

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jaroslava Javůrková

Využití stabilních izotopů pro studium potravní ekologie hmyzu
Stable isotopes and the study of insects ecology

bakalářská práce

Školitel: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

Praha, 2019

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, 10.5.2019

Jaroslava Javůrková

Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Petru Šípkovi, Ph.D. především za jeho trpělivost, ochotu a vstřícnost. Poděkování patří také mojí rodině za podporu v těžkých chvílích studia. Opomenout nelze ani poděkování kamarádům, kteří mi byli příjemným rozptýlením a nezávislými rádci.

Abstrakt

Potravní ekologie živočichů je důležitá součást studia ekosystémových vztahů. Tato bakalářská práce představuje rešerši v oblasti studia potravní ekologie, především hmyzu. Zaměřuje se zejména na metodu analýzy stabilních izotopů, která je jedním z aktuálních a v posledních desetiletích moderním přístupem pro studium této problematiky. Analýza stabilních izotopů je porovnána s ostatními často využívanými metodami pro studium potravní ekologie živočichů. Cílem této práce je představit metodu analýzy stabilních izotopů a její možné využití pro studium potravní ekologie hmyzu. První část podává nutný teoretický základ, praktické použití v laboratoři a dále se věnuje představení problémům typicky řešeným touto metodou v oblasti studia hmyzu.

Klíčová slova: stabilní izotopy, analýza stabilních izotopů, potravní ekologie, potravní preference, hmyz

Abstract

Animal foraging ecology is an important part in the puzzle ecosystem relationships. This bachelor thesis presents review in the field of food ecology, especially insects. It focuses on the method of analysis of stable isotopes, which is one of the current and in recent decades a modern approach for studying this issue. Stable isotope analysis is compared with other frequently used methods for animal food ecology. The aim of this work is to introduce this method and its possible use in the study of insect food ecology. The first part provides the necessary theoretical background, practical application in laboratory and then it deals with the problems typically adressed by this method.

Key words: stable isotopes, stable isotopes analysis, food ecology, food preferences, insects

Obsah

Úvod.....	6
1 Izotopy prvků	7
1.1 Stabilní izotopy	7
1.2 Využití stabilních izotopů	8
2 Metody studia potravní ekologie	9
2.1 Vizuální analýza.....	9
2.2 Molekulární metody	9
2.3 Analýza stabilních izotopů (SIA).....	10
2.3.1 Analýza dat z hmotnostního spektrometru.....	13
2.3.2 Hmotnostní spektrometr.....	14
3 Využití stabilních izotopů u hmyzu	16
3.1 Trofické úrovně a potravní preference.....	16
3.2 Migrace	18
4 Stabilní izotopy a nekrobiontní hmyz	20
5 Závěr	21
Seznam použité literatury.....	22

Úvod

Studium potravní ekologie živočichů je významným faktorem pro pochopení interakcí mezi jednotlivými druhy v ekosystému. Existuje řada metod, které umožňují tuto problematiku studovat a interpretovat (Kartzinel et al. 2015; Nielsen et al. 2018). Důležité je si uvědomit, že informace o stravě poskytují představu o struktuře a funkci celých ekosystémů (Estes et al. 2011; Poelen et al. 2014). Analýza stabilních izotopů (anglicky stable isotopes analysis, SIA) je stále častěji využívanou metodou v oblasti studia životních strategií živočichů. Pro studium potravní ekologie živočichů je vědci používána již více než 40 let (Fry 2006). Díky měření izotopového poměru pomocí hmotnostního spektrometru lze určit složení potravy (Nokelainen et al. 2016) a potravní preference i u živočichů, kteří se neživí pouze jedním typem potravy (Potapov et al. 2019). Dále stabilní izotopy umožňují mapovat pohyb živočichů a pochopit tak mnohé procesy v jednotlivých ekosystémech. Tato bakalářská práce se zabývá analýzou stabilních izotopů zejména uhlíku a dusíku, které jsou v této oblasti využívány jako jedny z nejběžnějších (Gratton and Forbes 2006; Stavert et al. 2014; Hyodo 2015).

Cílem této bakalářské práce je shrnout základní metody používané pro studium potravní ekologie živočichů, především hmyzu. Zaměřuje se na konkrétní, v posledních letech velmi se rozvíjející metodu analýzy stabilních izotopů. Práce představuje praktické použití analýzy stabilních izotopů a shrnuje dosavadní poznatky užitečné pro aplikaci vlastního budoucího experimentu a vypracování diplomové práce. V této práci je postupně vysvětleno, co si lze představit pod pojmem izotopy a proč jsou právě stabilní izotopy vhodné pro studium ekologie živočichů a kde všude se s nimi ve vědě můžeme setkat. Práce dále představuje i další alternativně využívané metody studia potravní ekologie. V posledních kapitolách je představen výčet možných uplatnění této metody konkrétně u hmyzu a objasnění postupů doposud provedených experimentů v rámci publikovaných studií.

Analýza stabilních izotopů je velmi užitečným nástrojem pro biology a ekology, nicméně pro studium potravní ekologie hmyzu nebyla zatím používána velmi často. Ačkoliv je hmyz velice diverzifikovanou a velmi rozšířenou skupinou organismů, která nepochybně významně ovlivňuje fungování mnoha systémů, je v tomto směru oproti ostatním organismům takřka přehlížena.

1 Izotopy prvků

Chemické prvky jsou složeny z atomů, které mají v jádře stejný počet protonů, tj. mají stejné protonové neboli atomové číslo. Tyto prvky jsou dále charakterizovány hmotnostním neboli nukleonovým číslem, které je definováno součtem protonů a neutronů v daném atomu prvku. Jednotlivé chemické prvky se v přírodě vyskytují v různých formách, které jsou označovány jako izotopy. Izotopy prvku mají shodný počet protonů v jádře, ale liší se počtem neutronů, tedy mají i rozdílnou atomovou hmotnost (Cabicar 1982). Příkladem izotopů může být vodík a deuterium. Nejběžnější v přírodě se vyskytující izotop, který je označován prostě jako vodík, má v jádru pouze jeden proton. Naproti tomu deuterium má ve svém jádru proton a neutron, proto je rozdílná i hmotnost těchto dvou izotopů (Sulzman 2007). Izotopy prvku s větším množstvím neutronů jsou těžší, a proto reagují v metabolických nebo biochemických reakcích pomaleji než izotopy lehké (Sulzman 2007).

Jednotlivé chemické prvky se v přírodě vyskytují jako radioaktivní nebo jako stabilní. Začátkem 21. století vědci odhadovali, že na naší planetě Zemi existuje přibližně 120 prvků a 3100 izotopů, přičemž stabilních izotopů je 283, což je méně než deset procent všech známých izotopů (Fry 2006). Radioaktivní prvky jsou takové, jejichž jádro se samovolně rozpadá, emituje radioaktivní záření a dochází k přeměně prvku na jiný. Radioaktivní prvky jsou ve vědě významné, jejich využití v jaderné fyzice, jaderných elektrárnách a v jiných disciplínách je nezanedbatelným, nicméně pro tuto práci nejsou zvláště zajímavými právě kvůli svému poločasu rozpadu, jimž jsou charakterizovány. Poločas rozpadu je doba, během které pravděpodobně dojde k rozpadu právě poloviny počátečního počtu jader prvku.

1.1 Stabilní izotopy

Kritériem pro určení, který izotop je stabilní, je výše zmíněný poločas rozpadu. Na rozdíl od radioaktivních izotopů dochází k rozpadu stabilních izotopů za mnohonásobně delší dobu. Tato doba je delší, než je v současnosti možné jednoznačně zjistit dostupnou měřicí technikou (Cabicar 1982). Dle Šantrůčka (2014) je tato hodnota rovna 10^{18} roků. V přírodě se mnohé prvky vyskytují ve většinovém zastoupení toho nejlehčího izotopu prvku, například více než 95 % všech izotopů představuje ten nejlehčí izotop zastoupení pro prvky jako je vodík, dusík, kyslík a síra (Fry 2006). Stabilní izotopy byly zachyceny na naší planetě díky Velkému třesku. V případě některých prvků, jako je například uhlík a dusík, kterými se tato práce zabývá, zůstal zachován poměr jejich stabilních izotopů. Jelikož izotopy těchto prvků nevznikají rozpadem jiného radioaktivního prvku, zůstává právě proto tento poměr neměnný. Pro analýzu

stabilních izotopů jsou používány izotopy ^{12}C a ^{13}C v případě uhlíku, v případě dusíku jsou to izotopy ^{14}N a ^{15}N . Tato bakalářská práce je zaměřena především na izotopy uhlíku a dusíku z toho důvodu, že jsou to organické prvky, které se vyskytují všude kolem nás a jsou běžnou součástí potravy živočichů (Ikeda et al. 2010; Atkinson et al. 2018). Stabilní izotopy jsou ze stravy ukládány do tkání živočichů a na různých trofických úrovních nacházíme jejich různé poměrné zastoupení, čehož je možno využít pro další studie (Gratton and Forbes 2006).

