

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Barbora Száková

Metody studia chemické ekologie nekrofágního hmyzu

Methods in chemical ecology of carrion insects

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

Konzultant: Robert Hanus, Ph.D.

Praha, 2019

Čestné prohlášení:

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

V Praze dne 10. 05. 2019

Barbora Száková

Poděkování

Můj vděk patří těm, kteří šíří vědění.

Abstrakt

Nekrofágní hmyz hraje nezastupitelnou roli v koloběhu živin. Mršinu zvládne lokalizovat do několika minut a následně ji kolonizovat s mnohem větší úspěšností, než je tomu u mrchožroutů z podkmene obratlovců. Pro hmyz je k vyhledávání potravy, ale i k dalším aspektům týkajících se přežití, klíčový čich; příslušné receptory se nachází především v tykadlech a v maxilárních palpách. Výzkum percepce chemických signálů se provádí pomocí biotestů, které zkoumají odpověď z hlediska behaviorálního, nebo metodami zaznamenávajícími odezvu živočicha po fyziologické stránce, jako je např. elektroantenografie (EAG). K analýze organických těkavých látek slouží sestava plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS).

Klíčová slova: Nekrobiontní hmyz, olfaktorické receptorové neurony, olfaktorické receptory, organické těkavé látky, bioesej, elektrofyziologie, elektroantenografie

Abstract

Carrion insects have irreplaceable role in nutrient cycle. They are able to locate a carcass within a few minutes and colonize it. Insect's orientation is enabled mainly by smell, primary sensory receptors are placed in antennae and maxillary palps. Perception research of chemical signals is done by biotests, which are testing behavioral responses, or by methods measuring physiological response such as electroantennography (EAG). To analyze volatile organic compounds are used gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS).

Keywords: Carrion insects, olfactory receptors (ORs), volatile organic compounds (VOCs), bioassays, electrophysiology, electroantennography (EAG)

Seznam zkratek

AL – antenální lalok

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

EAG – elektroantenografie

GC-EAD – gas chromatography-electroantennographic detection

GPCRs – G-protein-coupled receptors

GRs – chuťové receptory (gustatory receptors)

HEK – human embryonic kidney

Irs – ionotropní receptory

LH – laterální roh protocerebra (lateral horn)

LN_s – lokální neurony (local neurons)

OBPs – odorant vázající proteiny (odorant-binding proteins)

Orco – olfactory receptor coreceptor

ORN_s (OSN_s) – olfaktorické receptorové (senzorické) neurony

OR_s – čichové receptory (olfactory receptors)

PMI – post mortem interval

PN_s – projekční neurony (projection neurons)

SSR – single sensillum recording

S-VOC_s – sírné organické sloučeniny (sulphur-volatile organic compounds)

VOC_s – organické těkavé látky (volatile organic compounds)

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 2. Nekrobiontní a nekrofágní hmyz | 2 |
| 2.1 Cyklus živin a role mršiny v ekosystému | 2 |
| 2.2 Nekrobiontní a nekrofágní hmyz | 3 |
| 2.3 Procesy spjaté s mršinou | 4 |
| 2.3.1 Stadia rozkladu založená na fyzikálních vlastnostech mršiny | 4 |
| 2.3.2 Sukcesní vlny hmyzu kolonizujícího mršinu | 5 |
| 2.3.3 Profily těkavých látek produkované vertebrátními kadávery..... | 7 |
| 3. Metody vzorkování, izolace a chemické analýzy komplexních těkavých profilů vertebrátních kadáverů | 10 |
| 3.1 Manipulace s kadáverem | 10 |
| 3.2 Vzorkování profilů těkavých látek | 10 |
| 3.2.1 Extrakce pomocí rozpouštědla | 10 |
| 3.2.2 Headspace..... | 10 |
| 3.2.3 Solid-phase microextraction (SPME)..... | 11 |
| 3.2.4 Solid sample injection | 11 |
| 3.3 Analýza těkavých látek..... | 11 |
| 4. Fyziologie čichového smyslového aparátu..... | 12 |
| 4.1 Tykadlo | 12 |
| 4.2 Senzily | 13 |
| 4.3 Olfaktorické neurony a mechanismus olfaktorické dráhy | 15 |
| 4.4 Chemoreceptory..... | 17 |
| 4.4.1 Čichové receptory | 17 |
| 4.4.2 Iontropní receptory | 18 |
| 4.4.3 Gustatorické receptory | 18 |
| 4.5 Ligandy..... | 19 |
| 5. Metody studující biologickou aktivitu těkavých látek vertebrátních kadáverů pro kolonizátory z řad nekrobiontního hmyzu..... | 19 |
| 5.1 Behaviorální..... | 19 |
| 5.2 Elektrofyzilogické | 20 |
| 5.3 Metody užívané k funkční charakteristice hmyzích olfaktorických receptorů..... | 21 |
| 5.4 Role organických těkavých látek u nekrofágního hmyzu | 23 |
| 6. Závěr..... | 24 |

1. Úvod

Živočichové zasahují do okolního prostředí i po své smrti (Lindeman 1942; Tomberline 2017). Jejich mrtvá těla představují obživu pro mikroorganismy, členovce i mnohé obratlovce, jejichž aktivitou je uspíšena recyklace živin z mršiny. Za mršinu (kadáver) se považují všechny recyklovatelné, ale též nezkonzumované zbytky zvířete (Barton 2015). Místa výskytu mršin jsou mnohdy nahodilá, mohou však také podléhat nenáhodným vzorcům a vytvářet pro daný biotop typická ohniska výskytu. Charakteristickým příkladem je kulturní krajina, ve které se mršiny častěji nacházejí podél silnic a jiných dopravních staveb či dalších antropogenních zdrojů mortality, jako jsou vedení vysokého napětí, rozsáhlé prosklené plochy atp. (Forman 1998; Klem Jr et al. 2009). Jelikož je kadáver svou podstatou efemérním zdrojem živin a jeho výskyt je těžce predikovatelný, jsou pro nekrofágní hmyz klíčové behaviorální a smyslové adaptace pro jeho nalezení, jimž jednoznačně dominuje čich, podobně jako je tomu i u většiny ostatního hmyzu (LeBlanc 2009).

Význam chemických smyslů v životě hmyzu je znám po staletí (McIndoo 1914), nicméně až rozvoj metod analytické chemie, hmotnostní spektrometrie, chemické syntézy a na druhé straně též smyslové fyziologie, dal ve druhé polovině 20. století vznik novému, stále relativně mladému oboru chemické ekologie, jehož těžištěm je dodnes právě chemická komunikace hmyzu. Chemická ekologie zkoumá význam chemických smyslů pro orientaci v prostředí a komunikaci s pomocí feromonů jak z akademických, tak z praktických hledisek, zejména u škodlivých nebo naopak člověku prospěšných druhů. Příznačně byl jako první hmyzí feromon popsán Adolfem Butenandtem v roce 1959 bombykol, tj. pohlavní feromon bource morušového (*Bombyx mori*) (Butenandt 1959). Zatímco feromony jsou z definice substancemi využívanými k vnitrodruhové komunikaci, u solitérního hmyzu především k nalezení partnera, organické těkavé látky (VOCs z anglického „volatile organic compounds“) jsou klíčovými stimuly pro orientaci v prostředí v kontextu hledání potravy, hnízdních příležitostí nebo vhodného substrátu pro kladení vajíček.

Nekrobiontní hmyz, který mršinu využívá jako zdroj potravy i jako místo pro rozmnožování, je nápomocen ve forenzním lékařství. Obvykle po více než 72 hodinách není možno soudním lékařem přesně určit stáří mrtvol (Gennard 2012); relativně spolehlivě však lze stanovit dobu úmrtí (post mortem interval, PMI) podle nalezených zástupců hmyzu a jejich vývojových stádií v souvislosti s okolním klimatem, a to i u ostatků starých až tři měsíce. Hmyz

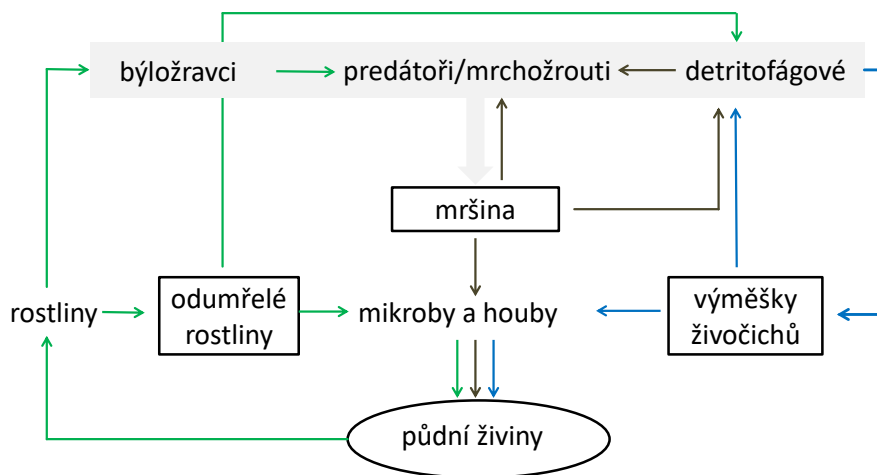
také napoví, zda bylo s tělem po smrti manipulováno či bylo intoxikováno drogami (Goff & Lord 2001; Šuláková 2014). Předmětem forenzní entomologie jsou také občanskoprávní spory, problémy se škůdci či parazity (Gennard 2012; Šuláková 2014).

Kromě forenzního využití má některý nekrobiontní hmyz také medicínský význam. Larvy bzučivek (*Calliphoridae*) sloužily od pradávna k ošetření nezhojených, hnisajících ran, jelikož díky nim dochází k šetrnému odstranění nekrotizující tkáně (Whitaker 2007). Za první světové války s nimi experimentoval William Stevenson Baer, který začal chovat bzučivky ve sterilním prostředí (Sherman 2000). Larvy bzučivky zelené produkují antimikrobiální peptidy – jedním z prvních popsanych a nejdůležitějších je lucifensin, za jehož objevením stojí český tým Čerovský et al. (2010). Zejména kvůli narůstající rezistenci bakterií vůči antibiotikům nachází larvální terapie uplatnění i v dnešní době. Také orální a anální sekrety hrobaříků (*Nicrophorinae*) obsahují antimikrobiální peptidy, výrazně prodlužující trvanlivost mrtvé tkáně, která takto ošetřená a zahrabaná slouží jako potrava jejich potomkům (Hall et al. 2011).

