol Soc Am.* 1989;82(5):593–598. <https://doi.org/10.1093/aesa/82.5.593>
- Frączak-Lagiewska K, Matuszewski S. Resource partitioning between closely related carrion beetles: *Thanatophilus sinuatus* (F.) and *Thanatophilus rugosus* (L.) (Coleoptera: Silphidae). *Entomol Gen.* 2018;37:143–156.
- Fuller ME. The insect inhabitants of carrion: a study in animal ecology. *Austral Council Sci Ind Res Bull.* 1934;82:1–62.
- Gillooly JF, Brown JH, West GB, Savage VM, Charnov EL. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science.* 2001;293(5538):2248–2251. <https://doi.org/10.1126/science.1061967>
- Hatch MH. Studies on the Silphinae. *J N Y Entomol Soc.* 1927;35:331–371.
- Heymons R, von Lengerken H. Studien Über die lebenserscheinungen der silphini (Coleopt.). VII. *Oiceoptoma thoracica* L. *Ökol Tiere.* 1931;20:691–706.
- Honek A, Martinkova Z, Saska P. Effect of size, taxonomic affiliation and geographic origin of dandelion (*Taraxacum* agg.) seeds on predation by ground beetles (Carabidae, Coleoptera). *Basic Appl Ecol.* 2011;12(1):89–96. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2010.11.003>
- Ikeda H, Kagaya T, Kubota K, Abe T. Evolutionary relationships among food habit, loss of flight, and reproductive traits: life-history evolution in the Silphinae (Coleoptera: Silphidae). *Evol Int J Org Evol.* 2008;62(8):2065–2079. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00432.x>
- Ikeda H, Kubota K, Kagaya T, Abe T. Niche differentiation of burying beetles (Coleoptera: Silphidae: Nicrophorinae) in carcass use in relation to bod size: estimation from stable isotope analysis. *Appl Entomol Zool.* 2006;41(4):561–564. <https://doi.org/10.1303/aez.2006.561>
- Ikeda H, Kubota K, Kagaya T, Abe T. Flight capabilities and feeding habits of silphine beetles: are flightless species really “carrion beetles”? *Ecol Res.* 2007;22(2):237–241. <https://doi.org/10.1007/s11284-006-0012-1>
- Jakubec P, Kadlec J, Šípek P. Standardized laboratory methodology for the evaluation of foraging strategies in necrophilous beetles: a case study of necrophila (*Calosilpha*) *brunnicolis* (Coleoptera: Silphidae). *J Med Entomol.* 2021;58(1):40–46. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa163>
- Jakubec P, Novák M, Qubaiová J, Šuláková H, Růžicka J. Description of immature stages of *Thanatophilus sinuatus* (Coleoptera: Silphidae). *Int J Legal Med.* 2019;133(5):1549–1565. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02040-1>
- Jakubec P, Růžicka J. Is the type of soil an important factor determining the local abundance of carrion beetles (Coleoptera: Silphidae)? *Eur J Entomol.* 2015;112(4):747–754. <https://doi.org/10.14411/eje.2015.071>
- King JE, Riegler M, Thomas RG, Spooner-Hart RN. Phylogenetic placement of Australian carrion beetles (Coleoptera: Silphidae). *Aust Entomol.* 2015;54:366–375.
- Kočárek P. Decomposition and Coleoptera succession on exposed carrion of small mammal in Opava, the Czech Republic. *Eur J Soil Biol.* 2003;39(1):31–45. [https://doi.org/10.1016/s1164-5563\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/s1164-5563(02)00007-9)
- Kulkarni SS, Dosdall LM, Spence JR, Willenborg CJ. Brassicaceous weed seed predation by ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Weed Sci.* 2016;64(2):294–302. <https://doi.org/10.1614/ws-d-15-00069.1>
- Lüdecke D. sjPlot: data visualization for statistics in social science; 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1308157>
- Lutz L, Amendt J, Moreau G. Carcass concealment alters assemblages and reproduction of forensically important beetles. *Forensic Sci Int.* 2018;291:124–132. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.08.014>
- Matuszewski S, Bajerlein D, Konwerski S, Szpila K. An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe. *Forensic Sci Int.* 2008;180(2–3):61–69. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.06.015>
- Matuszewski S, Szafałowicz M. Temperature-dependent appearance of forensically useful beetles on carcasses. *Forensic Sci Int.* 2013;229(1–3):92–99. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.03.034>
- Matuszewski S, Szafałowicz M, Jarmusz M. Insects colonising carcasses in open and forest habitats of Central Europe: search for indicators of corpse relocation. *Forensic Sci Int.* 2013;231(1–3):234–239. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.05.018>
- Merritt RW, De Jong GD. Arthropod communities in terrestrial environments. In: Benbow ME, Tomberlin JK, Tarone AM, editors. *Carrion ecology, evolution, and their applications.* Boca Raton (FL): CRC Press; 2016. p. 65–92.
- Midgley JM, Richards CS, Villet MH. The utility of Coleoptera in forensic investigations. In: Amendt J, Goff ML, Campobasso CP, Grassberger M, editors. *Current concepts in forensic entomology.* Dordrecht (the Netherlands): Springer Netherlands; 2010. p. 57–68.
- Midgley JM, Villet MH. Development of *Thanatophilus micans* (Fabricius 1794) (Coleoptera: Silphidae) at constant temperatures. *Int J Legal Med.* 2009a;123(4):285–292. <https://doi.org/10.1007/s00414-008-0280-0>
- Midgley JM, Villet MH. Effect of the killing method on post-mortem change in length of larvae of *Thanatophilus micans* (Fabricius 1794) (Coleoptera: Silphidae) stored in 70% ethanol. *Int J Legal Med.* 2009b;123(2):103–108. <https://doi.org/10.1007/s00414-008-0260-4>
- Montoya-Molina S, Jakubec P, Qubaiová J, Novák M, Šuláková H, Růžicka J. Developmental models of the carrion beetle *Thanatophilus rugosus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Silphidae). *Sci Rep.* 2021b;11(1):19377. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98833-9>
- Montoya-Molina S, Jakubec P, Qubaiová J, Novák M, Šuláková H, Růžicka J. Developmental models of the forensically important carrion beetle, *Thanatophilus sinuatus* (Coleoptera: Silphidae). *J Med Entomol.* 2021a;58(3):1041–1047. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa255>
- Mroczkowski M. Klucze do oznaczania owadów Polski, Część XIX Chrzaszczce—Coleoptera, Zeszyt 25 Silphidae. [Keys to identification of Poland insects, Part XIX Beetles—Coleoptera, Issue 25—Silphidae]. Państwowe wydawnictwo naukowe, Warszawa; 1955.
- Newton AF. Staphyliniformia world catalog database (June 2023). Staphyliniformia world catalog database; 2023. http://archive.fieldmuseum.org/peet_staph
- Novák M, Jakubec P, Qubaiová J, Šuláková H, Růžicka J. Revisited larval morphology of *Thanatophilus rugosus* (Coleoptera: Silphidae). *Int J Legal Med.* 2018;132(3):939–954. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1764-6>
- Qubaiová J, Jakubec P, Montoya-Molina S, Novák M, Šuláková H. Influence of diet on development and survival of *Thanatophilus rugosus* (Coleoptera: Silphidae). *J Med Entomol.* 2021;58(6):2124–2129. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab141>
- Qubaiová J, Jakubec P, Montoya-Molina S, Novák M, Šuláková H. Diet impact on the development and survival of *Oiceoptoma thoracicum* (Coleoptera: Silphidae). *J Med Entomol.* 2022;59(6):1905–1910. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac129>
- Qubaiová J, Jakubec P, Montoya-Molina S, Novák M, Šuláková H. The impact of diet and photoperiodism on the life history of *Thanatophilus sinuatus* (Coleoptera: Silphidae). *J Med Entomol.* 2023;60(3):453–459. <https://doi.org/10.1093/jme/tjad012>
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing [program]. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing; 2020.
- Ratcliffe BC. The natural history of *Necrodes surinamensis* (Fabr.) (Coleoptera: Silphidae). *Trans Am Entomol Soc.* 1972;98:359–410.
- Ratcliffe BC. The carrion beetles (Coleoptera: Silphidae) of Nebraska. *Bull Univ Nebr State Mus.* 1996;13:1–100.
- Ridgeway JA, Midgley JM, Collett IJ, Villet MH. Advantages of using development models of the carrion beetles *Thanatophilus micans* (Fabricius) and *T. mutilatus* (Castelneau) (Coleoptera: Silphidae) for estimating minimum post mortem intervals, verified with case data. *Int J Legal Med.* 2014;128(1):207–220. <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0865-0>
- Růžicka J. Silphidae. In: Löbl I, Löbl D, editors. *Catalogue of Palaearctic Coleoptera volume 2/1. Hydrophiloidea—Staphylinoidea*, revised and updated edition. Leiden & Boston (the Netherlands): Brill; 2015. p. 291–304.
- Růžicka J, Jakubec P, Mahlerová K, Šípková H, Nishikawa M. Integrative taxonomy and species distribution models of the genus *Diames* Hope, 1840 (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae). *Sci Rep.* 2023;13(1):1–24.
- Sikes DS. Carrion beetles (Coleoptera: Silphidae). In: Capinera JL, editor. *Encyclopedia of entomology.* Berlin (Germany): Springer Netherlands; 2008. p. 749–758.
- Singer MS. Determinants of polyphagy by a woolly bear caterpillar: a test of the physiological efficiency hypothesis. *Oikos.* 2001;93(2):194–204. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.930203.x>