1.2 Využití stabilních izotopů

Stabilní izotopy jsou v biologických a ekologických disciplínách používány zejména proto, že dávají možnost sledovat jejich přirozené cyklování v biosféře. Díky jejich frakcionaci a míchání zanechávají pomyslnou stopu, která je typická například pro konkrétní geografickou oblast (Kelly and Heaton 2005; Fry 2006). Poměry stabilních izotopů uhlíku, dusíku a vodíku jsou používány i pro studium rostlin, například pro sledování zdrojů dusíku rostlin, hodnocení fotosyntetického režimu nebo k měření vodní bilance (Gannes et al. 1997; Sanchez Bragado et al. 2019). Stejně tak lze stabilní izotopy použít jako značky (Grabmaier et al. 2014; Nervo et al. 2017; Westrop et al. 2017) a určit tak například geografický původ živočichů dle jejich zdroje potravy (Hood-nowotny et al. 2016; Nervo et al. 2017). Značením stabilními izotopy lze sledovat cyklování prvků v ekosystému (Hood-nowotny et al. 2016; Nervo et al. 2017).

Analýzu stabilních izotopů lze aplikovat rovněž v archeologických výzkumech (Benson et al. 2007; Mackinnon et al. 2019; Jessica et al. 2019), například pro určení sociálního postavení na základě složení potravy jedinců nebo jejich původ (Eerkens et al. 2019). V archeologických výzkumech je jako vzorek používán kolagen z kostí nebo zubů (Eerkens et al. 2019; Angelis et al. 2019).

Pro člověka jsou stabilní izotopy uplatnitelné například pro ověření jakosti a původu potravin (Koziat 1993; Boner 2002; S. Kelly and Heaton 2005; Worku et al. 2019). Tyto studie jsou užitečné pro ochranu spotřebitele a odhalují případné falšování původu nebo složení potravin (Strojnik et al. 2018; Worku et al. 2019).

2 Metody studia potravní ekologie

Studium potravní ekologie živočichů je nezbytné pro porozumění interakcí v ekosystému a jeho fungování (Agosta 2006; Lancaster et al. 2008; Rhinesmith-Carranza 2018). Během konzumace potravy dochází k asimilaci živin (Atkinson et al. 2018; Kumar 2018). Část pozřené stravy je vylučována a část je v podobě prvků inkorporována do tkání živočichů. Živočichové ve svém okolí nachází potenciální široké spektrum dostupné potravy (Agosta 2006; Kumar 2018). Díky svým preferencím je skutečná škála potravy jen vybraným procentem této nabídky. Různé metody studia potravní ekologie se pokouší reflektovat reálné složení potravy jedince, nicméně každá z nich se zaměřuje spíše na určitou část (Juen and Traugott 2005; Kumar 2018). Studium potravní ekologie živočichů je v současnosti založeno na třech hlavních skupinách metod, kterými jsou vizuální analýzy, molekulární analýzy a analýzy stabilních izotopů.

2.1 Vizuální analýza

Běžně používanou metodou pro studium potravní ekologie živočichů je prosté pozorování v terénu nebo vizuální analýza obsahu žaludku či střev. Během relativně krátké chvíle tak lze získat informace o rozmanitosti stravy. Analýza žaludku ovšem může znamenat usmrcení zvířete (Pineda-munoz 2014), proto je vhodnější pro méně hojné nebo vzácné druhy živočichů použít například metodu průplachu žaludku nebo vyvolat zvracení (Fijn et al. 2012; Cornelissen et al. 2018; Nielsen et al. 2018; McMeans et al. 2019). Na druhou stranu se jedná o metodu finančně méně nákladnou, než je například DNA analýza. Nevýhodou této metody je, především u větších zvířat pohybujících se ve velkých areálech, že získané informace pravděpodobně budou pouze z malé části areálu a týkající se několika málo jedinců (Pineda-munoz 2014). Kritickým bodem této metody je skutečnost, že pouhým pohledem není možné nebo jen velmi obtížně identifikovat již rozkládající se potravu, případně její tekutou složku (Davidson et al. 2004; Bennett and Hobson 2009). Z hlediska praktičnosti je metoda vhodná pro hrubé určení složení potravy. Doporučována je pro sledování interakcí mezi predátorem a kořistí (Birkhofer et al. 2017; Iakovlev et al. 2017).

2.2 Molekulární metody

Alternativní hojně využívanou možností, jak identifikovat složení potravy živočichů, je molekulární analýza obsahu trávicí soustavy. Oproti prosté vizuální metodě je pochopitelně náročnější časově na přípravu vzorků a nutnost udržení jejich kvality. Poskytuje ovšem mnohem přesnější informace o složení potravy díky analýze fragmentů DNA potravy

(Vall 2013). DNA sekvenování je výhodné právě proto, že pro identifikaci kořisti stačí odebrat velmi malý vzorek a pomocí polymerázové řetězové reakce (anglicky Polymerase Chain Reaction, PCR) zmnožit požadovaný úsek DNA replikací nukleových kyselin. Pro analýzu se používají vzorky obsahu žaludku nebo trus (Bowser et al. 2013). Nevýhodou této metody je, že zkoumá pouze aktuální stav a využití pro stanovení dlouhodobých potravních preferencí vyžaduje kontinuální sběr materiálu (Nielsen et al. 2018; Carroll et al. 2019). Problematické může být také určení sekundární predace (Bowser et al. 2013) nebo volba primerů (Elbrecht and Leese 2015; Rubbmark et al. 2019). Ve vodním prostředí dochází k hromadění genetické informace uschované například v odloupených šupinách ryb. Tato skutečnost je výhodou a nevýhodou v ekologických studiích zároveň. Výhodná může být v případě, že v experimentu je otázkou diverzita živočichů žijících ve sledované oblasti (Kelly et al. 2014). Nevýhodná je právě pro studium potravní ekologie, neboť ve vodním prostředí konzument přijímá společně se svou kořistí i volně plovoucí DNA jiného živočicha a nelze tak odlišit během analýzy, zda se jedná o vzorek skutečné kořisti nebo právě o náhodné pozření (Kelly et al. 2014).

Dalším kritickým bodem je uchování vzorků před samotnou analýzou. Pro analýzu DNA je důležité zachovat velmi dobrou kvalitu vzorků, což může být komplikací například při studiu půdních živočichů (Straube and Juen 2013). Materiál je standardně před analýzou zmrazen, což při odběru v terénu představuje riziko jeho rozmrazení při přepravě do laboratoře (Straube and Juen 2013). Vhodné je proto materiál uchovávat při delší přepravě v lihu.

2.3 Analýza stabilních izotopů (SIA)

Ve srovnání s předchozími dvěma metodami studia potravní ekologie je jednoznačnou výhodou analýzy stabilních izotopů možnost jejího využití pro získání informací o potravě živočichů v řádu nejen několika hodin nebo dní, ale díky odběru jednotlivých tkání nebo analyzování celého těla lze získat komplexní informace o potravě za celý život jedince či v jiném vývojovém stádiu (DeNiro and Epstein 1978; Bennett and Hobson 2009). Jelikož jsou analyzovány jednotlivé chemické prvky ukládající se do tkání, můžeme tuto metodu považovat za nejpřesnější. Nevýhodou je ovšem finanční náročnost (Hood-Nowotny et al. 2016) a mnohdy potřeba spolupráce s externí laboratoří. Izotopová analýza na rozdíl od molekulárních metod neposkytuje informace o taxonomické příslušnosti kořisti.

Stabilní izotopy nám dávají možnost sledovat potravní niky živočichů, trofickou úroveň (Roeder 2017), postavení v potravním řetězci a umožňují vyhodnotit potravní strategii

živočichů (Hood-nowotny and Knols 2007; Boecklen et al. 2011; Hyodo 2015) na úrovni jedinců i populací. Dále je možné díky stabilním izotopům sledovat i migraci živočichů (Hallworth et al. 2018). Izotopovou analýzu lze použít ve dvou různých variantách. První variantou je objemová analýza stabilních izotopů, alternativou je analýza aminokyselin (Harris et al. 2014; Ishikawa 2018; Potapov et al. 2019). Objemovou analýzou lze sledovat množství izotopů uhlíku a dusíku, případně dalších prvků jako je například síra (Mccutchan et al. 2003; Potapov et al. 2019). Izotopové poměry uhlíku a síry jsou typicky v hodnotách nižších než jedna promile, naproti tomu izotopové poměry dusíku se pohybují v hodnotách dvě až čtyři promile oproti kořisti (Mccutchan et al. 2003). Z tohoto důvodu jsou pro stanovení trofické úrovně a složení stravy používány izotopy dusíku. Pro stanovení závislosti, respektive preferencí jednotlivých složek potravy, jsou používány izotopy uhlíku, případně síry (Nielsen et al. 2018).

Analýza stabilních izotopů je tradičně prováděna pomocí hmotnostního spektrometru (IRMS – isotope ratio mass spectrometer), který porovnává poměry stabilních izotopů (Fry 2006, Cabicar 1982). Konzumenti během asimilace prvků přednostně vylučují lehčí izotopy, proto jejich tkáně obsahují vzhledem ke své kořisti větší množství těžkých izotopů (Mccutchan et al. 2003) a dochází k jejich akumulaci. To znamená, že živočichové vyšší trofické úrovně mají ve svých tkáních uloženo více těžkého izotopu. Vzorky je potřeba vysušit při vysoké teplotě, spálit a převést do plynného stavu. Pro měření se vzorky převádí na oxid uhličitý CO_2 , plynný dusík N_2 , případně na oxid siřičitý SO_2 (Fry 2006).