2. Nekrobiontní a nekrofágní hmyz

2.1 Cyklus živin a role mršiny v ekosystému

Mršina je důležitou složkou potravního řetězce pro celou řadu mrchožroutů a detritivorů (Lindeman 1942; Teal 1962). Poskytuje živiny v hojném množství, zato však velice krátkodobě a pomíjivě (Swift et al. 1979; Moore et al. 2004). Přestože jsou zbytky organismů oproti rostlinám v ekosystému v minoritním zastoupení, poskytují více živin než rostlinný detrit (Swift et al. 1979; Gessner et al. 2010; Barton 2013). Klíčové prvky, jako dusík a fosfor (Swift et al. 1979; Moore et al. 2004), jsou tedy dostupnější z těl uhynulých živočichů než z rostlinné hmoty (Parmenter and MacMahon 2009).



Obr. 1: Tok energie a živin v potravním řetězci vázaném na mršinu. Šedě jsou vyznačeny žijící organismy zasahující do ekosystému mršiny. Hnědé šipky znázorňují tok energie a organických látek z mršiny prostřednictvím mrchožroutů a detritivorů, proud živin mikroby a houbami do půdy. Modré šipky ukazují přenos energie žijících živočichů exkrety do detritivorů a mikrobů. Zelené šipky představují tok živin rostlinami (překresleno dle Barton 2013).

Kadáver tvoří v krajině nepravidelně rozmístěné mikrohabitaty (Carter et al. 2007), v nichž probíhají masivní chemické degradační procesy, se kterými se pojí výrazná biologická aktivita (Barton 2013). Nachází se zde široký gradient živin a dochází k rychlé sukcesi organismů. Na tyto hotspots jsou vázáni specialisté napříč všemi říšemi (DeVault 2003; Grassberger 2004, Tibbett & Carter 2008). V temperátním prostředí hmyz však mršinu osidluje ze všech kolonizátorů nejdříve a v nejhojnějším počtu (Byrd 2002).

2.2 Nekrobiontní a nekrofágní hmyz

V tomto prostředí nalézáme **nekrobiontní hmyz**, trávící zde převážnou část života, kam patří **nekrofágní hmyz**, živící se tkání mrtvých živočichů. Dále se na kadáver váží **parazit** či **parazitoidi** nekrofágů (vosičky – Braconidae), **omnivorní druhy** živící se jak nekrotizující tkání, tak i larvami či dospělci nekrofágního hmyzu (Carabidae, Staphylinidae). Příležitostně se mohou na mršině přiživit jiní členovci, kteří nejsou nekrobiontními specialisty, jako pavouci, sekáči a roztoči; mnoho z druhů vyskytujících se na mršinách však nelze striktně zařadit pouze do jedné kategorie (Smith 1986).

Jelikož mršina samotná je v prostředí velmi omezeným zdrojem, objevují se u některých čeledí (například Dermestidae) autoregulační mechanismy, které zabraňují tomu, aby vyhynula celá

mikropopulace larev dříve, než dokončí svůj vývoj v dospělce. Často se proto objevuje kanibalismus při němž jsou méně vyvinuté larvy pozřeny silnějšími, které pak jsou schopné dospět v imaga i za nedostatku živin a vody (Zhantiev 2008).

Oproti tomu například u larev bzučivek (*Lucilia serricata*) je se zvyšující se denzitou a početností populace larev v mršině spojeno snížení mortality a jejich zrychlený vývoj, neboť tak dokáží větší část zdrojů zpracovat dříve, než mršinu kolonizují jiné nekrofágní druhy hmyzu (Scanvion et al 2018).

2.3 Procesy spjaté s mršinou

Na procesy spjaté s mršinou můžeme nahlížet ve třech rovinách, s ohledem na:

- *stadia rozkladu mršiny podle fyzikální vlastnosti*
- *sukcesní vlny hmyzu kolonizujícího mršinu*
- *měnících se profilů těkavých látek produkovaných mršinou*

2.3.1 Stadia rozkladu založená na fyzikálních vlastnostech mršiny

Pro zjednodušení se rozklad mršiny člení do několika fází, které rozpracoval například Payne (1965) či Carter et al. (2007). Tím je však do značné míry zanedbán fakt, že dekompozice je kontinuální proces, kde záleží na fyzickém stavu jedince a okolním prostředí a nelze přesně ohraničit jednotlivé fáze (Carter & Tibbett 2008). Nejčastěji používaná je následující klasifikace dle Reeda (1958), založená na fyzikálních vlastnostech:

Čerstvá mršina (fresh stage): Do pár minut po smrti, snížení tělesné teploty, autolýza způsobená nekontrolovanou aktivitou enzymů, lehké nadmutí, nálet prvního hmyzu.

Nadmutá mršina (bloated stage): Aktivita anaerobních bakterií přítomných v trávicí soustavě, tvorba metanu a dalších nízkomolekulárních plynů.

Zahnívání (decay stage): Nastává po úniku plynů, suchá porušená kůže, opad chlupů a vlasů způsoben aktivitou larev, aerobní rozklad, zvýšená teplota těla dosahuje největšího teplotního rozdílu oproti vnějšímu prostředí.

a) *aktivní hnití (active decay)*: Nejvyšší teplota těla a ztráta hmotnosti.

b) *pokročilé hnití (advanced decay)*: Dehydratace, pokles teploty, výrazný zápach.

Vysychání (dry stage): Zbývají pouze pevné tkáně jako kosti, chrupavky, zuby, kůže a její deriváty.

2.3.2 Sukcesní vlny hmyzu kolonizujícího mršinu

Při absenci vertebrálních mrchožroutů kolonizuje hmyz mršinu v sukcesních vlnách. Sukcesní vlny hmyzu se řídí profily těkavých látek uvolňujících se z mršiny, dle Daňka (1990) a Šulákové (2014) se rozeznává 6 – 8 sukcesních vln v závislosti na okolních podmínkách.

První sukcesní vlna – čerstvá mršina

Ohledně po úmrtí dochází k zastavení krevního oběhu (Benbow 2015). Už v této fázi přilétají na tělo pionýrské druhy s rychlou disperzí, jako jsou mouchy – Phoridae, Muscidae, Calliphoridae (Payne 1965; Scott 1998, Reibe & Madea 2010), atrahovány pachem potu a krve. Ihned kladou vajíčka, často ještě na živé, bezbranné živočichy, a to na sliznice kolem očí a jiných tělesných dutin (Leccese 2004; Šuláková 2014). Také se objevují vosy a mravenci (Šuláková 2014).

Druhá sukcesní vlna – nadmutí mršiny

Činností bakterií přítomných v trávicím traktu vznikají plyny nadouvající mršinu. Ty lákají mouchy z čeledi Sarcophagidae (Šuláková 2014). Z brouků přicházejí zástupci z čeledi Silphidae mající význam i z kriminalistického hlediska. V dospělosti se živí jak mrtvou tkání, tak i dravě (Byrd 2002). Čeleď Silphidae je známa pohřbíváním drobných obratlovců nebo částí mršiny v rámci rodičovské péče (Milne & Milne 1976). Jen málo je prozkoumána čeleď Staphylinidae, vyskytující se na sušších ostatcích. Dospělci se živí dravě především larvami much, zatímco larvy drabčků jsou atrahovány navíc i rozkládající se tkání. V důsledku nenápadného vzhledu, skrývání se v trhlinách kůže i díky obratnému letu jsou však obtížně nalezitelní (Byrd 2002). Objevit se mohou i střevlíci (Carabidae) a další omnivorní hmyz.

Třetí sukcesní vlna – fermentace tuků (zmýdelnění)

Biochemicky aktivní začíná být kadáver saponifikací tuků. Tvoří se mastné kyseliny, především kyselina máselná, která přitahuje mouchy rodu *Hydrotaea* (Šuláková 2014). Z dravých brouků nastupují zástupci čeledi Histeridae (Klimešová et al. 2015 podle Daňka 1990).

Čtvrtá sukcesní vlna – fermentace proteinů („sýrová fermentace“)

Fermentací proteinů se tvoří kaseózní látky pachem připomínající přezrálý sýr. Na ně reagují mnozí zástupci hmyzu, zejména sýrohloďky (Piophilidae), slunilkovití (Faniidae), kmitalkovití (Sepsidae) a rod *Drosophila* (Šuláková 2017). Zároveň dochází k úbytku měkkých tkání, což vede ke snížení počtu nekrofágních druhů i jejich jedinců. V loži mrtvoly probíhají vývojové cykly některých much a brouků (Klimešová et al. 2015). Za vysokých teplot probíhají tyto dva typy fermentace simultánně na různých částech těla (Šuláková 2017).

Pátá sukcesní vlna – pokročilý rozklad mršiny (čpavková fermentace)

V pozdních fázích rozkladu byli nalezeni střevlící (Carabidae), živící se larvami bzučivek (Chapman and Sankey, 1955; Anderson and VanLaerhoven, 1996). Na rozkladu se podílejí i draví mršníci (Histeridae) (Fuller, 1934; Bornemissza, 1957; Johnson, 1975; Rodriguez and Bass, 1983; Avila & Goff, 1998).

V pokročilém rozkladu se z těla uvolňuje amoniak lákající hrbilky (Phoridae). Nakyslý zápach spojený s kaseózními látkami láká kožojedy (Dermestidae) a pestrokrovečnický (Cleridae), nalézt lze i lesknáčky (Nitidulidae) (Šuláková 2017).

Šestá sukcesní vlna – vysychání zbytků měkkých tkání

V této fázi rozkladu neposkytuje kadáver dostatek potravy nekrofágům. Zbytky měkkých tkání, jako je kůže, svalovina, šlachy, chrupavky a dermální deriváty, okupují kožojedy (Dermestidae) a čeleď Trogidae (Kočárek 2002; Schroeder & Püschel 2002; Grassberg & Frank 2004), pestrokrovečníci (Cleridae) (Bornemissza, 1957; Grassberger and Frank, 2004) a švábi (Denic et al., 1997; Archer, 2002).

Sedmá a osmá sukcesní vlna – kosterní zbytky

Kostní dřev je zdrojem proteinů pro roztoče, kteří narušují kostní tkáň a urychlují tak rozpad kostry (Klimešová et al. 2015). Případné nezkonsumované zbytky vysušených chrupavek, vlasů, peří nebo rohoviny jsou významné jako potrava pro vrtavcovité (Anobiidae: Ptininae) a pro stále přibývající roztoče. V uzavřených prostorech se objevují skladištní škůdci

jako moli z čeledi Tineidae a kožojedi. V terminálním stadiu rozkladu ubývá počet kolonizátorů. Neúživné ostatky mohou sloužit k úkrytu drabčíkovitým (Joseph et al. 2011; Klimešová et al. 2015; Šuláková 2017).