- Soo Hoo CF, Fraenkel G. The selection of food plants in a polyphagous insect, *Prodenia eridania* (Cramer). J Insect Physiol. 1966;12(6):693–709. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(66\)90115-6](https://doi.org/10.1016/0022-1910(66)90115-6)
- Steele BF. Notes on the feeding habits of carrion beetles. J N Y Entomol Soc. 1927;35:77–81.
- Šustek Z. Keys to identification of insects 2: Carrion beetles of Czechoslovakia (Coleoptera: Silphidae). Zprávy Československé Společnosti Entomologické při ČSAV. 1981;2:1–47.
- VanLaerhoven SL. Ecological theory and its application in forensic entomology. In: Byrd JH, Castner JL, editors. Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. Boca Raton (FL): CRC Press; 2010, p. 493–517.
- Villet MHM. African carrion ecosystems and their insect communities in relation to forensic entomology. Pest Technol. 2011;5:1–15.
- Waldbauer GP. The consumption, digestion and utilization of solanaceous and non-solanaceous plants by larvae of the tobacco hornworm, *Protoparce sexta* (Johan.) (Lepidoptera: Sphingidae). Entomol Exp Appl. 1964;7(3):253–269. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1964.tb02445.x>
- Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. New York (NY): Springer-Verlag New York; 2009.

Závěr

V průběhu řešení disertační práce jsme navrhli a experimentálně ověřili metodiky vhodné pro studium a testování potravní ekologie nekrobiotních druhů hmyzu ať už přímo v terénu, ale také v laboratorním prostředí, kde se dají poměrně snadno, rychle a levně testovat potravní preference různých druhů nejenom nekrobiontního hmyzu.

V našich podmínkách byly podobné studie s manipulováním sukcese a vlivem těchto manipulací na průběh rozkladu a složení společenstva hmyzu prováděny zcela výjimečně. Pouze Sladeczek *et al.* (2021) prováděl obdobné experimenty, ale zaměřil se na trus velkých býložravců.

Pomocí těchto terénních experimentů jsme ukázali, že pokud je kadaver hlodavce z jakéhokoli důvodu na tři nebo více dní nepřístupný hmyzu, dojde ke změně směru vývoje celého společenstva a rozklad bude probíhat odlišným způsobem. Největší negativní vliv má toto znepřístupnění zejména na časně se objevující dominantní skupiny nekrobiontního hmyzu, jako jsou larvy bzučivky a hrobaříci. Nicméně hrobaříci poměrně ochotně kolonizují i mršinu tři dny starou. Zpožděný začátek kolonizace kadaveru hmyzem vede naopak k vyššímu výskytu konkurenčně slabších skupin hmyzu. Velký vliv na rozklad a složení společenstev hmyzu má nejenom velikost, kdy větší mršiny hostí větší diverzitu i abundanci jedinců, ale i sezonalita. Vliv sezóny byl velmi patrný na schopnosti hrobaříků monopolizovat kadavery myší, kdy většinu mršin monopolizovali v jarních měsících.

