

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Detekce fluorescenčně značené kořisti ve střevech
predátorů a scavengerů, dynamika scavengingu
v modelovém experimentu**

Bakalářská práce

Ondřej Mottl

Školitel: RNDr. Pavel Foltan, PhD.

České Budějovice 2013

Bakalářská práce

Mottl O., 2013: Detekce fluorescenčně značené kořisti ve střevech predátorů a scannerů, dynamika scavengingu v modelovém experimentu (Detection of UV-fluorescent-marked prey in the guts of predators and scavengers, dynamic of scavenging in a model experiment Bc. Thesis, in Czech) - 38p, Faculty of science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Scavenging represents an important ecological process in terms of nutrition circulation and food web interactions. This thesis deals with using of UV-fluorescent dye in a field experiment based on method developed in laboratory to assess whether this method is applicable for identification of scavengers under field conditions. Field experiment was conducted in Mokre, Ceske Budejovice, Czech Republic. This laboratory part has been made at the Faculty of Science, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 26. dubna 2013.

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Pavlu Foltanovi za trpělivost a osobní přístup. Dále chci poděkovat Janu Okrouhlíkovi za cenné rady při práci, Romanu Neužilovi za poskytnutí larev a Šárce Klementové a Petru Kopáčkovi za zapůjčení vybavení. Chci poděkovat mojí rodině a partnerce za podporu a všem přátelům za psychickou výdrž.

Obsah

1 Současná fakta	1
1.2 <i>Potravní pyramida a tok živin</i>	1
1.2.1 <i>Mrchožroutství bezobratlých zdechlin (Scavenging)</i>	3
1.3 <i>Scavenging a probematika vztahu predátor-kořist</i>	4
2. Metody identifikace vztahu predátor-kořist	5
2.1 <i>Typy používaných metod pro výzkum vztahu predátor-kořist</i>	5
3. Souhrn a použití známých metod na výzkum predátor-kořist	7
3.1 <i>Statistické metody</i>	7
3.1.1 <i>Korelační odhad</i>	8
3.1.2 <i>Sezónní četnost predátorů</i>	9
3.2 <i>Přímé pozorování</i>	9
3.3 <i>Použití mini-plot experimentů</i>	10
3.4 <i>Značení kořisti</i>	11
3.4.1 <i>Barviva, značení prachem a perorální barvení</i>	12
3.4.1.1 <i>Barvení UV-fluorescentním pigmentem</i>	12
3.4.2 <i>Perorální využití barviv a pigmentů</i>	13
3.4.3 <i>Značení vzácnými prvky</i>	14
3.4.4 <i>Použití stabilních izotopů</i>	14
3.4.5 <i>Značení radioaktivními isotopy</i>	15
3.5 <i>Molekulární metody</i>	15
3.5.1 <i>Elektroforéza proteinů</i>	15
3.5.2 <i>Serologické značení</i>	16
3.5.2.1 <i>ELISA</i>	16
3.5.2.2 <i>Monoklonální protilátky</i>	17
3.5.2.3 <i>Králičí imunoglobulin</i>	18
3.5.3 <i>PCR a DNA</i>	18
Pilotní pokus	20
4 Materiál a metody	20
4.1 <i>Detekce fluorescenčně obarvené kořisti UV-fluorescenční pigment</i>	20
4.2 <i>Příprava návnady</i>	20
4.3 <i>Zemní pastě</i>	20

4.4 Výběr lokality.....	21
4.5 Meteorologická data.....	22
4.6 Polní experiment – Spektrum scavengerů	23
4.6.1 Analýza obsahu střevního traktu.....	24
4.6.2 Detekce Fluorescence.....	24
4.6.3 Zjištění kritické hodnoty pozitivního označení	24
4.6.4 Zpracování dat	24
4.7 Dynamika scavengingu	25
5 Výsledky	25
5.1 Výsledky pokusu Spektrum scavengerů.....	25
5.2 Výsledky Dynamiky scavengingu	28
6 Diskuze a závěr	29
7 Bibliografie	33
8. Přílohy.....	39

Úvod

1 Současná fakta

1.2 Potravní pyramida a tok živin

Potravní pyramida a její variace představují široce přijímaný obecný model toku živin v ekosystému. Na bázi pyramidy je primární producent, nad kterým je konzument prvního řádu následovaný konzumentem druhého řádu a tak dále. Organismy z vyšších pater konzumují ty z nižších a jsou konzumovány úrovní nad nimi (viz Obrázek 1). To je běžný pohled na potravní pyramidu (Janzen 1977). Po smrti organismu jsou látky rozloženy saprofágy zcela mimo model pyramidy a putují do báze systému (Pimm 2002).



Obrázek 1: Tradiční pohled na potravní pyramidu bez scavengingu. Živiny se šíří do vyšších pater pomocí konzumace pater nižších. Mrtvé organismy jsou rozloženy reducenty.

Za rozkladače jsou v terestrických ekosystémech nejčastěji považovány houby a bakterie (Begon *et al.* 1990), jiné rozkladače různé modifikace modelu potravní pyramidy ve většině případů opomíjí. Odumřelé organismy rostlinného původu jsou sice nejčastěji zkonsumovány houbami a bakteriemi, ovšem zdechliny (mrtvé organismy živočišného původu) jsou, dle Feller & Feller (1982), ve většině terestrických ekosystémů konzumovány z 50-100% mrchožrouty. Tato informace ovšem značně mění celý pohled na tok živin, neboť značná část se vrací zpět do koloběhu právě za pomoci mrchožroutství (viz Obrázek 2) a posunuje tak energetickou hladinu ekosystému značně nahoru (de Vault *et al.* 2003).



Obrázek. 2: Hypotetická potravní pyramida včetně efektu scavengingu. Živiny se šíří do vyšších pater pomocí konzumace pater nižších. Sklon pyramidy není tak ostrý a živiny cyklují ve vyšších vrstvách za pomoci scavengingu. Reducenti rozkládají z velké části hlavně trus.

Zejména mrtvoly členovců (vzhledem k jejich značné celkové biomase a krátkým životním cyklům) pak mohou mít značný vliv na energetické sítě ekosystému, neboť obsahují velké množství nevyužitých zdrojů. Sezónní úmrtí členovců po páření tak mohou skokově ovlivňovat celý ekosystém. Jako příklad populačního výkyvu, lze uvést třeba periodicky se pářící cikády *Magicicada cassini*, jejíž skupinové úmrtí zásadně ovlivňuje celý ekosystém v Kings Creek v Kansasu prokazatelným zvýšením množství dusíku se sedmnáctiletou periodou (Whiles *et al.* 2001).

1.2.1 Mrchožroutství bezobratlých zdechlin (Scavenging)

Otázkou zůstává, jací živočichové tuto potravní strategii používají a jak velké procentuální zastoupení potravy zdechliny představují. Této problematice je sice v současnosti věnováno více pozornosti, přesto je mrchožroutství bezobratlých zdechlin (scavenging) málo prozkoumanou disciplínou. Touto tematikou se v užším smyslu do současné doby zabývalo jen 7 článků (Fiala 2011). Jsou to Seastedt *et al.* (1981); Fellers & Fellers (1982); Young (1984); Retana *et al.* (1991); Bestelmeyer & Wiens (2003); Foltan *et al.* (2005) a Tan & Corlett (2012).

Mrchožroutství bezobratlých zdechlin jinými bezobratlými je málo studované, ačkoli se na odklizení mrtvol podílí nejvíce právě hmyz (Young 1984). To podporuje studie Pechová & Foltan (2008), kde je popsána zvláštní strategie proti scavengingu, při které parazitoid (hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita*) dokončující vývoj v mrtvém hostiteli ovlivní chování hostitele těsně před smrtí, tak aby nebyl hostitel nalezen mrchožroutem. To nasvědčuje tomu, že scavenging je častou potravní strategií, jinak by se proti němu jen těžko mohla vytvořit strategie. Celá problematika scavengingu na mrtvých bezobratlých je velmi málo zdokumentována a často se jedná buď o laboratorní pokusy, nebo pokusy s bezobratlou návnadou v místě výskytu mravenců simulující výskyt kořisti. Při výzkumu rychlosti vyhledávání kořisti a distribuci kořisti v rámci mravenčí kolonie se tak vlastně nedopatřením podařilo získat i data o scavengingu. To z mravenců dělá nejlépe zdokumentované mrchožrouty (Carroll & Janzen 1973; Retana *et al.* 1991; Baur *et al.* 1998; Bestelmeyer & Wiens 2003; DeVault *et al.* 2003; Buczkowski & Bennett 2007; Tan & Corlett 2012).

Na mrchožroutství je často hleděno jako na raritní strategii než na běžný zdroj živin pro organismus (DeVault *et al.* 2003). Přitom v mrtvolách jsou v podstatě živiny volně k dispozici, neboť se mrtvoly nebrání ani se nepohybují. Predátor tedy může velmi snadno doplňovat živiny za pomoci požívání nalezených mršin (Seastedt *et al.* 1981), i když je považován převážně za predátora. Překážkou pro obligatorní scavenging je náhodný výskyt mršin v čase a prostoru (s výjimkou masových úhynů po paření apod.), jejich malá velikost, nemožnost skladovat zásoby živin v malém těle bezobratlého scavengera po velkou dobu a velká kompetice fakultativních scavengerů – rychlé mizení náhodně distribuovaných mrtvol (Renata *et al.* 1991; Foltan *et al.* 2005).

1.3 Scavenging a problematika vztahu predátor-kořist

Z hlediska potravní ekologie většina modelů predátor-kořist problematiku mrchožroutství nezahrnuje. Určitá a pravděpodobně značná část výsledků studií modelu predátor-kořist může být tedy značně ovlivněna, neboť predátor sice ovlivňuje populaci kořisti, ovšem nemalé množství kořisti zemře jinou cestou než predací jako jsou například nemoci, parazitace, dehydratace, hlad nebo smrt následkem zranění. (DeVault *et al.* 2003)

Problém nastává zejména při použití jinak velmi cenných a užitečných analýz střevního obsahu predátorů (Symondson 2002), neboť je problematické zjistit, jak se živočich do střeva dostal, zdali predací nebo mrchožroutstvím (DeVault *et al.* 2003). To dobře ilustruje příklad, kdy lovci v Iowě našli v doupěti lišky uzenu šunku, z toho ale neleze usoudit, že liška loví prasata (Errington 1935).

Problémem v určení vztahu predátor kořist, při použití výše zmíněných metod, je potom i druhotná predace, známá také jako hyperpredace, při které je první predátor ihned po konzumaci kořisti uloven dalším predátorem a při rozboru střevního obsahu je poté mylně považována kořist prvního predátora za vlastní kořist druhotného predátora i přesto, že druhotný predátor prvotní kořist vůbec neloví. Druhotná predace je sice poměrně často zmiňována v publikacích zabývajících se metodami střevních analýz (Hagler & Narajo 1996; Sunderland 1987, 1996; Symondson *et al.* 1996 a Symondson 2002), ale její četnost není nijak blíže specifikována. Na tento fakt poukázal již například Harwood *et al.* (2001). Hyperpredace sice nemusí být tak častá jako scavenging, ale i přesto by se s ní, při interpretaci střevní analýzy, mělo počítat.

Pro zkoumání scavengingu lze pravděpodobně využít některých metod běžně používaných pro zkoumání vztahu predátor-kořist. Lze rovněž předpokládat, že některé metody používané pro identifikaci vztahu predátor-kořist mohou být scavengingem silně ovlivněny. Právě možností využití metod pro zkoumání vztahu predátor-kořist pro výzkum scavengingu, popř. jejich možným zkreslením scavengingem, se zabývá následující kapitola.

2. Metody identifikace vztahu predátor-kořist

Značná část ekologických nebo etologických studií zabývajících se trofickými sítěmi, které pracují s populacemi živočichů v daném ekosystému, potřebují zjistit, kým je daný živočich loven, případně, kdo je jeho kořistí. Řešení tohoto zdánlivě banálního problému může být metodicky velmi komplikované. Pokud se jedná o živočicha dostatečně velkého, denního a terestrického, jako například lvi lovící zebry, tak to není problémem. Značná část živočichů je ale drobná, evasivní, kriptická nebo noční. Tento fakt značně komplikuje nejjednodušší zjišťovací techniku, kterou je přímé pozorování.

