

ردیابی شکارگری با استفاده از qPCR: اثر مقدار طعمه، زمان سپری شده، رژیم

غذایی دنبال کننده و حفظ نمونه در مقدار قابل تشخیص DNA طعمه

### چکیده

با استفاده از PCR کمی تکثیرکننده‌ی یک امپلیکون 214 جفت‌بازی mtDNA اختصاصی شکار از ژن میتوکندریایی COI سوسک کلرادو، (Coleoptera: *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Chrysomelidae)، به منظور واضح کردن اثرات زمان و رژیم غذایی مصرف‌شده، تعداد تخم‌های شکار و روش‌های تثبیت و حفظ نمونه بر مقدار DNA هدف شناسایی شده، از تخم‌های شکار با سن و تعداد مشخص برای تغذیه یک شکارگر عمومی (*Coleomegilla maculata* (De Geer) (Coleoptera: Coccinellidae) استفاده شد. سیگنال، به طور مستقیم پس از قطع تغذیه به شدت ضعیف شد، حتی زمانی که شکارگرها بلافاصله در دمای 20- درجه سلسیوس منجمد شده بودند. با این حال، مقدار هدف ردیابی شده، ارتباط معنی‌داری با تعداد تخم‌های مصرف کرده و زمان سپری شده از تغذیه دارد. کاهش DNA ردیابی شده‌ی شکار، با یک مدل نمایی منفی سازگار بود. توالی DNA هدف از شکارگرهای گرسنگی دیده ناپدید شد (نیمه عمر کمی برآورد شده 59 دقیقه) که خیلی آهسته‌تر از آن‌هایی بود که از شته‌های سیب‌زمینی، پس از تغذیه از تخم‌های شکار مورد نظر تغذیه کرده بودند (برآورد نیمه عمر 16 دقیقه)، در حالی که در آن‌هایی که از تخم‌های *C. maculate* به عنوان یک chaser استفاده کرده بودند، نرخ تخریب توالی DNA شکار مورد نظر در حد متوسط بود. پروتکل‌های تثبیت‌کننده از اهمیت ویژه‌ای در استفاده مناسب از روش qPCR برخوردارند. در میان هفت روش آزمایش شده، ذخیره سازی شکارگر بلافاصله در اتانول 70٪ سرد شده تا 20- درجه سلسیوس، بیشترین میزان توالی هدف را ارائه کرد، که 22/8٪ از آن به طور مستقیم از یک تخم دست‌نخورده‌ی شکار بازیافت شده بود. محصول نمونه‌های منجمد شده‌ی بدون حلال در دمای 80- و 20- درجه سلسیوس، به ترتیب تنها 6٪ و 2/3٪ DNA هدف بود و در ضدفریز مبتنی بر اتانول و اتیلن‌گلیکول در دمای اتاق، کمتر از 1٪ از DNA شکار را بازیابی کرد. با این وجود، طعمه مورد نظر در

بیش از 80٪ از شکارگرهای ذخیره‌شده‌ی ضدفریز ردیابی شد. شکارگرهای کشته شده و نگهداری شده در دمای اتاق به مدت 4 ساعت یا 5 روز، هیچ DNA شکار مورد نظری را در 18 مورد از 20 مورد تولید نکردند. ای نتایج ارزش و پیچیدگی کاربرد تکنیک qPCR را در پژوهش‌های شکارگری مزرعه‌ای نشان می‌دهد.

## مقدمه

ردیابی و تعیین مقدار الگوهای شکارگری پیچیده است و در عین حال برای توسعه و بهبود کنترل بیولوژیک حفاظتی ضروری است (Symondson et al. 2002). روش‌های مختلفی برای تعیین وقوع، فراوانی و تاثیر شکارگرها بر جمعیت طعمه استفاده شده است، که عبارتند از مشاهده مستقیم وقایع شکارگری، دستکاری کنترل‌شده‌ی تعداد شکارگر و شکار برای تعیین اثرات به وجود آمده و تشخیص نشانگرهای شکار در شکارگرها. نشانگرهای بیوشیمیایی منحصر به فرد برای شکار، پروتئین یا اسیدهای نوکلئیک، یک ابزار همه کاره را برای تشخیص و کمی‌سازی شکار فراهم می‌کند. دو روش پیشرو، تجزیه و تحلیل مبتنی بر آنتی‌بادی پروتئین‌های طعمه و تجزیه و تحلیل توالی خاص DNA شکار مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) است. هر کدام از این تکنیک‌ها مزایا و معایبی دارند. به طور کلی، گسترش immunoassay گرانتر است و به طور بالقوه قادر به تشخیص مراحل مختلف زندگی شکار، بر اساس حضور پروتئین مربوطه است. گسترش روش‌های مبتنی بر PCR سریع تر و ارزان تر است (Symondson 2002) و فرصتی برای بررسی همزمان شکارگری روی شکارهای متعدد است، هر چند که هزینه‌های هر نمونه ممکن است بیشتر باشد (Sheppard and Harwood 2005).

اینکه توالی DNA شکار در شکارگر قابل ردیابی باشد یا نه، به عوامل زیادی مانند انتخاب توالی هدف و به ویژه طول آن، زمان (های) کشمکش (های) تغذیه‌ای، دما، وضعیت فیزیولوژیکی و وزن شکارگر، هضم شکار مورد نظر یا شکار دیگر و سایر مواد غذایی قبل، در حین و بعد از مصرف شکار مورد علاقه، تعداد کپی‌های DNA در شکار و حفاظت از نمونه پس از نمونه‌برداری (به عنوان مثال انجماد) برای جلوگیری از تخریب بستگی دارد. DNA شکار ممکن است به عنوان نتیجه‌ای از شکارگری ثانویه (Sheppard et al. 2005) با PCR. Harwood et al.

2001 با ELISA) و/یا لاشه‌خواری (Juen and Traugott 2005 با PCR، Calder et al. 2005 با ELISA) تشخیص داده شود، که در صورت در نظر داشتن شکارگری شکار زنده، به عنوان مثبت‌های کاذب یا تشخیص نادرست در نظر گرفته می‌شوند.