Přehled členovců kolonizujících mršinu v souvislosti s fází rozkladu:

| fáze rozkladu | hlavní kolonizátoři mršiny |
|----------------------|--|
| čerstvá mršina | Calliphoridae, Formicidae, Muscidae, Phoridae, Vespoidea |
| nadmutí | Carabidae, Sarcophagidae, Silphidae, Staphylinidae |
| zmýdelnění tuků | Cleridae, Histeridae, Staphylinidae |
| fermentace proteinů | Carabidae, Drosophilidae, Faniidae, Histeridae, Hydrotaea, Piophilidae, Sepsidae |
| čpavková fermentace | Cleridae, Dermestidae, Faniidae, Nitidulidae, Phoridae, Piophilidae, Sepsidae |
| vysychání | Acari, Blattodea, Cleridae, Dermestidae, Trogidae |
| kosterní zbytky | Acari, Anobiidae, Dermestidae, Tineidae |

2.3.3 Profily těkavých látek produkované vertebrátními kadávery

Mršina je dynamickou soustavou uvolňující do okolí organické těkavé látky (VOCs). Takovými látkami se míní sloučeniny organického původu sublimující při běžné pokojové teplotě. Každá fáze rozkladu se ve svém těkavém profilu liší, lze je klasifikovat do tří vln:

- *autolýza*
- *hnutí*
- *diageneze (rozpad kostí)*

Autolýza

Zastavením krevního oběhu dochází ke snížení koncentrace kyslíku a koncentrace CO₂ narůstá, čímž klesá intracelulární hodnota pH. Aktivita enzymů (proteáz, lipáz, karbohydráz) přestává být regulována a dochází k narušení kohezivitu buněk. Uvolněné nutrienty jsou tak volně dostupné bakteriím. Teplota těla se přizpůsobuje okolní teplotě – algor mortis, sražená krev tvoří na těle mapy – livor mortis (Vass 2001; Carter et al 2007; Gennard 2012). Posmrtná

ztuhlost – rigor mortis – nastává vyčerpáním zásob ATP, kdy unikají vápenaté ionty ze sarkoplazmatického retikula (Štefan & Mach 2005).

Hnití

Hniloba se projevuje nazelenalým zbarvením kůže v důsledku tvořícího se sulfhemoglobinu. Mikroorganismy, tedy bakterie (převážně *Clostridium* a *Bacterioides*), houby a prvoci, narušují měkké tkáně a katabolickými reakcemi vznikají plyny, mrtvolné tekutiny a další jednodušší molekuly. Anaerobní fermentací se z trávicího traktu uvolňují látky obsahující těkavé mastné kyseliny, jako kyselina máselná a propionová. Vznikající plyny (hydrogensulfidy, metan, amoniak, sulfan, vodík, CO₂) způsobují nafouknutí těla a trhliny v kůži (Vass 2001; Gennard 2012). Rozkladem lipidů a proteinů se tvoří glycerol a fenoly (Vass 2001).

Ve vlhkém teplém prostředí dochází při zásaditém pH hydrolyzou tuku k saponifikaci mršiny. V příhodných podmínkách se ze vznikajících mastných kyselin aktivitou anaerobních bakterií (*Clostridium*) formuje adipocer, mrtvolný vosk (Vass 2001; Forbes et al. 2005) umožňující zachovat ostatky na řadu let (Fiedler & Graw 2003).

Diageneze

Během diageneze se rozkládají organické látky, jako je kolagen, a anorganické látky – vápník, hořčík, hydroxyapatit. Vlivem vlhkosti a aktivitou roztočů dochází k narušení struktury a tím i k rozpadu kostry.

Problematika členění fází rozkladu mršiny je velice komplexní – proces dekompozice nelze striktně vymezit na jednotlivé fáze, ty se naopak mohou překrývat a v některých případech nemusí k určitým procesům dojít vůbec (Vass 2001; Šuláková 2014). Objevuje se i názor, že by bylo exaktní rozklad dělit na preskeletonizaci a postskeletonizaci (Vass 2001).

Základními stavebními složkami savčích těl jsou proteiny, lipidy, sacharidy a minerály. Při studiu těkavých látek kadáverů je nutno zohlednit faktory jako velikost těla, hustota ochlupení a šíře kůže (Vass 2008; Dautartas 2018). Vliv na zastoupení těkavých látek má i hloubka pohřbení těla, dále složení, vlhkost a pH půdy spolu s mikrobionty.

Samo lidské tělo je tvořeno přibližně z 64 % vody, 20 % proteinů, 10 % tuku, 5 % minerálů a 1 % sacharidů (Janaway et al. 2009). Vass et al. při analýze těkavých profilů pohřbených lidských těl zachytil během čtyř let měření 478 specifických látek (Vass et al. 2008).

Přehled hlavních těkavých látek produkovaných vertebrálními kadávery

| Skupina sloučenin | 1. den | 3. den | 1 týden | 2 týdny | 3 týdny |
|--------------------------------------|--|--|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Kyseliny | propionová máselná kapronová | propionová máselná kapronová | | | |
| Sulfidy | | | dimetyldisulfid | dimetyldisulfid sirouhlík | dimetyldisulfid sirouhlík |
| Ketony, alkoholy | 2-butanon 1-pentanol 2-methylbutanol | 2-butanon 1-pentanol 2-methylbutanol | cyklohexanon | cyklohexanon ethylalkohol | cyklohexanon ethylalkohol |
| Estery, aldehydy | ethylester kys. kapronové benzaldehyd 1-oktanal | ethylester kys. kapronové benzaldehyd 1-oktanal | heptanal nonanal | heptanal nonanal acetaldehyd | heptanal nonanal acetaldehyd |
| Uhlovodíky | tetrachloroethylen | tetrachloroethylen | toluen dekan hexan | hexan | hexan |
| Aromatické heterocyklické sloučeniny | indol | indol | | | |

Tab. 1: Krev (podle Rendine et al. 2019)

| Skupina sloučenin | Hlavní organické těkavé látky |
|----------------------|---|
| Cyklické uhlovodíky | dimethylbenzen, ethylbenzen, toluen, styren, methylethylbenzen (kumen), benzen |
| Acyklické uhl. | heptan, methylpentan, undekan |
| Dusíkaté sloučeniny | methenamin (urotropin), benzonitril |
| Sírné sloučeniny | oxid siřičitý, sirouhlík, benzothiazol, dimethylhexan, S-S-dioxid, dimethyltrisulfid, dimetyldisulfid |
| Kyseliny/estery | kyselina palmitová, methylester |
| Kyslíkaté sloučeniny | dekanal, benzenmethanol, hexanol, ethylbenzaldehyd, nonanal, benzen, propanon |
| Halogeny | chloroform, trichlorethen, dichlorodifluoroethan, trichloroethan, tetrachlormethan |
| Ostatní sloučeniny | methylnaftalen, naftalen |

Tab. 2: Hlavní organické těkavé látky detekované na povrchu ročních mrtvých těl (Vass et al. 2004)

3. Metody vzorkování, izolace a chemické analýzy komplexních těkavých profilů vertebrálních kadáverů

3.1 Manipulace s kadáverem

K pozorování mršiny se volí nejčastěji obratlovci jako prase (*Sus scrofa*), králík (*Oryctolagus cuniculus*), pes nebo kur domácí (*Gallus gallus f. domestica L.*) (Reed 1958; Šuláková 2014; Dautartas 2018). Zvířata bývají usmrcena veterinárním lékařem a před uložením ponechána v chladu, aby došlo ke sjednocení teploty těl (Dautartas 2018). Zamrazení kadáveru má vliv na způsob rozkladu a na počet kolonizujících jedinců, ne však na procentuální zastoupení jednotlivých druhů (Šuláková 2014). K zabránění přístupu obratlovců se těla umisťují do drátěných klecí (Dautartas 2018).

3.2 Vzorkování profilů těkavých látek

Pro chemickou analýzu je zapotřebí získat vhodný vzorek látky, který obsahuje co nejméně nežádoucích příměsí. K tomu slouží různé vzorkovací metody, u nichž se klade důraz na jednoduché a opakovatelné použití, zároveň však musí být dostatečně citlivé na to, aby zachytily všechny složky těkavých profilů (Millar & Sims 1998; Kumar & Viden 2007).

3.2.1 Extrakce pomocí rozpouštědla

Touto běžnou metodou jsou získávány vzorky široké škály látek, nejen VOCs. Princip spočívá v rozpuštění vzorku v solventu. Nevýhodou je nízká selektivita solventu, proto takto připravené vzorky často obsahují spoustu příměsí dalších látek, které zanáší analytické přístroje. Proto je také vyžadováno postup frakcionizace několikrát zopakovat pro úplné očištění od nežádoucích látek (Millar & Sims 1998).

3.2.2 Headspace

Technika headspace je vhodná pro zachytávání těkavých a částečně těkavých látek při neměnných podmínkách. Uspořádání headspace může být statické nebo dynamické dynamické (Millar & Sims 1998). Při statické metodě se vzorkuje na vhodný sorbent (typicky aktivní uhlí)

sloupec vzduchu nad vzorkovaným objektem, případně je odebírána přímo plynná fáze vzduchotěsnou stříkačkou. Velmi oblíbenou metodou je mikroextrakce na pevnou fázi, kdy je sorpčním materiálem tzv. SPME vlákno (solid phase microextraction), jež může být vybaveno různým sorpčním materiálem a svou velikostí umožňuje jednak vzorkování plynné fáze nad relativně malými objekty a zároveň přímou desorpci analytů ve vstupu plynového chromatografu (GC). Dynamický headspace představuje takové uzavřené uspořádání, ve kterém jsou ze vzorkovaného objektu VOCs unášeny aktivně cirkulujícím předčištěným vzduchem a akumulují se na sorbentu (Millar & Sims 1998; Kumar & Viden 2007; Hoffman et al. 2009).

3.2.3 Solid-phase microextraction (SPME)

Princip mikroextrakce pevné fáze spočívá v použití vlákna potaženého extrakční fází – kapalinou (polymerem) nebo pevnou látkou (sorbentem). Extrakty mohou být tekuté či plynné fázi. Takový vzorek je připraven pro analýzu pomocí plynové chromatografie (GC) a hmotnostní spektrometrie (MS) (Millar & Sims 1998; Spietelun et al. 2010).