Protože většina chování živočichů nemůže být přímo pozorována, vznikly různé metody pro jejich nepřímé pozorování. Mezi nejpoužívanější patří použití určité látky pro označení sledovaných jedinců. Tento princip sledování hmyzu byl využit již v r. 1920 (Hagler & Jackson 2001) pro značení komárů v rýžových polích pro kontrolu rozšíření malárie.

Značení biologických vzorků je velmi důležitý proces při provádění jak terénních tak laboratorních pokusů. Výběr vhodného označení pro daný pokus může být naprosto zásadní při plánování metodiky pokusu. Přitom bývá tento fakt často opomíjen, případně nejsou některé techniky příliš známé (Symondson 2002). Při značení vzorku musí být brány v potaz zejména faktory, jako jsou délka označení, cena, přesnost výsledků, možnost manipulace se vzorkem apod.

2.1 Typy používaných metod pro výzkum vztahu predátor-kořist

Použitelných metod je velké množství a pro zpřehlednění se mohou teoreticky rozdělit do několika skupin, podle kritérií jako jsou práce s materiálem, jakým způsobem lze metody využít, nebo náročnost na vybavení.

Nejjednodušším kritériem dělením metod je dělení na invazní a neinvazní. Invazní metody jsou všechny, při kterých dochází k zabití nebo poškození predátora pro získání informace o obsahu žaludku, popřípadě zbytku trávicí trubice. I přes velmi malou pravděpodobnost opětovného použití živočicha mají tyto metody hned několik výhod, neboť přímá analýza obsahu trávicí trubice dodává velmi silný důkaz (ne stoprocentní, viz hyperpredace) o predaci daného živočicha. Bohužel ovšem neříkají nic o tom, jakým způsobem se daný vzorek do živočicha dostal. Predací nebo scavengingem? Vzorek pozřených živočichů lze získat i neinvazivně a to z trusu. Metoda výzkumu trusu, může být účinná, jen pokud se v trusu dají nalézt tvrdé, nestravitelné části živočichů jako například kosti, chitin atd. Na určení je ovšem potřeba velmi zkušený determinátor. Bohužel je tedy tato technika často nevhodná pro výzkum značného množství bezobratlých jak ukázal například Moreby (1988), při výzkumu zbytků bezobratlých v ptačím trusu.

Invazní metody ovšem nemůžeme použít, pokud máme například malé množství testovacích subjektů, nemůžeme přesně určit, jak se daná organická hmota do trávicí trubice dostala nebo se jedná o chráněného predátora.

Další možnost dělení metod je dělení na kvalitativní a kvantitativní, které použil například Grant & Sheppard (1985). Kvalitativní metody zodpovídají jednoduchou otázku a to zda se daný živočich živí právě touto kořistí. Odpovědi jsou ANO nebo NE. Naproti tomu kvalitativní metody říkají kolik živočichů je predátor schopen zabít a pozřít a frekvence lovení daného druhu.

Podle Haglera & Jacksona (2001), kteří se ve své rešerši zaměřují na značení hmyzu jako obecný problém, je možné dělení metod zkoumající vztah predátor-kořist na MRR (mark-release-recapture) a MR (mark-recapture) metody. Využití konkrétního metodického postupu pak závisí zejména na tom, pro jaký účel chceme živočichy pozorovat. Zatímco MRR se využívají na dlouhodobé značení jednotlivých jedinců, MR metody mohou být použity buď pro plošné značení velkého množství jedinců, nebo na techniky, kdy dochází k označení jedince automaticky (samooznačení) bez zásahu člověka (například miska s barvou položená před vchod do mraveniště označí každého jedince, který projde dovnitř nebo ven). Při zkoumání vztahu predátor-kořist se spíše využijí metody MRR neboť potřebujeme interakce mezi značenou kořistí a predátorem. Metody MR by byly použitelné, pouze pokud by značení bylo přenosné. To ovšem nezaručí, že přenos značení proběhl při predaci a ne při náhodném střetu, obraně teritoria nebo jiné interakci. MRR jsou v určitém pohledu pro výzkum scavengingu vhodnější, například je možné označit předem zdechliny (mark), položit je jako návnady (release) a následně zkoumat trávící trakty chycených potenciálních scavengerů na přítomnost označené kořisti (recapture), viz dále.

Další z možných dělení metod pro výzkum vztahu predátor-kořist je na terénní použití a laboratorní pokusy. Zatímco laboratorní pokusy dovolují lépe pracovat s materiály a živočichy, terénní pokusy jsou často mnohem blíže přirozenému prostředí a skutečné funkci ekosystému. Pokusy v laboratoři sice umožňují snadněji designovat pokus a často zvyšují celkovou přesnost výsledků, ale interakce mezi živočichy v laboratorních podmínkách nemusí mít v mnohých případech s reálnou interakcí nic společného.

3. Souhrn a použití známých metod na výzkum predátor-kořist

3.1 Statistické metody

Statistické metody využívají data o velikosti populací a jejich správné zpracování a interpretování nám může poskytnout nové informace o vztazích mezi živočichy v ekosystému s možností odhalení potenciálního predátora. Pokud se na tyto metody navíc podíváme s přihlédnutím na existenci scavengingu, můžeme získat unikátní pohledy na vztahy mezi organismy a někdy i zcela nové interpretace získaných dat.

3.1.1 Korelační odhad

Korelační odhad je statistická metoda založená na zaznamenávání velikosti populace predátorů a kořisti po několik sezon a hledání korelační závislosti mezi populacemi. I když se jedná pouze o nepřímé potvrzení vztahu, byla tato metoda v minulosti používána. Putman & Herne (1964) například pomocí manipulativního experimentu v broskvových sadech zjistil predáční vztah mezi pavoukem rodu *Typhlodromus* a vlnovníkem *Aculus cornutus*. Negativum této metody je zejména možnost, že obě populace patří do mnohem komplikovanější struktury vztahů v dané populaci a nemusí spolu přímo interagovat (Huffaker & Kennett 1969). Obě populace navíc musí být sledovány po značnou dobu a ani to nemusí poskytnout těsnou korelační závislost. O kauzalitě se mnohdy nelze dozvědět více, dokud není proveden manipulativní experiment. Tato metoda je tedy vhodná pro prvotní podezření na vztah predátor-kořist, ale nelze ji použít jako silný argument pro potvrzení predáčního vztahu. Z pohledu zjištění scavengingu je tato metoda naprosto nevhodná neboť z dat o počtu jedinců nelze říct co se děje s mrtvolami, které nepodlehnu predaci. Naopak, pokud je predátor zároveň scavengerem, značně to zkomplikuje určení vztahu. Při vysoké úmrtnosti jednoho druhu může jiný druh za pomoci scavengingu prospívat i přesto, že není přímým predátorem daného druhu.

3.1.2 Sezónní četnost predátorů

Jedná se opět o dedukci za pomoci již získaných dat o populacích. Velikosti populací mohou nejen každoročně oscilovat, ale mohou vykazovat nárazové vzrůsty i propady v závislosti na sezóně. Sledovány mohou být například populace predátora po náhlých sezónních výskytech kořisti, jako jsou hromadné páření a jiné. Může být také ale sledována například reakce dané populace na náhlý sezónní nárůst populace predátora. Je velmi lákavé utvořit jednoduchý precedent o vztahu predátor-kořist, ovšem nesmíme zapomínat na problematiku příčiny a následku, neboť systém může být opět mnohem složitější a ze získaných dat nevyčteme všechny složky ekosystému. Tato metoda může být velmi prospěšná, pokud zkoumáme vztah predátor-kořist-pesticid (Grant & Sheppard 1985), kdy se zkoumá vliv četnosti predátora na stav pěstované plodiny. Pesticidy mohou ovlivňovat nejen stavy herbivorů ale i populace predátorů, protože ti se mohou živit i částečně otrávenými škůdci (Langan *et al.* 2004). Statistické metody mohou být v budoucnu použity na výzkum scavengingu pokud by se sledovala hromadná úmrtí hmyzu po páření a následný nárůst populace podezřelé na scavenging.

3.2 Přímé pozorování

Jak již bylo zmíněno, přímé pozorování je metoda, která často dává přibližnou informaci o interakci mezi dvěma organismy. Může pozorovateli dodat představu, jak bude živočich na kořist reagovat, pokud ji potká znovu. Tato metoda byla použita ve velkém množství pokusů (například: Richman *et al.* 1983; Young 1984; Gibson *et al.* 1997, Pfannenstiel & Yeorgan 2002). Pokud je ovšem pozorováno pouze přímo žraní a nikoliv samostatný lov, může dojít k podcenění vlivu scavengingu. Tato metoda má i další nevýhody. Mezi největší patří obrovské množství času, které musí pozorovatel strávit sledováním pokusu a jeho opakováním. I když by tento problém mohl být lehce vyřešen pomocí moderní techniky (například videokamery). Fakt, že přítomnost pozorovatele (příp. videokamery) znehodnotí přirozené prostředí vyřešit nelze, neboť obecně lze říci, že samotné pozorování může ovlivňovat stav pozorovaného.

Nejedním z dalších problémů při zkoumání vztahu predátor-kořist přímým pozorováním je zhoršená viditelnost, jako je mlha nebo tma. Značná část živočichů je nokturnální a noční pozorování bez pomoci světla prakticky není možné (když nebudeme uvažovat o termovizorech a noctovizorech, které jsou pro sledování bezobratlých velmi nepřesné a drahé). I přes tento problém se tato metodika používá v praxi. Například Tan & Corlett (2012) používali speciální kameru s nočním módem pro pozorování rychlosti scavengingu v tropické oblasti Singapuru v několika terénech, jako je například primární a sekundární les nebo park. Kamera pomohla dojít k závěru, že přes den jsou v dané oblasti hlavní scavengeři mravenci, kdežto v noci byly nejvíce viděni škvoři.

Dalším problémem je nepřehlednost přirozeného prostředí. Většina živočichů je malá a silně kryptická, takže jejich nalezení může být problém, natož pozorování chování a predace. Snahy o upravení prostředí (terénu) nebo přesunutí živočicha do přehlednějšího prostředí vyústí v narušení jeho přirozeného prostředí a poskytnou nepřesnou informaci (Tan & Corlett 2012).

I přes všechny tyto nevýhody se ovšem jedná o metody poskytující v určitých případech velmi věrohodnou informaci o stravovacích návycích živočicha. Může velmi často přispět i při výzkumu scavengingu, protože jedinec může být zpozorován při pojídání mrtvol, nebo využití techniky pro přímé pozorování zdechlin, které jsou předem připravené jako návnady a je pozorováno, kteří živočichové při nalezení zdechliny budou jevit tendence ke scavengingu.

3.3 Použití mini-plot experimentů

Při pokusu v terénu je možné použít neprostupnou bariéru pro uzavření jistého prostoru a ten poté využívat pro sledování interakcí v tomto zmenšeném, uměle vytvořeném ekosystému. Jedná se tedy o jistý kompromis mezi terénním přímým pozorováním a laboratorním pokusem. Prostor se tak totiž více podobá přirozenému prostředí, ale ulehčuje manipulaci s pokusem. Může se jednat buď o bariéru úplnou, jako použil například Hagler (2006), který zkoumal predátory dvou motýlů (*Pectinophora* a *Trichoplusia*) a klopušky (*Lygus*) v polním mini-plot experimentu. Nebo bariéru polopropustnou, kdy překážkou některé organismy projdou a jiné ne. Například Gibson *et al.* (1997) položil návnady do země a přikryl kameny, aby se k nim dostali pouze živočichové žijící v půdě.