PCR معمولی، اندازه‌گیری کیفی (دوجمله‌ای) اینکه آیا DNA شکار در معده شکارهای مورد نظر وجود دارد را انجام می‌دهد. PCR کمی (qPCR)، کمیت DNA هدف ردیابی شده را از طریق تعیین اینکه چند چرخه PCR برای بالا بردن رنگ گزارشگر فلوروسنت بالاتر از سطح پیش‌زمینه مورد نیاز است، گزارش می‌دهد، که به منظور به دست آوردن مقادیر شناخته‌شده‌ی چرخه آستانه (Ct) که باعث محاسبه‌ی تعداد سلول‌ها، ارگانیسیم‌ها یا کپی‌های DNA از نمونه‌های تست شده، با محتوای ناشناخته می‌شود، با مقادیر شناخته‌شده‌ی هدف مقایسه شد. qPCR با کاربرد گسترده در موارد پزشکی و پزشکی قانونی، برای تحقیقات شکار-شکارگری سازش یافته است. Deagle و همکاران (2006) شکارگری شیر دریایی از ماهی را با استفاده از ردیابی DNA qPCR شکارگر و شکار در نمونه-های مدفوع مورد بررسی قرار دادند. Troedsson و همکاران (2007) و Nejstgaard و همکاران (2008) از qPCR برای تعیین مقدار جلبک تک سلولی در معده زئوپلانکتون بی‌مهره‌ی دریایی استفاده کردند. Zhang و همکاران (2007) از qPCR برای تعیین مقدار DNA هدف *Bemisia tabaci* موجود در چندین شکارگر در مزارع پنبه‌ی چین استفاده کردند. با توجه به این پژوهش‌ها، مشخص است که qPCR در مقایسه با PCR معمولی در اندازه‌گیری شکارگری، اطلاعاتی را اضافه می‌کند، اما باید قبل از تفاسیر واضح از آزمایش‌های مزرعه‌ای مصرف شکار توسط qPCR، مطالعات اولیه آزمایشگاهی باید در یک سیستم مطالعیه انجام شود.

باید برای تعریف اینکه کدام یک از عوامل اثرات قابل توجهی بر ناپدید شدن FNA اندازه‌گیری شده هدف دارند، آزمایش‌های کنترل شده‌ای برای ترکیب مورد نظر از شکار-شکارگر خاص انجام شود. زیرا هم در PCR معمولی و هم در PCR کمی، اهداف مختلف (Deagle et al. 2006; Hoogendoorn and Heimpel 2001) و شکارگرهای مختلف (Greenstone et al. 2007)، منجر به نرخ بسیار متفاوت ناپدید شدن DNA شکار می‌شود.

در این زمینه، مقادیر هدف باید در پرتو الگوهای تغذیه‌ای، بر اساس رفتارهای شکارگر، فراوانی، مرحله و در دسترس بودن شکار، زمان روز، آب و هوا، خاک، معماری گیاه و غیره تفسیر شود.

*Coleomegilla maculata* (De Geer) (Coleoptera: Coccinellidae) یک کفشدوزک بسیار پلی‌فاژ و با پراکنش گسترده است که شکارگر بومی آمریکای شمالی و مرکزی است. این شکارگر در بسیاری از اکوسیستم‌های کشاورزی به فراوانی یافت می‌شود و شکارگر مهم سوسک کلرادو (*Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) در مزارع سیب‌زمینی است، در حالی که ممکن است نسبت بالایی از تخم‌های این آفت و همچنین تعداد قابل توجهی از لاروهای کوچک را بکشد (Hazzard et al. 1991; Hilbeck et al. 1997). برهمکنش‌های پویای بین *C. maculate* و شکار آن *L. decemlineata*، مستلزم کاربرد روش‌های جدید برای تعیین کارایی این شکارگر به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک است. با توجه به اینکه تعیین کمیت دقیق شکارگری توسط PCR، یک فرآیند با پیچیدگی بسیار است، یک سری از بررسی‌های کنترل شده دقیق در مورد این موضوع و شکارگر پلی‌فاژ در آزمایشگاه انجام شد. به طور خاص، آزمایش‌ها برای تعیین موارد زیر طراحی شده بودند: 1) چگونگی شیوه‌های معمول جمع‌آوری/ذخیره‌سازی بر ردیابی DNA شکار درون شکارگرها تاثیر می‌گذارد، 2) چگونه کمیت شکار بر خروجی آنالیز qPCR شکارگر تاثیر می‌گذارد، 3) چگونه زمان هضم و تاثیر تغذیه بعدی بر قابلیت ردیابی شکار مورد نظر تاثیر می‌گذارد.

## مواد و روش‌ها

### شکار

تخم‌های *L. decemlineata* از کلنی آزمایشگاه بیوکنترل حشرات USDAARS به دست آمد که منشأ آن از تخم‌های به دست آمده از گروه کشاورزی نیوجرسی در سال 1996 بود. حشرات جمع‌آوری شده مزرعه‌ای از مزارع سیب‌زمینی در مرکز تحقیقات کشاورزی Beltsville در Beltsville, MD, USA به دست آمد که برای حفظ تنوع ژنتیکی در کلنی، هر ساله به کلنی وارد می‌شدند. افراد بالغ و لاروها با استفاده از شاخ و برگ سیب‌زمینی (رقم

Kennebec) به عنوان غذا پرورش یافتند. تخم‌های مورد استفاده برای تغذیه آزمایشگاهی، زمانی که تخم‌های شکار 1، 3 یا 5 روزه بود برای تغذیه شکارگرها استفاده شد. تخم‌های یک روزه در 24 ساعت آزمایش گذاشته شدند و آن‌هایی که تغذیه نشده بودند بلافاصله در دمای 25 درجه، به مدت 48 یا 96 ساعت دیگر نگهداری شدند. در تخم‌های 5 روزه جنین تشکیل شده بود و نزدیک به تفریخ بودند. شته سیب‌زمینی *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae) (Thomas) استفاده شده در آزمایش‌ها از سیب‌زمینی (رقم) کشت شده در گلخانه‌های Beltsville, Maryland جمع‌آوری شد و تا یک روز قبل از آزمایش‌های تغذیه‌ای روی شاخ و برگ سیب زمینی نگهداری شد.

### شکارگرها

*C. maculate* از یک کلنی موجود در اواخر تابستان 2005 که از مزارع پنبه و سیب زمینی در مرکز تحقیقات کشاورزی MD, USA, Beltsville با دست جمع‌آوری شده بود، به دست آمد. افراد بالغ و لاروها در دوره نوری 16:8 (روشنایی: تاریکی) با رطوبت نسبی تقریباً 50٪ در دمای حدود 25 درجه سلسیوس پرورش داده شدند و با جایگزین گرده (Bee-PRO, Mann Lake Ltd., [www.mannlakeltd.net](http://www.mannlakeltd.net)) تغذیه شدند و در اوایل دوره لاروی، از تخم‌های *Helicoverpa rea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) و در سن سوم و چهارم لاروی و بالغ از تخم *L. decemlineata* به عنوان مکمل استفاده شد. تمام مراحل زندگی با فتیله‌های دندانپزشکی اشباع شده از آب تهیه شدند.

