

УДК 595.76

ИЗОТОПНЫЙ СОСТАВ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ И $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) РАЗНЫХ ТКАНЕЙ ЖЕСТКОКРЫЛЫХ НАСЕКОМЫХ (COLEOPTERA) И ЕГО ИЗМЕНЕНИЯ В ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2015 г. С. М. Цуриков¹, А. А. Гончаров², А. В. Тиунов²

¹Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва 119991, Россия
e-mail: smtsurikov@rambler.ru

²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва 119071, Россия
Поступила в редакцию 15.01.2014 г.

Изотопный анализ широко применяется для исследования структуры трофических сетей и трофических связей организмов. Методы изотопного анализа быстро развиваются, однако многие практически важные вопросы все еще плохо проработаны. При исследовании изотопного состава крупных насекомых необходимо принимать во внимание вариабельность величин $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ разных тканей и органов, а также возможные изменения изотопного состава тканей при метаморфозе. Уличинки и имаго жуков-носорогов *Oryctes nasicornis* и чернотелок *Uloma rufa* из природных популяций диапазон величин $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в пределах одной особи достигал 4.8 и 2.4‰, соответственно. Мы полагаем, что использование для изотопного анализа мышечной ткани или конечностей насекомых позволяет получить результаты, которые легче всего поддаются интерпретации. На примере *O. nasicornis* и *U. rufa*, а также малого мучного хрущака (*Tribolium confusum*) из лабораторной культуры показано, что метаморфоз не приводит к существенному изменению изотопного состава азота в тканях жуков. Изменения величины $\delta^{13}\text{C}$ в процессе онтогенеза связаны преимущественно с изменением массовой доли жировой ткани. Величина трофического фракционирования изотопов углерода ($\Delta^{13}\text{C}$) и азота ($\Delta^{15}\text{N}$) личинок и имаго *T. confusum* зависела от типа пищи, но в целом соответствовала ожидаемым величинам, от -1 до 1.5 ‰ для $\Delta^{13}\text{C}$ и от 3 до 5 ‰ для $\Delta^{15}\text{N}$.

Ключевые слова: Scarabaeidae, Tenebrionidae, *Oryctes nasicornis*, *Uloma rufa*, *Tribolium confusum*, стабильные изотопы, трофическое фракционирование изотопов, метаморфоз, липиды.

DOI: 10.7868/S0044513415030149

Изотопный анализ широко применяется для исследования структуры трофических сетей и трофических связей организмов. Методы изотопного анализа, в том числе способы сбора и обработки биологического материала, быстро развиваются (Tagroux et al., 2010; Krab et al., 2012). Однако многие практически важные вопросы все еще плохо проработаны. Изотопный состав (соотношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ и $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) разных органических соединений, составляющих ткани живых организмов, не одинаков. В частности, липиды и хитин обеднены ^{13}C и ^{15}N по сравнению с белками (Webb et al., 1998). Разные ткани и части тела насекомых значительно различаются по массовому содержанию мышечных белков, хитина и липидов, что приводит к различиям в их изотопном составе (Wehi, Nicks, 2010). Существенная вариация изотопного состава углерода ($\delta^{13}\text{C}$) и азота ($\delta^{15}\text{N}$) в пределах одного организма была показана на примере позвоночных (Vanderklift, Ponsard, 2003; Saut et al., 2009), диплопод (Семенюк, Тиунов, 2011), прямокрылых (Wehi, Nicks, 2010) и тлей

(Perkins et al., 2013). В связи с этим при экологических исследованиях крупных беспозвоночных встает вопрос корректного выбора частей тела или органов для изотопного анализа. Решение этого вопроса затруднено недостатком опубликованных сведений об изотопном составе разных тканей насекомых (DeNiro, Epstein, 1978, 1981; Gratton, Forbes, 2006; Tibbets et al., 2008). Для характеристики изотопного состава в разных исследованиях использовали отдельные сегменты тела или тагмы (Tillberg et al., 2006; Traugott et al., 2007), внутренние органы (Perkins et al., 2013), наружный скелет (Tayasu et al., 2002). Но в большинстве опубликованных работ для анализа использовали целых насекомых.

Развитие с полным превращением, характерное для некоторых отрядов насекомых, сопровождается сложными биохимическими превращениями в процессе метаморфоза (Шванвич, 1949), что может приводить к изменению изотопного состава тканей особи. Действительно, для нескольких видов насекомых показано увеличе-

Таблица 1. Изотопный состав углерода и азота (величины $\Delta^{13}\text{C}$, $\Delta^{15}\text{N}$), а также массовое соотношение C/N в разных частях тела и органах личинок *Oryctes nasicornis* ($n = 5$) и *Uloma rufa* ($n = 4$)

Части тела	<i>Oryctes nasicornis</i>			<i>Uloma rufa</i>		
	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰	$\Delta^{15}\text{N}$, ‰	C/N	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰	$\Delta^{15}\text{N}$, ‰	C/N
Голова	0.6 ± 0.3 a	2.4 ± 0.5 ab	4.7 ± 0.1 a	3.1 ± 0.4 a	1.7 ± 0.1 b	4.3 ± 0.2 a
Ноги	1.1 ± 0.3 a	2.5 ± 0.8 ab	4.4 ± 0.1 a	—	—	—
Покровы	0.1 ± 0.5 a	0.6 ± 0.3 a	4.4 ± 0.1 a	2.4 ± 0.3 a	0.7 ± 0.3 a	4.7 ± 0.2 a
Мышцы	0.5 ± 0.8 a	3.0 ± 0.2 b	5.5 ± 0.8 a	4.0 ± 0.1 a	2.8 ± 0.1 c	3.9 ± 0.1 a
Стенка кишки	-0.2 ± 0.2 a	2.4 ± 0.6 ab	5.6 ± 0.4 a	2.7 ± 0.5 a	2.3 ± 0.2 bc	7.2 ± 1.9 a
Жировое тело	-3.1 ± 0.7 b	3.0 ± 0.3 b	21.4 ± 3.4 b	—	—	—

Примечание. Разные буквы означают значимую ($p < 0.05$) разницу между тканями в пределах каждого столбца (Tukey HSD test).