Grant & Sheppard (1985) doporučují použití několika ohraničených území, kdy do některých vypustí i predátora i kořist a do jiných pouze kořist (kontrolní). Tato metoda má velké výhody neboť je výsledek velmi dobře čitelný a s pokusem se dá lehce manipulovat. Grant & Sheppard uvádí například možnost zavedení standardizovaných velikostí mini-plot experimentů pro snazší porovnávání výsledků mezi vědci a jako největší nevýhodu uvádí zejména ovlivnění přirozeného prostředí, neboť i jednoduchá mini-plot vytvoří mikroklima a studované organismy mohou být bariérou ovlivnění. Ve většině prací se práce s bariérou používá jen jako modifikace přímého pozorování proto pro ni platí i stejné výhody při výzkumu scavengingu. V některých případech je pokus použitím mini-plotu doplněn i o jiné metody jako například imunologické značení nebo značení barvivem (viz dále) jako například použil Hagler (2006).

3.4 Značení kořisti

Ideální značení kořisti pro výzkum interakcí s dalšími živočichy by mělo být trvalé, netoxické, snadno aplikovatelné, jasně zpětně identifikovatelné a levné. To ovšem není tak snadné, neboť značení pro jeden druh pokusu může být v některých případech velmi dobré ale v jiné situaci (jiné podmínky, vzorky, živočichové,...) může být zcela nepoužitelné (Hagler & Jackson 2001). Mezi nejjednodušší metody značení patří metody na zjednodušení přímého pozorování, tedy rozpoznávání jedinců, jako jsou například polepovací štítky, mechanické poškození (v tomto případě myšleno jako lehké poškození zvířete pro budoucí lehké rozpoznání, používané zejména pro větší zvířata jako ryby, ptáky a savce, často označované jako cejchování) a značení barvivem. Tyto metody jsou levné i rychlé, mají ovšem i své nevýhody. V případě štítků hrozí snadná ztráta, narušení přirozeného chování (koloniální hmyz) nebo zranění zvířete. Mechanické poškození je náročné na provedení u bezobratlých živočichů z čistě velikostních proporcí a na často se na jedince nemusí vejít. Mechanické poškození musí být provedeno tak, aby nebyl jedinec přílišně poškozen nebo nezemřel. Při pokusech s bezobratlými živočichy je navíc často potřeba pracovat s velkým množstvím jedinců a metoda mechanického poškození by se tak mohla stát velmi časově náročnou a možnosti variací značek také u hmyzu nejsou příliš veliké. Existují ovšem i velmi specifické a náročné druhy značení jako implantace magnetických čipů do živých slimáků (Grimm 1996).

3.4.1 Barviva, značení prachem a perorální barvení

Značení barvivem může být velmi levné a provedeno ve velkém měřítku, protože barvu lze snadno rozprášit na velké množství jedinců. Barvivo může být také dlouhotrvající a může být použito pro pokusy pracující s delším časovým úsekem. Problém opět nastává v možnosti změny přirozeného chování živočichů. Jedinec může přitahovat predátory, kteří by ho jinak nenapadli nebo naopak zastrašovat. U každého barviva musí být navíc zjištěna toxicita pro daný druh.

3.4.1.1 Barvení UV-fluorescenčním pigmentem

Používání různobarevných pigmentů jako značení je poměrně stará metoda. UV-fluorescentní pigmenty mohou odstranit problém se změnou přirozeného chování a přitom jsou stále stejně dobře detekovatelné. Značení pigmentem má opět výhodu zejména díky možnosti označit velmi rychle velké množství jedinců a to neplatí jen o drobném hmyzu, jako jsou například termity nebo octomilky (Bestelmeyer & Wiens 2003), kteří byli označeni oranžovým fluorescenčním pigmentem k detekci predace mravenců v Coloradu. Značení lze ale použít například i na slimáky, což předvedli Foltan & Konvička (2008), kteří pomocí pigmentu rozpuštěného v polyetylen glykolu injekcí označili slimáky. Warner & Bierzychudek (2009) zase potvrdili, že značení jimi použitého fluorescenčního pigmentu nemá vliv na životnost jedinců, když označili skupinu baboček (*Vanessa cardui*) a sledovali úmrtnost proti kontrole v laboratorních podmínkách.

Hlavní nevýhodou potom může být použití příliš velkého množství prachu, a jedinec může tak být omezen v pohybu a tím se změní i jeho disperzní schopnosti (Chang 1946), v extrémních případech potom jedinec umírá (Messing *et al.* 1993).

3.4.2. Perorální využití barviv a pigmentů

Podávat barviva jedincům perorálně je další možnost využití barev a pigmentů. Do potravy se mohou přidat například v oleji rozpustné barvy. Termiti krmení papírem s barvou se ukázali jako vhodná metoda pro pozorování disperze termitů. Obarvení jedinci mohou být vráceni do hnízda a použiti pro MRR metody (Haagsma & Rust 1993). Mezi výhody tohoto využití patří zejména nízká cena a snadná manipulace neboť stačí smíchat barvu s potravou. Nutností je ovšem zjištění toxicity barviva. Nevýhodou je možnost špatného rozpoznání označených jedinců a jejich nutnost zabití, rozdrcení a extrakce pro potvrzení obarvení (Hagler & Jackson 2001).

Perorální značení UV-fluorescentním pigmentem poprvé použil Hawkes (1972), kdy označil vajíčka můry *Tyria jacobaeae* pomocí barviva rozpuštěném v alkoholu. Ty nechal poté pozřít škvory, které následně rozdrtil, nechal péci v troubě po dobu jedné hodiny a fluorescenci vyhodnocoval tak, že svítil UV lampou na vzorky v temné místnosti. Potvrdil, že pigment se udržel ve střevech po dobu 3 dnů a varuje před zvolením správného pigmentu, neboť některé, jím zvolené pigmenty byly neúčinné. Od té doby se práce s pigmenty posunuly dále a vyhledávají se nejvhodnější pigmenty pro obarvování různých bezobratlých (Okrouhlík & Foltan, nepublikováno).

Perorální značení fluorescentním pigmentem je levné, snadno manipulovatelné, se snadnou aplikací na velké množství jedinců a při použití metody na zjištění specifického kvantového výtěžku fluorescence obsahu střev predátorů i velmi průkazné rozpoznání označených jedinců. Tato metoda je velmi dobrá i pro výzkum scavengingu (viz vlastní pokus). Nevýhody jsou poté nutnost zjištění specifického kvantového výtěžku fluorescence kontrolních jedinců od všech chycených druhů a nutnost použití dražšího přístroje, který je ovšem velmi jednoduchý na ovládání a především dovoluje provádět test několika desítek jedinců najednou (Okrouhlík & Foltan, nepublikováno).

3.4.3 Značení vzácnými prvky

Bezobratlé je možné značit vzácnými prvky, jako jsou například rubidium, stroncium, cesium, mangan, hafnium a iridium, případně lanthanoidy jako jsou lanthanium, samarium, europium, dysprosium a cerium (Hagler & Jackson 2001). Běžně používaný je chlorid rubidia (RbCl), který byl použit například ve studii Prasifka *et al.* (2001) v Texasu, při výzkumu přesunu bezobratlých a jejich predátorů mezi bavlnou a obilovinami. Prokázali, že označení pomocí chloridu rubidia je použitelné nejdéle na šest dní.

Při použití této metody ve větším měřítku může být zpětná identifikace časově náročná a pracná. Značení vzácnými prvky patří mezi poměrně finančně náročné metody, pro které je navíc potřeba zvláštní znalosti pro práci se zdrojem neuronů (při práci s lanthanoidy). Některé druhy mohou být, při vyšších koncentracích určitých prvků, ohroženy i na životě. Z tohoto důvodu je potřeba prvotní testovací pokus na toxicitu pro daný druh. Použití této metody jako MRR pro výzkumu scavengingu lze úplně stejně jako značení barvivem nebo UV-fluorescenčním pigmentem, kdy se zvolená zdechlina označí vzácným prvkem a následně se testují chycení predátoři v oblasti na přítomnost zvoleného vzácného prvku. Vzácných prvků lze použít i několik najednou, například pro označení různých druhů návnad jiným prvkem. Obecně je tato metoda ovšem značně finančně i časově náročná.

3.4.4 Použití stabilních izotopů

Stabilní izotopy lze, v určitém pohledu, chápat jako vzácné prvky, neboť některé biotopy mohou být na určité izotopy velmi chudé. Možnost použití stabilních izotopů uhlíku ^{13}C a dusíku ^{15}N ke zkoumání potravních sítí použili například Ponsard & Arditi (2000) v terénních podmínkách. Potvrdili, že pomocí zjišťování množství daných izotopů v zemině, rostlinách a živočišných mohli zjistit, zdali je daný jedinec herbivor nebo predátor. V diskuzi ovšem uvádějí, že bližší a přesnější výsledky o vzájemných interakcích říci zatím nemohli.

Další využití značení stabilním izotopem dusíku byla provedena v laboratoři (Nienstedt & Poehling 2004), kdy byly označené mšice předkládány jako kořist různým predátorům (střevlíček a pavučenka) a poté zjišťovány nárůsty koncentrace izotopů v jejich tělech. Jednalo se o velmi průkazné označení, protože již po pozření jediné mšice, bylo možno jedince označit jako pozitivního.

Mezi hlavní nevýhody této metody patří nutnost použití drahého vybavení, které vyžaduje zvláštní technické vyškolení. Pro provoz většiny přístrojů je potřeba řádově několik miligramů biomasy, což může být u hmyzu značný problém (Hagler & Jackson 2001). Pro výzkum scavengingu je metoda vhodná podobně jako značení barvivem, pokud jsou izotopy použity na označení zdechlin a je sledováno, kdo je požívá. Tato metoda je ovšem mnohem dražší a složitější na provoz, podobně jako značení vzácnými prvky.

3.4.5 Značení radioaktivními izotopy

Použití radioaktivních prvků ke značení hmyzu je metoda používaná hlavně od padesátých do sedmdesátých let (Buschman et al. 1977; McDaniel & Sterling 1979). Tato metoda je vhodná zejména jako MRR pro svoji velmi dobrou čitelnost výsledů. Její provozování může být ale škodlivé životnímu prostředí, může být časově velmi náročné a drahé a v dnešní době musí mít navíc každý pokus vlastní povolení. Proto se v dnešní době prakticky nevyužívá pro výzkum predátor-kořist natož pro výzkum scavengingu (Hagler & Jackson 2001).

3.5 Molekulární metody

3.5.1 Elektroforéza proteinů

Elektroforéza proteinů je nejjednodušší molekulární metoda, která je využívána pro výzkum predátor-kořist. Její princip spočívá v získání vzorku kořisti a vzorku obsahu střeva predátora. Oba vzorky jsou použity k elektroforéze v polyacrylamidovém gelu a porovnají se vzorky výsledných proužků gelu na shodu. Tato metoda je sice jednoduchá, nese ovšem značné nevýhody. Například je nutná znalost jak predátora, tak kořisti. Pokud například chytíme jen predátora a netušíme, čím se živí, tak je velmi obtížné to zjišťovat. Hlavní problém ovšem nastává, pokud predátor sežere více druhů kořisti. Proteiny se promíchají a výsledek nebude jasný. Použití této techniky je vhodné například pro laboratorní ověření predace jednoho druhu jiným. I přes nevýhody se tato metoda používala ještě donedávna (Corey *et al.* 1998). Pro použití na výzkum scavengingu se jedná o potenciálně zajímavou variantu potvrzení vztahu v laboratorním pokusu, při práci s jedním druhem scavengera a jedním druhem mrtvoly.