Při analyzování tkání živočichů je důležité, aby obsah střeva nekontaminoval připravované vzorky, tzn. v případě analyzování celého živočicha je nezbytné nechat střevo vyprázdnit, ponechat zkoumané jedince po dobu alespoň čtyř hodin na živu před jejich sušením (Ikeda et al. 2010; Atkinson et al. 2018) nebo lze po usmrcení zkoumaných jedinců hmyzu střevo odstranit (Gratton and Forbes 2006). Analýza stabilních izotopů umožňuje zjistit potravní preferenci rostlin primárními konzumenty (mšice, savý hmyz apod.) v závislosti například na typu fotosyntézy pro C_3 nebo C_4 rostliny. V takové studii je žádoucí zajistit místní příslušnost populace, u holometabolního hmyzu je možné toho dosáhnout sběrem kukel. Tím se zajistí zároveň to, že populace nekonzumovala jiné zdroje potravy, které by mohly zkreslit výsledky (Gratton and Forbes 2006). Usmrcení hmyzu je prováděno jeho vložením do roztoku s vysokým obsahem alkoholu, případně zmrazením (Iakovlev et al. 2017; Potapov et al. 2019).

Pro analýzu stabilních izotopů u hmyzu je běžně používáno vysoušení vzorku po dobu několika desítek hodin. Jednotliví autoři uvádí různé hodnoty teploty a dobu, po kterou byly vzorky vysušeny. Můžeme se setkat s postupy, kde je vzorek vysoušen při 50 °C po dobu 48 hodin (Gratton and Forbes 2006; Winters and Yee 2012; Potapov et al. 2019), jiní autoři vzorky připravovali při teplotě 65 °C po dobu 72 hodin (Prasifka et al. 2004). Jelikož postupy autorů se různí, lze předpokládat, že pro analýzu stabilních izotopů je důležité zvážit zejména množství materiálu, hmotnost jednotlivých vzorků a rychlost jejich vysychání. Dostatečné vysoušení vzorku lze kontrolovat sledováním hmotnosti, respektive její stability (Feng et al. 2019). Vysušený materiál je vhodné rozdělit na menší části a homogenizovat jej například mlýnkem (Prasifka et al. 2004; Potapov et al. 2019). Pokud je součástí experimentu analýza půdního materiálu, je možné tento vzorek zbavit od spadných větviček nebo živočichů prosetím přes síto (Uvarov and Karaban 2015). Důležitá je znalost izotopových poměrů substrátu, ve kterém se vzorek nacházel, například trus (Nervo et al. 2017), případně rostlinný materiál nebo půdu (Uvarov and Karaban 2015) či jiný materiál.

Běžně je vzorek rozdělen na části o hmotnosti od několika desetin gramu až do hmotnosti zhruba tři gramy a teprve poté je vysušován (Gratton and Forbes 2006; Kaufman et al. 2010). Pro samotnou analýzu je homogenizovaný vysušený vzorek navážen na hmotnost v rozmezí od 200 mikrogramů až po 3 miligramy (Atkinson et al. 2018; Potapov et al. 2019) a uložen do cínových kapslí (Jouta et al. 2017; Atkinson et al. 2018; McMeans et al. 2019). Takto připravené vzorky jsou následně vyhodnocovány pomocí hmotnostního spektrometru pro měření izotopového poměru (IRMS), viz Obrázek 1.



Obrázek 1: Hmotnostní spektrometr, model Thermo Scientific 253 Plus, převzato z www.thermofisher.com.

2.3.1 Analýza dat z hmotnostního spektrometru

Pro analýzu dat je důležitá znalost zastoupení izotopů prvku v daném vzorku. Pokud je předmětem experimentu zjištění jednotlivých složek potravy nebo vliv této stravy právě na poměr izotopů ukládajících se do tkání živočichů, je důležité znát také izotopové složení potravy (Gratton and Forbes 2006). Jelikož v přírodě se vyskytují prvky v majoritním zastoupení většinou toho lehčího a těžký izotop je oproti němu velmi málo častý, není praktické vyjadřovat jejich poměr v absolutních hodnotách (Sulzman 2007). Z toho důvodu je poměr izotopů vyjadřován relativně vzhledem k mezinárodnímu standardu v promilích ‰. (Fry 2006). Izotopový poměr je značen řeckým písmenem δ (delta) a je vyjádřen pomocí tohoto vzorce:

$$\delta = (R_{\text{vzorek}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}} * 1000 [\text{‰}]$$

R_{vzorek} vyjadřuje poměr izotopů ve vzorku, R_{standard} vyjadřuje poměr izotopů v mezinárodně uznávaném standardu. Hodnota δ pak vyjadřuje, jak se zkoumaný vzorek liší od standardu. Pokud δ nabývá záporných hodnot, vzorek obsahuje oproti standardu menší množství těžkého izotopu. Pokud δ nabývá naopak kladných hodnot, vzorek je oproti standardu obohacen o těžký izotop. V případě nulové hodnoty je vzorek složením stejnocenný jako mezinárodně uznávaný standard, viz Tabulka 1 (Fry 2006).

Tabulka 1: Mezinárodně uznávané standardy pro izotopy uhlíku a dusíku.

izotop	standard	poměr izotopů	% těžkého izotopu	% lehkého izotopu
uhlík	PeeDee Belemnite	0,01118	1,1056	98,8944
dusík	atmosférický dusík	0,0036765	0,3663	99,6337

PeeDee Belemnite je fosilní vápenec získaný ze schránky *Belemnitella americana* (Fry 2006). V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých izotopů prvků uhlíku a dusíku. Z hodnot je patrné, že lehké izotopy ^{12}C a ^{14}N se vyskytují ve více než 98%, proto je poměr stabilních izotopů vyjadřován relativně dle výše uvedeného vzorce.

V ekologických studiích jsou rovněž používány izotopy vodíku, síry a kyslíku. Vzhledem k většímu množství používaných izotopů jsou uvedeny samostatně v Tabulce 2.

Tabulka 2: Vybrané mezinárodně uznávané standardy pro izotopy vodíku a síry.

izotop	standard	poměr izotopů	% těžkého izotopu	% lehkého izotopu
vodík	Standard Mean Ocean Water	0.00015576	0.015574	99.984426
kyslík 17O/16O	Standard Mean Ocean Water	0.0003799	0.03790	99.76206
kyslík 18O/16O	Standard Mean Ocean Water	0.0020052	0.20004	99.76206
síra ³³ S/ ³² S	Canyon Diablo Troilite	0.0078772	0.74865	95.03957
síra ³⁴ S/ ³² S	Canyon Diablo Troilite	0.0441626	4.19719	95.03957

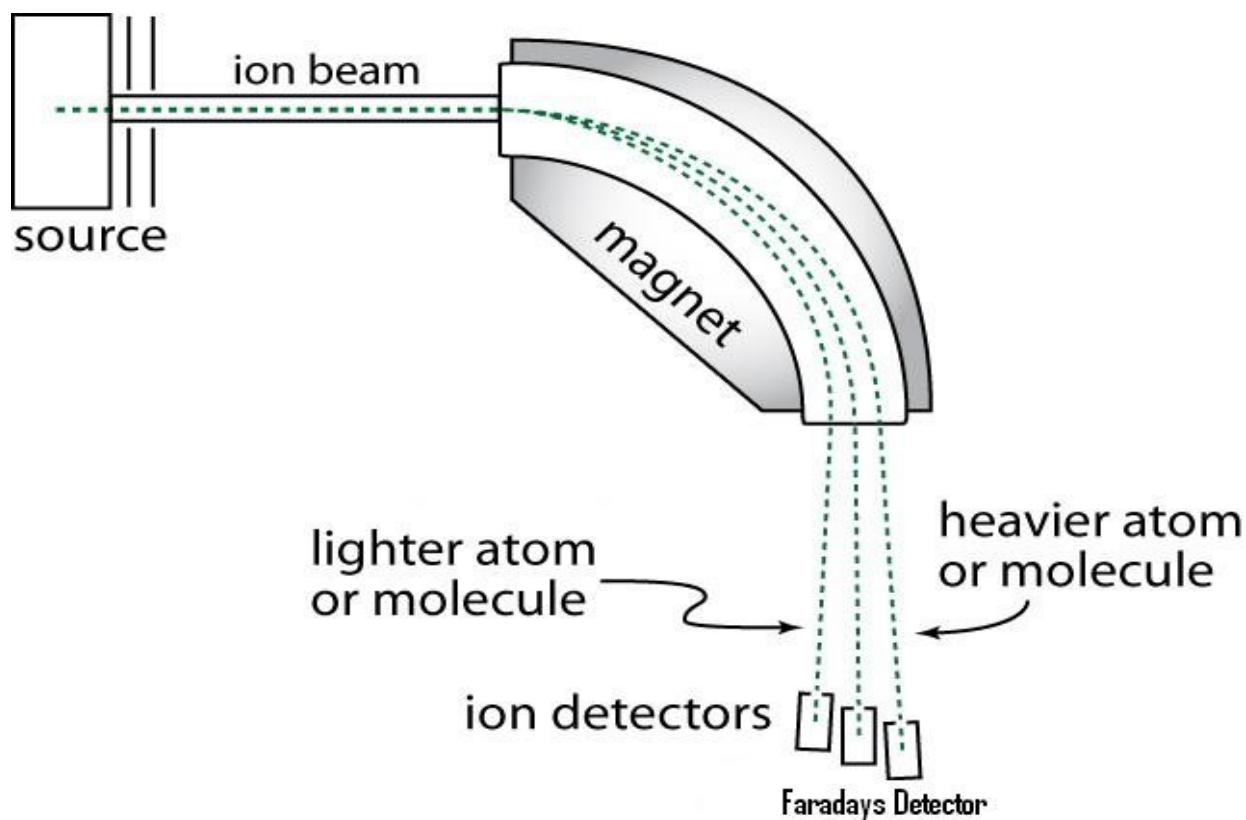
Standard Mean Ocean Water je izotopový standard oceánské vody, používá se pro studie hydrologických cyklů. Canyon Diablo Troilite je meteorit, který dopadl na Zem asi před 50 000 lety v Arizoně (Fry 2006).