Таблица 2. Изотопный состав углерода и азота (величины $\Delta^{13}\text{C}$, $\Delta^{15}\text{N}$), а также массовое соотношение C/N в разных частях тела и органах имаго *Oryctes nasicornis* ($n = 5$) и *Uloma rufa* ($n = 4$)

Части тела	<i>Oryctes nasicornis</i>			<i>Uloma rufa</i>		
	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰	$\Delta^{15}\text{N}$, ‰	C/N	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰	$\Delta^{15}\text{N}$, ‰	C/N
Голова	-0.8 ± 0.4 ab	2.6 ± 0.2 ab	5.5 ± 0.3 a	2.8 ± 0.1 a	2.2 ± 0.2 b	4.6 ± 0.2 a
Ноги	1.0 ± 0.2 cb	3.1 ± 0.2 b	4.1 ± 0.1 a	2.7 ± 0.2 a	2.2 ± 0.1 b	4.4 ± 0.1 a
Покровы	0.6 ± 0.2 cb	2.7 ± 0.2 ab	4.3 ± 0.1 a	—	—	—
Крылья	1.8 ± 0.4 c	4.0 ± 0.3 b	3.9 ± 0.1 a	2.8 ± 0.2 a	2.6 ± 0.1 ab	4.7 ± 0.3 a
Надкрылья	-0.5 ± 0.1 b	2.1 ± 0.1 a	5.1 ± 0.1 a	2.8 ± 0.1 a	1.6 ± 0.1 b	4.5 ± 0.1 a
Мышцы	0.6 ± 0.7 cb	3.0 ± 0.2 ab	4.7 ± 0.7 a	3.3 ± 0.3 a	3.0 ± 0.1 a	4.1 ± 0.1 a
Гонады	0.1 ± 0.4 cb	2.8 ± 0.2 ab	5.2 ± 0.3 a	3.1 ± 0.4 a	3.3 ± 0.2 a	4.4 ± 0.3 a
Мальпигиевы сосуды	-0.2 ± 0.7 cb	2.2 ± 0.2 a	5.3 ± 0.7 a	—	—	—
Стенка кишки	0.6 ± 0.3 cb	2.2 ± 0.5 a	4.4 ± 0.1 a	2.4 ± 0.4 a	2.3 ± 0.3 ab	6.4 ± 1.2 a
Жировое тело	-3.0 ± 0.8 a	1.7 ± 0.5 a	15.7 ± 5.6 b	—	—	—

Примечание. Разные буквы означают значимую ($p < 0.05$) разницу между тканями в пределах каждого столбца (Tukey HSD test).

ние содержания ^{15}N у имаго по сравнению с личинками (Doi et al., 2007; Tibbets et al., 2008). Однако вопрос о том, в какой степени изотопный состав молодого имаго отражает изотопный состав личинок, остается почти не проработанным.

Целью данной работы было исследование изотопного состава разных частей тела личинок и имаго жесткокрылых и изменений изотопного состава тканей в онтогенезе насекомых с полным превращением.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для исследования изотопного состава отдельных органов насекомых и различий онтогенетических стадий были использованы личинки и имаго жука-носорога обыкновенного (*Oryctes na-*

sicornis (L. 1758)) (Scarabaeidae) и чернотелки *Uloma rufa* Piller et Mitterpacher 1783 (= *Uloma perroudi* Mulsant et Guillebeau 1855) (Tenebrionidae). Насекомые были собраны в июне 2012 г. в отвале опилок деревоперерабатывающего комбината в окрестностях г. Шуя Ивановской обл. ($56^{\circ}51'$ с.ш., $41^{\circ}22'$ в.д.). Основным критерием выбора объектов была однородность изотопного состава их пищевого субстрата (разлагающихся опилок). Насекомые были разделены на отдельные ткани и органы: голова, ноги, склеротизированные внешние покровы, крылья, мышцы груди, жировое тело, стенку передней кишки, мальпигиевы сосуды (табл. 1, 2). Фрагменты внешних покровов *U. rufa* и личинок *O. nasicornis* были взяты с вентральной части первых брюшных сегментов, у имаго *O. nasicornis* — с дорсальной части брюшка.

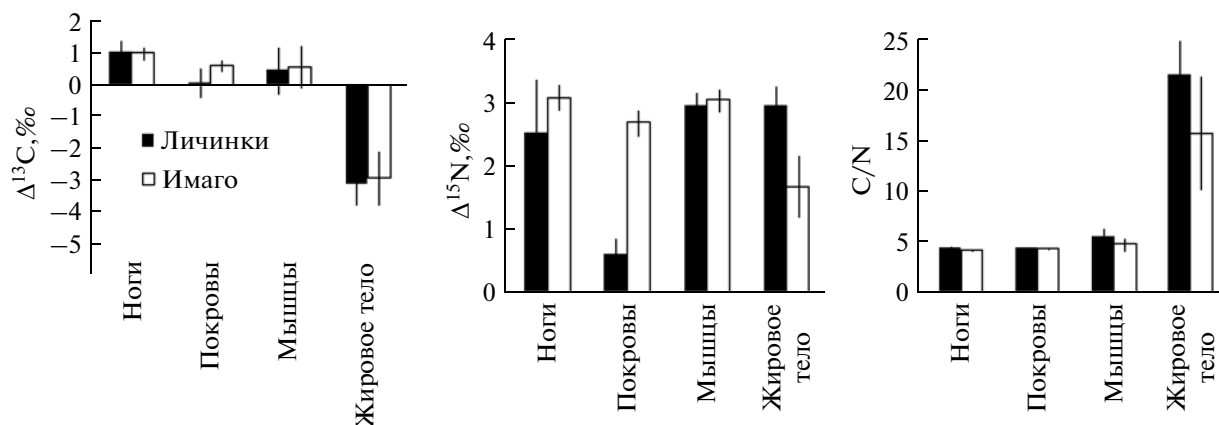


Рис. 1. Изотопный состав углерода ($\Delta^{13}\text{C}$), азота ($\Delta^{15}\text{N}$) и массовое соотношение C/N некоторых частей тела личинок и имаго *Oryctes nasicornis*. Средние и стандартная ошибка, $n = 5$.