3.5.2 Serologické značení

Metoda serologického značení využívá přirozenou reakci teplokrevných organismů tvorby protilátek. Poprvé byly serologické testy použity pro výzkum vztahu predátor-kořist již v roce 1946 (Brooke & Proske 1946; Hagler *et al.* 1992). Vzniklo hned několik variant této metody. První využívá polyklonální protilátky, kdy se vzorek zkoumané kořisti injekčně vstříkne do krevního oběhu obvykle savce (nejčastěji králíka) a po určité době se z krve odeberou protilátky. Vznikne směs různých protilátek, některé z nich pak při dalším kontaktu budou reagovat na původně vstříknuté imunogeny. Tak mohou být protilátky použity na testování obsahu trávicího traktu nebo výkalů predátora na přítomnost zkoumaného vzorku kořisti. Při výzkumu scavengingu ovšem není jasné, jak se daný jedinec do trávicího traktu dostane. To může vést k mylnému označení scavengingu jako predace. Pro zjištění přesnějšího vztahu predátor-kořist se tato metoda se používá v kombinaci s elektroforézou (Symondson 2002). Časté bývá i použití u vodních živočichů, kde značná část výše zmiňovaných značení nelze použít. Hlavní nevýhodou této metody může být nespecifická falešně pozitivní reakce protilátek s antigenem, protože sérum obsahuje velké množství různých protilátek. Všechny kombinace protilátek a antigenů by se tedy, pro zpřesnění výsledků, měly testovat na „cross-reaction“. Další velmi zásadní nevýhodou je nemožnost opakování pokusu protože žádná dvě séra nebudou stejná i když se nechají vytvořit ve stejném savci (Symondson 2002).

3.5.2.1 ELISA

Zlepšení využití polyklonálních protilátek přineslo hlavně použití metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Tato metoda spočívá ve využití zvláštních proteinů, které se navážou na komplex protilátka-antigen a to pouze na komplex a nikoliv na jednotlivé části. Při navázání dojde ke změně struktury a ve většině případů i změně barvy. Toho se využívá tak, že se na mikrotitrační destičku nanese sada vzorků společně s protilátkami a enzymem a pozoruje se, u kterého vzorku došlo k vytvoření komplexu protilátka-antigen, následnému napojení enzymu a tím pádem i zbarvení. Tím se celý značně zrychlí a zpřesní označování pozitivních vzorků, přesto zůstává problém s „cross--reaction“ a falešnou pozitivitou.

3.8.2.2 Monoklonální protilátky

Výrazným vylepšením sérologických metod přineslo používání monoklonálních protilátek (monoclonal antibody, MAB). Oproti polyklonálním se na tvorbu protilátek využívají zvláštní fúze B-lymfocytů a buněk myelomu, které umožňují vytvoření pouze protilátek proti jednomu danému druhu. Přesnost může být zvolena jako instar-specifická, druhově-specifická, nebo specifická proti jakémukoliv vyššímu taxonu (Hagler et al. 1992). Tato metoda se podobně jako polyklonální protilátky používá v kombinaci s ELISA.

Metoda MAB pomohla ukázat několik zajímavých interakcí mezi živočichy, například Symondson *et al.* (2000) ukázal, že k udržení počtů predátorů *Pterostichus melanarius* (carabidae), přirozených nepřátel slimáků a mšic v polích výrazně přispívají počty žížal a dal by se tak upravit management polí tak, aby vyhovoval nejen střevlíkům, ale i žížalám.

Problém hyper-predace, který byl již zmiňován výše, byl zkoumán pomocí monoklonálních protilátek (Harwood et al. 2001), kdy byly označeny mšice, které byly podány jako potrava pavoukovi, kterého podali jako potravu střevlíkovi, jehož trávicí trubici poté testovali na přítomnost mšice. Výsledkem tohoto pokusu je, že druhotná predace nekomplikuje střevní analýzy tolik, jako se myslelo. Problém scavengingu ovšem při testech na střevech predátorů stále zůstává. Používat tuto metodu pro výzkum scavengingu je možné, s přihlédnutím na problém, že zjistit, jak se do střeva (trusu) určitý materiál dostal, nemůžeme, pokud sami tento materiál nepřipravíme (formou návnad). Monoklonální protilátky se často používají při výzkumu vztahu predátor-kořist a z tohoto důvodu Calder *et al.* (2005) zjišťoval jak moc scavenging tento vztah ovlivňuje v laboratorním pokusu se střevlíky a slimáky a poukázal, že scavenging může značně ovlivňovat pohled na ekologické vztahy v přírodě z hlediska přenosu živin.

3.5.2.3 Králičí imunoglobulin

Velmi používané je i použití přímého označení kořisti pomocí králičího imunoglobulinu G (IgG) a následné testování střev predátorů pomocí séra jiného savce (nejčastěji kozy) s již vytvořenými protilátkami proti králičímu IgG. Tuto metodu ve vztahu predátor-kořist poprvé použili Hagler & Durand (1994), kdy studoval sluněčka a bradavičníky jako zástupce kousajících predátorů a hlavněnky a hladěnky jako zástupce sajících predátorů. Obě skupiny byly nakrmeny označenými dospělci molice a vajíčky motýla (*Gelechiidae*). Metoda se ukázala být účinnou pro detekci potravy kousajících predátorů (98.8% vyhodnoceno jako jako IgG pozitivní). Výhoda této metody proti MAB je zejména vyšší citlivost metody, jak prokázal Mansfield *et al.* (2008), kdy porovnával obě zmiňované techniky v laboratorních podmínkách. Odpadá nutnost vytváření specifických protilátek pro jednotlivé druhy bezobratlých, což značně ulehčuje a urychluje používání. Později se tato metoda použila například k rozuzlení potravních vztahů mezi mravenci a termity v zahrádkářské kolonii v Indianě (Buczowski & Bennett 2007). Mezi nevýhody patří hlavně cena metody, nutnost specializovaných přístrojů a časová náročnost ELISA metody. Další riziko může hrozit, pokud se IgG rozprašuje na jedince zevně pro urychlení a pro práci ve větších měřících. Pak hrozí přenos IgG z jednoho jedince na jiného dotykem, kopulací nebo jinou interakcí. (Hagler 2006).

3.5.3 PCR a DNA

Využití druhově-specifických primerů na použití amplifikace DNA ze střev predátorů na výzkum vztahu predátor-kořist bylo poprvé představeno v roce 1999 (Zaidi *et al.* 1999). V této práci byli komáři přenecháni k sežrání dravými střevlíky *Pterostichus cupreus*, kteří byly poté zabiti za určitou dobu (0-28 hodin) a rozdrceni. DNA komárů v jejich trávicím traktu byla poté cíleně amplifikována pomocí specifického primeru a PCR (polymerase chain reaction). Zaidi potvrdil, že detekce komáří DNA je stejně silná, ať nechali střevlíka trávit 0 nebo 28 hodin. Na počtu sežraných komárů jedním jedincem také nezáleželo. Zároveň poukázal na fakt, že komáří DNA je lépe detekovatelná při amplifikaci kratšího řetězce (146 bází). Dále Zaidi doporučuje zlepšení metodiky, protože účinnost metody byla jen 85,5%.

Od té doby vzniklo několik prací, které se zaměřují na metodickém zlepšení celé metody jako například teplota gelu při elektroforéze (Harper *et al.* 2007), používání správných primerů (King *et al.* 2008) a zejména využití next-generation DNA sequencing (Shendure & Hanlee 2008). Později se také začala metoda používat spíše na extrahovaný obsah trávicího traktu (Hoogendoorn & Heimpel 2001) nebo výkaly predátorů (Deagle *et al.* 2005) než na celé rozdrcené jedince.

Tato metoda také vyžaduje tvorbu specifických látek pro každý druh. Zatímco u MAB se jednalo o specifické protilátky, u DNA metody se jedná specifické primery, které jsou ovšem jednodušší a levnější na výrobu (Chen *et al.* 2000). Obě metody mají problém s postupnou degradací organického materiálu ve střevech predátorů, ale DNA metoda má tu výhodu, že sledovaná DNA, může být amplifikována pomocí PCR, i když v tomto procesu může vzniknout značné množství chyb (Symondson 2002).

Metoda byla použita ve značném množství prací pracujících s bezobratlými ve vztahu predátor-kořist (Chen *et al.* 2000; Hoogendoorn & Heimpel 2001; Harper *et al.* 2005; Gariepy *et al.* 2007), na druhy u kterých ostatní metody nelze tak dobře použít, jako je například krill (Martin *et al.* 2006). Při výzkumu je tedy možné použít metodu jako potvrzení vztahu predátor-kořist. Ovšem metoda, jako všechny ostatní střevní analýzy nebo rozborů exkrementů, nemůže potvrdit, jakým způsobem se materiál do trávicího traktu dostal a hrozí nebezpečí špatné interpretace výsledků (Juen & Traugott 2005; Foltan *et al.* 2005).

Hlavní nevýhodou PCR a DNA metod identifikace kořisti ve střevech predátorů je časové náročná práce v laboratoři nutná k extrakci každého vzorku a finanční náročnost jak přístrojů, primerů a případně PCR kitů.

Pilotní pokus

Cílem pilotního pokusu bylo v terénních podmínkách ověřit funkčnost metody značení kořisti UV-fluorescenčním pigmentem (Foltan & Konvička 2008; Okrouhlík & Foltan, nepublikováno) pro jednoznačnou identifikaci scavengerů a nalezení případných možností zlepšení v metodice.

4 Materiál a metody

4.1 Detekce fluorescenčně obarvené kořisti UV-fluorescenční pigment

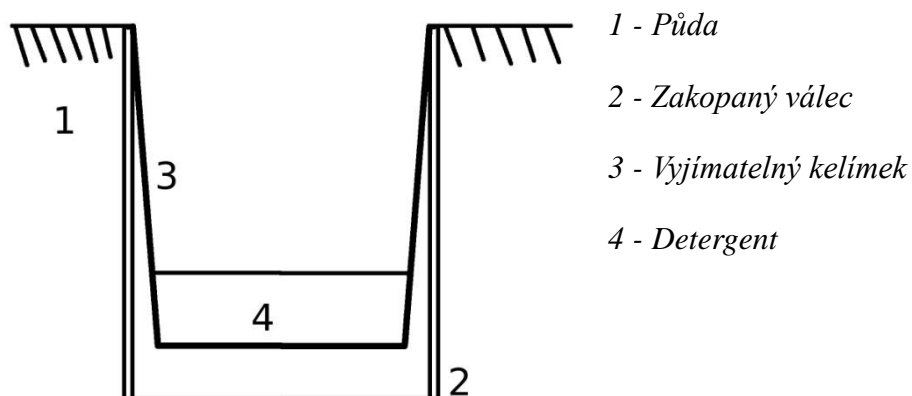
V pokusu bylo použito fluorescenční barvivo JST-10 (Radglo). Toto barvivo není rozpustné ve vodě ani v ethanolu. Může být rozpuštěno jen silně nepolárním rozpouštědlem například chloroform-methanолоvou směsí.

4.2 Příprava návnady

Larvy mouchy domácí (*Musca domestica*) byly krmeny pšeničným šrotem smíchaným s fluorescenčním pigmentem (v poměru 20:1) po dobu 3 dnů od nakladení vajíček, vybrány ze substrátu, omyty, zabity zmrazením a uchovány v teplotě -18°C. Před použitím byly rozmrazeny, namočeny ve vodě po dobu 20 minut a poté usušeny. Tím se barva dostala pouze do trávicího traktu larvy a nemohla kontaminovat dotykem.

4.3 Zemní pasti

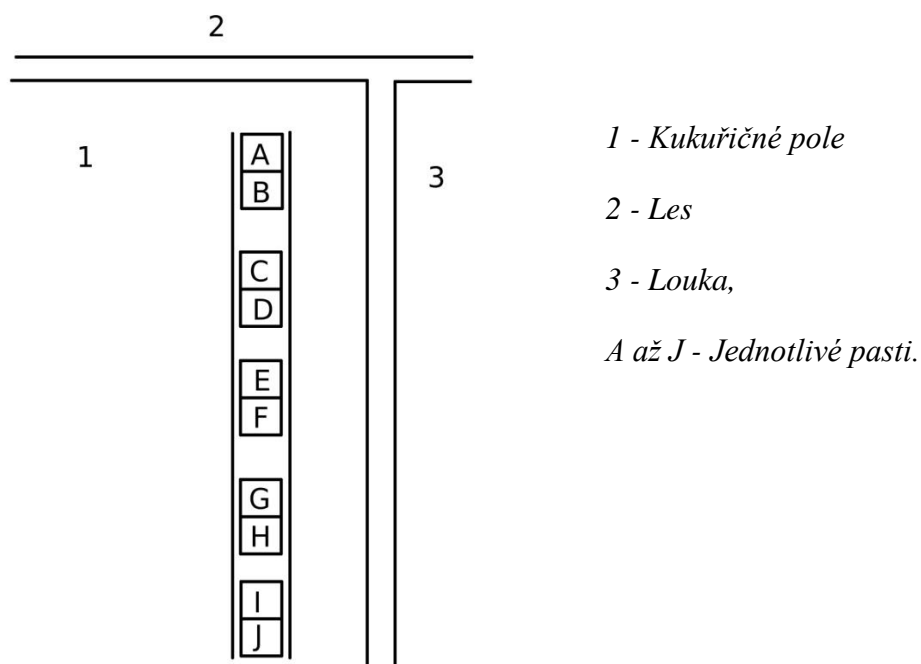
Byly použity zemní pasti složené ze dvou částí. První část je dutý válec zakopaný do země tak, aby jeho horní okraj nebyl výše než okolní terén a nevznikla tak překážka pro volně se pohybující hmyz. Druhou částí je plastový kelímek vložený do válce naplněný do jedné čtvrtiny detergentem pro usmrcení chycených jedinců (viz Obrázek 3).