### پروتکل عمومی تغذیه

سن چهارم *C. maculate* برای آزمایش‌ها انتخاب شد، زیرا برای خوردن کامل چندین تخم *L. decemlineata* بدون سیر شدن، به اندازه کافی بزرگ بودند. قبل از انجام آزمایش، لاروها روی جایگزین گرده و تخم‌های *H. zea* تغذیه شدند و پس از آن، 24 ساعت قبل از شروع آزمایش تغذیه‌ای، به صورت تکی در ظروف پتری تهویه‌دار 10×35 میلی‌متری (با استفاده از فتیله‌های دندانپزشکی اشباع شده در آب با طول تقریبی 8 میلی‌متر) گرسنگی داده شدند. تخم‌های با سن مشخص *L. decemlineata* برای لاروهای انفرادی ارائه شد. زمان فراهم شدن لاروها،

شروع تغذیه و توقف تغذیه تا نزدیک‌ترین دقایق گزارش شد. تشخیص داده شد که یک لارو زمانی که تمام تخم‌ها را مصرف می‌کند، تغذیه خود را متوقف کرده و حتی حرکات پالپ‌ها نیز متوقف می‌شود یا لارو از محل ماده غذایی دور می‌شود. علاوه بر این، برای هر آزمایشی، چند تکرار از لاروهای شکارگر تغذیه نکرده و گروه‌های جداگانه از تخم‌های با سن و تعداد مورد نظر، به طور یکسان پس از اتمام این تغذیه‌ها، برای تغذیه از لاروها تیمار شدند. لاروهایی که پس از دو ساعت تغذیه خود را شروع نکردند و همچنین لاروهایی که 4 ساعت پس از شروع تغذیه، تغذیه خود را متوقف نکرده بودند، دور انداخته شدند.

### اثر ذخیره‌سازی نمونه

به دلیل بازیابی ظاهری کم DNA ردیابی شده در پروتکل انجماد در دمای 20- درجه سلسیوس و به دنبال آن افزودن اتانول 70٪ در دمای 22 درجه سلسیوس، تاثیر چندین روش تثبیت‌کننده برای جلوگیری از هضم DNA برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی مورد مقایسه قرار گرفت. به منظور شبیه‌سازی شیوه‌های رایج حفاظت در مزرعه یا آزمایشگاه، بهبود این روش‌ها و شبیه‌سازی بدترین شرایط یعنی حفاظت نکردن به مدت چند ساعت یا چند روز، این تیمارها انتخاب شدند. *C. maculate*، 2 دقیقه بعد از تغذیه کامل از یک تخم 3 روزه، به لوله‌های میکروسنتریفیوژ اتوکلاو شده‌ی 0/5 میلی‌لیتری منتقل شدند. تیمار به صورت زیر انجام شد:

1. کنترل مثبت فقط تخم، با استفاده از یک تخم سه‌روزه *L. decemlineata*، ذخیره شده در دمای 20- درجه سلسیوس در اتانول 70٪ سرد شده در دمای 20- درجه سلسیوس (ACS/USP grade, not denatured).
2. شکارگر تغذیه‌کرده و منجمد شده در دمای 20- درجه سلسیوس در اتانول 70٪ سرد شده در 20- درجه سلسیوس.
3. شکارگر تغذیه‌کرده و منجمد شده در یخ خشک و منتقل شده به فریزر 80- درجه سلسیوس پس از 1 ساعت.
4. شکارگر تغذیه‌کرده‌ی ذخیره شده بدون حلال در دمای 20- درجه سلسیوس به مدت 5 روز و به دنبال آن افزودن اتانول 70 درصد سرد شده در دمای 20- درجه سلسیوس.
5. شکارگر تغذیه‌کرده و ذخیره شده در دمای اتاق (22 درجه سلسیوس) در اتانول 70٪.

6. شکارگر تغذیه کرده و ذخیره شده در دمای اتاق در ضدیخ قوی (نوع اتیلن گلیکول، Prestone® Antifreeze/ Coolant).

7. شکارگر تغذیه کرده و کشته شده با CO<sub>2</sub> با افزودن اتانول 70٪ با دمای اتاق پس از 4 ساعت.

8. شکارگر تغذیه کرده و کشته شده با CO<sub>2</sub> با افزودن اتانول 70٪ با دمای اتاق پس از 5 روز.

9. شکارگر تغذیه نکرده (کنترل منفی) و ذخیره شده در دمای 20- درجه سلسیوس در اتانول 70٪ سرد شده در دمای 20- درجه سلسیوس.

نمونه‌ها پس از تثبیت، در دماهای مربوطه خود گذاشته شدند: تیمارهای 5 تا 8 در دمای اتاق، تیمارهای 1، 2، 4 و 9 در دمای 20- درجه سلسیوس و تیمار 3 در دمای 80- درجه سلسیوس. تمام نمونه‌ها 7 تا 8 روز پس از تغذیه پردازش شدند.

#### پروتکل تغذیه‌ای: مقدار و سن تخم شکار

تخم 1، 3، 5 روزه شکار، در گروه‌های حاوی 1، 3 یا 5 تخم در ظروف پتری قرار داده شدند (11-17 تکرار در هر تیمار). لارو *C. maculata*، پس از تغذیه، بلافاصله در دمای 20- درجه سلسیوس منجمد شد و بعد از آن به لوله‌های میکروسنتریفیوژ اتوکلاو شده 0/5 میلی‌لیتری با اتانول 70٪ منتقل شد. در این آزمایش، هیچ لاروی پس از تغذیه نگهداری نشد، به طوری که در تمام نمونه‌ها زمان پس از تغذیه صفر بود. سنجش‌های تخم‌های 1، 3 و 5 روزه در روزهای مختلف انجام شد، که مانع انجام مقایسه آماری سطوح تیمار سن تخم شد.