Vzorky připravené v průběhu experimentu jsou umístěny do hmotnostního spektrometru, který je napojen na elementární analyzátor (Winters and Yee 2012; Iakovlev et al. 2017; McMeans et al. 2019). Hodnoty získané měřením se dále zpracovávají pomocí různých statistických metod jako například Anova (Tooker and Hanks 2004; Kaufmann and Schering 2014; Iakovlev et al. 2017; Potapov et al. 2019), v programu R (RStudio Team 2015; Nokelainen et al. 2016; Potapov et al. 2019) nebo například Manova (Stavert et al. 2014) v závislosti na tom, jaká byla prvotní hypotéza a jakou otázku by měla data zodpovědět.

2.3.2 Hmotnostní spektrometr

Analýza stabilních izotopů je prováděna pomocí přístroje zvaného hmotnostní spektrometr. Hlavními součástmi toho přístroje jsou iontový zdroj, analyzátor, detektor a dávkovač vzorků. Principem měření je zjednodušeně ionizace plynného vzorku pomocí elektronů. Ionty putují skrz elektromagnetické pole, kde dochází k odchýlení drah jednotlivých částic. Jelikož se izotopy liší svou hmotností, lehčí vybočují z osy více než ty těžké. Celý tento proces probíhající

ve vakuu zaznamenává detektor a výsledek je zpracováván počítačem, který je s celým systémem propojen, viz Obrázek 2. Výsledkem měření je již zmiňovaný poměr izotopů v daném vzorku.



Obrázek 2: Schéma hmotnostního spektrometru.

Znázorněn je průchod vzorku skrz iontový paprsek a elektromagnetické pole. Pozorovat lze vychýlení os dráhy lehčích a těžších molekul, které zaznamenává detektor. Převzato z <http://orgchemguide.blogspot.com/>.

3 Využití stabilních izotopů u hmyzu

Hmyz je skupina živočichů patřící do kmene členovců (Arthropoda). Přesné fylogenetické postavení je nejasné a objevují se stále nové studie týkající se fylogeneze hmyzu i jeho vnitřních skupin. Někdy je hmyz považován za sesterskou skupinu koryšů (Crustacea), v některých případech je považován za její vnitřní skupinu (Kjer et al. 2006; Tamone and Harrison 2015). Ačkoliv se počet vnitřních skupin hmyzu neustále mění díky molekulárním studiím (Dmitriev et al. 2018), jednoznačně je hmyz nejpočetnější skupinou živočichů. V současnosti je popsáno přes jeden milion druhů (Gaston 1991; Gullan and Cranston 2010; Stork 2018). Úspěšnost této skupiny je zapříčiněna zřejmě nejen schopností letu (Mayhew 2007), různými typy rozmnožování a mnoha životními strategiím, ale i díky metamorfóze (Yang 2001; Mayhew 2007; Rainford et al. 2014). Jednotlivá životní stádia hmyzu totiž obývají jiné habitaty (například larvy vážek a dospělci) a využívají jiné zdroje potravy (například housenka a dospělý motýl), proto si vzájemně nekonkurují (platí pro holometabolní hmyz). Stabilní izotopy jsou významné pro studium potravních nik živočichů, jejich trofickou úroveň a určení postavení v potravním řetězci (Winters and Yee 2012; Iakovlev et al. 2017). Pro odhadnutí trofické úrovně jsou používány izotopy dusíku (DeNiro and Epstein 1978; McCutchan et al. 2003; Heethoff and Scheu 2016; Bernhardt et al. 2017; Iakovlev et al. 2017). Díky izotopům uhlíku lze stanovit poměry zdrojů potravy živočichů, to znamená i vyhodnocení potravní strategie (Caut et al. 2009; Boecklen et al. 2011; Hyodo 2015; Bond et al. 2016; Heethoff and Scheu 2016) a vzájemné interakce mezi jednotlivými organismy v ekosystému (Grabmaier et al. 2014).

Izotopová analýza byla doposud používána především ve studiích týkajících se vodního prostředí (McMeans et al. 2019). Doposud provedené experimenty zahrnují hmyz jako přímý předmět studia, kde je sledována ekologie jeho samého (Gratton and Forbes 2006). Často hmyz figuruje ve studiích jako kořist jiných studovaných živočichů (Lancaster et al. 2008; Uadreo et al. 2018). Vzhledem k relativně nízkému počtu doposud provedených experimentů zaměřených právě na ekologii hmyzu s využitím stabilních izotopů jsou dále uvedeny vybrané konkrétní příklady studií a experimentů.

3.1 Trofické úrovně a potravní preference

Trofická úroveň organismu představuje jeho umístění v potravním řetězci z hlediska zdroje uhlíku. Těchto úrovní rozlišujeme několik a každá z nich hraje důležitou roli v ekosystému,

protože se vzájemně ovlivňují. Nejnižší trofickou úrovní jsou primární producenti, kterými jsou organismy, produkující prostřednictvím anorganických zdrojů organické sloučeniny (Ripple et al. 2016). Typickými producenty jsou autotrofní organismy získávající uhlík z oxidu uhličitého, který následně přeměňují na organické sloučeniny. Tyto organické sloučeniny poté slouží primárním konzumentům jako zdroj uhlíku. Další trofickou úroveň pak zaujímají sekundární konzumenti, pro které je zdrojem uhlíku kořist v podobě primárních konzumentů. Z výše uvedeného plyne, že primární, případně sekundární nebo vyšší konzumenti nejsou schopni vlastní existence bez primárních producentů. Konkrétním příkladem tohoto systému může být rostlina (producent), býložravec (primární konzument), predátor (sekundární konzument). V reálném ekosystému jsou pochopitelně tyto vztahy mnohem složitější a mnohdy nejasné. Živočichové se přizpůsobují podmínkám jako například množství kořisti a konkurence (Bearhop et al. 2004). Trofická úroveň živočicha je vyjadřována pomocí rozdílu poměru stabilních izotopů v jednotkách promile a tato hodnota je obvykle o dvě až pět promile vyšší než u kořisti, průměrně cca 3,5 promile (DeNiro and Epstein 1978; Adams and Sterner 2000; Bearhop et al. 2004; Tooker and Hanks 2004), což ne vždy platí pro detritivory (Oelbermann and Scheu 2010). Nicméně doposud není jasné, jak velká je odchylka v měření a přípravě vzorků, proto není možné s jistotou říci, jaká je absolutní hodnota rozdílu mezi jednotlivými trofickými úrovněmi (Adams and Sterner 2000).

Díky analýzám izotopů uhlíku a dusíku bylo zjištěno, že v různých vývojových stádiích dochází k postupnému navyšování izotopového poměru dusíku a je tedy nezbytné ve vlastní studii s tímto možným rozdílem počítat při stanovení trofické úrovně (Tibbets et al. 2008; Sloan et al. 2013).

V dalších studiích se objevují brouci z čeledi vrubounovití (Scarabaeidae). Tito brouci jsou nezbytnou součástí fungování ekosystému, neboť díky nim dochází prostřednictvím mineralizace k cyklování dusíku. Ten je nezbytný pro růst a vývoj rostlin (Nichols et al. 2008). Testovány byly izotopovou analýzou dusíku jejich potravní preference (Stavert et al. 2014) a cyklování živin pomocí izotopového značení (Nervo et al. 2017). Cílem první studie bylo určit, zda novozélandští brouci *Saphobius edwardsi* preferují jako potravu trus nebo mršinu. Brouci byli sesbíráni z jejich přirozeného prostředí. Pokus probíhal v laboratorních podmínkách, kde jim bylo nabídnuto několik různých variant potravy z různých druhů živočichů (trus živočichů žijících ve stejné lokalitě, savčí trus, hmyzí výkaly a mršiny). V průběhu pokusu byl pořizován videozáznam pro zachycení behaviorálních aktivit při výběru potravy a následně byla provedena izotopová analýza (Stavert et al. 2014). Dle výsledků

pozorování byly pro tyto brouky atraktivní takřka všechny rozkládající se zdroje potravy, především kuřecí mršina. Toto potvrdila i izotopová analýza, proto se dá vyhodnotit, že v případě *Saphobius edwardsi* se jedná o generalisty (Stavert et al. 2014).

Ve studii Nervo a kolektiv použili izotopové značení pro studium vzájemných interakcí v ekosystému. Modelovým organismem byli brouci skupiny Scarabaeoidea (Nervo et al. 2017). Tato skupina brouků je koprofágní, čímž napomáhá přirozenému toku živin a je proto klíčovou skupinou živočichů v ekosystémech (Nichols et al. 2008; Slade et al. 2011; Nervo et al. 2017). Izotopové značky jsou konkrétní hodnoty naměřené v dané oblasti (Rubenstein and Hobson 2004; Hood-nowotny et al. 2016). Tyto hodnoty jednoznačně určují původ jedinců. Můžeme rozlišit, zda byli sledovaní jedinci původně z oblasti, kde je pěstována zemědělská rostlina, nebo zda pochází z míst, kde je doposud přirozená vegetace (Hood-nowotny et al. 2016). Používány jsou izotopové poměry prvků uvedených v Tabulce 1 a v Tabulce 2 a jsou porovnávány s jejich mezinárodně uznávanými standardy. Alternativně je možné do potravy laboratorně chovaných živočichů zařadit potravu o předem známém izotopovém složení (Grabmaier et al. 2014; Nervo et al. 2017).