Дополнительное исследование изменения изотопного состава на протяжении жизненного цикла было проведено на лабораторной культуре малого мучного хрущака (*Tribolium confusum* (Jacquelin du Val 1861)) (Tenebrionidae). В эксперименте использовали два пищевых субстрата: крупу пшеницы (растение с С3 типом фотосинтеза, $\delta^{13}\text{C}$ около -27‰) и кукурузы (растение с С4 типом фотосинтеза, $\delta^{13}\text{C}$ около -12‰). Личинки содержались при температуре 28°C и относительной влажности воздуха 40% . В ходе эксперимента был произведен отбор насекомых на всех стадиях жизненного цикла, кроме яйца. Личинки были разделены на четыре возрастные группы согласно размеру и длительности развития (Л1–Л4). Далее отбирали насекомых на стадии куколки (К). Среди взрослых жуков выделяли недавно вышедших из куколки молодых имаго с мягкими покровами (ИМ) и зрелых имаго (ИЗ). После извлечения из контейнеров с пищей животных выдерживали в течение 24 ч в пустых сосудах для освобождения кишечника. Поскольку в данном случае нас интересовали онтогенетические изменения изотопного состава целого организма, для анализа был использован гомогенат целой особи.

Образцы тканей *O. nasicornis* и *U. rufa* и целые экземпляры *T. confusum* высушивали при температуре 50°C в течение 48 ч. Высушенных *T. confusum* перед анализом измельчали в ступке. Изотопный анализ насекомых и образцов пищевых субстратов ($n = 4-5$) был проведен на комплексе оборудования, состоящем из элементного анализатора Flash 1112 и изотопного масс-спектрометра Thermo Delta V Plus в Центре коллективного пользования при ИПЭЭ РАН. Изотопный состав азота и углерода выражали в тысячных долях отклонения от международного эталона (vPDB и атмосферного N), δ (‰):

$$\delta X_{\text{образец}} = [(R_{\text{образец}}/R_{\text{эталон}}) - 1] \times 1000,$$

где X – это элемент (азот или углерод), R – молярное соотношение тяжелого и легкого изотопов соответствующего элемента. Аналитическая погрешность определения изотопного состава азота и углерода не превышала $\pm 0.2\text{‰}$. Помимо изотопного состава, в каждой пробе было определено процентное содержание углерода и азота (%C, %N) и их массовое соотношение (C/N).

Пищевые субстраты исследованных насекомых существенно различались по изотопному составу углерода и азота. Величины $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ составляли, соответственно, -25.6 ± 0.1 и $-1.3 \pm 0.2\text{‰}$ в древесных опилках; -26.9 ± 0.1 и $-2.8 \pm 0.1\text{‰}$ в пшеничной крупе; -11.5 ± 0.1 и $4.0 \pm 0.1\text{‰}$ в кукурузной крупе. Для удобства сравнения результатов разных экспериментов мы использовали не измеренные величины $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ насекомых (или их фрагментов), а разницу между изотопным составом насекомых и изотопным составом соответствующих пищевых субстратов: $\Delta = \delta_{\text{консумент}} - \delta_{\text{пища}}$. Эта разница обычно именуется “трофическим фракционированием” (Martinez del Rio et al., 2009).

Статистическую обработку данных производили с помощью программного пакета Statistica 8 (StatSoft, Tulsa, USA). Были использованы дисперсионный и корреляционный анализы. За уровень достоверности принята вероятность $p < 0.05$; в тексте приводятся средние значения и (после знака \pm) стандартная ошибка средней.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изотопный и элементный состав отдельных тканей и частей тела личинок (табл. 1) и имаго (табл. 2) *O. nasicornis* достоверно различались. Жировая ткань имела наименьшие величины $\Delta^{13}\text{C}$ как у личинок, так и у имаго жуков-носоро-