Při behaviorálním testování potravních preferencí vybraných druhů mrchožroutů jsme dospěli k závěru, že potravní guildy nekrofágních brouků představují spíše kontinuum než diskrétní jednotky a nejsou tedy jednoduše klasifikovatelné. Nelze tedy automaticky předpokládat, že druhy, které jsou na základě starší literatury považovány za striktně nekrofágní se živí pouze rozkládající se tkání kadaveru. Z našich experimentů je zřejmé, že i tyto druhy jsou schopny se za určitých podmínek chovat dravě. S největší pravděpodobností nepohrdnou ani jinou vhodnou potravou. Vysvětlení tohoto chování může ležet v potravním oportunismu, alternativních potravních strategiích v případě nedostatku potravy

nebo jako způsob, jak potlačit konkurenci na bohatém zdroji potravy. Podobný vzorec chování je znám i u larev masařek, kdy se u některých druhů předpokládá dravé chování prvních instarů larev (Pape, 1987; Richet *et al.*, 2011). Značný vliv na potravní preference, bude mít také velikost daného mrchožrouta, jelikož větší druhy se pravděpodobněji budou chovat dravěji než druhy malé.

Experimenty zaměřené na testování potravních preferencí jedinců poskytují přesnější informace o konkrétním potravním chování jedince. Tyto laboratorní testy potravních preferencí mohou být s drobnými úpravami použity i na jiné druhy. Například na dravé či herbivorní druhy hmyzu, které mohou vykazovat preference k určitému druhu potravy nebo je možné testovat množství jimi zkonsumované potravy za dvacet čtyři hodin.

Literatura

Abdul-Wahab AS, Rice EL. 1967. Plant Inhibition by Johnson Grass and Its Possible Significance in Old- Field Succession. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **94**, 486–497.

Alcaide M, Rico C, Ruiz S, Soriguer R, Muñoz J, Figuerola J. 2009. Disentangling Vector–Borne Transmission Networks: A Universal DNA Barcoding Method to Identify Vertebrate Hosts from Arthropod Bloodmeals. (L Rénia, Ed.). *PLoS ONE* **4**, e7092.

Allen ML, Elbroch LM, Wilmers CC, Wittmer HU. 2014. Trophic Facilitation or Limitation? Comparative Effects of Pumas and Black Bears on the Scavenger Community. (B Fenton, Ed.). *PLoS ONE* **9**, e102257.

Amendt J, Krettek R, Zehner R. 2004. Forensic entomology. *Naturwissenschaften* **91**, 51–65.

Anderson RS. 1982. Resource partitioning in the carrion beetle (Coleoptera:Silphidae) fauna of southern Ontario: ecological and evolutionary considerations. *Canadian Journal of Zoology* **60**, 1314–1325.

Anderson RS, Peck SB. 1984. Bionomics of nearctic species of *Aclypea* Reitter: Phytophagous" carrion" beetles(Coleoptera: Silphidae). *Pan–Pacific Entomologis* **60**, 248–255.

Anderson G, VanLaerhoven S. 1996. Initial Studies on Insect Succession on Carrion in Southwestern British Columbia. *Journal of Forensic Sciences* **41**, 617–625.

Ballard JWO, Thayer MK, Newton AF, Grismer ER. 1998. Data Sets, Partitions, and Characters: Philosophies and Procedures for Analyzing Multiple Data Sets. (D Cannatella, Ed.). *Systematic Biology* **47**, 367–396.

Barton PS, Cunningham SA, Lindenmayer DB, Manning AD. 2013. The role of carrion in maintaining biodiversity and ecological processes in terrestrial ecosystems. *Oecologia* **171**, 761–772.

Begon M, Townsend CR. 2021. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. John Wiley & Sons.

Benbow ME, Barton PS, Ulyshen MD, Beasley JC, DeVault TL, Strickland MS, Tomberlin JK, Jordan HR, Pechal JL. 2019. Necrobiome framework for bridging decomposition ecology of autotrophically and heterotrophically derived organic matter. *Ecological Monographs* **89**, e01331.

Benton A. 1966. *Field Biology and Ecology*. McGraw–Hill.

Beutel RG, Leschen RAB. 2005. Phylogenetic analysis of Staphyliniformia (Coleoptera) based on characters of larvae and adults. *Systematic Entomology* **30**, 510–548.

Beutel RG, Molenda R. 1997. Comparative morphology of selected larvae of Staphylinioidea (Coleoptera, Polyphaga) with phylogenetic implications. *Zoologischer Anzeiger* **236**, 37–67.

Bocak L, Barton C, Crampton-Platt A, Chesters D, Ahrens D, Vogler AP. 2014. Building the Coleoptera tree–of–life for >8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology* **39**, 97–110.

Borer ET, Gruner DS. 2009. III.6 Top–Down and Bottom–Up Regulation of Communities. In: Levin SA, Carpenter SR, Godfray HCJ, Kinzig AP, Loreau M, Losos JB, Walker B, Wilcove DS, eds. *The Princeton Guide to Ecology*. Princeton University Press, 296–304.

- Bornemissza GF.** 1957. An analysis of Arthropod succession in Carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Australian Journal of Zoology* **5**, 1–12.
- Bornemissza OF.** 1979. The Australian Dung Beetle research unit in Pretoria. *South African Journal of Science* **75**, 257–260.
- Brygadyrenko VV, Reshetniak DY.** 2014. Trophic preferences of *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae) with regard to seeds of agricultural crops in conditions of laboratory experiment. *Baltic Journal of Coleopterology* **14**, 179–190.
- Cai Y, Li X.** 2021. The complete mitochondrial genome of a burying beetle, *Nicrophorus nepalensis* Hope, 1831 (Coleoptera: Silphidae). *Mitochondrial DNA Part B* **6**, 1727–1728.
- Caldwell MM, Richards JH, Beyschlag W.** 1991. Hydraulic lift: ecological implications of water efflux from roots. *Plant root growth: an ecological perspective* **24**, 423–436.
- Carrión JF, Gastauer M, Mota NM, Meira-Neto JAA.** 2017. Facilitation as a driver of plant assemblages in Caatinga. *Journal of Arid Environments* **142**, 50–58.
- Carter DO, Yellowlees D, Tibbett M.** 2006. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften* **94**, 12–24.
- Charabidze D, Vincent B, Pasquerault T, Hedouin V.** 2016. The biology and ecology of *Necrodes littoralis*, a species of forensic interest in Europe. *International Journal of Legal Medicine* **130**, 273–280.
- Charalabidis A, Dechaume-Moncharmont F-X, Carbonne B, Bohan DA, Petit S.** 2019. Diversity of foraging strategies and responses to predator interference in seed-eating carabid beetles. *Basic and Applied Ecology* **36**, 13–24.
- Chen Y, Giles KL, Payton ME, Greenstone MH.** 2000. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Molecular Ecology* **9**, 1887–1898.
- Chew FS.** 1980. Foodplant Preferences of Pievis Caterpillars (Lepidoptera). *Oecologia*, 347–353.
- Connell JH, Slatyer RO.** 1977. Mechanisms of Succession in Natural Communities and Their Role in Community Stability and Organization. *The American Naturalist* **111**, 1119–1144.
- Dalerum F, Angerbjörn A.** 2005. Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. *Oecologia* **144**, 647–58.
- Dawson BM, Wallman JF, Evans MJ, Barton PS.** 2022. Insect abundance patterns on vertebrate remains reveal carrion resource quality variation. *Oecologia* **198**, 1043–1056.
- Dekeirsschietter J, Verheggen F, Lognay G, Haubruge E.** 2011. Large carrion beetles (Coleoptera, Silphidae) in Western Europe: a review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **15**, 435–447.
- Denno RF, Cothran WR.** 1976. Competitive Interactions and Ecological Strategies of Sarcophagid and Calliphorid Flies Inhabiting Rabbit Carrion. *Annals of the Entomological Society of America* **69**, 109–113.
- DeSalle R, Goldstein P.** 2019. Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution* **7**, 302.