Dalším z prováděných výzkumů byla zjišťována trofická úroveň a sezónní změna složení potravy u mravenců *Formica aquilonia* (Iakovlev et al. 2017). Mravenci rodu *Formica* typicky žijí v lesích mírného pásu, kde významně ovlivňují složení společenstev členovců (Domisch et al. 2009; Iakovlev et al. 2017). Běžně se jedná o predátory generalisty, mohou se ale živit i jako býložravci (Davidson et al. 2004; Domisch et al. 2009). Vzhledem k variabilitě složení potravy je navzdory řadě provedeným studiím jejich trofická úroveň nejasná (Domisch et al. 2009; Iakovlev et al. 2017). Analyzovány byly kromě mravenců také primární zdroje jejich potravy respektive uhlíku a dusíku, tzn. různé druhy organismů a substrátu (Iakovlev et al. 2017). Výsledky hodnot izotopu uhlíku ukázaly vysokou trofickou závislost těchto mravenců na mšicích, které žijí na stromech. Hodnoty izotopů dusíku se pohybovaly v hodnotách cca o 3,5 ‰ vyšších než u mšic. V této konkrétní populaci se mravenci *Formica aquilonia* dle výsledných hodnot jeví jako predátoři první třídy (Iakovlev et al. 2017).

3.2 Migrace

Někteří živočichové kvůli sezónním podmínkám migrují, což se podepisuje na složení jejich potravy (Schwemmer et al. 2016; Jouta et al. 2017; Hobson et al. 2018). Díky konzumaci odlišné potravy dochází ke změně izotopových hodnot, které jsou typické pro geografickou oblast nebo lze rozlišit kořist pevninskou či mořskou (Jouta et al. 2017; Hobson et al. 2018).

Na základě izotopové analýzy lze sledovat sezónní pohyb živočichů, případně určit jejich původ (Stefanescu et al. 2016; Jouta et al. 2017; Cao et al. 2018; Hobson et al. 2018).

Využití nacházíme v tomto případě pro stanovení původů sezónně migrujících hmyzích škůdců a schopnosti jejich disperze (Schallhart et al. 2009; Hobson et al. 2018). Stanovení původu hmyzích škůdců a jejich migrace může napomoci v nasazení jejich predátorů (Hobson et al. 2018). Díky stabilním izotopům byla zjištěna větší schopnost rozšíření dospělců brouků z čeledi kovaříkovití (Elateridae) (Schallhart et al. 2009). Tato skupina hmyzu je považována za agrární škůdce kvůli škodám, které páchá na kulturních plodinách (Furlan 2004; Schallhart et al. 2009) a znalost jejich ekologie může být nápomocna při ochraně plodin před těmito škůdci.

Díky stabilním izotopům byla potvrzená známá teorie o migraci na dlouhé vzdálenosti u babočky bodlákové (*Vanessa cardui*). Předpokladem bylo, že tento druh motýla sezónně migruje z Evropy přes Saharu. Využit byl princip izotopových značek (Stefanescu et al. 2016). Podobným způsobem byl proveden výzkum u vážky *Pantala flavescens* (Cao et al. 2018), kde byla rovněž potvrzena sezónní migrace, jak bylo předpokládáno. Migrace hmyzu, tzn. přizpůsobení se aktuálním podmínkám jako je teplota nebo dostupnost potravy může mít vliv na reprodukční schopnosti (Zanden et al. 2018).

4 Stabilní izotopy a nekrobiontní hmyz

Nekrobiontní živočichové jsou takoví, kteří po část svého života obývají mrtvé tělo jiného živočicha, vyvíjejí se na něm a mohou se jím žít. Nekrofágní organismy se živí tkáněmi jiných mrtvých živočichů, ale není bezpodmínečně nutné, aby zde probíhal jejich vývoj nebo podstatná část života. Nekrobiontní a nekrofágní hmyz se podílí na rychlém rozkladu organické hmoty (Gullan and Cranston 2010). Pro člověky je významný především ve forezních vědách a kriminalistice (Zuha and Omar 2014; Bernhardt et al. 2017; Chesson et al. 2018; Matos et al. 2018). Díky znalosti nekrobiontního hmyzu lze určit dobu úmrtí a napomoci tak vyšetřování potenciálního trestného činu (Zuha and Omar 2014; Chesson et al. 2018). Do této skupiny patří čeledi hmyzu jako například bzučivkovití (Calliphoridae), moučovité (Muscidae), masařkovité (Sarcophagidae) ze skupiny dvoukřídlí (Diptera) (Benbow et al. 2016), dále pak zástupci brouků (Coleoptera) jako například mrchožroutovité (Silphidae), mršníkovidé (Histeridae), vrubounovité (Scarabaeidae) nebo drabčikovité (Staphylinidae) (Benbow et al. 2016).

Byl proveden výzkum na devíti druzích brouků, jehož cílem bylo zjistit zda se nelétaví brouci skutečně živí nekrofágně (Ikeda et al. 2007). Nejprve bylo určeno, zda konkrétní druh má nebo nemá přítomny létací svaly. U druhu *Eusilpha japonica* byla pozorována variabilita ve funkčnosti těchto svalů, u poloviny jedinců byla zjištěna absence létacích svalů, zatímco druhá polovina létací svaly měla (Ikeda et al. 2007). Čeleď mrchožroutovité (Silphidae) zahrnuje asi 200 druhů (Benbow et al. 2016). Živí se nekrofágně nebo jako predátoři (Kočárek 2003; Benbow et al. 2016). Výsledky studie ukázaly, že převážná většina vybraných nelétavých zástupců čeledi Silphidae se živí zejména na půdních bezobratlých. Zástupci bez schopnosti letu nemohou hledat potravu v tak rozsáhlém areálu oproti druhům se schopností letu, proto se živí mimo jiné živí na náhodně objevených mršinách (Ikeda et al. 2007).

Čeleď bzučivkovité (Calliphoridae) patří mezi jednu z prvních skupin, která nalétá na mrtvá lidská těla (Bernhardt et al. 2017; Matos et al. 2018). Jak naznačuje výzkum Bernhardta a kolektivu, izotopové hodnoty mrtvých lidských těl a některých zvířat byly velmi podobné (Bernhardt et al. 2017). V případě současného výskytu bzučivkovitých mohou být výsledky analýzy zavádějící. Doporučuje se proto použít kombinaci izotopové a DNA analýzy (Bernhardt et al. 2017).

5 Závěr

Studium hmyzu může vést k snadnějšímu pochopení interakcí v celém ekosystému (Agosta 2006; Lancaster et al. 2008; Rhinesmith-Carranza 2018). Jak se ukázalo, analýza stabilních izotopů uhlíku a dusíku je dobrým nástrojem pro výzkum této problematiky. Nicméně právě nedostatek dříve provedených experimentů může být jednou ze zásadních obtíží při navrhování vlastního budoucího výzkumu.

Analýza stabilních izotopů může být při správném provedení velice efektivní a přesná metoda především pro studium trofické úrovně živočichů, potravních preferencí a jejich geografickému původu. S přihlédnutím ke skutečnosti, že se jedná o metodu využívanou vědci již přes 40 let (Fry 2006), je bohužel v oblasti studia hmyzu stále novinkou a je potřeba provést podstatně více studií, které by pomohly odhalit mnohé nejasnosti v potravních strategiích. Pro co možná nejefektivnější výsledek budoucího experimentu je důležité si uvědomit, že izotopový poměr sám o sobě jako absolutní hodnota nepodává žádnou relevantní informaci. Je bezpodmínečně nutné hodnoty porovnat buď s mezinárodně uznávanými standardy nebo s hodnotami dříve naměřenými a zahrnout do tohoto měření i substrát, ve kterém se námi pozorovaný vzorek nacházel. Je pochopitelně nezbytné před samotným výzkumem být srozuměn s doposud známou ekologií živočichů, kteří jsou předmětem studia. Vhodné je kombinovat několik různých metod. Pro hrubou představu a behaviorální studie je žádoucí pozorování živočichů, ať už v terénu nebo v laboratorních podmínkách.

Analýza stabilních izotopů může rovněž poskytnout velice důležité informace týkající se hmyzích škůdců, což je v současné době, kdy je brán zřetel na co nejvyšší výnos hospodářských plodin užitečné pro aplikaci biologické ochrany v podobě přirozených predátorů. Pro člověka nachází uplatnění tato metoda i v oblasti kriminalistiky. Díky znalosti ekologie nekrobiontního hmyzu současně s použitím této metody je možné pomoci rozklíčovat potenciální kriminální činy.

Hmyz je skupinou velice rozmanitou a v ekosystémech i mimo ně hraje nezanedbatelnou roli. Vzhledem k širokému uplatnění analýzy stabilních izotopů je nezbytné pokračovat v dalších výzkumech a zdokonalovat tak výsledky, které mají pro člověka nezanedbatelný význam.