Obrázek 3: Schéma zemní pasti použité při chytání bezobratlých v kukuřičném poli při terénním pokusu pro určení spektra scavengerů.

4.4 Výběr lokality

Jako lokalita byla zvolena hranice kukuřičného pole a lesa v obci Mokré v jižních Čechách. Tato lokalita byla vybrána pro maximalizaci abundance predátorů a přehlednost terénu. Jednalo se o 2 metry široký vysekaný pruh vzdálený cca 5 metrů od konce pole. Jedna jeho část byla blízka hranici lesa a druhá sekané louce (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Nákres lokality a polohy pastí vzhledem k okolním biotopům při provádění terénních pokusů v kukuřičném poli

4.5 Meteorologická data

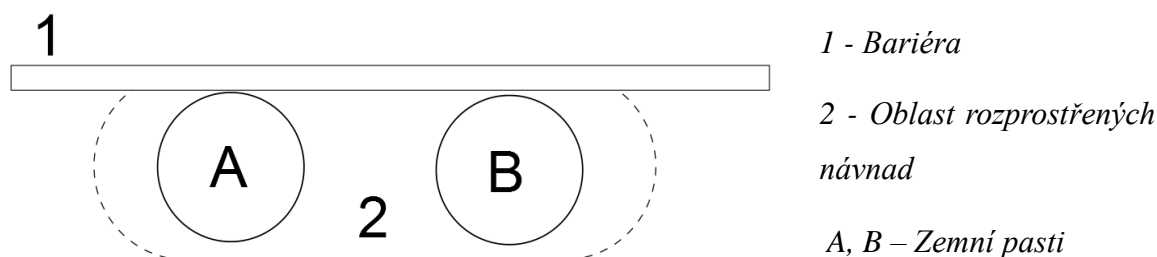
Experimenty byly provedeny ve dnech 22. 08. 2011 (průměrná teplota: 19.2°C, průměrná relativní vlhkost vzduchu 68%, nejvyšší naměřená rychlost větru 5,9 m*s⁻¹, průměrná rychlost větru 1,16 m*s⁻¹) a 23. 08. 2011 (průměrná teplota: 22.2°C, průměrná relativní vlhkost vzduchu 65%, nejvyšší naměřená rychlost větru 5,9 m*s⁻¹, průměrná rychlost větru 1,47 m*s⁻¹).

4.6 Polní experiment – Spektrum scavengerů

Bylo zakopáno deset zemních pastí (označení A-J) po dvojicích. Mezi jednotlivými dvojicemi byly rozestupy cca 10 metrů a mezi pastmi v každé dvojici byly rozestupy jeden metr. Každá dvojice pastí byla navíc opatřena bariérou (viz Obrázek 5) pro zisk většího množství jedinců pohybujících se v okolí. Kolem každé pasti bylo rozprostřeno asi 100 označených larev v okruhu maximálně 20 centimetrů tak aby každý jedinec přibližující se k pasti musel přijít do kontaktu s muší návnadou.

Pasti byly vybírány po dobu 24 hodin, první výběr byl proveden v 22:00 20.08.2011 a poslední 19:00 21.08.2011. Pro zamezení hromadění jedinců v pastech byly pasti vybírány každé 3 hodiny.

Vzorky z každého výběru byly konzervovány v 80% ethanolu, a označeny kódem. Do pastí byl po vyjmutí chycených jedinců dodán nový detergent, aby se minimalizovala možnost případné kontaminace.



1 - Bariéra

2 - Oblast rozprostřených
návnad

A, B – Zemní pasti

Obrázek 5: Náčrt polohy jedné dvojice zemních pastí s bariérou při pohledu shora včetně vyznačené plochy s návnadami (muší larvy). Dvojice pastí měly mezi sebou vždy rozestupy 5 metrů. Mezi dvojicemi pastí byla vzdálenost asi jeden metr.

4.6.1 Analýza obsahu střevního traktu

V laboratoři byl každý jedinec vyjmut z fixačního media. Poté mu byl odtržen thorax od cephalu tak, aby se vytáhlo střevo, které bylo lehkým zmáčknutím vymačkáno. Vše bylo vloženo do mikrozkušavky (eppendorfka 1,5ml), poté byla přidána chloroform-methanolová směs (mícháno v poměru 2:1) do naplnění eppendorfky. Každá eppendorfka byla označena kódem. Po každé extrakci střeva byla drtící tyčinka pečlivě omyta v sérii čistících roztoků (2x chloroform-methanolová směs, detergent, 2x destilovaná voda). Mezi každým roztokem byla tyčinka utřena čistým kusem filtračního papíru. Vzorky byly poté centrifugovány po dobu 15 minut při 10000 g pro oddělení supernatantu (rozpuštěné barvivo) a peletu (nežádoucí zbytky ze střev). Z každé eppendorfky bylo mikropipetou odebráno 100 μ l supernatantu do černé polypropylenové destičky (Nunclon 96) a ta byla přikryta alobalem. Celý postup byl provázen maximální snahou o zamezení kontaminace mezi jednotlivými vzorky.

4.6.2 Detekce Fluorescence

Chloroform-methanolová extrakční směs se nechala z polypropylenové destičky odpařit přes noc v digestoři za pokojové teploty a poté byla změřena fluorescence zbylého vzorku pomocí RF-5301 fluorescent reader (Shimadzu, Japan) při nastavení: excitační vlnová délka 455 nm, emisní vlnová délka 505 nm, šíře excitačního pásma 20 nm, šířka emisního pásma 9 nm, gain 75, počet čtení 25 a integrační čas 20 μ s.

4.6.3 Zjištění kritické hodnoty pozitivního označení

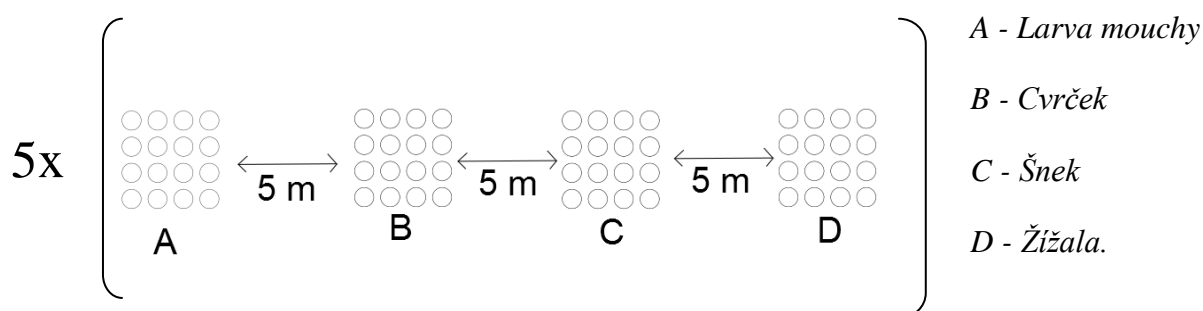
Kritická hodnota fluorescence pro stanovení pozitivních vzorků byla stanovena jako hodnota trojnásobku nejsilnější emise z osmi kontrolních jedinců druhu *Pterostichus melanarius* (brouci byli nakrmeni larvou mouchy neoznačené fluorescenčním pigmentem). Tato hodnota byla při použití nastavení přístroje (viz 4.6.2) stanovena jako 1600.

4.6.4 Zpracování dat

Veškerá data byla zpracována pomocí STATISTICA v. 10 (STATSOFT). Výsledné fluorescence byly zapsány spolu s údaji o druhu, pozici pasti kde byl vzorek nalezen, časem nálezu a údaji o pozitivitě. Za pozitivního byl považován každý jedinec, jehož fluorescence přesáhla kritickou hodnotu.

4.7 Dynamika scavengingu

Po dobu 24h byl v hodinových intervalech sledován úbytek zdechlin umístěných na poli. Na začátku experimentu bylo položeno 16 zdechlin jednoho druhu v matici 4x4 s rozestupy 5 cm mezi jedinci. Toto uspořádání se opakovalo pro každou návnadu představující zástupce čtyř tělních plánů bezobratlých: larva mouchy domácí (A), dospělý cvrček (B), ulitnatý plž (ideálně páskovka podobné velikosti) (C) a žížala (D). Mezi jednotlivými maticemi byly rozestupy asi 5 metrů. Experiment měl pět replikací v pravidelném designu tedy 20 matic o celkovém počtu 320 zdechlin (viz Obrázek 6). Data byla zpracována programem Statistica 10.0 pomocí analýzy přežívání Kaplan-Meier, kde byli započtení i částečně sežraní jedinci.



Obrázek 6: Schéma rozmístění mrtvol při terénním pokusu pro zjištění rychlosti scavengingu. Každý druh návnady byl rozmístěn do vzorce 4x4 a mezi jednotlivými návnadami byly pětimetrové rozestupy. Každá skupina měla pět opakování