3.2.4 Solid sample injection

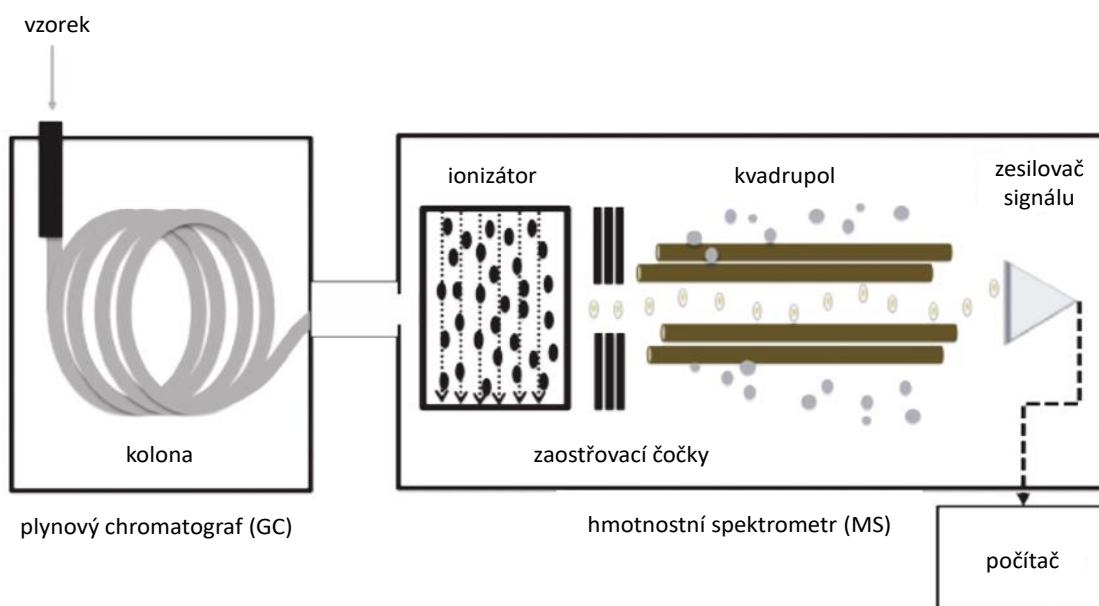
Tato metoda je svázaná s plynovou chromatografií. Umožňuje získat vzorek o malém objemu, například z feromonové žlázy. Takový vzorek je uzavřen v kapiláře a následně vpraven do GC. Nevýhodou je jednorázové použití každého vzorku.

3.3 Analýza těkavých látek

Připravené vzorky je potřeba nejprve očistit od nežádoucích příměsí a poté rozdělit pomocí separačních technik. Extrakty mohou být frakcionizovány na základě těkavosti, polarity, reaktivity nebo podle velikosti molekul (Millar & Sims 1998).

Pro analýzu těkavých látek se používá metoda plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). V této soustavě dochází k rozdělení plynných fází těkavých látek na jednotlivé složky na základě fyzikálně chemických vlastností (zejména bod varu a polarity) vlastností v závislosti na retenčním čase látky, vlastnostech chromatografické kolony a

použitím teplotního programu. V následujícím kroku pak separované analyty prodělají ionizaci a fragmentaci a hmota jednotlivých fragmentů molekul je pak stanovena hmotnostním spektrometrem (Millar & Sims 1998; Kumar & Viden 2007



Obr. 2: Sestava plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru (upraveno podle Nature Publishing Group)

4. Fyziologie čichového smyslového aparátu

4.1 Tykadlo

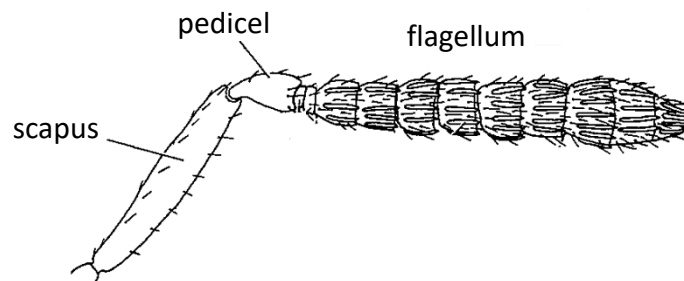
Primárními nositeli chemických smyslů jsou tykadla a maxilární palpy (makadla), nicméně specializované oblasti s chuťovou/čichovou percepcí lze nalézt i na dalších tělních přívěscích, jako např. na kladélku či nohou. Tykadla a makadla jsou párové hlavové přívěsky opatřené senzily, orgány pro percepci chemických látek skrze čich a chuť, dále umožňují percepci hmatovou, vnímání vlhkosti vzduchu, tepla a u některých zástupců také koncentraci CO₂ (Keil 1999). Klíčovým pro vnímání čichu jsou olfaktorické (čichové) receptory (viz členění níže). Nejstarší dochované tykadlo pochází z pragianu, spodního devonu, nalezené u chvostoskoka *Rhyniella praecursor* (Entognatha). S ohlednutím na bazální terestrické členovce, kteří mají tykadla díky vnitřním svalům velice flexibilní, avšak disponující malým počtem senzil a tudíž i slabou chemorepcí, se má za to, že tykadla nejspíše sloužila k vnímání mechanických podnětů (Schneider 1964). U nejbližších příbuzných hmyzu, tedy korýšů, olfaktorické

receptory nenalezneme, vyvinuly se pravděpodobně jako adaptace pro přechod hmyzích předků na souš (Missbach et al. 2014). Bilaterální uspořádání tykadel umožňuje orientaci ke zdroji VOCs (Wolf & Wehner 2000). Přestože makadla disponují značným množstvím ORs, nevěnuje se jim taková pozornost, jako tykadlům (Hansson & Stensmyr 2011).

Apterní hmyz s výjimkou řádu Protura, u nějž senzoricou funkci zajišťuje první pár nohou, má tykadla až na distální konce homonomně segmentovaná (Schneider 1964).

Tykadla adultních Pterygot jsou flagelátní a u některých druhů větvená, čímž je značně zvětšena jejich plocha (Schneider 1964). Sestávají z bazálního scapu, upevněného k hlavové kapsli, na nějž nasedá pedicel. V pedicelu se nachází Johnstonův orgán umožňující především orientaci v prostoru.

Třetí a zároveň poslední část tykadla se nazývá bičík (flagellum), na jehož člancích se nacházejí čichové a chuťové orgány, v případě čichu tedy olfaktorické senzily.

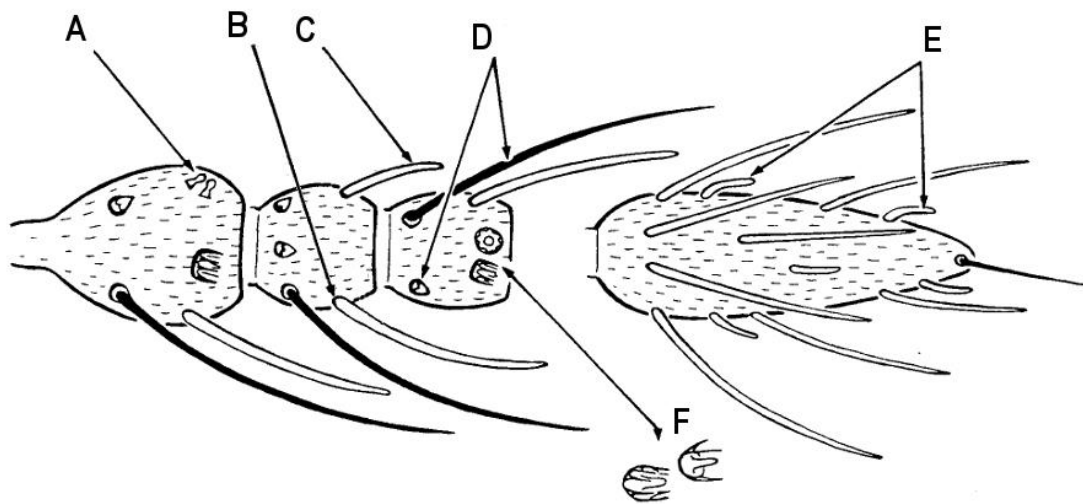


Obr. 3: Schéma lomeného tykadla Hymenoptera (Noyes & Valentine 1989; and Gauld 1984)

4.2 Senzily

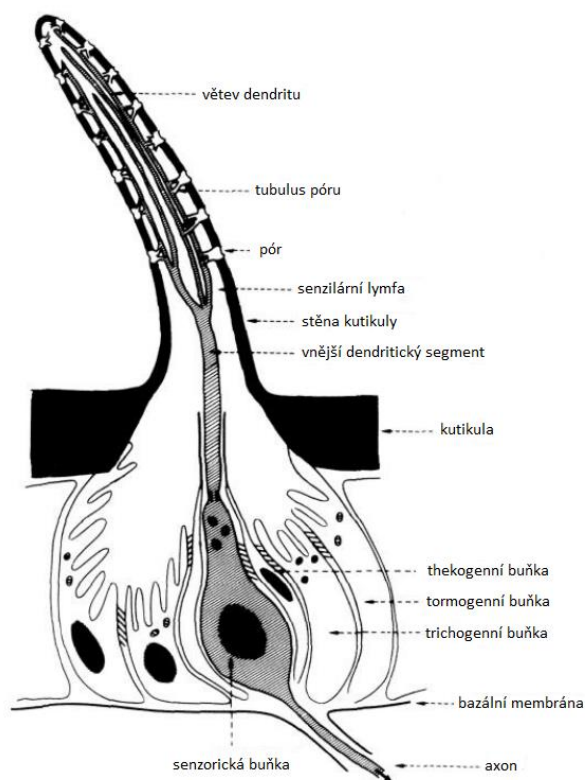
Senzily, smyslové orgány čichových a chuťových smyslů, ale též mechanorecepce a hygrorecepce, jsou kutikulární útvary nabývající různých struktur – od vláskovitých po destičkovité. Vlaskovité či chloupkovité senzily (sensillum trichoideum) jsou nejčastějšími typy olfaktorických senzíl a sestávají z vlastní sítě, artikulačního aparátu a dvou typů buněk – receptorových a ochranných. Vlasovité výběžky olfaktorických senzíl jsou opatřeny póry, přes které prostupují těkavé látky do senzilární lymfy (Steinbrecht 1997). Senzilární lymfa obsahuje množství odoranty vázajících proteinů (OBPs, odorant-binding proteins) umožňujících zachytit

molekuly VOCs, které typicky jsou hydrofobní (Vogt & Riddiford 1981). OBPs jsou produkovány ve velkém zastoupení podpůrnými buňkami a vykazují vazebnou specifitu (Swarup et al. 2011). Hlavní funkcí OBPs je transport těkavých hydrofobních ligandů senzilární lymfou k příslušným receptorům. OBPs patří do vysoce konzervované genové rodiny, avšak vykazují značnou sekvenční diverzitu a mohou hrát roli i v druhovém rozrůznění (Vieira & Rozas 2007 et al. 2011).