- Dorsey CK.** 1940. A Comparative Study of the Larvae of Six Species of Silpha¹ (Coleoptera, Silphidae). *Annals of the Entomological Society of America* **33**, 120–139.
- Eubanks MD, Denno RF.** 2000. Health food versus fast food: the effects of prey quality and mobility on prey selection by a generalist predator and indirect interactions among prey species. *Ecological Entomology* **25**, 140–146.
- Fawki S, Toft S.** 2005. Food preferences and the value of animal food for the carabid beetle *Amara similata* (Gyll.) (Col., Carabidae). *Journal of Applied Entomology* **129**, 551–556.
- Feldhaar H, Gebauer G, Blüthgen N.** 2009. Stable isotopes: past and future in exposing secrets of ant nutrition (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News* **13**.
- Finn JA.** 2001. Ephemeral Resource Patches as Model Systems for Diversity–Function Experiments. *Oikos* **92**, 363–366.
- Fox CW, Moya-Laraño J.** 2009. Diet affects female mating behaviour in a seed-feeding beetle. *Physiological Entomology* **34**, 370–378.
- Francey RJ, Allison CE, Etheridge DM, Trudinger CM, Enting IG, Leuenberger M, Langenfelds RL, Michel E, Steele LP.** 1999. A 1000–year high precision record of $\delta^{13}\text{C}$ in atmospheric CO_2 . *Tellus B* **51**, 170–193.
- Franklin CD.** 1993. Mechanisms of succession in a carrion community. A fourteen day post mortem study. San Jose State University.
- Frątczak–Łagiewska K, Matuszewskia S.** 2018. Resource partitioning between closely related carrion beetles: *Thanatophilus sinuatus* (F.) and *Thanatophilus rugosus* (L.) (Coleoptera: Silphidae). *Entomologia Generalis* **37**, 143–156.
- Fuller ME.** 1934. The Insect Inhabitants of Carrion : A Study in Animal Ecology. Bulletin of the Council for Scientific and Industrial Research, Australia *in press*.
- Gessner MO, Swan CM, Dang CK, McKie BG, Bardgett RD, Wall DH, Hättenschwiler S.** 2010. Diversity meets decomposition. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 372–380.
- Goff ML.** 2009. Early Postmortem Changes and Stages of Decomposition. In: Amendt J, Goff ML, Campobasso CP, Grassberger M, eds. *Current Concepts in Forensic Entomology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1–24.
- Gómez A, Kolokotronis S–O.** 2017. Genetic identification of mammalian meal source in dung beetle gut contents. *Mitochondrial DNA Part A* **28**, 612–615.
- Grebennikov VV, Newton AF.** 2009. Good–bye Scydmaenidae, or why the ant–like stone beetles should become megadiverse Staphylinidae sensu latissimo (Coleoptera). *EJE* **106**, 275–301.
- Grebennikov V, Newton A.** 2012. Detecting the basal dichotomies in the monophylum of carrion and rove beetles (Insecta: Coleoptera: Silphidae and Staphylinidae) with emphasis on the Oxytelina group of subfamilies. *Arthropod Systematics & Phylogeny* **70**, 133–165.
- Greenstone MH, Rowley DL, Weber DC, Payton ME, Hawthorne DJ.** 2007. Feeding mode and prey detectability half–lives in molecular gut–content analysis: an example with two predators of the Colorado potato beetle. *Bulletin of Entomological Research* **97**, 201–209.

- Gruner SV, Slone DH, Capinera JL.** 2007. Forensically Important Calliphoridae (Diptera) Associated with Pig Carrion in Rural North–Central Florida. *JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY* **44**.
- Gruszka J, Matuszewski S.** 2021. Insect rearing protocols in forensic entomology: Benefits from collective rearing of larvae in a carrion beetle *Necrodes littoralis* L. (Silphidae). *PLOS ONE* **16**, e0260680.
- Hanski I, Koskela H.** 1977. Niche relations among dung-inhabiting beetles. *Oecologia* **28**, 203–231.
- Hastir P, Gaspar C.** 2001. Diagnose d’une famille de fossoyeurs: les Silphidae. Notes fauniques de Gembloux **44**, 13–25.
- Hatch MH.** 1927. Studies on the Carrion Beetles of Minnesota, Including New Species. Technical Bulletin, University of Minnesota Agricultural Experiment Station **1927**, 1–19.
- Hebert PDN, Gregory TR.** 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. (V Savolainen, Ed.). *Systematic Biology* **54**, 852–859.
- Hershey AE, Pastor J, Peterson BJ, Kling GW.** 1993. Stable Isotopes Resolve the Drift Paradox for *Baetis* Mayflies in an Arctic River. *Ecology* **74**, 2315–2325.
- Hewadikaram KA, Goff ML.** 1991. Effect of Carcass Size on Rate of Decomposition and Arthropod Succession Patterns. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* **12**, 235.
- Hirschberger P, Degro HN.** 1996. Oviposition of the dung beetle *Aphodius ater* in relation to the abundance of yellow dungfly larvae (*Scatophaga stercoraria*). *Ecological Entomology* **21**, 352–357.
- Hocking MD, Darimont CT, Christie KS, Reimchen TE.** 2007. Niche variation in burying beetles (*Nicrophorus* spp.) associated with marine and terrestrial carrion. *Canadian Journal of Zoology* **85**, 437–442.
- Holloway AK, Schnell GD.** 1997. Relationship between numbers of the endangered American burying beetle *Nicrophorus americanus* Olivier (Coleoptera: Silphidae) and available food resources. *Biological Conservation* **81**, 145–152.
- Honek A, Martinkova Z, Saska P.** 2011. Effect of size, taxonomic affiliation and geographic origin of dandelion (*Taraxacum* agg.) seeds on predation by ground beetles (Carabidae, Coleoptera). *Basic and Applied Ecology* **12**, 89–96.
- Hood–Nowotny R, Knols BGJ.** 2007. Stable isotope methods in biological and ecological studies of arthropods. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **124**, 3–16.
- Hood–Nowotny R, Mayr L, Knols BG.** 2006. Use of carbon–13 as a population marker for *Anopheles arabiensis* in a sterile insect technique (SIT) context. *Malaria Journal* **5**, 6.
- Hoogendoorn M, Heimpel GE.** 2001. PCR–based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS–1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology* **10**, 2059–2067.
- Horenstein MB, Salvo A.** 2012. Community Dynamics of Carrion Flies and their Parasitoids in Experimental Carcasses in Central Argentina. *Journal of Insect Science* **12**, 1–10.
- Horn HS.** 1974. The Ecology of Secondary Succession. *Annual Review of Ecology and Systematics* **5**, 25–37.