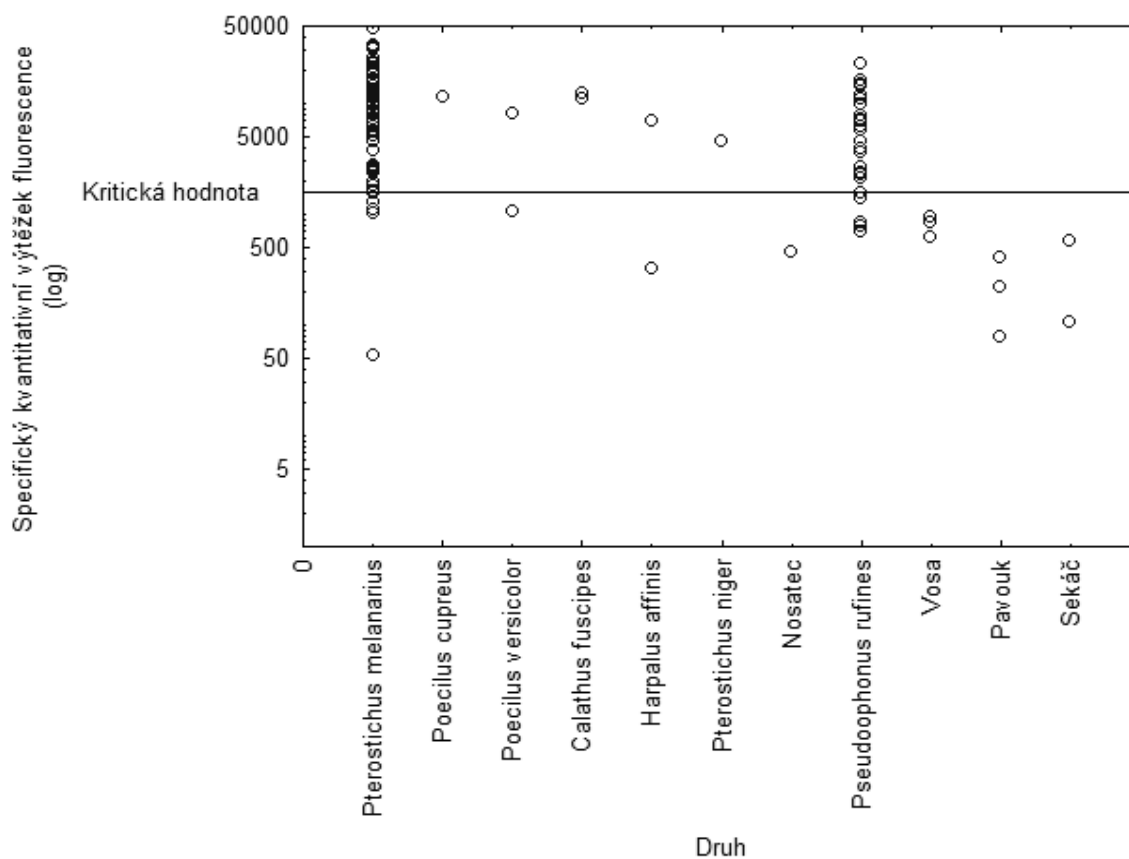
5 Výsledky

5.1 Výsledky pokusu Spektrum scavengerů

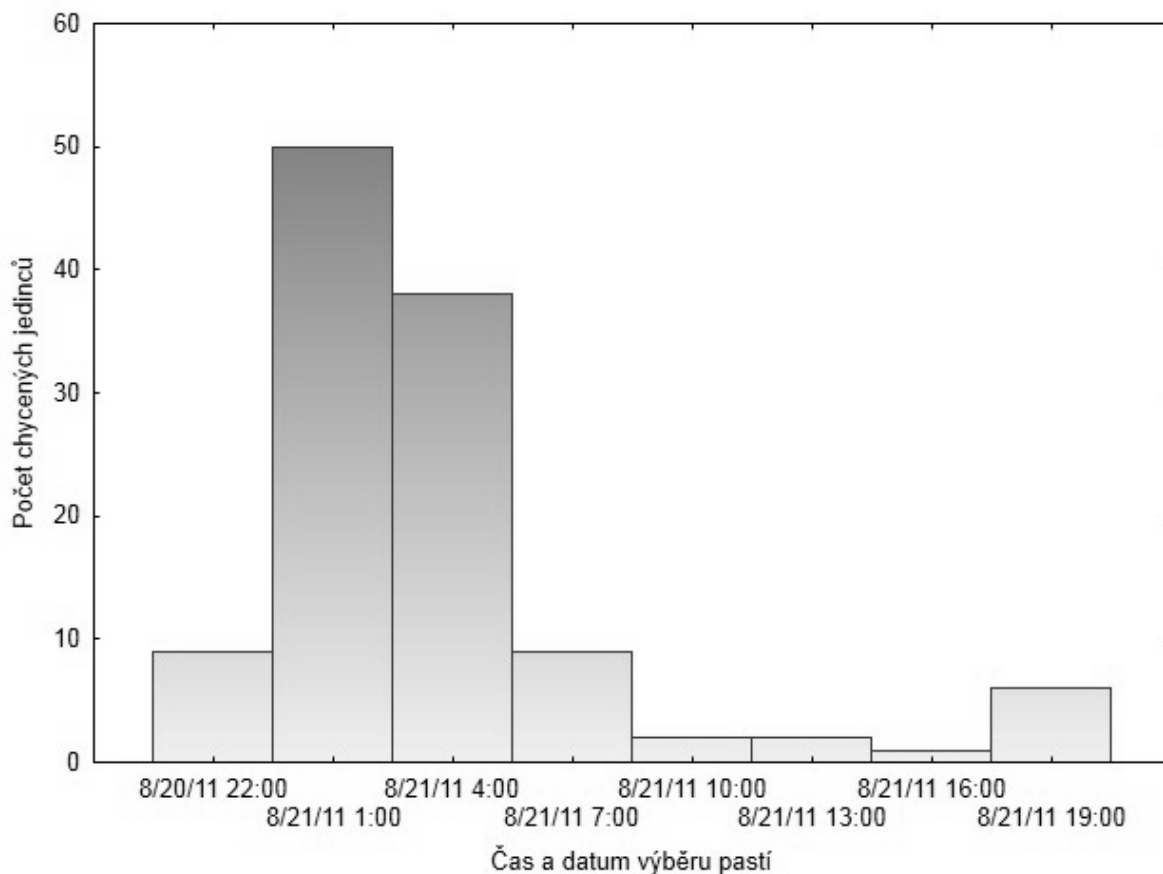
V pokusu s UV-fluorescenčním barvivem bylo do pastí chyceno celkem 117 jedinců, přičemž 108 bylo identifikováno jako střevlíkovití (Carabidae). Z těchto bylo 96 jedinců (88,89%) pozitivních na přítomnost UV-fluorescenčního barviva v trávicím traktu. Při bližším pohledu na složení jednotlivých druhů (viz Tabulka I) je vidět, že nejvíce bylo chyceno střevlíků druhu *Pterostichus melanarius* (70 jedinců, tzn. 60%) a *Pseudoophonus rufipes* (30 jedinců, tzn. 26%). Dohromady tyto dva druhy tvoří naprostou většinu chycených exemplářů (82%). Celkové počty chycených jedinců v závislosti na čase jsou zobrazeny na obrázku 8.

Tabulka.I: Druhy chycené do pastí při terénním pokusu včetně počtů jednotlivých jedinců a procentuálního vyjádření pozitivnosti na UV-fluorescenční pigment v trávicím traktu.

Systematické zařazení	Chyceno (ks)	z toho		% pozitivních
		pozitivních	negativních	
<i>Pterostichus melanarius</i> Coleoptera: Carabidae	70	65	5	93%
<i>Pseudoophonus rufipes</i> Coleoptera: Carabidae	30	24	6	80%
<i>Poecilus versicolor</i> Coleoptera: Carabidae	2	1	1	50%
<i>Calathus fuscipes</i> Coleoptera: Carabidae	2	2	0	100%
<i>Harpalus affinis</i> Coleoptera: Carabidae	2	1	1	50%
<i>Pterostichus niger</i> Coleoptera: Carabidae	1	1	0	100%
<i>Poecilus cupreus</i> Coleoptera: Carabidae	1	1	0	100%
Neurčená vosa Hymenoptera: Vespidae	3	0	3	0%
Neurčený pavouk Arachnida: Aranaeae	3	0	3	0%
Neurčený sekáč Arachnida: Opiliones	2	0	2	0%
Neurčený nosatec Coleoptera: Curculionidae	1	0	1	0%



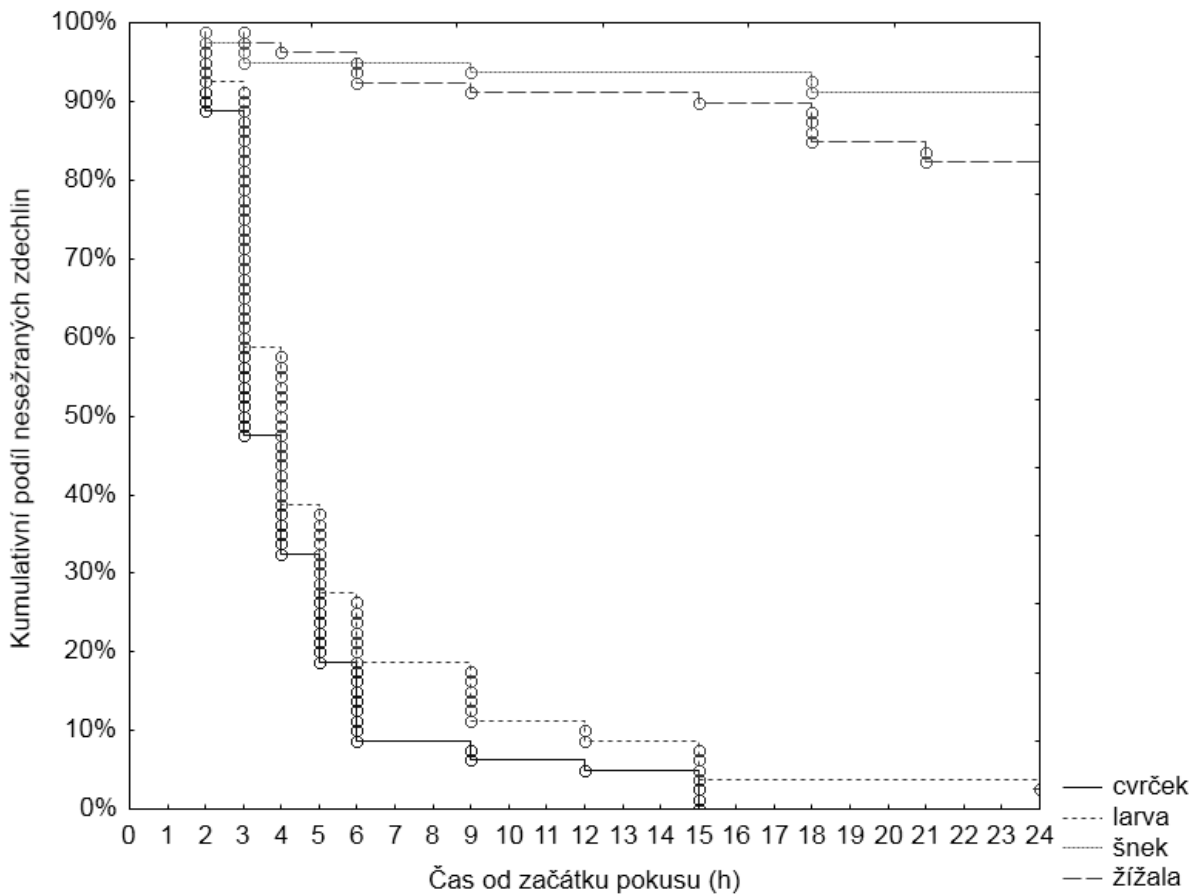
Obrázek 7: Logaritmus specifického kvantového výtěžku fluorescence zaživacího ústrojí pro jednotlivé jedince seřazené podle druhu, kteří byli chyceni do zemních past při terénním pokusu Spektrum scavengerů, kdy byly jako návnady kolem pastí položeny mrtvé larvy mouchy domácí označené UV-fluorescenčním barvivem. Za pozitivní byli považováni všichni jedinci se specifickým kvantovým výtěžkem fluorescence nad Kritickou hodnotou (více viz text).



Obrázek 8: Počet chycených jedinců do zemních pastí při určitých časech při terénním pokusu Spektrum scavengerů v kukuřičném poli.

5.2 Výsledky Dynamiky scavengingu

Za 24 hodin sežráno 179 z 320 jedinců (55,94%). Pokud se podíváme na jednotlivé návnady tak muší larvy nebyly sežrány pouze dvě, cvrčci byly sežráni všichni, šneků bylo sežráno 7 a žížal bylo sežráno 14. Pokud se podíváme na průběh mizení mrtvol v čase (viz Obrázek 9), vidíme, že nejrychlejší průběh úbytku vykazují larvy mouchy a cvrčci, kdy medián larev zmizí již po 3 hodinách a polovina cvrčku po čtyřech hodinách. V datech jsou započtena i data o částečně započtených jedincích. Průměrné časy mizení pro jednotlivé druhy při $N=80$ jsou: cvrčci – 4 hodiny 28 minut ($SD = 2,96$), muší larvy – 5 hodin 40 minut ($SD = 4,80$), šnek – 22 hodin 35 minut ($SD = 5,02$), žížala – 19 hodin 15 minut ($SD = 7,61$). Při pohledu na všechny druhy dohromady vychází průměrný čas mizení na 13 hodin při $N=320$, $SD = 9,65$ a medián je také 13 hodin.



Obrázek 9: Analýza přežívání mrtvol v terénním pokusu sledujícím dynamiku scavengingu v kukuřičném poli. Byly připraveny 4 druhy návnad o celkovém počtu 320 jedinců. Po celkovou dobu 24h byli v hodinových intervalech odečítány počty zmizelých mrtvol.

6 Diskuze a závěr

Výsledky pilotního pokusu potvrdily, že technika pro výzkum scavengingu pomocí detekce UV-fluorescenčního pigmentu ve střevech predátorů je proveditelná, jednoduchá, levná a rychlá. I přestože bylo nalezeno několik možných rizik, ukázala se tato metoda jako velmi slibný nástroj pro budoucí výzkum scavengingu.