#### پروتکل تغذیه‌ای: اثر زمان شروع تغذیه و رژیم غذایی دنبال کرده

لارو سن چهارم انفرادی *C. maculata*، از یک تخم سه روزه *L. decemlineata* تغذیه کرد و پس از تغذیه، در زمان  $t = 0$  در دمای 20- درجه سلسیوس در اتانول 70٪ سرد شده در دمای 20- درجه سلسیوس ثابت شد، یا به مدت 1، 2، 4 یا 8 ساعت نگهداری شد و یکی از سه تیمار زیر روی این لارو انجام شد: گرسنگی داده شده (فقط فتیله آب)، به صورت آزادانه از شته‌های سیب زمینی بالغ بدون بال تغذیه کرده یا به صورت آزادانه از تخم‌های سایر گونه‌های خود تغذیه کند (تخم‌های با سن نامشخص از کلنی آزمایشگاهی *C. maculate* که در بالا شرح داده شده

است). مقادیر شته یا تخم کفشدوزک مصرف شده ثبت شدند و این رژیم‌های غذایی به طور مداوم دوباره جایگزین شدند. در شماره‌های اختصاص داده شده به ساعات پس از تغذیه، هر لارو شکارگر در دمای 20- درجه سلسیوس در اتانول 70٪ سرد شده در دمای 20- درجه سلسیوس کشته شد و تا زمان پردازش تا 7 تا 8 روز بعد نگهداری شدند.

### استخراج DNA

به جز برای تیمارهای تعیین شده در آزمایش‌های ذخیره‌سازی نمونه، تمام نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA، به صورت جداگانه در اتانول 70٪ در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری شدند. تحقیقات اولیه (مشاهدات منتشر نشده) هیچ تفاوت قابل توجهی را در قابلیت ردیابی DNA *L. decemlineata* در تمام عصاره‌های *C. maculate* در معده‌های تشریح شده نشان ندادند، بنابراین استخراج از کل لارو انجام شد. علاوه بر این، DNA از سه تخم جداگانه 1، 3 و 5 روزه *L. decemlineata* استخراج شد و به منظور فراهم کردن داده‌های سه مجموعه منحنی استاندارد، DNA هر گروه از سه گروه تخم *L. decemlineata* به صورت جداگانه در 1x TE به غلظت‌های 0/5، 0/33، 0/1، 0/05، 0/01، 0/005 و 0/002 تخم رقیق شدند. در نهایت DNA یک تخم سه روزه اضافه به منظور استفاده به عنوان کنترل مثبت استخراج شد.

استخراج با استفاده از کیت استخراج بافت DNeasy® (QIAGEN Inc., catalog no. 69506) و با استفاده از [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) و با توجه به دستورالعمل‌های محصول انجام شد. نمونه‌ها در بافر ATL با استفاده از پستل‌های اتوکلاو شده له شدند و با پروتئیناز K به مدت 3 ساعت انکوبه شدند. محصول نهایی dsDNA از هر استخراج، با استفاده از نسبت جذب 260/280 نانومتر (BioPhotometer, Eppendorf, [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)) اندازه گیری شد. مقادیر DNA لارو شکارگر 30-228 میکروگرم/میلی‌لیتر و برای هر تخم *L. decemlineata* 6-31 میکروگرم/میلی‌لیتر بود. تمام مواد استخراج شده در دمای 20- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

### تکثیر DNA و سنجش کمی



در هر پلیت، کنترل‌ها شامل سه چاهک از لارو تغذیه نکرده *C. maculata*، سه چاهک از کنترل‌های بدون الگو و 8 کنترل تخم *L. decemlineata* بودند که عملکرد واکنش را در بین پلیت‌ها مقایسه می‌کردند. در هر آزمون سن/مقدار شکار، یک سری از سه منحنی استاندارد برای یک تخم با سن مشخص، در کنار نمونه‌های ناشناخته اجرا شد. منحنی‌های استاندارد تخم سه روزه *L. decemlineata* برای آزمایش‌های chaser و ذخیره‌سازی استفاده شد. توالی‌های پرایمر (رفت: 3'-CCTTTTCTCTTGGGCAGTTAT-5' برگشت: 5'-TTATCCCAAATCCAGGTAGAAT-3') برای تکثیر یک ناحیه 214 جفت بازی از ژن میتوکندریایی COI از *L. decemlineata* استفاده شد (Greenstone et al. 2007). واکنش (حجم کل 25 میکرولیتر) شامل 12/5 میکرولیتر شامل مستر میکس 2X Brilliant® SYER Green qPCR (Stratagene, )، 0/375 میکرولیتر ROX dye 30 نانومول (به عنوان رنگ مرجع)، 300 نانومول از هر کدام از پرایمرها، 1 میکرولیتر از DNA الگو و 9/125 میکرولیتر از آب مولکولی (SigmaAldrich, )، 1 میکرولیتر از MX3000P™ qPCR (www.sigmaaldrich.com) بود. نمونه‌های استخراج شده با استفاده از یک سیستم (Stratagene) تحت شرایط زیر تکثیر شدند: 95 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه، 50 چرخه 95 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه، 54 درجه سلسیوس به مدت 1 دقیقه و 72 درجه سلسیوس به مدت 1 دقیقه. فلوروسانس در طول موج 492 نانومتر در طول مرحله اتصال هر کدام از چرخه‌ها ثبت شد. برای اطمینان از تکثیر فقط محصول مورد نیاز، از طریق گرما دادن نمونه به 95 درجه سلسیوس به مدت 1 دقیقه و پس از آن کاهش دما به 55 درجه سلسیوس و افزایش آن به صورت 0/2 درجه سلسیوسی تا 95 درجه سلسیوس، یک منحنی تفکیک برای هر واکنش ایجاد شد و به دنبال آن، به طور مدام بر فلوروسانس نظارت شد. محصول PCR این واکنش در دمای 74/15 درجه سلسیوس جدا شد.