Obr. 3: Typy senzil. A: Čípkovitá zapuštěná hlouběji, až pod úroveň kutikuly (sensillum ampullaceum) sloužící především jako chemoreceptor. B: Vlásokovitá a C: chloupkovitá (sensillum trichoideum) sloužící k mechanorepci a chemorepci – často pro vnímání feromonů. D: Dlouhá tenká (sensillum chaeticum) sloužící většinou k mechanorepci. E: Čípkovitá (sensillum basiconicum) sloužící jako chemoreceptor, obvykle pro stopování potravy. F: Čípkovitá senzila zapuštěná mělce do kutikuly (sensillum coeloconicum) (podle iikculicoides.net)

Senzilami procházejí dendrity jednoho či několika olfaktorických receptorových neuronů (ORNs, někdy OSNs – olfactory sensory neurons), bazikónické senzily hostí až 50 ORNs (Ochieng et al. 1998).



Obr. 4: Organizace olfaktorické trichogenní senzily (upraveno podle Masson & Mustaparta 1990).

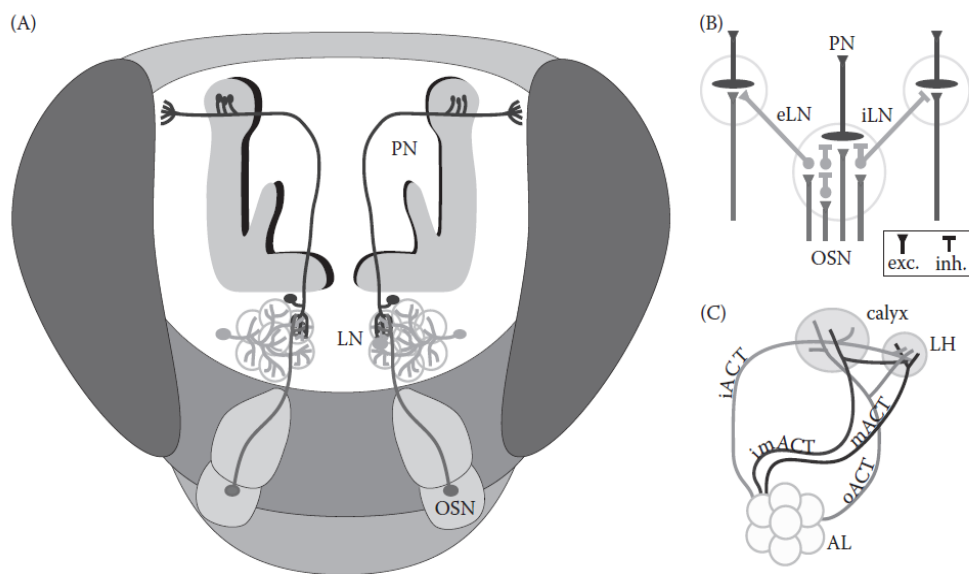
4.3 Olfaktorické neurony a mechanismus olfaktorické dráhy

Axony ORNs konkrétního typu olfaktorického receptoru se promítají na určitou oblast antenálního laloku (AL, analog čichového bulbu obratlovců) zvanou glomerulus. Ten sestává z několika axonů ORN spojených s dendrity projekčních neuronů – PNs. PN inervuje obvykle jeden glomerulus a nese čichový signál z antenálního laloku do vyšších mozkových center, jakými je houbovitě tělísko nebo postranní roh protocerebra. Odtud putuje signál do podjícnového ganglia (Strausfeld & Hildebrand 1999; Pask & Ray 2016).

Každý ORN nese na své membráně zpravidla jeden typ olfaktorického receptoru, přestože je možná koexprese dvou receptorů na jediném neuronu (Goldman et al. 2005).

ORs jsou spřažené s G proteiny (GPCRs) a mají sedm transmembránových motivů (Dixon et al. 1986; Dhallan et al. 1991; Benton et al. 2006). K depolarizaci ORNs dochází navázáním odorantu (prvního posla) na receptor a stimulací G proteinu, která vede k aktivaci adenylátcyklázy. Tento enzym intracelulárně zvýší koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu – cAMP (druhého posla), čímž dojde k otevření iontových kanálů (Firestein et al 1991). Otevření a zavření těchto kanálů je řízeno napětově – při klidové hodnotě

membránového potenciálu jsou zavřeny a k otevření dochází po dosažení určité prahové hodnoty membránového potenciálu. Při depolarizaci membrány, kdy dochází k otevření kanálů, dochází k zvýšení intracelulární koncentrace sodných kationtů. Vyvolaná změna elektrochemického gradientu vede ke vzniku akčního potenciálu a otevření dalších kanálů, které vedou elektrický vzruch. Po transpolarizaci se iontové kanály uzavírají, kationty sodíku jsou transportovány do extracelulárního prostoru. Aktivací draselných kanálů se membránový potenciál ustálí na klidovou hodnotu (Kaissling 1986; Firestein et al. 1991; Stengl et al. 1992).



Obr. 6: Olfaktorický systém octomilky, *Drosophila melanogaster*. (A) Schéma hlavy s otevřeným mozkem. ORNs se nacházejí na tykadlech a promítají se do antenálního laloku, kde interagují s lokálními neurony (LN) spojeny synapsí s projekčními neurony (PN). (B) Schéma synapsí ukazující připojení ke glomerulu, kde ORNs jsou v přímém kontaktu s PNs nebo nepřímo prostřednictvím LNs, které mohou být inhibiční nebo excitační a spojují se buď v glomerulu nebo napříč glomerulem. (C) Pohled na jednu hemisféru (středová čára vlevo) se 4 PN úseky, které spojují antenální lalok (AL) s kalichem houbovitého tělíska a postranní roh (LH) (převzato z Galizia & Sachse 2010).

4.4 Chemoreceptory

Chemopercepce je zprostředkována diverzifikovanou skupinou chemoreceptorů, na které se váží příslušné molekuly (ligandy):

- čichové receptory (*odorant/olfactory receptors – ORs*)
- ionotropní receptory (*IRs*)
- gustatorické (chuťové) receptory (*GRs*)

Příjem plyných látek umožňují ORs a IRs, GRs detekují molekuly obsažené v roztocích a také přítomnost CO₂.

4.4.1 Čichové receptory

ORs představují nejprobádanější skupinu chemoreceptorů. Je to unikátní a také nejvíce diverzifikovaná skupina receptorů v rámci hmyzu (Vosshall et al. 1999; Pask & Ray 2016). Nejvíce se jich nachází v tykadlech a palpách; byly však nalezeny i v sosáku nebo na spermatozoidech komárů (Kwon et al. 2009; Pitts et al. 2014). První gen kódující OR byl nalezen u octomilky *Drosophila melanogaster* v rámci genomového sekvenování v roce 1999. Fylogenetické analýzy naznačují původ OR v rodině gustatorických receptorů (Robertson et al. 2003).

D. melanogaster má 62 ORs, tento počet je však napříč druhy hmyzu velmi variabilní, jejich diverzifikace a velká evoluční plasticita je základem pro ekologickou a v důsledku i druhovou diverzifikaci hmyzu. Funkce ORs je zajištěna heteromerní vazbou pro ligand specifického OR a koreceptoru – Orco, vzdáleně příbuznému Gr (Robertson et al. 2003; Wicher et al. 2008 & 2015). Orco (Or83b u *D. melanogaster*) se chová jako chaperon a jeví se nezbytným k lokalizaci ORs k membráně ORNs, čímž se podílí na přenosu signálu (Larsson et al. 2004). Orco je exprimováno oproti dalším ORs ve větším zastoupení (Vosshall 2000; Larsson et al. 2004; Jones et al. 2005; Mitchell et al. 2012). Zatímco Orco je napříč třídou hmyzu konzervovaný, sekvence genů OR bývají specifické a divergentní a nevykazují tedy blízké orthology (Krieger et al. 2003; Benton et al. 2006; Hansson & Stensmyr 2011).

4.4.2 Iontropní receptory

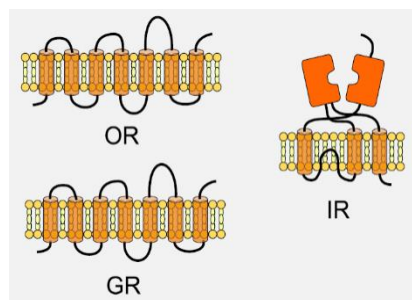
V tykadlech *Drosophily* byly objeveny neurony, které neexprimují ORs ani GRs a vykazují odpověď k určitým kyselinám, aminům, aldehydům či vlhkosti a tedy by se mohlo jednat o samostatnou skupinu chemoreceptorů (Yao et al. 2005). Byly nalezeny v čípkovité senzile (sensillum coeloconicum) a dalších částech tykadla *Drosophily* a pojmenovány jako ionotropní receptory – IRs (Benton et al. 2009). Oproti ORs jsou tyto receptory exprimovány příslušnými ORNs ve větším počtu (Benton et al. 2009).

IRs jsou rozšířením ionotropních glutamátových receptorů (iGluRs), které se nacházejí u členovců, hlístů a měkkýšů. Většina genů však pozbývá konzervovaných zbytků glutamátových vazeb a uvažuje se o jejich původu u prokaryot (Benton et al. 2009; Pask & Ray 2016).

4.4.3 Gustatorické receptory

Hmyz, obvláště mouchy, se vyznačují chuťovými receptory s širokou disperzí, čímž mohou takto poznávat chemické látky bez přímého kontaktu ústního ústrojí. *Drosophila melanogaster* má GRs rozšířeny napříč spoustou tělních přívěsků včetně tarsů a křídel. Oproti olfaktorickým senzilám jsou senzily GRs kratší a zašpicatělé, které dokáží lépe proniknout do roztoku (Amrein 2016).

Oxid uhličitý může na hmyz působit dvěma odlišnými způsoby – buďto je přitahuje, jako je tomu u mnohých hematofágů (komáři, štěnice) nebo je odpuzuje – *D. melanogaster* (Dekker et al. 2005).



Obr. 5: Struktura tří typů chemoreceptorů hmyzu a jejich ukotvení v membránách chemoreceptorových neuronů (Hansson & Stensmyr 2011).