Rizikem použité metody značení vzorků UV-fluorescenčním barvivem může být zejména kontaminace mezi odchycenými jedinci. Z tohoto důvodu bylo provedeno několik opatření k minimalizaci tohoto rizika. Larvy much byly označeny barvou vnitřně nikoliv zevně, aby pigment nemohl být přenesen kontaktem. Zemní pasti byly vybírány každé 3 hodiny jako prevence hromadění velkého množství potenciálních scavengerů. Použitý pigment JST-10 není ve vodě ani v ethanolu rozpustný (Foltan & Konvička 2008; Foltan & Okrouhlík, nepublikováno). Potvrzením, že daná opatření, včetně maximální péče při extrakci a zpracování vzorků, zmíněné v metodice, byla účinná, je fakt, že ve stejném výběru byly v pastech nalezeny jak pozitivní, tak i negativní vzorky. Některé druhy odchycených bezobratlých pak byly 100% negativní.

Další problém by mohlo představovat zvolení kritické hodnoty specifického kvantového výtěžku fluorescence jen od jednoho chyceného druhu. To je ošetřeno za pomoci trojnásobné multiplikace nejsilnější fluorescence ze všech kontrolních vzorků. Kritická hodnota je tak silně nadhodnocena a to by mělo zaručit pokrytí rozdílu mezi přirozenou fluorescencí *P. melanarius* popř. muší larvy a jinými druhy bezobratlých predátorů a kořisti.

Hlavními scavengery v našich podmínkách, na lokalitě bez masivního výskytu mravenců, by tedy mohli být střevlíci, jak předpokládali Foltan *et al.* (2005) ve své práci provedené ve Velké Británii. Rychlost mizení mrtvol slimáků v různých lokalitách a časech byla v jejich práci silně korelována s abundancí střevlíka *P. melanarius*.

Střevlíci byli potvrzeni jako nejčastější scavengeri v námi pozorovaném biotopu i pomocí fotografického materiálu (viz Příloha 2). Ostatní práce, zaměřené na scavenging bezobratlých mrtvol, byly podniknuty v oblastech s vyšší průměrnou teplotou: Španělsko (Retana *et al.* 1991) a USA (Seastedt *et al.* 1981; Fellers & Fellers 1982; Young 1984 a Bestelmayer & Wiens 2002). V těchto pracích byly za hlavní scavengery označeni mravenci a v některých případech v nočním pozorování i škvoři.

V mém pokusu byly jako hlavní scavengeři identifikovány dravé druhy střevlíků a to zejména *P.melanarius* a *P.rufipes*, kterých bylo nejvíce. Z ostatních druhů nebylo chyceno tolik jedinců. Nicméně i druhy *P.cupreus*, *C.fuscipes* a *P.niger* byly pozitivní na použitý UV-fluorescenční pigment. To naznačuje, že i ostatní druhy bezobratlých, dříve označovány jako dravé (Bohan et al. 2000; McKemeya et al. 2003; 2010; King et al. 2010) by ve skutečnosti mohli být aspoň částečnými scavengery. To vše by se mohlo značně promítnout například na potravní pyramidě zmiňované v kapitole 1.2 (viz obrázek 2).

Design zemních pastí s bariérou byl navrhnout tak, aby maximalizoval šanci, že jedinec, který již pozřel označenou návnadu, spadl do zemní pasti. Pomocí bariéry a rozsahu rozmístění návnad se zvýšila šance, že jedinec, ať přišel z jakéhokoliv směru, natrefil nejdříve na návnadu a poté až na past nebo na bariéru. Bariéra ho donutila vydat se jedním ze dvou směrů, přičemž minimálně jeden z nich vedl do pasti.

Metodika za pomoci zemních pastí bohužel nedovoluje pozorovat aktivitu další skupiny scavengerů a tou jsou létající scavengeři, jako jsou například vosy (Seastetd et al. 1981). Přestože byly 3 vosí exempláře chyceny v zemních pastech ani jeden nebyl označen za pozitivní, ale 3 jedince nelze považovat za dostatečný vzorek a v tomto směru bude potřeba podniknout výzkum jinou metodikou, například za pomoci nárazových pastí. Zdechlina by mohly být také sežrány hlodavci nebo ptáky, kteří se běžně hmyzem živí, ovšem v habitatu jako je kukuřičné pole je to velmi nepravděpodobné.

Z hlediska rychlosti mizení zdechlin můžeme značně zpřesnit výsledky o dynamice scavengingu. V biotopu obsahujícím mravence mrtvola zmizí do 5 minut (Fellers & Fellers 1982; Retana et al. 1991), ale v případě scavengingu v naší zeměpisné šířce, v oblasti bez mravenců, máme výsledky jen o rychlosti žraní jiných typů návnad a to slimáků (Foltan et al. 2005). V případě mé práce byl medián mizení mrtvol od 3 hodin (cvrček, larva mouchy) do 9 hodin (šnek, žížala). Resl (osobní komunikace), který prováděl pokus se stejným typem návnad v pšeničném poli v České Republice za pomoci pokládání zdechlin v transektu, dospěl k podobnému výsledku, kdy polovina návnad zmizela do 8 hodin. Rychlost scavengingu je tedy pravděpodobně silně ovlivněna místem konání studie, sezonalitou a z toho logicky vyplývající přítomností různých druhů bezobratlých scavengerů.

Data mohou být ovlivněna zvoleným habitatem. Za habitat bylo v mém pokusu zvoleno kukuřičné pole. Habitat je zvolen tak, aby byl co nejvíce jednoduchý, uniformní, přehledný a druhově chudý, protože byla potřeba pouze potvrdit metodiku s jednoduchými a přehlednými výsledky a jasnou průkazností pilotního pokusu.

Mimo habitat mohly být výsledky ovlivněny i dobou provedení pokusu. *P. melanarius* je druh aktivní zejména v noci (Lövei & Sunderland, 1996) a proto může být rychlost mizení zdechlin ovlivněna i dobou, kdy pokus začal. Pokud by byl pokus byl zahájen například v ranních hodinách, mohla by se doba, kdy byla sežrána polovina návnad posunout, protože střevlíci by byly více aktivní až nastávající noc. Noční aktivita je vidět i napočtu chycených jedinců do zemních pastí (viz Obrázek 8), kdy se s nadcházející nocí opět zvýšil počet chycených jedinců.

Zvláštní je i preference kořisti. O šneky a žížaly nebyl takový zájem, přestože v práci Resla (osobní komunikace) byly šneci konzumováni velmi rychle. Malá konzumace šneků a žížal může být způsobena přílišnou velikostí návnady. Potravu bylo možná v oblasti tolik, že scavengeri preferovali muší larvy a cvrčky z důvodu kratšího handlingu a jedinec tak stihl sežrat více potravy, pokud se zaměřil na menší a snadno zpracovatelnou potravu jako byly muší larvy. I rychlost predace totiž závisí na velikosti kořisti, jak potvrdil Mair & Port. (2001).

Další práce by se měla soustředit na využití metody fluorescentního označení návnad v různých typech biotopů po dobu celé sezony a umožnit tak identifikaci scavengerů v různých habitatech, případně zjistit sezónní dynamiku scavengingu. Další bod výzkumu by měla být úprava metodiky tak, aby byla použitelná i pro výzkum létajících scavengerů jako jsou vosy, neboť data o létajících scavengerech zatím úplně chybí.

7 Bibliografie

- Baur, M., Kaya, H., & Strong, D. (1998). Foraging ants as scavengers on entomopathogenic nematode-killed insects. *Biological Control*, 236: 231–236.
- Begon, M., Harper, J., & Townsend, C. (1990). *Ekologie (jedinci, populace a společenstva) Begon a kol.*(p. 981).
- Bestelmeyer, B., & Wiens, J. (2003). Scavenging ant foraging behavior and variation in the scale of nutrient redistribution among semi-arid grasslands. *Journal of arid environments*, 53: 373–386.
- Bohan, D. A., Bohan, A. C., Glen, D. M., Symondson, W. O. C., Wiltshire, C. W. and Hughes, L. (2000). Spatial dynamics of predation by carabid beetles on slugs. *Journal of Animal Ecology*, 69: 367–379.
- Buczowski, G., & Bennett, G. (2007). Protein marking reveals predation on termites by the woodland ant, *Aphaenogaster rudis*. *Insectes Sociaux*, 54: 219–224.
- Buschman, L. L., W. H. Whitcomb, R. C. Hemenway, D. L. Mays, Nguyen Ru, N. C. Leppa, and B. J. Smittle. (1977). Predators of velvetbean caterpillar eggs in Florida soy- beans. *Environmental Entomology*, 6: 403-407.
- Brooke, M. M., & Proske, H. O. (1946). Precipitin test for determining natural insect predators of immature mosquitoes. *Journal of the National Malaria Society* 5: 45-56.
- Calder, C.R., Harwood, J.D. and Symondson, W.O.C. (2005). Detection of scavenged material in the guts of predators using monoclonal antibodies: a significant source of error in measurement of predation?. *Bulletin of Entomological Research*, 95: 57-62.
- Carroll, C., & Janzen, D. (1973). Ecology of foraging by ants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 4: 231–257.
- Chang, H. T. (1946). Studies on the use of fluorescent dyes for marking *Anopheles quadrimaculatus* Say. *Mosquito news*. 122-5.
- Chen, Y., Giles, K. L., Payton, M. E. and Greenstone, M. H. (2000), Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Molecular Ecology*, 9: 1887–1898
- Corey, D., Kambhampati, S. and Wilde, G. (1998). Electrophoretic Analysis of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) Feeding Habits in Field Corn. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 71: 11-17
- Deagle, B. E., Tollit, D. J., Jarman, S. N., Hindell, M. a, Trites, a W., & Gales, N. J. (2005). Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular ecology*, 14: 1831–42.

- DeVault, T. L., Rhodes, Jr., O. E. and Shivik, J. A. (2003). Scavenging by vertebrates: behavioral, ecological, and evolutionary perspectives on an important energy transfer pathway in terrestrial ecosystems. *Oikos*, 102: 225–234.
- Errington, P. L. (1935). Food habits of mid-west foxes. *Journal of Mammalogy*, 16: 192–200.
- Fellers, G. & Fellers, J. (1982). Scavenging rates of invertebrates in an eastern deciduous forest. *American Midland Naturalist*, 107: 389–392.
- Fiala J. (2011). Scavenging na mrtvých bezobratlých v různých typech agrecenóz. (Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, České Budějovice).
- Foltan, P., & Konvicka, M. (2008). A new method for marking slugs by ultraviolet-fluorescent dye. *Journal of Molluscan Studies*, 74: 293–297.
- Foltan, P., Sheppard, S., Konvicka, M. And Symondson, W. O. C. (2005). The significance of facultative scavenging in generalist predator nutrition: detecting decayed prey in the guts of predators using PCR. *Molecular Ecology*, 14: 4147–4158.
- Gariepy, T. D., Kuhlmann, U., Gillott, C., & Erlandson, M. (2007). Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. *Journal of Applied Entomology*, 131: 225–240.
- Gibson, P., Cosens, D., & Buchanan, K. (1997). A chance field observation and pilor laboratory studies of predation of the New Zealand flatworm by the larvae and adults of carabid and staphylinid beetles. *Annals of applied biology*, 581–585.
- Grant, J., & Sheppard, M. (1985). Techniques for evaluating predators for control of insect pests 1.2, (2296), 99–116.
- Grimm, B. (1996). A new method for individually marking slugs *Arion lusitanicus* (Mabille) by magnetic transponders. *Journal of Molluscan Studies*, 62: 477–482.
- Haagsma, K. A., Rust, M. K. (1993). Two marking dyes useful for monitoring field populations of *Reticulitermes hesperus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology*, 23:155–64.
- Hagler, J., Cohen, A., Dunlop, D., & Enriquez, F. (1992). Field evaluation of predation on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) using a species-and stage-specific monoclonal antibody. *Environmental Entomology*, 21: 896-900.
- Hagler, J., & Durand, C. (1994). A new method for immunologically marking prey and its use in predation studies. *BioControl*, 39: 257–265.