Seznam použité literatury

- Adams, Thomas S, and Robert W Sterner. 2000. 'The Effect of Dietary Nitrogen Content on Trophic Level $\delta^{15}\text{N}$ Enrichment' 45 (3): 601–7.
- Agosta, Salvatore J. 2006. 'On Ecological Fitting, Plant Insect Associations, Herbi v Ore Host Shifts, and Host Plant Selection'. *Oikos* 3 (May).
- Angelis, Flavio De, Gabriele Scorrano, Cristina Martínez-labarga, Francesca Giustini, Mauro Brilli, Elsa Pacciani, Mara Silvestrini, et al. 2019. 'Eneolithic Subsistence Economy in Central Italy : First Dietary Reconstructions through Stable Isotopes'. *Archaeological and Anthropological Sciences*.
- Atkinson, Carla L., Andrea C. Encalada, Amanda T. Rugenski, Steve A. Thomas, Andrea Landeira-Dabarca, N. Le Roy Poff, and Alexander S. Flecker. 2018. 'Determinants of Food Resource Assimilation by Stream Insects along a Tropical Elevation Gradient'. *Oecologia* 187 (3): 731–44. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4142-2>.
- Bearhop, Stuart, Colin E Adams, Susan Waldron, Richard A Fuller, and Hazel Macleod. 2004. 'Determining Trophic Niche Width : A Novel Approach Using Stable Isotope Analysis', 1007–12.
- Benbow, M. Eric, Jeffery K. Tomberlin, and Aaron M. Tarone. 2016. *Carrion Ecology, Evolution, and Their Applications*.
- Bennett, Pamela M, and Keith A Hobson. 2009. 'Trophic Structure of a Boreal Forest Arthropod Community Revealed by Stable Isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) Analyses'. *Entomological Science*, 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2009.00308.x>.
- Benson, Sarah, Chris Lennard, Philip Maynard, and Claude Roux. 2007. 'Forensic Applications of Isotope Ratio Mass Spectrometry — A Review'. *Elsevier* 157 (2006): 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.03.012>.
- Bernhardt, Victoria, Thomas Holdermann, Nicole Scheid, Thomas Schäfer, Marcel A Verhoff, and Jens Amendt. 2017. 'Same , Same but Different ! — Matching Entomological Traces to a Human Food Source by Stable Isotope Analysis'. *International Journal of Legal Medicine* 132 (3): 915–21.
- Birkhofer, Klaus, Helena Bylund, Peter Dalin, Olga Ferlian, Vesna Gagic, Peter A. Hambäck, Maartje Klapwijk, et al. 2017. 'Methods to Identify the Prey of Invertebrate Predators in Terrestrial Field Studies'. *Ecology and Evolution* 7 (6): 1942–53. <https://doi.org/10.1002/ece3.2791>.
- Boecklen, William J., Christopher T. Yarnes, Bethany A. Cook, and Avis C. James. 2011. 'On the Use of Stable Isotopes in Trophic Ecology'. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42 (1): 411–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144726>.
- Bond, Alexander L., Timothy D. Jardine, and Keith A. Hobson. 2016. 'Multi-Tissue Stable-Isotope Analyses Can Identify Dietary Specialization'. *Methods in Ecology and Evolution* 7 (12): 1428–37. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12620>.
- Boner, Markus. 2002. 'Examination of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopes in Sparkling and Semi-Sparkling Wine with the Aid of Simple on-Line Sampling'. *Micromass Application Note* 516, no. August.

- Bowser, A Kirsten, Antony W Diamond, and Jason A Addison. 2013. 'From Puffins to Plankton : A DNA-Based Analysis of a Seabird Food Chain in the Northern Gulf of Maine' 8 (12): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083152>.
- Cao, Ling-zhen, Xiao-wei Fu, Chao-xing Hu, and Kong-ming Wu. 2018. 'Seasonal Migration of *Pantala Flavesces* Across the Bohai Strait in Northern China'. *Environmental Entomology* 47 (March): 1–7. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy017>.
- Carroll, E L, R Gallego, M A Sewell, J Zeldis, L Ranjard, H A Ross, L K Tooman, R O Rorke, R D Newcomb, and R Constantine. 2019. 'Multi-Locus DNA Metabarcoding of Zooplankton Communities and Scat Reveal Trophic Interactions of a Generalist Predator'. *Scientific Reports*, no. July 2018: 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36478-x>.
- Caut, Stéphane, Elena Angulo, and Franck Courchamp. 2009. 'Variation in Discrimination Factors ($\Delta 15 N$ and $\Delta 13 C$): The Effect of Diet Isotopic Values and Applications for Diet Reconstruction', no. Post 2002: 443–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01620.x>.
- Chesson, Lesley A., Janet E. Barnette, Gabriel J. Bowen, J. Renée Brooks, John F. Casale, Thure E. Cerling, Craig S. Cook, et al. 2018. 'Applying the Principles of Isotope Analysis in Plant and Animal Ecology to Forensic Science in the Americas'. *Oecologia* 187 (4): 1077–94. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4188-1>.
- Cornelissen, I J M, J Vijverberg, A M Van Den Beld, N R Helmsing, J A J Verreth, and L A J Nagelkerke. 2018. 'Stomach Contents and Stable Isotopes Con Fi Rm Ontogenetic Diet Shifts of Nile Perch , *Lates Niloticus* , in Southern Lake Victoria'. *Journal of Great Lakes Research*, no. xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.08.008>.
- Davidson, Diane W, Steven C Cook, and Roy R Snelling. 2004. 'Liquid-Feeding Performances of Ants (Formicidae): Ecological and Evolutionary Implications'. *Oecologia*, 255–66. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1508-4>.
- DeNiro, Michael J., and Samuel Epstein. 1978. 'Influence of Diet on the Distribution of Carbon Isotopes in Animals * Pathways'. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42: 495–506.
- Dmitriev, V. Yu., D. S. Aristov, A. S. Bashkuev, D. V. Vasilenko, P. Vřsanský, A. V. Gorochov, E. D. Lukashvitch, et al. 2018. 'Insect Diversity from the Carboniferous to Recent'. *Paleontological Journal* 52 (6): 610–19. <https://doi.org/10.1134/S0031030118060047>.
- Domisch, T., L. Finér, S. Neuvonen, P. Niemelä, A. C. Risch, and J. Kilpeläinen. 2009. 'Foraging Activity and Dietary Spectrum of Wood Ants (*Formica Rufa* Group) and Their Role in Nutrient Fl Uxes in Boreal Forests'. *Ecological Entomology* 34: 369–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2009.01086.x>.
- Eerkens, Jelmer W, Eric J Bartelink, Julianna Bartel, and Phillip R Johnson. 2019. 'REPORT Isotopic Insights into Dietary Life History, Social Status, and Food Sharing in American Samoa', 1–17. <https://doi.org/10.1017/aaq.2018.84>.
- Elbrecht, Vasco, and Florian Leese. 2015. 'Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance ? Testing Primer Bias and Biomass — Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol', 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130324>.

- Estes, James A, John Terborgh, Justin S Brashares, Mary E Power, Joel Berger, William J Bond, Stephen R Carpenter, et al. 2011. 'Trophic Downgrading of Planet Earth' 333 (July): 301–7.
- Feng, Lichao, Liang Chang, Shaoqing Zhang, Xinyu Zhu, Sina Adl, and Donghui Wu. 2019. 'What Is the Carcass-Usage Mode of the Collembola ? A Case Study of Entomobrya Proxima in the Laboratory'. *Insects* 10. <https://doi.org/10.3390/insects10030067>.
- Fijn, Ruben C, Jan A Van Franeker, and Phil N Trathan. 2012. 'Vomit or Flush ? Diet Analysis Using Samples from Spontaneous Regurgitates or the Water-off-Load Technique'. *Seabird* 25: 22–28.
- Fry, Brian. 2006. *Stable Isotope Ecology. Stable Isotope Ecology Course*. New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/0-387-33745-8>.
- Furlan, L. 2004. 'The Biology of Agriotes Sordidus Illiger (Col ., Elateridae)' 128: 696–706. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00914.696>.
- Gannes, Leonard Z, Diane M O Brien, Carlos Martínez, and D E L Rio. 1997. 'Stable Isotopes in Animal Ecology: Assumptions, Caveats, and a Call for More Laboratory Work.' *Ecology* 78 (4): 1271–76. <https://doi.org/10.2307/2265878>.
- Gaston, Kevin J. 1991. 'The Magnitude of Global Insect Species Richness'. *Conservation Biology* 5 (3).
- Grabmaier, Andrea, Florian Heigl, Nico Eisenhauer, Marcel Van Der Heijden, and Johann G Zaller. 2014. 'Stable Isotope Labelling of Earthworms Can Help Deciphering Belowground–Aboveground Interactions Involving Earthworms, Mycorrhizal Fungi, Plants and Aphids'. *Pedobiologia - Journal of Soil Ecology*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2014.10.002>.
- Gratton, Claudio, and Andrew E. Forbes. 2006. 'Changes in $\Delta^{13}\text{C}$ Stable Isotopes in Multiple Tissues of Insect Predators Fed Isotopically Distinct Prey'. *Oecologia* 147 (4): 615–24. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0322-y>.
- Gullan, P.J., and P.S. Cranston. 2010. *The Insects: An Outline of Entomology*. Chichester: Chapman & Hall.
- Hallworth, Michael T, Peter P Marra, Kent P Mcfarland, Sara Zahendra, and Colin E Studs. 2018. 'Tracking Dragons : Stable Isotopes Reveal the Annual Cycle of a Long-Distance Migratory Insect'.
- Harris, Benjamin P., Jock W. Young, Andrew T. Revill, and Matthew D. Taylor. 2014. 'Understanding Diel-Vertical Feeding Migrations in Zooplankton Using Bulk Carbon and Nitrogen Stable Isotopes'. *Journal of Plankton Research* 36: 1159–63. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbu026>.
- Heethoff, Michael, and Stefan Scheu. 2016. 'Reliability of Isotopic Fractionation ($\text{D } 15 \text{ N}$, $\text{D } 13 \text{ C}$) for the Delimitation of Trophic Levels of Oribatid Mites : Diet Strongly Affects $\text{D } 13 \text{ C}$ but Not $\text{D } 15 \text{ N}$ '. *Soil Biology & Biochemistry* 101: 124–29. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.013>.
- Hobson, Keith A., Kyle Doward, Kevin J. Kardynal, and Jeremy N. McNeil. 2018. 'Inferring Origins of Migrating Insects Using Isoscapes : A Case Study Using the True Armyworm , Mythimna Unipuncta , in North America'. *Ecological Entomology*. <https://doi.org/10.1111/een.12505>.