- Hunt T, Bergsten J, Levkanicova Z, et al.** 2007. A Comprehensive Phylogeny of Beetles Reveals the Evolutionary Origins of a Superradiation. *Science* **318**, 1913–1916.
- Ikeda H, Kagaya T, Kubota K, Abe T.** 2008. Evolutionary Relationships among Food Habit, Loss of Flight, and Reproductive Traits: Life–History Evolution in the Silphinae (Coleoptera: Silphidae). *Evolution* **62**, 2065–2079.
- Ikeda H, Kubota K, Kagaya T, Abe T.** 2007. Flight capabilities and feeding habits of silphine beetles: are flightless species really “carrion beetles”? *Ecological Research* **22**, 237–241.
- Ikeda H, Nishikawa M, Sota T.** 2012. Loss of flight promotes beetle diversification. *Nature Communications* **3**, 648.
- Ito M, Nishigaki A, Hasegawa M.** 2023. The effect of pioneer carrion beetles on the emission of volatile organic compounds and carrion insect community assembly. *Ecology and Evolution* **13**, e10818.
- Jakubec P, Kadlec J, Šípek P.** 2021. Standardized Laboratory Methodology for the Evaluation of Foraging Strategies in Necrophilous Beetles: A Case Study of *Necrophila* (Calosilpha) *brunnicollis* (Coleoptera: Silphidae). (J Byrd, Ed.). *Journal of Medical Entomology*, tjaa163.
- Kadlec J, Jakubec P, Šípek P.** 2024. In vitro comparison of two food choice methodologies for necrophagous species of the genus *Thanatophilus* (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae). *Journal of Medical Entomology* **61**, 541–553.
- Kalinová B, Podskalská H, Růžička J, Hoskovec M.** 2009. Irresistible bouquet of death—how are burying beetles (Coleoptera: Silphidae: *Nicrophorus*) attracted by carcasses. *Naturwissenschaften* **96**, 889–899.
- Kelly JF.** 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology* **78**, 1–27.
- King J, Riegler M, Thomas R, Spooner–Hart R.** 2015. Phylogenetic placement of Australian carrion beetles (Coleoptera: Silphidae): Phylogeny of Australian Silphidae. *Austral Entomology* **54**, 366–375.
- Kiyashko SI, Imbs AB, Narita T, Svetashev VI, Wada E.** 2004. Fatty acid composition of aquatic insect larvae *Stictochironomus pictulus* (Diptera: Chironomidae): evidence of feeding upon methanotrophic bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **139**, 705–711.
- Klecka J, Boukal DS.** 2012. Who Eats Whom in a Pool? A Comparative Study of Prey Selectivity by Predatory Aquatic Insects. (LA Nunes Amaral, Ed.). *PLoS ONE* **7**, e37741.
- Kočárek P.** 2001. Nekrobiontní hmyz v účasti na dekompozičních procesech (Necrobiont insects and their role in decomposition processes). Autoreferát disertační práce, Univerzita Palackého.
- Kočárek P.** 2003. Decomposition and Coleoptera succession on exposed carrion of small mammal in Opava, the Czech Republic. *European Journal of Soil Biology* **39**, 31–45.
- Koch K.** 1989. *Die Käfer Mitteleuropas, Ökologie (Vol. 3)*. Krefeld: Goecke & Evers Verlag.
- Kulkarni SS, Dosdall LM, Spence JR, Willenborg CJ.** 2016. Brassicaceous Weed Seed Predation by Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae). *Weed Science* **64**, 294–302.