4.5 Ligandy

Na ORs se váží příslušné organické těkavé látky, ligandy. Odpověď ORNs závisí i na koncentraci těchto látek. Při vystavení receptoru výrazně zvýšené míře odorantu lze získat odpověď ve většině ORNs. Proto je koncentrace ligandu klíčová (Hansson & Stensmyr 2011). Kromě atraktantů existuje také škála látek, pro které hmyz vykazuje zcela opačnou odpověď a fungují tedy jako repelenty – například hexenol linoucí se z nezralého ovoce či methylfenol produkovaný savci odpuzuje určité druhy zlatohlávků (Larsson et al. 2003; Bengtsson et al. 2009).

5. Metody studující biologickou aktivitu těkavých látek vertebrálních kadaverů pro kolonizátory z řad nekrobionního hmyzu

5.1 Behaviorální

Biotesty

K biotestům (bioesejím) se využívá živých živočichů, u kterých se sleduje jejich preference směru pohybu vůči zdroji těkavých látek. Provádějí se v uzavřených soustavách, ve kterých je uhlíkovými filtry pročištěn vzduch (Hare 1998).

Založené na proudícím vzduchu

- olfaktometry
- větrné tunely

Obě tato zařízení jsou založena na podobném principu. Olfaktometr je soustavou ve tvaru T či Y, kde jedno z těchto navzájem separovaných ramen je zdrojem odorantu, druhé rameno je kontrolní a proudí jím tedy čistý vzduch. V olfaktometru se častěji sleduje preference volby směru a hodnota vzdálenosti živočicha. Větrné tunely jsou vhodné pro létající živočichy (Hare 1998).

Prováděné v nehybném vzduchu

Používají se k demonstraci atrakce (orientované pohyby ke zdroji VOCs) nebo odporu (repelenty) (Dethier et al. 1960). K takové studii postačí Petriho miska a zdroj těkavých látek, které jsou obvykle nanесeny na kosek filtračního papíru či buničiny. Tento postup je vhodné provádět u nelétavých zástupců. Problém nastává při vystavení živočicha látce s velkou těkavostí, která zakrátko zaplní celý experimentální prostor a tím pádem je eliminován gradient postupu těkavých látek, na který by hmyz měl reagovat. Na stejném principu použití návnady jsou založeny lapací pasti (Hare 1998).

5.2 Elektrofyziologické

Technikami umožňujícími získat reakci olfaktorického systému hmyzu na chemický stimul je *elektroantenografie*, kde je měřen elektrický vzruch po celém tykadle, a měření jednotlivé sensily – *SSR (single sensillum recording)*.

SSR podává informaci o akčním potenciálu z jediné sensily, odpovědi nabývají charakteru ANO/NE a umožňuje přesně lokalizovat jednotlivé sensily exprimující konkrétní ORs pro studované těkavé stimuly (Olsson & Hansson 2013).

Elektroantenogram a GC-EAD

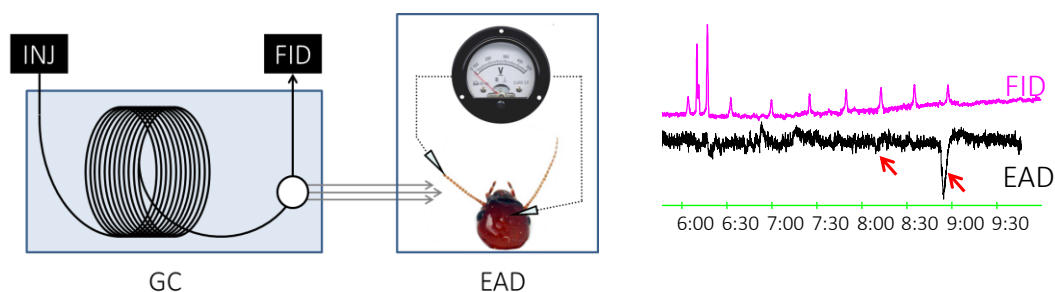
Základy elektroantenografie položil Dietrich Schneider, který u samců bource morušového (*Bombyx mori*) testoval jejich reakci na samičí sexuální feromon, bombykol (Schneider 1957). Princip elektroantenografie spočívá v napojení proximálního a distálního konce tykadla k vodivým elektrodám za pomoci skleněných kapilár obsahujících fyziologický solný roztok. Zapojené tykadlo je následně vystaveno proudu vzduchu (efluentu) obsahující zkoumanou látku, jakou může být určitá těkavá látka nebo feromon.

EAG představuje sumu akčních potenciálů na membráně ORNs (Roelofs 1984). Fyziologická odpověď je chápána jako změna elektrického potenciálu na membráně ORNs, která se v antenografu projeví jako snížení elektrického odporu, viz níže. Základní sestava EAG je tvořena z vodivých kovových elektrod, zesilovače elektrického napětí, vibrace tlumící podložky, Faradayovy klece a mikroskopu umožňujícího pracovat na delší vzdálenost (Olsson

& Hansson 2013). Tato metoda se uplatňuje například při identifikaci feromonů a VOCs hostitelských rostlin (Masson & Mustaparta 1990).

Pro efektivnější identifikaci ligandů se využívá soustava elektroantenografického detektoru a plynového chromatografu (GC-EAD), kde v koloně GC dochází vlivem zvýšené teploty k rozdělení jednotlivých frakcí těkavých látek, které jsou kontinuálně uvolňovány na tykadlo či senzilu. Vzorek studované látky je uvolněn do rozpouštědla obsahujícího uhlovodíky, obvykle alkany o známém počtu uhlíků ve svém řetězci. Podle nich je možné se v antenografu orientovat (Masson & Mustaparta 1990 dle Arn et al. 1975).

Výše zmíněnými metodami lze změřit elektrické impulzy vně buňky. Boeckh (1962) rozšířil metody získávání odpovědí Ors pomocí wolframového vlákna. Vlákno proniknutivší stěnou senzily je tak přímo v kontaktu senzilární lymfy s elektrodou. Díky této technice lze měřit změnu elektrického potenciálu i u takových struktur, jako jsou krátké trichoidní senzily či deskovité póry a jiné planární struktury (Masson & Mustaparta 1990).



Obr. 6: Systém – EAD. Vzorek sledované látky spolu s těkavým rozpouštědlem je vpraven do plynového chromatogramu – GC (INJ). V koloně GC dochází k rozdělení vzorku a podle stupně těkavosti vycházejí jednotlivé frakce (efluent) přes splitter na zapojené tykadlo (FID). FID je produkován signál úměrný množství těkavých látek ve vyústění kolony. EAD detekuje změnu elektrického proudu vyvolanou proudem vzduchu smíšeným s proudem vzduchu z kolony nad anténou hmyzu; kombinovaný chromatogram FID / EAD.

5.3 Metody užívané k funční charakteristice hmyzích olfaktorických receptorů

Prázdňý neuron Drosophily („Empty Neuron“)

Tato technika spočívá ve vytvoření mutantního ORN, *ab3A*, který postrádá endogenní ORs (*Or22a* a *Or22b*), tudíž takový neuron nereaguje na pachy. Receptory jsou systematicky exprimovány do prázdňého neuronu, čímž je umožněno měřit odpověď na známém receptoru. Využívá se k charakteristice ORs, IRs a GRs pomocí metody SSR (single sensillum recording).

Tímto způsobem lze analyzovat, jak je kvalita, množství a trvanlivost odorantu kódována v repertoáru receptoru (van Naters et al. 2007; Mathew et al. 2013). Provádí se *in vivo*, měří se receptorově specifické vlastnosti akčního potenciálu a lze na nich testovat receptory různých druhů. Nevýhodou je časová náročnost vytvoření transgenních linií a možná inkompatibilita receptoru s neuronem (Kreher et al. 2008; Pask & Ray 2016).

Zobrazování neuronálně specifických Ca^{2+}

Vápenaté kationty hrají důležitou roli v přenosu signálů jakožto sekundární poslové. Při této metodě se využívá fluorescenčně značených Ca^{2+} iontů. Fluorescenční indikátory se naváží na vápenaté kationty v buňkách nebo celých tkáních (v případě hmyzu v glomerulu nebo tykadle). Pomocí fluorescenčního nebo konfokální mikroskopu lze pozorovat vylití vápenatých iontů v reakci na čichový stimul. Tímto je umožněno zkoumat ORNs *in vivo* (Grienberger & Konnerth; Pask & Ray 2016).

*Exprese ORs v oocytech *Xenopus laevis**

Identifikaci odorantových ligandů lze provádět i pomocí exprese ORs o známé sekvenci v oocytech drápatky (*Xenopus laevis*). Prvním takto exprimovaným OR byl *Or43a* pocházející z *D. melanogaster*. Oocyt se vystavuje roztokům látek a měří se změna elektrického potenciálu na jeho receptorech pomocí dvouelektrodové napěťové svorky nebo *patch clamp* metodou.

Tato technika poskytuje rychlou odezvu receptoru, je však omezena na testování hydrofilních molekul (Wang et al. 2009; Pask & Ray 2016).

HEK (human embryonic kidney cells)

Ke studiu ORs se používají upravené kultury buněk ledvin (HEK193), ve kterých jsou exprimovány ORs. Takové buňky jsou vystaveny DMSO, methanolu nebo odorantům solubilizovanými OBPs (Montagné et al. 2015). Fyziologickou odpověď lze ověřit pomocí elektrodoové svorky a zobrazováním vápenatých kationtů (Pask & Ray 2016).

S pokrokem v chemické informatice byla vyvinuta metoda pro promítání ligandů ORs, IRs, ale i GRs *in silico*. Počítačem jsou analyzovány trojrozměrné struktury známých ligandů, podle kterých se identifikují společné strukturální rysy aktivní látky (Boyle et al. 2013).

5.4 Role organických těkavých látek u nekrofágního hmyzu

Chemická ekologie nekrofágního hmyzu je málo prozkoumána; studie se zaměřují především na zástupce Dipter. Jako možné atraktanty jsou u nekrofágního hmyzu uváděny sirné těkavé organické sloučeniny, S-VOCs (Dekeirsschieter et al. 2013). Takovými látkami je především methylmerkaptan, methylthioacetát, dimethylsulfid, dimethyldisulfid (DMDS), dimethyltrisulfid (DMTS), butanol, kyselina máselná, indol, kresol, putrescin, a kadaverin (Kalinová et al. 2009; Dekeirsschieter et al. 2013). Nejsilnější elektrofyzilogické odpovědi vykazuje druh *Thanatophilus sinuatus* na DMDS a butanol, avšak depolarizaci antén vyvolaly všechny testované látky zmíněné výše. Ukázalo se také, že samci vykazují vyšší senzitivitu k organickým těkavým látkám (Dekeirsschieter et al. 2013). Při studiu aktivity VOCs u zástupců rodu *Nicrophorus* byla zjištěna preference k těkavým látkám produkovanými čerstvou mršinou (Kalinová et al. 2009).