### تجزیه و تحلیل داده ها

برای بردن dRn (baseline-corrected normalized fluorescence) درست بالای فلورورانس پس زمینه که در دامنه‌ی 0/01 تا 0/05 است، آستانه فلوروسانس به صورت دستی تنظیم شد. برای هر نمونه، چرخه ایجاد شده که

در آن فلورسانس می‌تواند بالاتر از پیش‌زمینه (Ct) مشاهده شود، به یک صفحه گسترده فرستاده شد. واکنش‌هایی که 50 چرخه تکثیر انجام نمی‌دهند، به عنوان ردیابی نشده در نظر گرفته شدند. تنوع پاسخ بین پلیت‌ها، برای گرفتن مقدار میانگین برای 24 کنترل مثبت، مقادیر Ct برای تیمارهای تخم 1، 3 و 5 روزه کنترل شد و به ترتیب، توسط 0/96-، 0/16 و 0/79 واحد استاندارد شد. یک منحنی استاندارد برای سه مجموعه از غلظت‌های تخم شناخته‌شده *L. decemlineata* برای هر رده سنی تخم ایجاد شد و معنی‌داری آن با ANOVA (SAS Institute 1998) تعیین شد. چندجمله‌ای‌های با مرتبه بالاتر برای معنی‌داری مورد آزمایش قرار گرفتند. رگرسیون خطی به دست آمده برای تعیین ردیابی‌های معادل تخم ناشناخته، مربوط به مقادیر CT گزار شده، مورد استفاده قرار گرفت.

اثر تیمارهای تثبیت‌کننده، با استفاده از این سه معیار مقایسه شدند: چند نمونه، DNA هدف قابل ردیابی داشت (در 50 چرخه). چند تخم شکار معادل تشخیص داده شد. و چه مقدار DNA کل (شکارگر به علاوه شکار) در نمونه (میکروگرم / میلی لیتر) موجود بود. آزمون‌های کلی برای اثر تیمار در میان هفت پروتکل تثبیت‌کننده، با استفاده از آزمون  $\chi^2$  برای درصد ردیابی شده و آزمون آماری Kruskal-Wallis H برای مهال تخم‌ها و DNA کل انجام شد (SAS Institute 1998). پس از آن، مقایسه ارتوگونال ناپارامتری درجه آزادی منفرد برنامه‌ریزی شده با آزمون دقیق فیشر برای درصد تشخیص و با آزمون Mann-Whitney U برای معاد تخم‌ها و DNA کل (SAS Institute 1998)، بای تشخیص تفاوت‌های بین تیمارهای انفرادی و مجموعه‌های گروه‌بندی شده به صورت لجستیکی و کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شد. برای نمونه‌ای که در آن *L. decemlineata* تشخیص داده نشد، مقادیر بین صفر و تخمین آستانه‌ی تشخیص، به هدف مقایسه‌ی آماری به صورت تصادفی انتخاب شدند. این آستانه تشخیص با  $Ct = 42$ ، حداقل تعداد کل چرخه‌ها که در آن‌ها هیچ DNA هدفی برای مجموعه داده‌های آزمون تثبیت‌کننده مشاهده نشده بود، مطابقت داشت.

اثر زمان سپری شده با سه تیمار رژیم غذایی chaser، با استفاده از مدلسازی کوواریانس غیر خطی (SAS PROC NL MIXED, SAS-STAT v9.1, SAS Institute 2003; Milliken and Johnson 2002) مورد

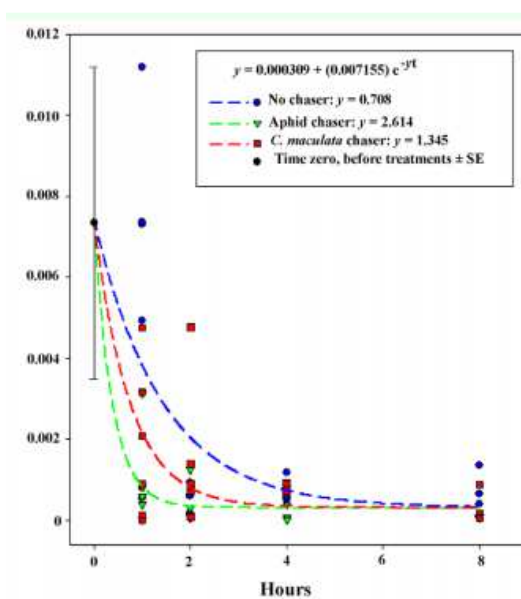
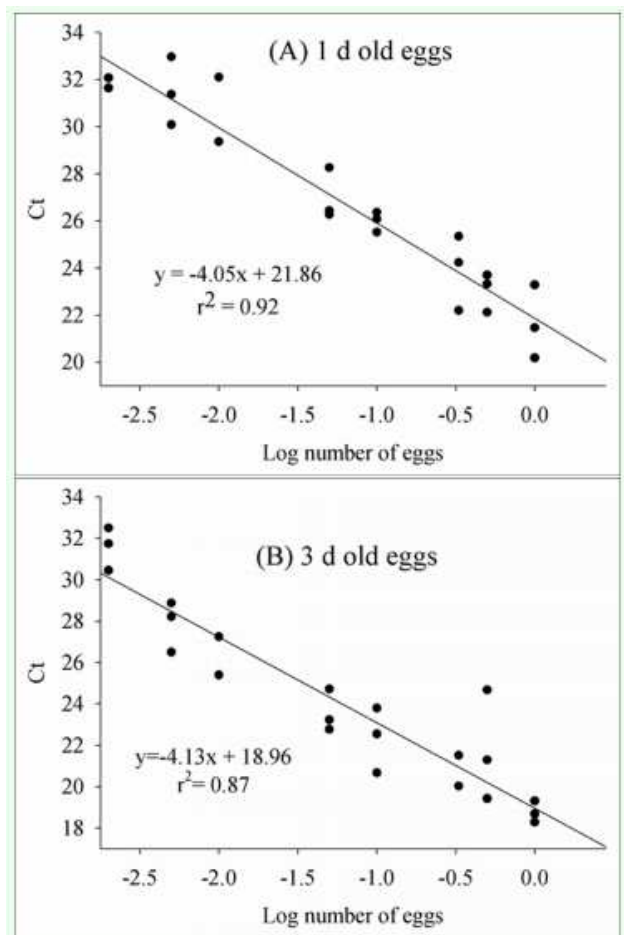
آزمایش قرار گرفت. یک مدل نمایی منفی سه پارامتری با استفاده از داده‌های معمول (pre-chaser) در  $t = 0$  و داده‌های خاص تیمار برای زمان سپری شده پس از تغذیه‌ای، به منحنی‌ها برازش شد. در ابتدا، مدل کامل با هر سه پارامتر در معادله‌ی  $y = \alpha + \beta e^{-\gamma t}$  به طور جداگانه برای سه تیمار دنبال‌کننده به کار برده شد. در این مدل سه پارامتری،  $\alpha$  حداقل مجانبی به صورت  $t \rightarrow \infty$  است،  $\beta$  تعیین‌کننده مقدار اولیه در  $t = 0$  است،  $\gamma$  توانی است که سرعت تخریب را مدل‌سازی می‌کند. پس از آن، در زمانی که پارامترها بین تیمارها اختلاف معنی‌دار نداشتند، مدل با استفاده از SAS PROC NLMIXED (SAS Institute 2003) ساده شد. تاثیر مصرف مشاهده شده‌ی رژیم غذایی دینا کننده (شته یا تخم *C. maculate*) بر معادله‌های تخم ردیابی شده با استفاده از ANOVA (SAS Institute 1998)، بین تیمارهای دنبال‌کننده و زمان سپری شده مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج

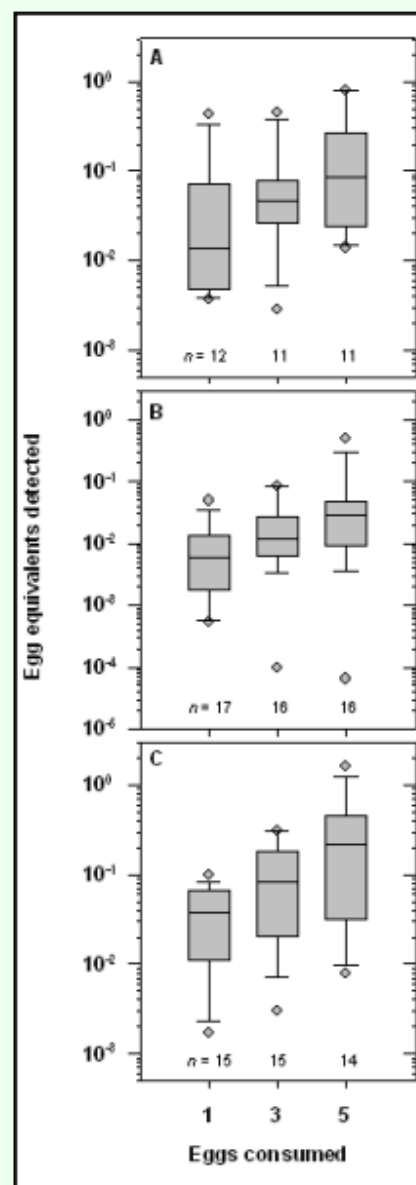
### اثر تعداد تخم بر مقدار توالی هدف

برای تمام سه سن تخم، لگاریتم تعداد تخم مصرف شده تاثیر بسیار معنی‌داری بر مقادیر CT داشت. منحنی‌های استاندارد جداگانه‌ی بین رده‌های سنی در شکل 1 نشان داده شده است. هر سه آن‌ها، رگرسیون خطی معنی‌دار ( $p < 0.0001$ ) تولید کردند. with no significant higher-order term. این منحنی‌ها برای تعیین تعداد تخم ردیابی شده در نمونه‌های آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت. تمام 127 آزمایش در  $t=0$  موفق بودند، با این حال، مقادیر ردیابی شده بسیار کمتر از مقادیر بازیابی شده از یک تخم دست‌نخورده‌ی شکار بود و همچنین تنوع را در مقدار (معادله‌های تخم) ردیابی شده در  $t=0$  نشان داد. تعداد تخم‌ای خورده شده تاثیر معنی‌داری بر مقدار توالی ردیابی شده‌ی DNA ( $F_{1,1251} = 18.74$ ;  $p < 0.0001$ )، برای  $\log(x + I)$  معادله‌های تخم تبدیل شده) هدف داشتند (شکل 2). نسبت معادله‌های تخم ردیابی شده (معادله‌های تخم ردیابی شده با تخم‌های خورده شده جدا شدند)، با تعداد تخم‌های خورده شده در هر رده سنی تخم تفاوت نداشت ( $p = 0.56$ ،  $F_{1,321} = 0.29$ ؛  $p = 0.59$ ،  $F_{1,421} = 1.65$ ؛  $p = 0.21$ ،  $F_{1,47} = 0.35$ )، به ترتیب برای تخم‌های 1، 3 و 5 روزه، که نشان می‌دهد که کمی-سازی، متناسب با تخم‌های تغذیه شده برای سن برابر تخم است. نسبت معادله‌های تخم ردیابی شده، با طول دوره

تغذیه شکارگر تفاوتی نکرد ( $p = 0.56$ ,  $F_{1,321} = 0.36$ ;  $p = 0.45$ ,  $F_{1,471} = 0.59$ ;  $p = 0.30$ ,  $F_{1,421} = 1.08$ )  
 به ترتیب برای تخم‌های 1، 3 و 5 روزه.



شکل 1



شکل 2

### اثر تثبیت‌کننده در قابلیت تشخیص توالی هدف، مقدار و DNA کل

پروتکل تثبیت‌کننده، چگونگی تیمار یک نمونه در زمان  $t=0$  پس از اتمام تغذیه شکارگر، تاثیر بسیار معنی‌داری بر درصد ردیابی، معادل‌های تخم ردیابی شده و DNA کل (شکرگر و شکار) موجود در نمونه دارد (جدول 1). بر اساس یک میانگین تکرار  $n=10\pm1$ ، دامنه تشخیص بین 100٪ تا 0٪ بود. بیشترین مقدار DNA هدف ردیابی-