- Hood-nowotny, Rebecca, Ally Harari, Rakesh K Seth, Suk Ling Wee, Des E Conlong, M Suckling, Bill Woods, Kaouthar Lebdi-grissa, Gregory Simmons, and James E Carpenter. 2016. 'Stable Isotope Markers Differentiate between Mass-Reared and Wild Lepidoptera in Sterile Insect Technique Programs'. *Florida Entomological Society* 99: 166–76.
- Hood-nowotny, Rebecca, and Bart G J Knols. 2007. 'Stable Isotope Methods in Biological and Ecological Studies of Arthropods', 3–16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00572.x>.
- Hood-Nowotny, Rebecca, Leo Mayr, Nabil Saad, Rakesh K. Seth, Goggy Davidowitz, and Gregory Simmons. 2016. 'Towards Incorporating Insect Isotope Analysis Using Cavity Ring-Down Spectroscopy into Area-Wide Insect Pest Management Programs'. *Florida Entomologist* 99 (sp1): 177–84. <https://doi.org/10.1653/024.099.sp121>.
- Hyodo, Fujio. 2015. 'Use of Stable Carbon and Nitrogen Isotopes in Insect Trophic Ecology'. *Entomological Science* 18 (3): 295–312. <https://doi.org/10.1111/ens.12128>.
- Iakovlev, Ivan K., Tatiana A. Novgorodova, Alexei V. Tiunov, and Zhanna I. Reznikova. 2017. 'Trophic Position and Seasonal Changes in the Diet of the Red Wood Ant *Formica Aquilonia* as Indicated by Stable Isotope Analysis'. *Ecological Entomology* 42 (3): 263–72. <https://doi.org/10.1111/een.12384>.
- Ikeda, Hiroshi, Kohei Kubota, Akira Kagawa, and Teiji Sota. 2010. 'Diverse Diet Compositions among Harpaline Ground Beetle Species Revealed by Mixing Model Analyses of Stable Isotope Ratios'. *Ecological Entomology* 35 (3): 307–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01182.x>.
- Ikeda, Hiroshi, Kohei Kubota, Takashi Kagaya, and Toshio Abe. 2007. 'Flight Capabilities and Feeding Habits of Silphine Beetles : Are Flightless Species Really ““ Carrion Beetles ””?' *Ecological Research*, 237–41. <https://doi.org/10.1007/s11284-006-0012-1>.
- Ishikawa, Naoto F. 2018. 'Use of Compound-Specific Nitrogen Isotope Analysis of Amino Acids in Trophic Ecology : Assumptions , Applications , and Implications'. *Ecological Research* 33: 825–37. <https://doi.org/10.1007/s11284-018-1616-y>.
- Jessica, Tricia, Anne Munkittrick, Tamara L Varney, Kelly-anne Pike, and Vaughan Grimes. 2019. 'Journal of Archaeological Science : Reports Life Histories from the Southside Cemetery , St . John ’ s , Newfoundland : Insights into Royal Naval Diet Using Stable Isotopes'. *Journal of Archaeological Science: Reports* 24 (February): 815–28. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2019.02.016>.
- Jouta, Jeltje, Maurine W. Dietz, Jeroen Reneerkens, Theunis Piersma, Eldar Rakhimberdiev, Gunnar T. Hallgrímsson, and Ido Pen. 2017. 'Ecological Forensics: Using Single Point Stable Isotope Values to Infer Seasonal Schedules of Animals after Two Diet Switches'. *Methods in Ecology and Evolution* 8 (4): 492–500. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12695>.
- Juen, Anita, and Michael Traugott. 2005. 'Detecting Predation and Scavenging by DNA Gut-Content Analysis: A Case Study Using a Soil Insect Predator-Prey System'. *Oecologia* 142 (3): 344–52. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1736-7>.

- Kartzinel, Tyler R, Patricia A Chen, Tyler C Coverdale, David L Erickson, W John Kress, Maria L Kuzmina, Daniel I Rubenstein, Wei Wang, and Robert M Pringle. 2015. 'DNA Metabarcoding Illuminates Dietary Niche Partitioning by African Large Herbivores'. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503283112>.
- Kaufman, Michael G., Kirsten S. Pelz-Stelinski, Donald A. Yee, Steven A. Juliano, Peggy H. Ostrom, and Edward D. Walker. 2010. 'Stable Isotope Analysis Reveals Detrital Resource Base Sources of the Tree Hole Mosquito, *Aedes Triseriatus*'. *Ecological Entomology* 35 (5): 586–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01217.x>.
- Kaufmann Jorg, and Schering. 2014. 'Analysis of Variance ANOVA By J'. *Wiley Encyclopedia of Clinical Trials*, 1–12.
- Kelly, Ryan P, Jesse A Port, Kevan M Yamahara, and Larry B Crowder. 2014. 'Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm' 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086175>.
- Kelly, Simon, and Karl Heaton. 2005. 'Tracing the Geographical Origin of Food : The Application of Multi-Element and Analysis' 16: 555–67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.08.008>.
- Kjer, Karl M, Frank Louis Carle, and Jessica Ware. 2006. 'A Molecular Phylogeny of Hexapoda'. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, no. October 2014.
- Kočárek, Petr. 2003. 'Decomposition and Coleoptera Succession on Exposed Carrion of Small Mammal in Opava , the Czech Republic'. *European Journal of Soil Biology* 39: 31–45.
- Koziet, J. 1993. 'Determination of Carbon-13 Content of Sugars of Fruit and Vegetable Juices'. *Analytica Chimica Acta* 271: 31–38.
- Kumar, Vrinda Ravi. 2018. 'The Induction of Larval Resource Preference In'. *Entomology, Ecological* 43. <https://doi.org/10.1111/een.12658>.
- Lancaster, J., Dobson, M., Magana, A. M., Arnold, A., & Mathooko, J. M. 2008. 'AN UNUSUAL TROPHIC SUBSIDY AND SPECIES DOMINANCE IN A TROPICAL STREAM'. *Ecology* 89 (8): 2325–34.
- Mackinnon, Amy T, Nicholas V Passalacqua, and Eric J Bartelink. 2019. 'Exploring Diet and Status in the Medieval and Modern Periods of Asturias , Spain , Using Stable Isotopes from Bone Collagen'.
- Matos, Mayara P V, Kateryna I Konstantynova, Rachel M Mohr, Glen P Jackson, and Glen P Jackson. 2018. 'Analysis of the 13 C Isotope Ratios of Amino Acids in the Larvae , Pupae and Adult Stages of Calliphora Vicina Blow Flies and Their Carrion Food Sources'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (30): 7943–54.
- Mayhew, Peter J. 2007. 'Why Are There so Many Insect Species ? Perspectives from Fossils and Phylogenies' 44: 425–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00018.x>.
- McCutchan, James, Wiliam Lewis, Carol Kendall, and Claire McGrath. 2003. 'Variation in Trophic Shift for Stable Isotope Ratios of Carbon , Nitrogen , and Sulfur' 2 (February): 378–90.

- McMeans, Bailey C., Taku Kadoya, Thomas K. Pool, Gordon W. Holtgrieve, Sovan Lek, Heng Kong, Kirk Winemiller, et al. 2019. 'Consumer Trophic Positions Respond Variably to Seasonally Fluctuating Environments'. *Ecology* 100 (2): 1–10. <https://doi.org/10.1002/ecy.2570>.
- Nervo, Beatrice, Enrico Caprio, Luisella Celi, Michele Lonati, Giampiero Lombardi, Gloria Falsone, Gabriele Iussig, Claudia Palestrini, Daniel Said-Pullicino, and Antonio Rolando. 2017. 'Ecological Functions Provided by Dung Beetles Are Interlinked across Space and Time: Evidence from 15 N Isotope Tracing'. *Ecology* 98 (2): 433–46. <https://doi.org/10.1002/ecy.1653>.
- Nichols, E, S Spector, J Louzada, T Larsen, S Amezcuita, and M E Favila. 2008. 'Ecological Functions and Ecosystem Services Provided by Scarabaeinae Dung Beetles'. *Biological Conservation* 1. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.04.011>.
- Nielsen, Jens M., Elizabeth L. Clare, Brian Hayden, Michael T. Brett, and Pavel Kratina. 2018. 'Diet Tracing in Ecology: Method Comparison and Selection'. *Methods in Ecology and Evolution* 9 (2): 278–91. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12869>.
- Nokelainen, Ossi, Brad S. Ripley, Erik van Bergen, Colin P. Osborne, and Paul M. Brakefield. 2016. 'Preference for C4 Shade Grasses Increases Hatchling Performance in the Butterfly, *Bicyclus safitza*'. *Ecology and Evolution* 6 (15): 5246–55. <https://doi.org/10.1002/ece3.2235>.
- Oelbermann, K, and S Scheu. 2010. 'Trophic Guilds of Generalist Feeders in Soil Animal Communities as Indicated by Stable Isotope Analysis (15 N / 14 N)'. *Bulletin of Entomological Research*, no. January: 511–20. <https://doi.org/10.1017/S0007485309990587>.
- Paris, Lieu, Paris Paris, and H T Information Public. 2007. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Edited by Robert Michener and Kate Lajtha. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470691854>.
- Pineda-munoz, Silvia, John Alroy, and Silvia Pineda-munoz. 2014. 'Dietary Characterization of Terrestrial Mammals'.
- Poelen, Jorrit H, James D Simons, and Chris J Mungall. 2014. 'Ecological Informatics Global Biotic Interactions : An Open Infrastructure to Share and Analyze Species-Interaction Datasets'. *Ecological Informatics* 24: 148–59. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2014.08.005>.
- Potapov, Anton M., Alexei V. Tiunov, Stefan Scheu, Thomas Larsen, and Melanie M. Pollierer. 2019. 'Combining Bulk and Amino Acid Stable Isotope Analyses to Quantify Trophic Level and Basal Resources of Detritivores: A Case Study on Earthworms'. *Oecologia* 189 (2): 447–60. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-04335-3>.
- Prasifka, Jarrad R., Kevin M. Heinz, and Kirk O. Winemiller. 2004. 'Crop Colonisation, Feeding, and Reproduction by the Predatory Beetle, *Hippodamia convergens*, as Indicated by Stable Carbon Isotope Analysis'. *Ecological Entomology* 29 (2): 226–33. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2004.00585.x>.
- Rainford, James L, Michael Hofreiter, David B Nicholson, and Peter J Mayhew. 2014. 'Phylogenetic Distribution of Extant Richness Suggests Metamorphosis Is a Key Innovation Driving Diversification in Insects' 9 (10): 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109085>.