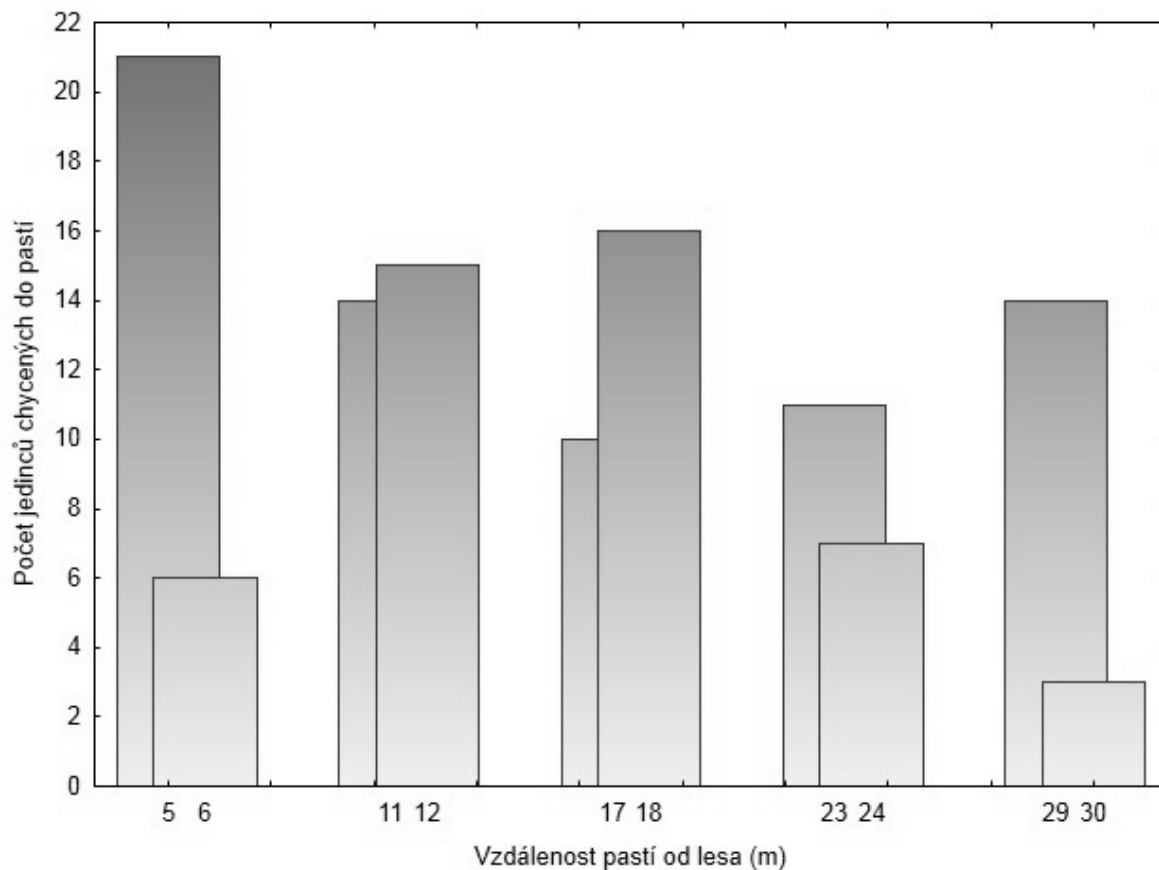
- Hagler, J. R., & S. E. Naranjo. (1996). Using gut content immunoassays to evaluate predaceous biological control agents: a case study. *The Ecology of Agricultural Pests-Biochemical Approaches* (ed. by WOC Symondson & JE Liddell), 383–399.
- Hagler, J., & Jackson, C. (1998). An immunomarking technique for labeling minute parasitoids. *Environmental Entomology*, 27: 1010-1016.
- Hagler, J. (2006). Development of an immunological technique for identifying multiple predator–prey interactions in a complex arthropod assemblage. *Annals of applied biology*, 149: 153–165.
- Harper, G., King, R., & Dodd, C. (2005). Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. *Molecular Ecology*, 14: 819–827.
- Harper, G. L., Sheppard, S. K., Harwood, J. D., Read, D. S., Glen, D. M., Bruford, M. W., and Symondson, W. O. C. (2007). Evaluation of temperature gradient gel electrophoresis for the analysis of prey DNA within the guts of invertebrate predators. *Bulletin of Entomological Research*, 96: 295–304.
- Harwood, J., & Phillips, S. (2001). Secondary predation: quantification of food chain errors in an aphid–spider–carabid system using monoclonal antibodies. *Molecular Ecology*, 10: 2049–2057.
- Hawkes, N. J. (1972). a fluorescent dye technique for marking insect eggs in predation studies. *Journal of Economic Entomology*, 65: 1477–1478.
- Hoogendoorn, M., & Heimpel, G. E. (2001). PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular ecology*, 10: 2059–2067.
- Huffaker, C. B. and Kennett, C. E. (1969). Some aspects of assessing efficiency of natural enemies. *The Canadian Entomologist*, 101: 425-447.
- Janzen, D. (1977). Why fruits rot, seeds mold, and meat spoils. *American Naturalist*, 111: 691–713.
- Juen, A., & Traugott, M. (2005). Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia*, 142: 344–352.
- King, R., & Read, D. (2008). INVITED REVIEW: Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology*, 17: 947–63.
- King, R. A., Vaughan, I. P., Bell, J. R., Bohan, D. A. and Symondson, W. O. C. (2010). Prey choice by carabid beetles feeding on an earthworm community analysed using species- and lineage-specific PCR primers. *Molecular Ecology*, 19: 1721–1732.

- Langan, A. M., Taylor, A. and Wheater, C. P. (2004). Effects of metaldehyde and methiocarb on feeding preferences and survival of a slug predator (*Pterostichus melanarius* (F.): Carabidae, Pterostichini). *Journal of Applied Entomology*, 128: 51–55.
- Lövei, G. L., & Sunderland, K. D. (1996). Ecology and Behavior of Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae). *Annual Review of Entomology*, 41: 231-256.
- Mair, J, Port, G. R. (2001). Predation by the carabid beetles *Pterostichus madidus* and *Nebria brevicollis* is affected by the size and condition of the prey slug *Deroceras reticulatum*. *Agricultural and Forest Entomology*, 3: 99–106.
- Mansfield, S. (2008). A comparative study on the efficacy of a pest-specific and prey-marking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of predation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 127: 199–206.
- Martin, D., Ross, R., Quetin, L., & Murray, A. (2006). Molecular approach (PCR-DGGE) to diet analysis in young Antarctic krill *Euphausia superba*. *Marine Ecology Progress Series*, 319: 155–165.
- McDaniel, S. G., Sterling, W. L. (1979). Predator Determination and Efficiency on *Heliothis virescens* Eggs in Cotton Using 32P. *Environmental Entomology*, 8: 1083-1087.
- McKemey, A. R., Symondson, W.O.C. and Glen, D.M. (2003). Predation and prey size choice by the carabid beetle *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae): the dangers of extrapolating from laboratory to field. *Bulletin of Entomological Research*, 93: 227-234.
- McKemey, A. R., Symondson, W. O. C., Glen, D. M., Brain, P. (2010). Effects of Slug Size on Predation by *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae). *Biocontrol Science and Technology*, 11: 81-91.
- Messing, R.H., Klungness, L.M., Purcell, M., Wong T.T.Y. (1993). Quality control parameters of mass-reared opiine parasitoids used in augmentative biological control of tephritid fruit flies in Hawaii. *Biological Control*, 3: 140–147.
- Moreby, S. J. (1988). An aid to the identification of arthropod fragments in the faeces of gamebird chicks (Galliformes). *Ibis*, 130: 519–526.
- Nienstedt, K., & Poehling, H. (2004). Prey to predator transfer of enriched 15N-contents: basic laboratory data for predation studies using 15N as marker. *Entomologia experimentalis et Applicata*, 112 :183–190.
- Okrouhlík J., & Foltan p. (nepublikováno). A new method for fluorescent marking prey and its use in evaluation of predation by gut content analysis approach, *in prep.*

- Pechová, H., & Foltan, P. (2008). The parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* defends its slug host from being predated or scavenged by manipulating host spatial behaviour. *Behavioural processes*, 78: 416–420.
- Pfannenstiel, R., & Yeargan, K. (2002). Identification and diel activity patterns of predators attacking *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs in soybean and sweet corn. *Environmental entomology*, 31: 232–241.
- Pimm, S. L. (2002). *Food Webs*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Ponsard, S., & Arditì, R. (2000). What can stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) tell about the food web of soil macro-invertebrates? *Ecology*, 81: 852–864.
- Prasifka, J., Heinz, K., & Sansone, C. (2001). Field testing rubidium marking for quantifying intercrop movement of predatory arthropods. *Environmental entomology*, 711–719.
- Putman, Wm. L. and Herne, D. H. G. (1964). Relations between *Typhlodromus caudiglans* Schuster (Acarina: Phytoseiidae) and Phytophagous Mites in Ontario Peach Orchards. *The Canadian Entomologist*, 96: 925-943.
- Retana, J., Cerdá, X., & Espadaler, X. (1991). Arthropod corpses in a temperate grassland: a limited supply? *Ecography*, 14: 63–67.
- Richman, D. B., W. H. Whitcomb, and W. F. Buren. (1983). Predation on neonate larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Florida and Puerto Rico citrus groves. *The Florida Entomologist*, 66: 215-222.
- Seastedt, T., Mameli, L., & Gridley, K. (1981). Arthropod use of invertebrate carrion. *American Midland Naturalist*, 105: 124–129.
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26: 1135–1145.
- Sunderland, K., & Crook, N. (1987). A study of feeding by polyphagous predators on cereal aphids using ELISA and gut dissection. *Journal of Applied Entomology*, 24: 907–933.
- Sunderland, K. D. (1996). Progress in quantifying predation using antibody techniques. In: *The Ecology of Agricultural Pests: Bio- chemical Approaches* (eds Symondson WOC, Liddell JE), 419–455.
- Symondson, W., & Glen, D., Wiltshire C. W., Langdon C. J. and Liddell J. E. (1996). Effects of cultivation techniques and methods of straw disposal on predation by *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) upon slugs (Gastropoda: Pulmonata). *Journal of Applied Entomology*, 33: 741–753.

- Symondson, W. O. C., Glen, D. M., Erickson, M. L., Liddell, J. E. and Langdon, C. J. (2000). Do earthworms help to sustain the slug predator *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) within crops? Investigations using monoclonal antibodies. *Molecular Ecology*, 9: 1279–1292.
- Symondson, W. (2002). Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 627–641.
- Tan, C., & Corlett, R. (2012). Scavenging of dead invertebrates along an urbanisation gradient in Singapore. *Insect Conservation and Diversity*, 5: 138–145.
- Warner, K., & Bierzychudek, P. (2009). Does marking with fluorescent powders affect the survival or development of larval *Vanessa cardui*?, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131: 320–324.
- Whiles, M. R., Callahan, M. A. Jr, Meyer, C. K., Brock, B. L. and Charlton, R. E. (2001). Emergence of periodical cicadas (*Magicicada cassini*) from a Kansas riparian forest: densities, biomass and nitrogen flux. *The American Midland Naturalist*, 145:176–187.
- Young, O. (1984). Utilization of dead insects on the soil surface in row crop situations. *Environmental entomology*, 13: 1346–1351.
- Zaidi, R. H., Jaal, Z., Hawkes, N. J., Hemingway, J., & Symondson, W. O. (1999). Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Molecular ecology*, 8 : 2081–2087.

8. Přílohy



Příloha 1: Celkový počet chycených jedinců v jednotlivých zemních pastech a vzdálenost pastí od lesa při terénním pokusu spektrum scavengerů v kukuřičném poli.



Příloha 2: Fotografie hromady mrtvol položená v kukuřičném poli zachycená automatickým fotoaparátem, potvrzující, že některé druhy střevlíkovitých jsou aktivními scavengeri.