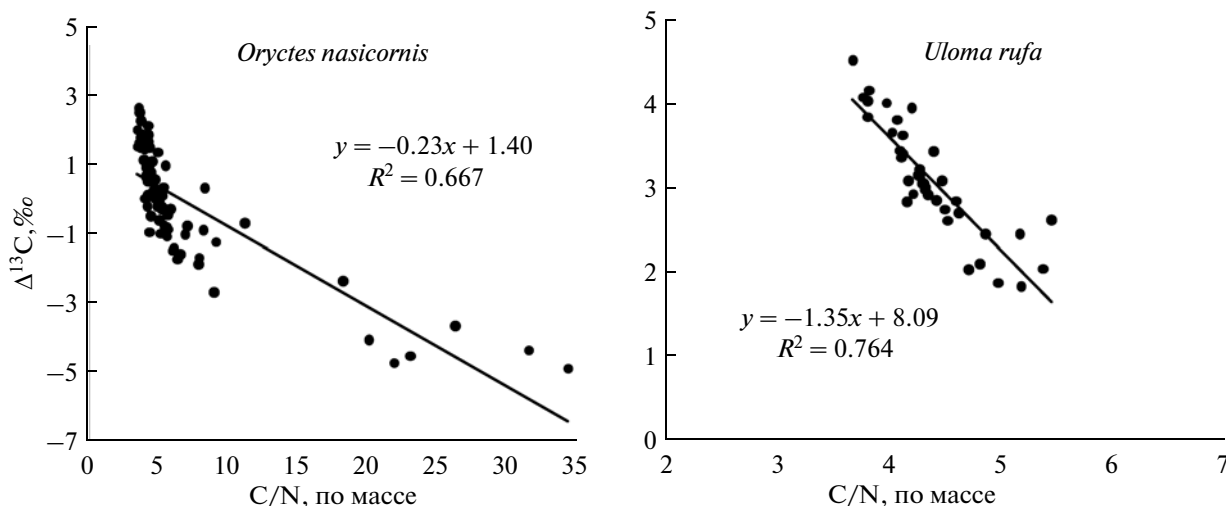


Рис. 2. Корреляция между величиной $\Delta^{13}\text{C}$ и массовым соотношением C/N в тканях личинок и имаго *Oryctes nasicornis* и *Uloma rufa*. Приведены уравнения линейной регрессии и доля объясненной дисперсии.

гов. Отношение C/N в жировой ткани было достоверно больше, чем в других тканях (рис. 1). Между величинами $\Delta^{13}\text{C}$ и соотношением C/N наблюдалась сильная отрицательная корреляция (рис. 2). Таким образом, низкую величину $\Delta^{13}\text{C}$ в жировом теле можно связать с большим содержанием липидов. Остальные ткани и части тела жуков-носорогов имели сходный изотопный состав углерода и в большинстве случаев слабо отличались от $\delta^{13}\text{C}$ субстрата ($\Delta^{13}\text{C}$ около 0), за исключением крыльев (табл. 2), которые были несколько обогащены ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C} = 1.8 \pm 0.4\text{‰}$). У личинок и имаго *U. rufa* жировое тело не было развито. Ни у личинок, ни у имаго разные ткани и органы не различались достоверно по изотопному составу углерода и соотношению C/N, хотя отрицательная корреляция между $\Delta^{13}\text{C}$ и соотношением C/N в тканях была хорошо выражена (рис. 2). Во всех исследованных тканях величина $\Delta^{13}\text{C}$ у *U. rufa* была существенно (на 1–3‰) выше, чем у *O. nasicornis* (табл. 1 и 2).

O. nasicornis и *U. rufa* практически не различались по изотопному составу азота. У личинок жуков-носорогов наибольшее содержание ^{15}N ($\Delta^{15}\text{N}$

около 3.0‰) отмечено в мышцах и жировом теле (табл. 1). От этих тканей достоверно отличались только внешние покровы ($0.6 \pm 0.3\text{‰}$). У имаго наибольшие величины $\Delta^{15}\text{N}$ обнаружены в крыльях, ногах, мышцах и гонадах. Жировое тело, мальпигиевы сосуды и надкрылья были обеднены ^{15}N (табл. 2). Сходным образом, у чернотелок *U. rufa* наибольшие величины $\Delta^{15}\text{N}$ были отмечены в мышцах и в гонадах, а наименьшие – во внешних покровах личинок и в надкрыльях имаго (табл. 1 и 2). Во всех случаях мы не обнаружили достоверных различий между изотопным составом мышц и конечностей жуков.

У обоих видов обнаружено значительное сходство изотопного состава мышечных тканей личинок и имаго, хотя в других органах имелись некоторые различия по изотопному составу азота (рис. 1). В целом результаты исследования двух видов жуков из природной популяции предполагают, что взрослые насекомые в основном сохранили изотопную подпись, присущую личинкам.

Исследование лабораторной популяции мучных хрущаков *T. confusum* дало возможность подробно проследить динамику изменений изотоп-

Таблица 3. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния стадии жизненного цикла и типа субстрата на изотопный состав углерода и азота (величины $\Delta^{13}\text{C}$, $\Delta^{15}\text{N}$), а также отношение C/N в тканях *Tribolium confusum*

Фактор	d.f.	$\Delta^{13}\text{C}$		$\Delta^{15}\text{N}$		C/N	
		F	p	F	p	F	p
Тип субстрата	1	40.0	<0.001	290.4	<0.001	0.1	0.715
Стадия	6	23.1	<0.001	15.1	<0.001	11.8	<0.001
Стадия × Тип субстрата	6	4.0	<0.001	2.9	0.012	2.3	0.039