- Kuusela S, Hanski I.** 1982. The structure of carrion fly communities: the size and the type of carrion. *Ecography* **5**, 337–348.
- Leschen RAB.** 1993. Evolutionary patterns of feeding in selected Staphylinidea (Coleoptera): shifts among food textures. Functional morphology of insect feeding. Entomological Society of America, 59.
- Lin S–W, Shiao S–F.** 2013. Life history data on the fly parasitoids *Aleochara nigra* Kraatz and *A. asiatica* Kraatz (Coleoptera: Staphylinidae), and their potential application in forensic entomology. *Forensic Science International* **232**, 46–55.
- Lonsdale D, Pautasso M, Holdenrieder O.** 2008. Wood–decaying fungi in the forest: conservation needs and management options. *European Journal of Forest Research* **127**, 1–22.
- Mahlerová K, Jakubec P, Krak K, Růžička J.** 2024. Resolving the intergeneric phylogeny of the large carrion beetles (Staphylinidae: Silphinae: Silphini). *Systematic Entomology* doi: 10.1111/syen.12650.
- Mallik AU, Inderjit (Eds.).** 2002. *Chemical Ecology of Plants: Allelopathy in Aquatic and Terrestrial Ecosystems*. Basel: Birkhäuser.
- Markow TA, Anwar S, Pfeiler E.** 2000. Stable isotope ratios of carbon and nitrogen in natural populations of *Drosophila* species and their hosts. *Functional Ecology* **14**, 261–266.
- Máslo P.** 2016. Faktory ovlivňující složení hmyzích společenstev na malých mršinách. Univerzita Karlova.
- Matuszewski S, Mądra–Bielewicz A.** 2022. Competition of insect decomposers over large vertebrate carrion: Necrodes beetles (Silphidae) vs. blow flies (Calliphoridae). *Current Zoology* **68**, 645–656.
- Maus C, Mittmann B, Peschke K.** 1998. Host Records of Parasitoid *Aleochara* Gravenhorst Species (Coleoptera, Staphylinidae) Attacking Puparia of Cyclorrhapheous Diptera. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* **45**, 231–254.
- McIntosh RP.** 1981. Succession and Ecological Theory. In: West DC, Shugart HH, Botkin DB, eds. *Forest Succession: Concepts and Application*. New York, NY: Springer, 10–23.
- Mckenna DD, Farrell BD, Caterino MS, Farnum CW, Hawks DC, Maddison DR, Seago AE, Short AEZ, Newton AF, Thayer MK.** 2015. Phylogeny and evolution of Staphyliniformia and Scarabaeiformia: forest litter as a stepping stone for diversification of nonphytophagous beetles. *Systematic Entomology* **40**, 35–60.
- McKenna DD, Shin S, Ahrens D, et al.** 2019. The evolution and genomic basis of beetle diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 24729–24737.
- McNabb DM, Halaj J, Wise DH.** 2001. Inferring trophic positions of generalist predators and their linkage to the detrital food web in agroecosystems: a stable isotope analysis. *Pedobiologia* **45**, 289–297.
- Méglin P.** 1894. *La faune des cadavres: application de l'entomologie à la médecine légale*. Gauthier–Villars.
- Milne LJ, Milne M.** 1976. The Social Behavior of Burying Beetles. *Scientific American* **235**, 84–89.

Moore JC, Berlow EL, Coleman DC, et al. 2004. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters* **7**, 584–600.

Muller CH. 1966. The Role of Chemical Inhibition (Allelopathy) in Vegetational Composition. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **93**, 332–351.

Newton AF. 2022. Staphyliniformia world catalog database. <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/9J9KC>. Accessed January 2025.

Niering WA, Whittaker RH, Lowe CH. 1963. The Saguaro: A Population in Relation to Environment. *Science* **142**, 15–23.

Pape T. 1987. *The Sarcophagidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. Fauna Entomologica Scandinavica (Book 19)*. Leiden–Copenhagen: Brill Academic Pub.

Pardo LH, Nadelhoffer KJ. 2010. Using Nitrogen Isotope Ratios to Assess Terrestrial Ecosystems at Regional and Global Scales. In: West JB, Bowen GJ, Dawson TE, Tu KP, eds. *Isoscapes: Understanding movement, pattern, and process on Earth through isotope mapping*. Dordrecht: Springer Netherlands, 221–249.

Payne JA. 1965. A Summer Carrion Study of the Baby Pig *Sus Scrofa* Linnaeus. *Ecology* **46**, 592–602.

Peck SB. 2000. *Silphidae Latreille, 1807. American Beetles, Volume I: Archostemata, Myxophaga, Adephaga, Polyphaga: Staphyliniformia*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 268–270.

Perri DV, Bruzzone O, Easdale MH. 2023. Ecological relationships between coprophagous insects and livestock production: a review. *Bulletin of Entomological Research* **113**, 735–747.

Peschke K, Krapf D, Fuldner D. 1987. Ecological Separation, Functional Relationships, and Limiting Resources in a Carrion Insect Community. *Zoologische Jahrbücher* **114**, 241–265.

Petit S, Boursault A, Bohan DA. 2014. Weed seed choice by carabid beetles (Coleoptera: Carabidae): Linking field measurements with laboratory diet assessments. *European Journal of Entomology* **111**, 615–620.

Phillips DL, Inger R, Bearhop S, Jackson AL, Moore JW, Parnell AC, Semmens BX, Ward EJ. 2014. Best practices for use of stable isotope mixing models in food–web studies. *Canadian Journal of Zoology* **92**, 823–835.

Poinar GO. 1985. *Silpha aenescens* Casey (Silphidae: Coleoptera) as a pest of home grown strawberries in California. *Pan–Pacific Entomologist* **61**, 118–120.

Ponsard S, Arditi R. 2000. What can stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) tell about the food web of soil macro–invertebrates? **81**.

Post DM. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* **83**, 703–718.

Povolný D. 1978. Hmyz v kriminologii. *Vesmír* **57**, 205–208.

Povolný D. 1979. Někteřá hlediska praktického využití hmyzu v kriminalistice. *Kriminalistický sborník* **10**, 620–632.