شده‌ی موجود در تخم دست‌نخورده (کنترل مثبت، تیمار 1) در شکارگرها، برای بیشترین بازیابی یعنی تیمار اتانول 20- درجه سلسیوس به میزان 22/8٪ بود (تیمار 2). DNA کد در شکارگرهای تغذیه کرده (تیمار 2) به طور معنی‌داری بیشتر از مقدار یافت شده در کنترل‌های تغذیه نکرده بود (تیمار 9) و حتی DNA کل تخم دست‌نخورده (مانند آنچه برای تیمار 1 اندازه‌گیری شده بود) کمتر از 10٪ DNA کل ردیابی شده در شکارگرهای تغذیه کرده بود (تیمار 2). فراوانی ردیابی در شکارگرهای کشته شده به صورت خشک و گرم، با CO<sub>2</sub>، که 4 ساعت یا 5 روز در دمای اتاق نگهداری شده بودند (به ترتیب تیمار 7 و 8)، مشابه فراوانی آن در کنترل‌های تغذیه نکرده بود (تیمار 9). مقایسه‌ی ارتوگونال ناپارامتری با یک درجه آزادی برای بررسی تفاوت‌های بین گروه‌های منطقی و تیمارهای انفرادی، مورد استفاده قرار گرفت. همانطور که توسط سه معیار اندازه‌گیری شده بود، نمونه‌های منجمد شده به عنوان یک گروه، به طور معنی‌دار بهتر از نمونه‌های نگهداری شده در دمای اتاق (22 درجه سلسیوس) حفظ شدند. بین سه تیمار منجمد شده، انجماد نمونه با اتانول (20- درجه سلسیوس)، به طور معنی‌داری منجر به ردیابی معادل‌های تخم بالاتر شد (میانگین بیشتر از 5 برابر نمونه‌های منجمد شده به صورت خشک). با این حال، منجمد کردن با اتانول، باعث ردیابی بیشتر فراوانی یا DNA کل که برای کل گروه تیمارهای منجمد شده بالا بود، نشد. با مقایسه‌ی انجماد خشک در دمای 20- درجه سلسیوس و در دمای 80- درجه سلسیوس، تفاوت معنی‌داری در هر کدام از اندازه‌گیری‌ها مشاهده نشد. در تیمارهای دمای اتاق، حلال‌ها (اتانول و ضدیخ)، درصد ردیابی و معادل‌های تخم ردیابی شده را به طور معنی‌دار افزایش دادند، اما DNA کل بیشتری را نشان ندادند. آزمایش تیمارهای حاوی حلال در دمای اتاق در جزئیات بیشتر، نشان داد که در صورتی که اتانول و ضدیخ در فراوانی ردیابی تفاوتی ندارند، تیمار ضدیخ، DNA کل را به طور معنی‌دار کاهش می‌دهد. در شکارگرهای کشته شده در خشکی و دمای بالا به مدت 4 ساعت یا 5 روز، فراوانی و مقدار ردیابی، کم تا حد صفر بود و همچنین یک کاهش معنی‌دار در DNA کل در نمونه‌های نگهداری شده به مدت 5 روز در مقایسه با 4 ساعت مشاهده شد.

trt.no.	Treatment	n	% detect	egg equivalent $\pm$ se	total DNA <sup>b</sup> (pred+prey) $\pm$ se
1	Egg positive control (frozen in EtOH)	10	100%	1.0000 $\pm$ 0.1233	1.72 $\pm$ 0.14
2	Freeze EtOH	9 (11) <sup>a</sup>	100%	0.2284 $\pm$ 0.0571	21.63 $\pm$ 1.81
3	Freeze -80°C	11 (12)	100%	0.0604 $\pm$ 0.0207	21.03 $\pm$ 2.08
4	Freeze -20°C	10	90%	0.0279 $\pm$ 0.0051	17.44 $\pm$ 1.64
5	Room temp EtOH	10	80%	0.0078 $\pm$ 0.0015	16.08 $\pm$ 1.55
6	Antifreeze	10	90%	0.0071 $\pm$ 0.0013	6.43 $\pm$ 3.61
7	CO <sub>2</sub> 4h	9	22%	0.0012 $\pm$ 0.0009	19.08 $\pm$ 1.41
8	CO <sub>2</sub> 5d	10	0%	0 $\pm$ 0	9.73 $\pm$ 1.60
9	Unfed control (frozen in EtOH)	10	0%	0 $\pm$ 0	16.04 $\pm$ 1.58
<b>TEST (treatment numbers compared)</b>			<b>% detect<sup>c</sup></b>	<b>egg equivalent<sup>d</sup></b>	<b>total DNA<sup>d</sup></b>
Overall significance of treatment (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)			$p < 0.0001$ ( $\chi^2(6) = 46.80$ )	$p < 0.0001$ (H(6) = 51.63)	$p < 0.0001$ (H(6) = 39.02)
Orthogonal contrasts:					
Contrast: frozen (2, 3, 4) vs. warm (5, 6, 7, 8)			$p < 0.0001$ (n=70)	$p < 0.0001$ (U=1129.5)	$p < 0.0001$ (U=1024.5)
Contrast within frozen: solvent (2) vs. dry (3, 4)			ns	$p = 0.0058$ (U=155.5)	ns
Contrast within warm: solvent (5, 6) vs. dry (7, 8)			$p < 0.0001$ (n=40)	$p < 0.0001$ (U=331)	ns
Contrast within frozen dry: -80°C (3) vs. -20°C (4)			ns	ns	ns
Contrast within warm solvent: EtOH (5) vs. Antifreeze (6)			ns	ns	$p = 0.0005$ (U=96)
Contrast within warm dry (CO <sub>2</sub> ): 4h (7) vs. 5d (8)			ns	ns	$p = 0.0015$ (U=84)
Contrasts with controls:					
Contrast within frozen solvent: fed (2) vs. egg control (1)			ns	$p = 0.0003$ (U=89)	---
Contrast within frozen solvent: fed (2) vs. unfed control (9)			---	---	$p = 0.0166$ (U=89)
Contrast warm dry (7, 8) vs. unfed control (9)			ns	ns	ns

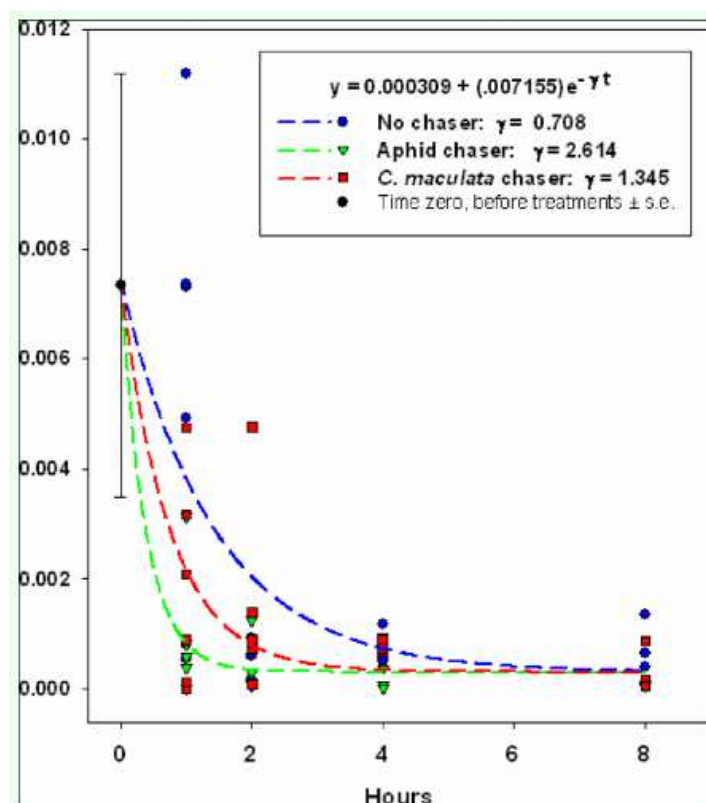
<sup>a</sup>Number in parentheses is n for total DNA determination, if different from n for qPCR replication.