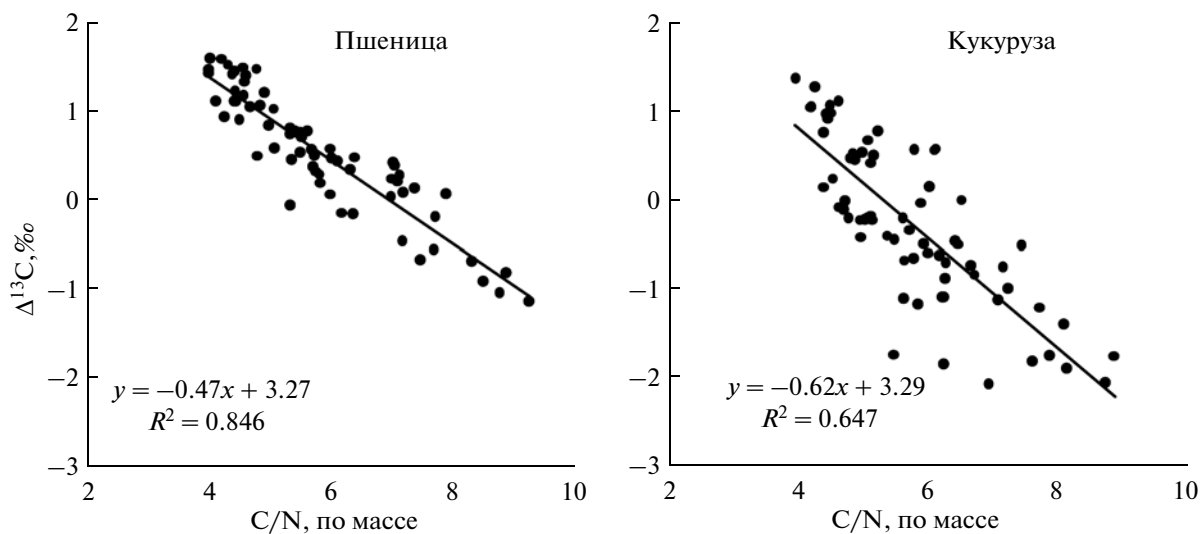


Рис. 3. Корреляция между величиной $\Delta^{13}\text{C}$ и массовым соотношением C/N в тканях *Tribolium confusum*, выращенного на пшеничной и кукурузной крупе (данные по всем изученным стадиям). Приведены уравнения линейной регрессии и доля объясненной дисперсии.

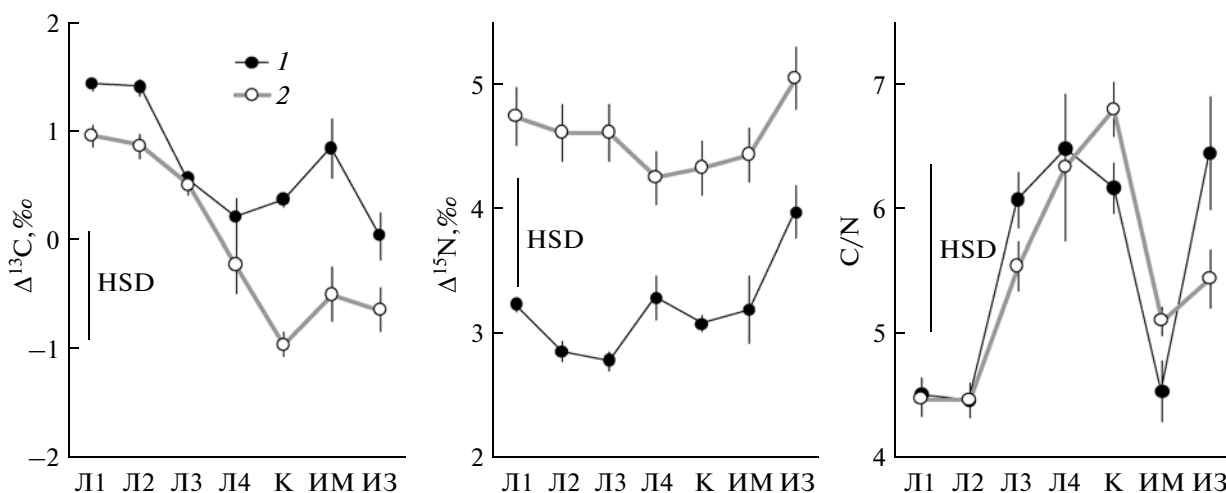


Рис. 4. Изменения изотопного состава (величин $\Delta^{13}\text{C}$ и $\Delta^{15}\text{N}$) и массового соотношения C/N на разных стадиях жизненного цикла *Tribolium confusum*, выращенного на пшеничной (1) и кукурузной (2) крупе. Обозначения стадий см. в тексте. Средние и стандартная ошибка, $n = 6-12$. HSD: достоверно значимая разница (Tukey test для неравных выборок).

ного состава углерода и азота особей на разных стадиях онтогенеза. Двухфакторный дисперсионный анализ подтвердил достоверное влияние стадии жизненного цикла и типа субстрата на величины $\Delta^{13}\text{C}$ и $\Delta^{15}\text{N}$ (табл. 3). По мере развития личинок при питании обоими видами корма наблюдалось постепенное снижение величины $\Delta^{13}\text{C}$, достигавшей минимума (на 1–2‰ ниже, чем на стадии Л1) перед окукливанием, на стадии куколки или зрелого имаго. Соотношение C/N постепенно увеличивалось по мере развития ли-

чинок, достигая максимума на стадии куколки или четвертого возраста личинки (6.5–6.8). Вне зависимости от типа рациона, между величинами $\Delta^{13}\text{C}$ и соотношением C/N в тканях *T. confusum* наблюдалась сильная отрицательная корреляция (рис. 3). Величина $\Delta^{15}\text{N}$ в течение онтогенеза варьировала меньше (в пределах 0.8–1.2‰) и в целом возрастала; максимальная величина была достигнута на стадии зрелого имаго, но разница между стадиями была, как правило, недостоверна (рис. 4). Усредненные за все время эксперимента

величины $\Delta^{15}\text{N}$ были достоверно выше при питании кукурузной крупой ($4.6 \pm 0.1\%$), чем при питании пшеничной крупой ($3.2 \pm 0.1\%$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Различия изотопного состава углерода и азота разных частей тела животных хорошо известны. Тем не менее, практически важный в экологических исследованиях вопрос о выборе наиболее подходящей для изотопного анализа ткани пока остается не решенным. При исследовании мелких почвенных насекомых в большинстве случаев для анализа использовали целых животных, иногда после удаления содержимого кишечника. Однако при работе с более крупными видами использование гомогената тканей целого насекомого, видимо, нецелесообразно, так как при увеличении размеров членистоногих возрастает относительная масса экзоскелета (Шванвич, 1949). Экзоскелет сформирован инертными веществами (в том числе хитином, биокарбонатами, восками), часто имеющими нетипичный для метаболически активных тканей изотопный состав (Тиунов, 2007; Семенюк, Тиунов, 2011; Maraun et al., 2011). Следовательно, использование гомогената целого насекомого может привести к плохо предсказуемым искажениям оценки изотопного состава особи. Мышечные ткани метаболически активны и не подвержены процессам долгосрочной аккумуляции инертных веществ. Поэтому изотопная подпись мышечных тканей может рассматриваться как характерная для целого животного. К сожалению, при работе с мелкими насекомыми и другими беспозвоночными получение мышечной ткани технически затруднено или невозможно.