- Qubaiová J, Jakubec P, Montoya–Molina S, Novák M, Šuláková H.** 2021. Influence of Diet on Development and Survival of *Thanatophilus rugosus* (Coleoptera: Silphidae). (J Byrd, Ed.). Journal of Medical Entomology **58**, 2124–2129.
- Qubaiová J, Jakubec P, Montoya–Molina S, Novák M, Šuláková H.** 2022. Diet Impact on the Development and Survival of *Oiceoptoma thoracicum* (Coleoptera: Silphidae). (J Byrd, Ed.). Journal of Medical Entomology **59**, 1905–1910.
- Qubaiová J, Jakubec P, Montoya–Molina S, Novák M, Šuláková H.** 2023. The Impact of Diet and Photoperiodism on the Life History of *Thanatophilus sinuatus* (Coleoptera: Silphidae). Journal of Medical Entomology **60**, 453–459.
- Quinby BM, Feldman NS, Flaherty EA, Belk MC, Smith ADF, Creighton JC.** 2020. Isotopic discrimination between carrion and elytra clippings of lab-reared American burying beetles (*NICROPHORUS AMERICANUS*): Implications for conservation and evaluation of feeding relationships in the wild. Rapid Communications in Mass Spectrometry **34**, e8785.
- Ratcliffe BC.** 1972. The Natural History of *Necrodes Surinamensis* (Fabr.) (Coleoptera: Silphidae). Transactions of the American Entomological Society (1890–) **98**, 359–410.
- Ratcliffe BC.** 1996. The Carrion Beetles (Coleoptera: Silphidae) of Nebraska. Bulletin of the University of Nebraska State Museum **13**, 100.
- Rayner ADM, Boddy L.** 1988. Fungal Communities in the Decay of Wood. In: Marshall KC, ed. Advances in Microbial Ecology. Boston, MA: Springer US, 115–166.
- Richet R, Blackith RM, Pape T.** 2011. *Sarcophaga of France (Diptera: Sarcophagidae)*. Vancouver, Canada: Pensoft Pub.
- Ridsdill–Smith TJ, Hayles L, Palmer MJ.** 1986. Competition between the bush fly and a dung beetle in dung of differing characteristics. Entomologia Experimentalis et Applicata **41**, 83–90.
- Růžička J, Qubaiová J, Nishikawa M, Schneider J.** 2015. Revision of Palearctic and Oriental *Necrophila* Kirby et Spence, part 3: subgenus *Calosilpha* Portevin (Coleoptera: Silphidae: Silphinae). Zootaxa **4013**.
- Saska P, Honěk A, Martinková Z.** 2019. Preferences of carabid beetles (Coleoptera: Carabidae) for herbaceous seeds. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae **65**, 57–76.
- Scheu S, Falca M.** 2000. The soil food web of two beech forests (*Fagus sylvatica*) of contrasting humus type: Stable isotope analysis of a macro– and a mesofauna-dominated community. Oecologia **123**, 285–296.
- Schildknecht H, Weis KH.** 1962. Über die chemische Abwehr der Aaskäfer: XIV. Mitteilung über Insektenabwehrstoffe. Zeitschrift für Naturforschung B **17**, 452–455.
- Schmidt SK, Reed SC, Nemergut DR, et al.** 2008. The earliest stages of ecosystem succession in high-elevation (5000 metres above sea level), recently deglaciated soils. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **275**, 2793–2802.
- Scott MP.** 1998. The ecology and behaviour of burying beetles. Annual Review of Entomology **43**, 595–618.

- Selva N, Jedrzejewska B, Jedrzejewski W, Wajrak A.** 2003. Scavenging on European bison carcasses in Białowieża Primeval Forest (eastern Poland). *Écoscience* **10**, 303–311.
- Sharanowski BJ, Walker EG, Anderson GS.** 2008. Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. *Forensic Science International* **179**, 219–240.
- Shelton AO, Gold ZJ, Jensen AJ, D'Agnese E, Andruszkiewicz E, Kelly P.** 2023. Toward quantitative metabarcoding. *Ecology* **104**.
- Shigo AL.** 1975. Biology of Decay and Wood Quality. In: Liese W, ed. *Biological Transformation of Wood by Microorganisms*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1–15.
- Sikes DS.** 2005. Silphidae Latreille, 1807. *Handbook of Zoology. Vol. 4: Arthropoda: Insecta*. Berlin: Walter de Gruyter, 288–296.
- Sikes DS.** 2008. Carrion beetles (Coleoptera: Silphidae). *Encyclopedia of entomology*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 749–758.
- Sikes DS.** 2016. Silphidae Latreille, 1807. *Coleoptera, beetles volume I: Morphology and systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga partim)* 2nd edn. *Handbook of Zoology, Arthropoda: Insecta*. Berlin, Germany: Walter de Gruyter, 386–394.
- Sikes DS, Thayer MK, Newton AF.** 2024. Large carrion and burying beetles evolved from Staphylinidae (Coleoptera, Staphylinidae, Silphinae): a review of the evidence. *ZooKeys* **1200**, 159.
- Sikes DS, Venables C.** 2013. Molecular phylogeny of the burying beetles (Coleoptera: Silphidae: Nicrophorinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **69**, 552–565.
- Singer MS.** 2001. Determinants of polyphagy by a woolly bear caterpillar: a test of the physiological efficiency hypothesis. *Oikos* **93**, 194–204.
- Šípková H, Růžička J.** 2009. Carrion succession stage preference among necrophagous beetles (Coleoptera: Silphidae) in central Europe. *Klapalekiana*, 213–219.
- Sladeczek FXJ, Segar ST, Konvicka M.** 2021. Early successional colonizers both facilitate and inhibit the late successional colonizers in communities of dung-inhabiting insects. *European Journal of Entomology* **118**, 240–249.
- Smith KGV.** 1986. *A Manual of Forensic Entomology*. London, England: Trustees of the British Museum (Natural History) and Cornell/University Press.
- Smith T.** 2019. How Long After a Carrion Beetle Feeds on a Beef Carcass Can You Recover Identifiable Beef Specific DNA? *Cantaurus* **27**, 34–37.
- Song N, Zhai Q, Zhang Y.** 2021. Higher-level phylogenetic relationships of rove beetles (Coleoptera, Staphylinidae) inferred from mitochondrial genome sequences. *Mitochondrial DNA Part A* **32**, 98–105.
- Soo Hoo CF, Fraenkel G.** 1966. The selection of food plants in a polyphagous insect, *Prodenia eridania* (Cramer). *Journal of Insect Physiology* **12**, 693–709.
- Stahler D, Heinrich B, Smith D.** 2002. Common ravens, *Corvus corax*, preferentially associate with grey wolves, *Canis lupus*, as a foraging strategy in winter. *Animal Behaviour* **64**, 283–290.