6. Závěr

Nekrofágní hmyz je důležitý pro ekosystém jakožto hlavní recyklátor mrtvé biomasy fauny. U druhu mouchy bzučivky zelené (*Lucilia sericata*), ale i zástupců brouků podčeledi Nicrophorinae, byly nalezeny antimikrobiální peptidy mající význam jak v rámci prodloužení trvanlivosti potravy, tak i z hlediska medicínského.

Mnohé druhy nekrobiontního hmyzu jsou důležitými vodítky sloužícími pro stanovení doby úmrtí (post mortem intervalu), ale i místa úmrtí a další manipulace s tělem a může upozornit i na případnou intoxikaci těla.

Mršina, relativně levný zdroj živin, se vyskytuje v ekosystému do značné míry nepředvídatelně a rychle podléhá degradačním procesům, proto zde existuje velká kompetice o zdroj. Nejlépe se z takových potravních specialistů uplatňují živočichové s citlivým čichovým ústrojím, který dokáže mršinu rychle lokalizovat, jako je právě hmyz.

Stádia rozkladu kadáveru, sukcese nekrobiontního hmyzu, ale i látky vznikající v mršině jsou závislé na okolních podmínkách, jako je teplota, vlhkost vzduchu, intenzita zastínění, hloubka pohřbení nebo zastoupení vertebrálních mrchožroutů.

Při studiu chemické ekologie se používají různé vzorkovací metody, jako je například headspace, získané vzorky jsou dále analyzovány nejčastěji metodou plynové chromatografie (GC) a hmotnostní spektrometrie (MS). Identifikované molekuly s předpokládanou biologickou aktivitou jsou pak testovány přímo zástupci určitého druhu hmyzu formou bioesejí, nebo se zkoumá jejich fyziologická aktivita metodou GC-EAD, SSR nebo dalšími technickými postupy.

Ač chemické látky hrají nezastupitelnou roli při komunikaci hmyzu, zdaleka nejsou probádány mechanismy jejich působení. Tato práce by mohla sloužit jako podklad ke studiu percepce chemických látek hmyzem například ve forezních vědách

Seznam použité literatury

- Amrein, H. (2016). Mechanism of Taste Perception in *Drosophila*. In *Chemosensory Transduction* (pp. 245-269). Academic Press.
- Barton, P. S., Cunningham, S. A., Lindenmayer, D. B., & Manning, A. D. (2013). The role of carrion in maintaining biodiversity and ecological processes in terrestrial ecosystems. *Oecologia*, *171*(4), 761-772.
- Benninger, L. A., Carter, D. O., & Forbes, S. L. (2008). The biochemical alteration of soil beneath a decomposing carcass. *Forensic science international*, *180*(2-3), 70-75.
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W., & Vosshall, L. B. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS biology*, *4*(2), e20.
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., & Vosshall, L. B. (2009). Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, *136*(1), 149-162.
- Boeckh, J. (1962). Elektrophysiologische untersuchungen an einzelnen geruchsrezeptoren auf den antennen des totengräbers (*Necrophorus*, Coleoptera). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *46*(2), 212-248.
- Boyle, S. M., McNally, S., & Ray, A. (2013). Expanding the olfactory code by in silico decoding of odor-receptor chemical space. *Elife*, *2*, e01120.
- Brasseur, C., Dekeirsschieter, J., Schotsmans, E. M., de Koning, S., Wilson, A. S., Haubruge, E., & Focant, J. F. (2012). Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the forensic study of cadaveric volatile organic compounds released in soil by buried decaying pig carcasses. *Journal of chromatography A*, *1255*, 163-170.
- Butenandt, V. A. (1959). Über den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. *Reindarstellung und konstitution*. *Z. Naturforschg, b*, *14*, 283.
- Byrd, J. H. (2002). *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC press.
- Carter, D. O., Yellowlees, D., & Tibbett, M. (2007). Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften*, *94*(1), 12-24.
- Carter, D. O., Yellowlees, D., & Tibbett, M. (2008). Temperature affects microbial decomposition of cadavers (*Rattus rattus*) in contrasting soils. *Applied Soil Ecology*, *40*(1), 129-137.
- Cuthbertson, R. D., Shore, P. R., Sundström, L., & Heden, P. O. (1987). Direct analysis of diesel particulate-bound hydrocarbons by gas chromatography with solid sample injection. *SAE transactions*, 510-521.
- Čerovský, V., Žďárek, J., Fučík, V., Monincová, L., Voburka, Z., & Bém, R. (2010). Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(3), 455-466.
- Čerovský, V., & Bém, R. (2014). Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals*, *7*(3), 251-264.
- *Daněk, L. (1990). *Možnosti využití entomologie v kriminalistice*. Kriminalistický Ústav.
- Dautartas, A., Kenyhercz, M. W., Vidoli, G. M., Meadows Jantz, L., Mundorff, A., & Steadman, D. W. (2018). Differential decomposition among pig, rabbit, and human remains. *Journal of forensic sciences*, *63*(6), 1673-1683.
- Dekeirsschieter, J., Frederickx, C., Lognay, G., Brostaux, Y., Verheggen, F. J., & Haubruge, E. (2013). Electrophysiological and behavioral responses of *Thanatophilus sinuatus* Fabricius (Coleoptera: Silphidae) to selected cadaveric volatile organic compounds. *Journal of forensic sciences*, *58*(4), 917-923.
- Dekker, T., Geier, M., & Cardé, R. T. (2005). Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *Journal of Experimental Biology*, *208*(15), 2963-2972.

- Dethier, V. G., Browne, B. L., & Smith, C. N. (1960). The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *Journal of Economic Entomology*, 53(1), 134-136.
- DeVault, T. L., Rhodes, Jr, O. E., & Shivik, J. A. (2003). Scavenging by vertebrates: behavioral, ecological, and evolutionary perspectives on an important energy transfer pathway in terrestrial ecosystems. *Oikos*, 102(2), 225-234.
- Dhallan, R. S., Yau, K. W., Schrader, K. A., & Reed, R. R. (1990). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature*, 347(6289), 184.
- Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., ... & Mumford, R. A. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, 321(6065), 75.
- Fiedler, S., & Graw, M. (2003). Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere. *Naturwissenschaften*, 90(7), 291-300.
- Firestein, S., Zufall, F., & Shepherd, G. M. (1991). Single odor-sensitive channels in olfactory receptor neurons are also gated by cyclic nucleotides. *Journal of Neuroscience*, 11(11), 3565-3572.
- Forbes, S. L., Stuart, B. H., & Dent, B. B. (2005). The effect of the burial environment on adipocere formation. *Forensic science international*, 154(1), 24-34.
- Forman, R. T., & Alexander, L. E. (1998). Roads and their major ecological effects. *Annual review of ecology and systematics*, 29(1), 207-231.
- Galizia, C. G., & Sachse, S. (2010). Odor coding in insects. In *The neurobiology of olfaction*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Gennard, Dorothy. *Forensic entomology: an introduction*. John Wiley & Sons, 2012. p. 1-6; 30
- Ghaninia, M., Larsson, M., Hansson, B. S., & Ignell, R. (2008). Natural odor ligands for olfactory receptor neurons of the female mosquito *Aedes aegypti*: use of gas chromatography-linked single sensillum recordings. *Journal of Experimental Biology*, 211(18), 3020-3027.
- Goff, M. L., & Lord, W. D. (2001). Entomotoxicology: Insects as toxicological indicators and the impact of drugs and toxins on insect development. *Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations*, 331-340.
- Goldman, A. L., van Naters, W. V. D. G., Lessing, D., Warr, C. G., & Carlson, J. R. (2005). Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron*, 45(5), 661-666.
- Grassberger, M., and Ch Frank. (2004). Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat. *Journal of Medical Entomology* 41.3. 511-523.
- Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging calcium in neurons. *Neuron*, 73(5), 862-885.
- Hall, C. L., Wadsworth, N. K., Howard, D. R., Jennings, E. M., Farrell, L. D., Magnuson, T. S., & Smith, R. J. (2011). Inhibition of microorganisms on a carrion breeding resource: the antimicrobial peptide activity of burying beetle (Coleoptera: Silphidae) oral and anal secretions. *Environmental Entomology*, 40(3), 669-678.
- Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. (2011). Evolution of insect olfaction. *Neuron*, 72(5), 698-711.
- Haynes, K. F., & Millar, J. G. (Eds.). (2012). *Methods in Chemical Ecology Volume 2: Bioassay Methods*. Springer Science & Business Media.
- Hoffman, E. M., Curran, A. M., Dulgerian, N., Stockham, R. A., & Eckenrode, B. A. (2009). Characterization of the volatile organic compounds present in the headspace of decomposing human remains. *Forensic Science International*, 186(1-3), 6-13.
- Janaway, R. C., Percival, S. L., & Wilson, A. S. (2009). Decomposition of human remains. In *Microbiology and aging*(pp. 313-334). Humana Press.
- Jones, W. D., Nguyen, T. A. T., Kloss, B., Lee, K. J., & Vosshall, L. B. (2005). Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Current Biology*, 15(4), R119-R121.