- Rhinesmith-Carranza, J. 2018. 'Impacts of Dietary Amino Acid Composition and Microbial Presence on Preference and Performance of Immature *Lucilia Sericata* (Diptera : Calliphoridae)'. *Entomology, Ecological*. <https://doi.org/10.1111/een.12646>.
- Ripple, William J, James A Estes, Oswald J Schmitz, Vanessa Constant, Matthew J Kaylor, Adam Lenz, Jennifer L Motley, Katharine E Self, David S Taylor, and Christopher Wolf. 2016. 'What Is a Trophic Cascade?' *Trends in Ecology & Evolution*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.08.010>.
- Roeder, Karl A. 2017. 'From Cryptic Herbivore to Predator: Stable Isotopes Reveal Consistent Variability in Trophic Levels in an Ant Population'. *Biology, Evolutionary* 98 (2): 297–303. <https://doi.org/10.1002/ecy.1641>.
- Rubbmark, Oskar Rennstam, Daniela Sint, Sandra Cupic, and Michael Traugott. 2019. 'When to Use NGS or Diagnostic PCR in Diet Analyse'. *Molecular Ecology Resources* 19: 0–3. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12974>.
- Rubenstein, Dustin R., and Keith A. Hobson. 2004. 'From Birds to Butterflies: Animal Movement Patterns and Stable Isotopes'. *Trends in Ecology and Evolution* 19 (5): 256–63. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.03.017>.
- Sanchez Bragado, Rut, Maria Dolors Serret, Rosa Maria Marimon, Jordi Bort, and José Luis Araus. 2019. 'The Hydrogen Isotope Composition $\delta^2\text{H}$ Reflects Plant Performance'. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00238>.
- Schallhart, Nikolaus, Corinna Wallinger, Anita Juen, and Michael Traugott. 2009. 'Dispersal Abilities of Adult Click Beetles in Arable Land Revealed by Analysis of Carbon Stable Isotopes'. *Agricultural and Forest Entomology* 11: 333–39. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2009.00428.x>.
- Schwemmer, Philipp, Christian C Voigt, Anna-marie Corman, Sven Adler, and Stefan Garthe. 2016. 'Body Mass Change and Diet Switch Tracked by Stable Isotopes Indicate Time Spent at a Stopover Site during Autumn Migration in Dunlins *Calidris alpina*'. *Journal of Avian Biology*, no. March: 1–9. <https://doi.org/10.1111/jav.00873>.
- Slade, Eleanor M, Darren J Mann, and Owen T Lewis. 2011. 'Biodiversity and Ecosystem Function of Tropical Forest Dung Beetles under Contrasting Logging Regimes'. *Biological Conservation* 144 (1): 166–74. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.08.011>.
- Sloan, J V, S D Porter, and C L Sagers. 2013. 'Stable Isotope Enrichment in Laboratory Ant Colonies : Effects of Colony Age , Metamorphosis , Diet , and Fat Storage', 265–72. <https://doi.org/10.1111/eea.12126>.
- Stavert, J. R., A. C. Gaskett, D. J. Scott, and J. R. Beggs. 2014. 'Dung Beetles in an Avian-Dominated Island Ecosystem: Feeding and Trophic Ecology'. *Oecologia* 176 (1): 259–71. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3001-z>.
- Stefanescu, C., David X Soto, Gerard Talavera, Roger Vila, Keith A Hobson, and Cerdanyola Valle. 2016. 'Long-Distance Autumn Migration across the Sahara by Painted Lady Butterflies : Exploiting Resource Pulses in the Tropical Savannah'. *Biology Letters*.
- Stork, Nigel E. 2018. 'How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth ?', no. September 2017: 31–45.

- Straube, Daniela, and Anita Juen. 2013. 'European Journal of Soil Biology Storage and Shipping of Tissue Samples for DNA Analyses : A Case Study on Earthworms Q'. *EJSOBI* 57: 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.04.001>.
- Strojnik, Lidija, Matej Stopar, Emil Zlatič, Doris Kokalj, Mateja Naglič Gril, Bernard Ženko, Martin Žnidaršič, et al. 2018. 'Authentication of Key Aroma Compounds in Apple Using Stable Isotope Approach'. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.140>.
- Tamone, Sherry L, and Jon F Harrison. 2015. 'Integrative and Comparative Biology Linking Insects with Crustacea : Physiology of the Pancrustacea : An Introduction to the Symposium'. *Integrative and Comparative Biology* 55 (5): 765–70. <https://doi.org/10.1093/icb/icv093>.
- Tibbets, Teresa M, Leslie A Wheelless, and Carlos Martínez. 2008. 'Isotopic Enrichment without Change in Diet : An Ontogenetic Shift in δ 15 N during Insect Metamorphosis', no. Chapman 1998: 109–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01342.x>.
- Tooker, John F, and Lawrence M Hanks. 2004. 'Trophic Position of the Endophytic Beetle , Mordellistena Aethiops Smith (Coleoptera : Mordellidae) Trophic Position of the Endophytic Beetle , Mordellistena Aethiops Smith (Coleoptera : Mordellidae)'. *Entomological Society of America* 33 (2): 291–96.
- Uadreo, N Ittaya R, C Hristian C V Oigt, and S A R A B Umrungsri. 2018. 'Large Dietary Niche Overlap of Sympatric Open-Space Foraging Bats Revealed by Carbon and Nitrogen Stable Isotopes'. *Acta Chiropterologica* 20 (2): 329–41. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2018.20.2.005>.
- Uvarov, Alexei V., and Kamil Karaban. 2015. 'Do Alterations in Mesofauna Community Affect Earthworms?' *Oecologia* 179 (3): 877–87. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3383-6>.
- Vall, Cerdanyola. 2013. 'A Pragmatic Approach to the Analysis of Diets of Generalist Predators : The Use of next-Generation Sequencing with No Blocking Probes'. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12156>.
- Westrop, Gareth D, Lijie Wang, Gavin J Blackburn, Tong Zhang, Liang Zheng, G Watson, and Graham H Coombs. 2017. *Metabolomic Profiling and Stable Isotope Labelling of Trichomonas Vaginalis and Tritrichomonas Foetus Reveal Major Differences in Amino Acid Metabolism Including the Production of 2-Hydroxyisocaproic Acid , Cystathionine and S-Methylcysteine*.
- Winters, Anne E., and Donald A. Yee. 2012. 'Variation in Performance of Two Co-Occurring Mosquito Species across Diverse Resource Environments: Insights from Nutrient and Stable Isotope Analyses'. *Ecological Entomology* 37 (1): 56–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2011.01337.x>.
- Worku, Mohammed, Hari Ram Upadhayay, Kris Latruwe, Alex Taylor, Frank Vanhaecke, Luc Duchateau, and Pascal Boeckx. 2019. 'Differentiating the Geographical Origin of Ethiopian Coffee Using XRF- and ICPbased Multi-Element and Stable Isotope Profiling'. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.135>.

- Yang, Andrew S. 2001. 'Modularity , Evolvability , and Adaptive Radiations : A Comparison of the Hemi- and Holometabolous Insects' 72: 59–72.
- Zanden, Hannah B Vander, Carol L Chaffee, Antonio González-rodríguez, D T Tyler, D Ryan Norris, and Marta L Wayne. 2018. 'Alternate Migration Strategies of Eastern Monarch Butterflies Revealed by Stable Isotopes'. *Animal Migration* 5 (1): 74–83.
- Zuha, Raja Muhammad, and Baharudin Omar. 2014. 'Developmental Rate, Size, and Sexual Dimorphism of *Megaselia Scalaris* (Loew) (Diptera: Phoridae): Its Possible Implications in Forensic Entomology'. *Parasitology Research* 113 (6): 2285–94.
<https://doi.org/10.1007/s00436-014-3883-z>.