- Stamp NE, Bowers MD.** 1990. Variation in Food Quality and Temperature Constrain Foraging of Gregarious Caterpillars. *Ecology* **71**, 1031–1039.
- Steele BF.** 1927. Notes on the Feeding Habits of Carrion Beetles. *Journal of the New York Entomological Society* **35**, 77–81.
- Steenbergh WF, Lowe CH.** 1969. Critical Factors During the First Years of Life of the Saguaro (*Cereus Giganteus*) at Saguaro National Monument, Arizona. *Ecology* **50**, 825–834.
- Sugiura S.** 2017. Scavenging Behavior in Leaf-Feeding Caterpillars. *The Journal of the Lepidopterists' Society* **71**, 59–61.
- Suzuki S.** 2000. Carrion Burial by *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera: Silphidae) Prevents Fly Infestation. *Entomological Science* **3**, 269–272.
- Suzuki S, Nagano M.** 2006. Resource guarding by *Ptomascopus morio*: Simple parental care in the Nicrophorinae (Coleoptera: Silphidae). *European Journal of Entomology* **103**, 245–248.
- Symondson WOC.** 2004. Coleoptera (Carabidae, Staphylinidae, Lampyridae, Drilidae and Silphidae) as predators of terrestrial gastropods. | Natural enemies of terrestrial molluscs. *Natural enemies of terrestrial molluscs*. Wallingford & Cambridge: CABI Publish, 37–84.
- Taki W, Watanabe M.** 2009. Food intake and number of eggs laid by the carrion beetle, *Eusilpha japonica* (Coleoptera: Silphinae), collected using pitfall traps. *Applied Entomology and Zoology* **44**, 73–79.
- Tayasu I, Hyodo F, Abe T, Inoue T, Spain AV.** 2002. Nitrogen and carbon stable isotope ratios in the sympatric Australian termites, *Amitermes laurensis* and *Drepanotermes rubriceps* (Isoptera: Termitidae) in relation to their feeding habits and the quality of their food materials. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 297–301.
- Tayasu I, Inoue T, Miller LR, Sugimoto A, Takeichi S, Abe T.** 1998. Confirmation of soil-feeding termites (Isoptera; Termitidae; Termitinae) in Australia using stable isotope ratios. *Functional Ecology* **12**, 536–542.
- Tilman D.** 1987. Secondary Succession and the Pattern of Plant Dominance Along Experimental Nitrogen Gradients. *Ecological Monographs* **57**, 189–214.
- Tomberlin JK, Barton BT, Lashley MA, Jordan HR.** 2017. Mass mortality events and the role of necrophagous invertebrates. *Current Opinion in Insect Science* **23**, 7–12.
- Toni ASB, Serrão JE, Fialho VS.** 2023. A beetle for prosecution: exogenous DNA detection from larval and adult gut of a Neotropical carrion beetle. *Forensic Science, Medicine and Pathology* **19**, 184–191.
- Trimble ST, Sagers CL.** 2004. Differential host use in two highly specialized ant-plant associations: evidence from stable isotopes. *Oecologia* **138**, 74–82.
- Trumbo ST, Robinson GE.** 2004. Nutrition, hormones and life history in burying beetles. *Journal of Insect Physiology* **50**, 383–391.
- Trumbo ST, Sikes DS, Philbrick PKB.** 2016. Parental care and competition with microbes in carrion beetles: a study of ecological adaptation. *Animal Behaviour* **118**, 47–54.

- Uchida T, Kaneko N, Ito MT, Futagami K, Sasaki T, Sugimoto A.** 2004. Analysis of the feeding ecology of earthworms (Megascolecidae) in Japanese forests using gut content fractionation and and stable isotope natural abundances. *Applied Soil Ecology* **27**, 153–163.
- Ulrich W, Zalewski M, Komosiński K.** 2007. Diversity of carrion visiting beetles at rural and urban sites. *Community Ecology* **8**, 171–181.
- Unsicker SB, Renker C, Kahmen A, Spindler S, Buchmann N, Weisser WW.** 2005. Testing the efficiency of three¹⁵ N-labeled nitrogen compounds for indirect labeling of grasshoppers via plants in the field. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **116**, 219–226.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P.** 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* **24**, 110–117.
- Valiente-Banuet A, Rumebe AV, Verdú M, Callaway RM.** 2006. Quaternary Plant lineages sustain global diversity by facilitating Tertiary lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 16812–16817.
- Voss SC, Spafford H, Dadour IR.** 2009. Hymenopteran Parasitoids of Forensic Importance: Host Associations, Seasonality, and Prevalence of Parasitoids of Carrion Flies in Western Australia. *Journal of Medical Entomology* **46**, 1210–1219.
- Waldbauer GP.** 1964. The Consumption, Digestion and Utilization of Solanaceous and Non–Solanaceous Plants by Larvae of the Tobacco Hornworm, *Protoparce Sexta* (johan.) (lepidoptera: Sphingidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **7**, 253–269.
- Walker LR.** 1993. Nitrogen fixers and species replacements in primary succession. *Primary Succession on Land*. 249–272.
- Wang M, Chu J, Wang Y, Li F, Liao M, Shi H, Zhang Y, Hu G, Wang J.** 2019. Forensic entomology application in China: Four case reports. *Journal of Forensic and Legal Medicine* **63**, 40–47.
- Warren R, Bradford M.** 2011. Ant colonization and coarse woody debris decomposition in temperate forests. *Insectes Sociaux* **59**.
- Watahiki Y, Sasakawa K.** 2019. Effects of diet on female fecundity and larval development in the carrion beetle *Necrophila japonica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **167**, 85–90.
- Watson EJ, Carlton CE.** 2003. Spring Succession of Necrophilous Insects on Wildlife Carcasses in Louisiana. *Journal of Medical Entomology* **40**, 338–347.
- Weslien J, Djupström LB, Schroeder M, Widenfalk O.** 2011. Long-term priority effects among insects and fungi colonizing decaying wood. *Journal of Animal Ecology* **80**, 1155–1162.
- Wilmers CC, Crabtree RL, Smith DW, Murphy KM, Getz WM.** 2003. Trophic facilitation by introduced top predators: grey wolf subsidies to scavengers in Yellowstone National Park. *Journal of Animal Ecology* **72**, 909–916.
- Wolff M, Uribe A, Ortiz A, Duque P.** 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellin, Colombia. *Forensic Science International* **120**, 53–59.
- Worley I.** 1973. The ‘Black Crust’ Phenomenon in Upper Glacier Bay, Alaska. The ‘Black Crust’ Phenomenon in Upper Glacier Bay, Alaska *in press*.

Young O. 2009. Body Weight and Survival of *Calosoma sayi* (Coleoptera: Carabidae) During Laboratory Feeding Regimes. *Annals of the Entomological Society of America* **101**, 104–112.

Zaidi RH, Jaal Z, Hawkes NJ, Hemingway J, Symondson WOC. 1999. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Molecular Ecology* **8**, 2081–2087.

Zanetti NI, Visciarelli EC, Centeno ND. 2016. The Effect of Temperature and Laboratory Rearing Conditions on the Development of *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Forensic Sciences* **61**, 375–381.

Zhang S–Q, Che L–H, Li Y, Liang D, Pang H. 2018. Evolutionary history of Coleoptera revealed by extensive sampling of genes and species. *NATURE COMMUNICATIONS*, 11.

Zhao T–Y, He L, Xu X, Chen Z–N, Gao Y–Y, Lü L. 2022. The first mitochondrial genome of *Creophilus* Leach and *Platydracus* Thomson (Coleoptera: Staphylinidae: Staphylinini) and phylogenetic implication. *Zootaxa* **5099**, 179–200.