- Joseph, I., Mathew, D. G., Sathyan, P., & Vargheese, G. (2011). The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. *Journal of forensic dental sciences*, 3(2), 89.
- Kaissling, K. (1986). Chemo-electrical transduction in insect olfactory receptors. *Annual review of neuroscience*, 9(1), 121-145.
- Kaissling, K. E., Hildebrand, J. G., & Tumlinson, J. H. (1989). Pheromone receptor cells in the male moth *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 10(4), 273-279.
- 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(8), 889-899.
- Keil, T. A., & Steinbrecht, R. A. (1984). Mechanosensitive and olfactory sensilla of insects. In *Insect ultrastructure* (pp. 477-516). Springer, Boston, MA.
- Keil, T. A. (1999). Morphology and development of the peripheral olfactory organs. In *Insect olfaction* (pp. 5-47). Springer, Berlin, Heidelberg.
- King, J.E. (2012). Carrion insects and their application to forensic investigations in Richmond, NSW with particular reference to significant Coleoptera.
- Klem Jr, D., Farmer, C. J., Delacretaz, N., Gelb, Y., & Saenger, P. G. (2009). Architectural and Landscape Risk Factors Associated with Bird—Glass Collisions in an Urban Environment. *The Wilson Journal of Ornithology*, 126-134.
- Klimešová, V., Barták, M., & Šuláková, H. (2015). FORENZNÍ ENTOMOLOGIE A JEJÍ VYUŽITÍ V KRIMINALISTICKÉ PRAXI.
- Kreher, S. A., Mathew, D., Kim, J., & Carlson, J. R. (2008). Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron*, 59(1), 110-124.
- Krieger, J., Klink, O., Mohl, C., Raming, K., & Breer, H. (2003). A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *Journal of Comparative Physiology A*, 189(7), 519-526.
- Kumar, A., & Viden, I. (2007). Volatile organic compounds: Sampling methods and their worldwide profile in ambient air. *Environmental monitoring and assessment*, 131(1-3), 301-321.
- Larsson, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H., & Vosshall, L. B. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5), 703-714.
- LeBlanc, H. N., & Logan, J. G. (2009). Exploiting insect olfaction in forensic entomology. In *Current concepts in forensic entomology* (pp. 205-221). Springer, Dordrecht.
- Leccese, A. (2004). Insects as forensic indicators: methodological aspects. *Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 5(1), 26-32.
- Lindeman, R. L. (1942). The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology*, 23(4), 399-417.
- Manring, M. M., & Calhoun, J. H. (2011). Biographical Sketch: William S. Baer (1872–1931). *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(4), 917-919.
- Masson, C., & Mustaparta, H. (1990). Chemical information processing in the olfactory system of insects. *Physiological Reviews*, 70(1), 199-245.
- Mathew, D., Martelli, C., Kelley-Swift, E., Brusalis, C., Gershow, M., Samuel, A. D., ... & Carlson, J. R. (2013). Functional diversity among sensory receptors in a *Drosophila* olfactory circuit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), E2134-E2143.
- Matuszewski, S., Bajerlein, D., Konwerski, S., & Szpila, K. (2008). An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe. *Forensic Science International*, 180(2-3), 61-69.
- McIndoo, N. E. (1914). The olfactory sense of insects (Vol. 63). *Smithsonian Institution*.
- Milne, L. J., & Milne, M. (1976). The social behavior of burying beetles. *Scientific American*.

- Millar, J. G., & Sims, J. J. (1998). Preparation, cleanup, and preliminary fractionation of extracts. *Methods in chemical ecology*, 1, 1-37.
- Missbach, C., Dweck, H. K., Vogel, H., Vilcinskas, A., Stensmyr, M. C., Hansson, B. S., & Grosse-Wilde, E. (2014). Evolution of insect olfactory receptors. *Elife*, 3, e02115.
- Mitchell, R. F., Hughes, D. T., Luetje, C. W., Millar, J. G., Soriano-Agatón, F., Hanks, L. M., & Robertson, H. M. (2012). Sequencing and characterizing odorant receptors of the cerambycid beetle *Megacyllene caryae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(7), 499-505.
- Montagné, N., Chertemps, T., Brigaud, I., François, A., François, M. C., De Fouchier, A., ... & Jacquin-Joly, E. (2012). Functional characterization of a sex pheromone receptor in the pest moth *Spodoptera littoralis* by heterologous expression in *Drosophila*. *European Journal of Neuroscience*, 36(5), 2588-2596.
- Montagné, N., de Fouchier, A., Newcomb, R. D., & Jacquin-Joly, E. (2015). Advances in the identification and characterization of olfactory receptors in insects. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 130, pp. 55-80). Academic Press.
- Ochieng, S. A., Hallberg, E., & Hansson, B. S. (1998). Fine structure and distribution of antennal sensilla of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Cell and tissue research*, 291(3), 525-536.
- Olsson, S. B., & Hansson, B. S. (2013). Electroantennogram and single sensillum recording in insect antennae. In *Pheromone Signaling* (pp. 157-177). Humana Press, Totowa, NJ.
- Pask, G. M., & Ray, A. (2016). Insect Olfactory Receptors: An Interface between Chemistry and Biology. In *Chemosensory Transduction* (pp. 101-122).
- Pitts, R. J., Liu, C., Zhou, X., Malpartida, J. C., & Zwiebel, L. J. (2014). Odorant receptor-mediated sperm activation in disease vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), 2566-2571.
- Reed Jr, H. B. (1958). A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the insects. *American Midland Naturalist*, 213-245.
- Reibe, S., & Madea, B. (2010). How promptly do blowflies colonise fresh carcasses? A study comparing indoor with outdoor locations. *Forensic Science International*, 195(1-3), 52-57.
- Rendine, M., Fiore, C., Bertozzi, G., De Carlo, D., Filetti, V., Fortarezza, P., & Riezzo, I. (2019). Decomposing human blood: canine detection odor signature and volatile organic compounds. *Journal of forensic sciences*, 64(2), 587-592.
- Robertson, H. M., Warr, C. G., & Carlson, J. R. (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(suppl 2), 14537-14542.
- Roelofs W.L. (1984) Electroantennogram Assays: Rapid and Convenient Screening Procedures for Pheromones. In: Hummel H.E., Miller T.A. (eds) Techniques in Pheromone Research. Springer Series in Experimental Entomology. Springer, New York, NY
- Scanvion, Q., Hédouin, V., & Charabidzé, D. (2018). Collective exodigestion favours blow fly colonization and development on fresh carcasses. *Animal behaviour*, 141, 221-232.
- Schlaeger, S., Pickett, J. A., & Birkett, M. A. (2018). Prospects for management of whitefly using plant semiochemicals, compared with related pests. *Pest management science*.
- Schlaeger, S., J. A. Pickett, and M. A. Birkett 2018 Prospects for management of whitefly using plant semiochemicals, compared with related pests. *Pest Manag Sci* 74(11):2405-2411.
- Schneider, D. (1957). Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo-und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 40(1), 8-41.
- Schneider, D. (1964). Insect antennae. *Annual review of entomology*, 9(1), 103-122.
- Schroeder, H., Klotzbach, H., Oesterhelweg, L., & Püschel, K. (2002). Larder beetles (Coleoptera, Dermestidae) as an accelerating factor for decomposition of a human corpse. *Forensic Science International*, 127(3), 231-236.

- Sherman, R. A., Hall, M. J. R., & Thomas, S. (2000). Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual review of entomology*, 45(1), 55-81.
- Smith, K. G. (1986). *A manual of forensic entomology*.
- Spietelun, A., Pilarczyk, M., Kloskowski, A., & Namieśnik, J. (2010). Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4524-4537.
- Steinbrecht, R. A. (1997). Pore structures in insect olfactory sensilla: a review of data and concepts. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 26(3-4), 229-245.
- Stengl, M., Hatt, H., & Breer, H. (1992). Peripheral processes in insect olfaction. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 665-681.
- Strausfeld, N. J., & Hildebrand, J. G. (1999). Olfactory systems: common design, uncommon origins?. *Current opinion in neurobiology*, 9(5), 634-639.
- Swarup, S., Williams, T. I., & Anholt, R. R. (2011). Functional dissection of Odorant binding protein genes in *Drosophila melanogaster*. *Genes, Brain and Behavior*, 10(6), 648-657.
- Štefan, J., & Mach J. (2005). *Soudně lékařská a medicínsko-právní problematika v praxi*. Grada Publishing as. p. 12-20
- Šuláková, H. 2014. Forezní entomologie - když smrt je začátek. *Živa*. 5. 250-256.
- Šuláková, H., Harakalová, L., & Barták, M. (2014). Effect of freezing on the initial colonization of the carcass with necrophagous organisms. *Acta Musei Silesiae, Scientiae Naturales*, 63(1), 29-37.
- Šuláková, Hana. (2017). Kapitola 10. Forezní entomologie.
- Teal, J. M. (1962). Energy flow in the salt marsh ecosystem of Georgia. *Ecology*, 43(4), 614-624.
- Tibbett, M., & Carter, D. O. (Eds.). (2008). *Soil analysis in forensic taphonomy: chemical and biological effects of buried human remains*. CRC Press. (pp. 29-45)
- Tomberlin, J. K., Barton, B. T., Lashley, M. A., & Jordan, H. R. (2017). Mass mortality events and the role of necrophagous invertebrates. *Current opinion in insect science*, 23, 7-12.
- Ubelaker, D. H., & Zarenko, K. M. (2011). Adipocere: what is known after over two centuries of research. *Forensic science international*, 208(1-3), 167-172.
- van Naters, van der Goes, W., & Carlson, J. R. (2007). Receptors and neurons for fly odors in *Drosophila*. *Current biology*, 17(7), 606-612.
- Vass, A. A. (2001). Beyond the grave-understanding human decomposition. *Microbiology today*, 28, 190-193.
- Vass, A. A., Smith, R. R., Thompson, C. V., Burnett, M. N., Wolf, D. A., Synsteliën, J. A., ... & Eckenrode, B. A. (2004). Decompositional odor analysis database. *Journal of Forensic Science*, 49(4), 1-10.
- Vass, A. A. (2012). Odor mortis. *Forensic Science International*, 222(1-3), 234-241.
- Vass, A. A., Smith, R. R., Thompson, C. V., Burnett, M. N., Dulgerian, N., & Eckenrode, B. A. (2008). Odor analysis of decomposing buried human remains. *Journal of Forensic Sciences*, 53(2), 384-391.
- Vieira, F. G., Sánchez-Gracia, A., & Rozas, J. (2007). Comparative genomic analysis of the odorant-binding protein family in 12 *Drosophila* genomes: purifying selection and birth-and-death evolution. *Genome biology*, 8(11), R235.
- Vieira, F. G., & Rozas, J. (2011). Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. *Genome Biology and Evolution*, 3, 476-490.
- Vogt, R. G., & Riddiford, L. M. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828), 161.
- Vosshall, L. B., Wong, A. M., & Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, 102(2), 147-159.

- Wang, G., Qiu, Y. T., Lu, T., Kwon, H. W., Jason Pitts, R., Van Loon, J. J., ... & Zwiebel, L. J. (2009). Anopheles gambiae TRPA1 is a heat-activated channel expressed in thermosensitive sensilla of female antennae. *European Journal of Neuroscience*, 30(6), 967-974.
- Whitaker, I. S., Twine, C., Whitaker, M. J., Welck, M., Brown, C. S., & Shandall, A. (2007). Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgraduate medical journal*, 83(980), 409-413.
- Wicher, D., Schäfer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M. C., Heller, R., Heinemann, S. H., & Hansson, B. S. (2008). Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452(7190), 1007.
- Wicher, D. (2015). Olfactory signaling in insects. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 130, pp. 37-54). Academic Press.
- Wolf, H., & Wehner, R. (2000). Pinpointing food sources: olfactory and anemotactic orientation in desert ants, *Cataglyphis fortis*. *Journal of Experimental Biology*, 203(5), 857-868.
- Yao, C. A., Ignell, R., & Carlson, J. R. (2005). Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the Drosophila antenna. *Journal of Neuroscience*, 25(37), 8359-8367.