В исследованиях трофической структуры сообществ с использованием изотопного анализа наибольшее внимание обычно уделяется величине $\delta^{15}\text{N}$, поскольку она отражает трофический уровень организма (Scheu, Falca, 2000; McCutchan et al., 2003). Наши результаты предполагают, что величины $\delta^{15}\text{N}$ сходны в мышцах и конечностях, и общий разброс величин $\delta^{15}\text{N}$ основных частей тела и тканей в пределах одной особи редко превышает 1.0% . Это согласуется с данными, полученными при исследовании божьих коровок (Gratton, Forbes, 2006), тлей (Perkins et al., 2013), прямокрылых (Webb et al., 1998; Wehi, Hicks, 2010). Исключение составили внешние покровы и надкрылья, имевшие пониженную величину $\delta^{15}\text{N}$, что, возможно, связано с высоким содержанием в них хитина, обедненного ^{15}N (Webb et al., 1998). Напротив, крылья были сильно обогащены ^{15}N у имаго *O. nasicornis* (но не у *U. rufa*). Возможно, это связано с наличием в кутикуле крыльев эластичных белков, в том числе резилина, в состав которого входит относительно большая доля

обогащенных ^{15}N аспарагиновой кислоты и аланина (Popp et al., 2007; van Eldijk et al., 2012).

Сильная отрицательная корреляция величин $\Delta^{13}\text{C}$ и C/N у всех исследованных видов жуков (рис. 2 и 4), предполагает, что содержание липидов — один из главных факторов, определяющих внутривидовую вариацию изотопного состава углерода тканей насекомых. Это подтверждают и данные других исследователей (Tarroux et al., 2010; Perkins et al., 2013). Увеличение содержания липидов в тканях приводит к повышению соотношения C/N и уменьшению величин $\Delta^{13}\text{C}$, так как липиды обеднены ^{13}C (DeNiro, Epstein, 1978). Таким образом, экстракция липидов, которая широко применяется при исследовании водных беспозвоночных (Post et al., 2007), может быть полезна и при подготовке для изотопного анализа образцов тканей насекомых. Этот подход иногда используется в почвенно-зоологических исследованиях (Abd El-Wakeil, 2009). Однако содержащиеся в тканях жертвы липиды — это важный энергетический ресурс консументов. Экстракция липидов может привести к искажениям при реконструкции трофических связей хищных беспозвоночных (Tarroux et al., 2010). Кроме того, при выборе метода обработки материала необходимо учитывать, что экстракция липидов не применялась в большинстве проведенных к настоящему времени комплексных “изотопных” исследований структуры наземных (в том числе почвенных) трофических сетей.

Изотопный состав тканей *O. nasicornis* и *U. rufa* очень слабо отличался у личинок и имаго (рис. 1). Это предполагает отсутствие сильных изменений изотопного состава тканей при метаморфозе, хотя окончательный ответ на этот вопрос не может быть получен при исследовании природных популяций жуков. В лабораторном эксперименте с *T. confusum* мы обнаружили довольно слабые изменения изотопного состава азота в течение онтогенеза: разброс средних величин $\Delta^{15}\text{N}$ составил 1.2% на пшеничном корме и 0.8% на кукурузном. Примечательно, что собственно метаморфоз не сопровождался резкими изменениями величины $\Delta^{15}\text{N}$ (рис. 4). Несколько более выражены были онтогенетические изменения величины $\Delta^{13}\text{C}$, что связано, по-видимому, с динамикой содержания жировой ткани. Понижение отношения C/N и увеличение средних величин $\Delta^{13}\text{C}$ у *T. confusum* на стадии “молодого” имаго можно объяснить расходом жировых запасов во время стадии куколки. После этого взрослый жук начинает питаться и восстанавливает свои жировые запасы, что вновь приводит к увеличению соотношения C/N и уменьшению $\Delta^{13}\text{C}$ (рис. 4).

Наше исследование позволило получить новые данные о величине “трофического фракционирования” изотопов углерода и азота у жестко-

крылых. В мышечных тканях личинок и имаго *U. rufa* и *O. nasicornis* величина $\Delta^{15}\text{N}$ была фактически идентична и составила около 3‰ (табл. 1 и 2), что совершенно соответствует ожидаемому накоплению ^{15}N на один трофический уровень (McCutchan et al., 2003; Тиунов 2007). Напротив, изотопный состав углерода ($\Delta^{13}\text{C}$) тканей *U. rufa* и *O. nasicornis* существенно различался, несмотря на то, что эти виды обитали совместно. Можно полагать, что основной пищей чернотелок *U. rufa* служили не собственно древесные остатки, а заселяющая их микрофлора. В таком случае обогащение тканей чернотелок ^{13}C (на 2–4‰ по сравнению с опилками) совершенно соответствует увеличению величины $\delta^{13}\text{C}$ в тканях почвенных сапрофагов по сравнению с растительным опадом (Potarov et al., 2013). Следовательно, чернотелок можно отнести к “ложным ксилофагам” (Шовен, 1953). Личинки Scarabaeidae, в том числе *O. nasicornis*, имеют развитые симбиотические отношения с целлюлозолитической кишечной микрофлорой, которые обеспечиваются соответствующими морфологическими приспособлениями (слепые выросты в среднем отделе и бродильная камера в заднем отделе кишечника). Это позволяет жукам использовать в качестве источника углерода структурные компоненты растительных тканей (Стриганова, 1980). В силу этого, величина $\Delta^{13}\text{C}$ у жуков-носорогов мало отличается от нуля, что типично для насекомых-фитофагов (Spence, Rosenheim, 2005). Однако в данной работе мы не имели возможности с полной достоверностью проследить трофические связи жуков, собранных в природной популяции.

В лабораторном эксперименте с *T. confusum* изотопный состав пищи был точно известен. Малый мучной хрущак быстрее достигал стадии имаго на пшеничном корме (на 12 дней раньше при продолжительности развития около двух месяцев). Вероятно, это связано с большим содержанием белка в пшенице; массовая доля азота в пшеничной крупе ($2.3 \pm 0.1\%$) была в два раза больше, чем в кукурузной ($1.2 \pm 0.1\%$). Максимальные величины трофического фракционирования изотопов азота отмечены при питании кормом с невысоким содержанием белка; на кукурузном корме средняя величина $\Delta^{15}\text{N}$ была на 1.5‰ больше, чем при питании пшеничной крупой (рис. 4). Зависимость величины $\Delta^{15}\text{N}$ от качества пищи (в частности, от содержания белка) была неоднократно показана в лабораторных экспериментах, однако причины и механизмы этой зависимости пока плохо понятны (Webb et al., 1998; Martinez del Rio et al., 2009; Robbins et al., 2010; Semenina, Tiunov, 2011). Величина $\delta^{15}\text{N}$ в кукурузной крупе была существенно выше, чем в пшеничной (4.0 и -2.8% , соответственно). Таким образом, наши данные противоречат предположениям о

снижении величины $\Delta^{15}\text{N}$ с увеличением $\delta^{15}\text{N}$ в пище (Caut et al., 2009; Hussey et al., 2014). Величина $\Delta^{13}\text{C}$ у *T. confusum* варьировала в ходе онтогенеза в пределах от -1 до $+1.5\%$ вне зависимости от характера корма, что соответствует литературным данным о малом трофическом фракционировании изотопов углерода (Webb et al., 1998; McCutchan et al., 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе изотопного состава крупных насекомых необходимо принимать во внимание вариабельность величин $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ разных тканей и органов. У исследованных имаго и личинок двух видов жуков диапазон величин $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в пределах одной особи достигал 4.8 и 2.4‰, соответственно. Мы полагаем, что использование для изотопного анализа мышечной ткани (без дополнительной экстракции липидов) позволяет получить результаты, которые легче всего поддаются интерпретации. У исследованных видов жуков изотопный состав ног и мышечной ткани отличался незначительно. Следовательно, для изотопного анализа можно использовать конечности членистоногих. Метаморфоз не приводит к существенному изменению изотопного состава азота в тканях жуков. Относительно более выраженные (в пределах 2‰) изменения величины $\delta^{13}\text{C}$ в течение онтогенеза связаны преимущественно с динамикой массовой доли жировой ткани.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (14-04-01824а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Семенюк И.И., Тиунов А.В., 2011. Трофическая дифференциация видов в сообществе диплопод (Diplopoda, Myriapoda) по данным изотопного анализа / Структура и функции почвенного населения тропического муссонного леса (национальный парк Кат Тьен, Южный Вьетнам). М.: Товарищество научных изданий КМК. С. 254–273.
- Стриганова Б.Р., 1980. Питание почвенных сапрофагов. М.: Наука. 244 с.
- Тиунов А.В., 2007. Стабильные изотопы углерода и азота в почвенно-экологических исследованиях // Известия РАН. Серия биологическая. № 4. С. 475–489.
- Шванвич Б.Н., 1949. Курс общей энтомологии. М.: Советская наука. 900 с.
- Шовен Р., 1953. Физиология насекомых. М.: Изд-во иностранной литературы. 496 с.
- Abd El-Wakeil K., 2009. Trophic structure of macro- and meso-invertebrates in Japanese coniferous forest: Car-

- bon and nitrogen stable isotopes analyses // *Biochemical Systematics and Ecology*. V. 37. P. 317–324.
- Caut S., Angulo E., Courchamp F., 2009. Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction // *Journal of Applied Ecology*. V. 46. P. 443–453.
- DeNiro M., Epstein S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. V. 42. P. 495–506.
- DeNiro M., Epstein S., 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. V. 45. P. 341–351.
- Doi H., Kikuchi E., Takagi Sh., Shikano Sh., 2007. Changes in carbon and nitrogen stable isotopes of chironomid larvae during growth, starvation and metamorphosis // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. V. 21. P. 997–1002.
- Gratton C., Forbes A., 2006. Changes in $\delta^{13}\text{C}$ stable isotopes in multiple tissues of insect predators fed isotopically distinct prey // *Oecologia*. V. 147. P. 615–624.
- Hussey N.E., MacNeil M.A., McMeans B.C., Olin J.A., Dudley S.F.J. et al., 2014. Rescaling the trophic structure of marine food webs // *Ecology Letters*. V. 17. P. 239–250.
- Krab E., Van Logtestijn R., Cornelissen J., Berg M., 2012. Reservations about preservations: storage methods affect $\delta^{13}\text{C}$ signatures differently even in closely related soil fauna // *Methods in Ecology and Evolution*. V. 3. P. 138–144.
- Maraun M., Erdmann G., Fischer B., Pollierer M., Norton R. et al., 2011. Stable isotopes revisited: Their use and limits for oribatid mite trophic ecology // *Soil Biology and Biochemistry*. V. 43. P. 877–882.
- Martinez del Rio C., Wolf N., Carleton S., Gannes L., 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments // *Biological Reviews*. V. 84. P. 91–111.
- McCutchan J., Lewis W., Kendall C., McGrath C., 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur // *Oikos*. V. 102. P. 378–390.
- Perkins M., McDonald R., van Veen F., Kelly S., Rees G., Bearhop S., 2013. Important impacts of tissue selection and lipid extraction on ecological parameters derived from stable isotope ratios // *Methods in Ecology and Evolution*. V. 4. P. 944–953.
- Popp B., Graham B., Olson R., Hannides C., Lott M. et al., 2007. Insight into the trophic ecology of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, from compound-specific nitrogen isotope analysis of proteinaceous amino acids // *Stable Isotopes as Indicators of Ecological Change*. San Diego: Elsevier. P. 173–190.
- Post D., Layman C., Arrington A., Takimoto G., Quattrochi J., Montana C., 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses // *Oecologia*. V. 152. P. 179–189.
- Потапов А.М., Семенова Е.Е., Курakov А.В., Тиунов А.В., 2013. Large $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and small $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ isotope fractionation in an experimental detrital foodweb (litter-fungi-collembolans) // *Ecological Research*. V. 28. P. 1069–1079.
- Robbins C.T., Felicetti L.A., Florin S.T., 2010. The impact of protein quality on stable nitrogen isotope ratio discrimination and assimilated diet estimation // *Oecologia*. V. 162. P. 571–579.
- Scheu S., Falca M., 2000. The soil food web of two beech forests (*Fagus sylvatica*) of contrasting humus type: stable isotope analysis of a macro- and a mesofauna-dominated community // *Oecologia*. V. 123. P. 285–296.
- Semenina E.E., Тиунов А.В., 2011. Trophic fractionation ($\Delta^{15}\text{N}$) in Collembola depends on nutritional status: a laboratory experiment and mini-review // *Pedobiologia*. V. 54. P. 101–109.
- Spence K.O., Rosenheim J.A., 2005. Isotopic enrichment in herbivorous insects: a comparative field-based study of variation // *Oecologia*. V. 146. P. 89–97.
- Tarroux A., Ehrich D., Lecomte N., Jardine T., Bety J., Berteaux D., 2010. Sensitivity of stable isotope mixing models to variation in isotopic ratios: evaluating consequences of lipid extraction // *Methods in Ecology and Evolution*. V. 1. № 3. P. 231–241.
- Tayasu I., Nakamura T., Oda H., Hyodo F., Takematsu Y., Abe T., 2002. Termite ecology in a dry evergreen forest in Thailand in terms of stable ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and radio (^{14}C , ^{137}Cs and ^{210}Pb) isotopes // *Ecological Research*. V. 17. P. 195–206.
- Tibbets T., Wheeless L., Martínez del Rio C., 2008. Isotopic enrichment without change in diet: an ontogenetic shift in $\delta^{15}\text{N}$ during insect metamorphosis // *Functional Ecology*. V. 22. P. 109–113.
- Tillberg C., McCarthy D., Dolezal A., Suarez A., 2006. Measuring the trophic ecology of ants using stable isotopes // *Insectes Sociaux*. V. 53. P. 65–69.
- Traugott M., Pazmandi Ch., Kaufmann R., Juen A., 2007. Evaluating $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis to investigate trophic relationships of elaterid larvae (Coleoptera: Elateridae) // *Soil Biology and Biochemistry*. V. 39. P. 1023–1030.
- Vanderklift M., Ponsard S., 2003. Sources of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis // *Oecologia*. V. 136. P. 169–182.
- van Eldijk M., McGann C., Kiick K., Hest J., 2012. Elastomeric polypeptides // *Topics in Current Chemistry*. V. 310. P. 71–116.
- Webb S., Hedges G., Simpson S., 1998. Diet quality influences the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of locusts and their biochemical components // *Journal of Experimental Biology*. V. 201. P. 2903–2911.
- Wehi P., Hicks B., 2010. Isotopic fractionation in a large herbivorous insect, the Auckland tree weta // *Journal of Insect Physiology*. V. 56. P. 1877–1882.

INTRA-BODY VARIATION AND ONTOGENETIC CHANGES IN THE ISOTOPIC COMPOSITION ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ AND $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) OF BEETLES (COLEOPTERA)

S. M. Tsurikov¹, A. A. Goncharov², A. V. Tiunov²

¹Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow 111991, Russia
e-mail: smtsurikov@rambler.ru

²Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow 119071, Russia

The stable isotope analysis, which is widely used for studying trophic relationships of invertebrates, needs a correct estimation of trophic fractionation factors, as well as a careful choice of reference tissues. Different organs and body parts of large insects may vary in isotopic composition of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$), though detailed information is available for a limited set of species only. In the field-collected larvae and imagoes of *Oryctes nasicornis* (Scarabaeidae) and *Uloma rufa* (Tenebrionidae), a range of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values among different body parts and organs (muscles, legs, wings, elytra, fat body, gonads, etc.) was 4.8‰ and 2.4‰, respectively. We suggest that muscle tissue or legs of large insects should be preferably selected for the isotopic analysis. The isotopic composition of nitrogen in beetles did not depend on the ontogenetic stage and was not affected by metamorphosis. In larvae and imagoes of *Tribolium confusum* (Tenebrionidae) reared in laboratory culture, the trophic fractionation of carbon ($\Delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\Delta^{15}\text{N}$) were within the expected values (from -1 to 1.5‰ and from 3 to 5‰, respectively), though depended on the type of food. Changes in the $\delta^{13}\text{C}$ values during ontogenesis reflected changes in the relative proportion of lipids and correlated strongly with the C : N ratio.

Keywords: Scarabaeidae, Tenebrionidae, *Oryctes nasicornis*, *Uloma rufa*, *Tribolium confusum*, stable isotopes, trophic isotope fractionation, metamorphosis, lipids.