<sup>b</sup>Units are  $\mu$ g/ml.

<sup>c</sup>Overall significance tested with  $\chi^2$  test; contrasts with Fisher's exact test (overall n given where significant).

<sup>d</sup>Overall significance tested with Kruskal-Wallis H-test; contrasts with Mann-Whitney U-test.

## جدول 1



## شكل 3

با ترکیب دمای سرد و حلال، پروتکل ثابت‌کننده‌ای که بهتر از بقیه DNA هدف را حفظ می‌کند، پروتکل نگهداری با اتانول در دمای 20- درجه سلسیوس بود. شکارگرهای نگهداری شده در اتانول 20- درجه سلسیوس به سرعت کشته شدند، در کمتر از 1 ثانیه، سخت و بی‌حرکت شدند. اگرچه به طور متوسط تقریباً کمتر از یک چهارم از DNA هدف هضم شده، در این شکارگرها بازیابی شد، سه برابر بهتر از تیمار انجماد خشک در دمای 80- درجه سلسیوس بود.

### تاثیر رژیم دنبال‌کرده و زمان شروع تغذیه بر مقدار توالی DNA هدف

معادله نمایی منفی سه پارامتری، به طور قابل توجهی تاثیر زمان بر مقدار باقیمانده‌ی DNA هدف را محاسبه کرد و رژیم غذایی دنبال‌کننده تاثیر معنی‌داری بر مقدار DNA هدف در طول زمان داشت (شکل 3). به طور غیرمنتظره، به دلیل مقدار پایین در حد صفر در  $t=8$  h و در کنترل‌های  $t=0$  pre-chaser، پارامترهای  $a=0.000309$  و  $p=0.007155$ ، با تیمار دنبال‌کننده تفاوتی نداشت (شکل 3). پارامتر نمایی  $Y$ ، که سرعت کاهش را در طول زمان نشان می‌دهد، بین تیمارهای دنبال‌کننده به طور معنی‌داری متفاوت بود ( $F_{1,66}=19.04$ ,  $p<0.0001$ ، کلی)، به طوری که سطح توالی DNA هدف در طول زمان در شکارگرهای گرسنه بالاتر از شکارگرهای تغذیه کرده از شته بود ( $F_{1,66}=37.07$ ,  $p<0.0001$ ، مقایسه‌ای). شکارگرها با رژیم غذایی تخم *C. maculata*، به طور معنی‌داری متفاوت از هر یک از تیمارهای دیگر نبودند ( $p>0.17$ ). نیمه عمر، که انتظار می‌رود که پس از آن نصف مقدار موجود در  $t=0$  هضم شود، به صورت  $t=-\ln(0.5)/\gamma$  محاسبه شد. بنابراین با استفاده از مقدار  $y$  (شکل 3)، نیمه-عمرهای تخمین زده برای مقدار توالی *L. decemlineata* بدین صورت بود: 59 دقیقه برای شکارگر گرسنه، 16 دقیقه برای شکارگر تغذیه کرده از شته و 31 دقیقه برای لارو شکارگر تغذیه کرده از *C. maculate*. تمام شکارگرهای تغذیه کرده از رژیم غذایی دنبال‌کرده، حداقل از چند شته یا تخم *C. maculate* تغذیه کردند (برای 8 ساعت،  $7.30 \pm 1.92$  شته یا  $25.1 \pm 16.5$  تخم)، اما تغذیه از رژیم دنبال‌کرده، تاثیر معنی‌داری بر تیمارها و رده‌های زمان سپری‌شده نداشت (در تمام 8 مورد،  $p>0.11$ ).

بحث



تضعیف سیگنال DNA ردیابی شده توسط qPCR در حین مصرف سریع، قابل توجه و متغیر بود، اما مقدار نهایی ردیابی شده، با مقدار شکار خورده شده مرتبط بود. این کاهش در DNA قابل ردیابی، طی چند دقیقه تغذیه لارو شکارگر از تخم‌های 1، 3 و 5 روزهی *L. decemlineata* اتفاق افتاد. با استفاده از تکنیک اولیه حفاظت یعنی انجماد خشک در دمای 20- درجه سلسیوس، دامنه 0/00128-43/60٪ از DNA هضم شده قابل ردیابی بود که نشان‌دهندهی 2/29 تا 78.125 برابری تضعیف سیگنال بود. تخریب سریع DNA هدف حتی قبل از  $t=0$  پس از تغذیه نیز توسط Nejstgaard و همکاران (2008) در copepod ها مشاهده شد، که در آن بازایی qPCR جلبک تک سلولی مصرف شده در  $t=0$ ، با کنترل‌های مثبت qPCR مقایسه شد (ارگانسیم شکار دست نخورده، مانند مطالعه ما) و همچنین از فلوروسانس کلروفیل و میکروسکوپی استفاده شد. مقدار بازایی شده در  $t=0$ ، به طور موافق کمتر از مقدار مورد انتظار بود، که تخمین‌ها از 2 تا 32٪ با استفاده از خوانش فلورسانس و از 11 تا 20٪ در روش کلاسیک میکروسکوپی بود. Nejstgaard و همکاران (2008) سه منبع ممکن از این کاهش شدید در سیگنال را مورد بررسی قرار دادند: مهار توسط DNA شکارگر، منجمد کردن پس از تیمار، ذوب شدن و منجمد شدن (بخشی از پروتکل پس از تغذیه‌ای آن‌ها)، هضم سریع توسط copepod ها. نتیجه‌گیری آن‌ها این بود که تداخل DNA شکارگر، حداقل در سبت کمتر از 10.000:1 DNA شکارگر: شکار بی اهمیت بود. در سیستم ما، نسبت DNA شکارگر: شکار، کمتر از 30:1 تخمین زده شد و این نگرانی که ممکن است بازدارندگی اتفاق بیفتد (Juen and Traugott 2006)، در مورد مطالعه ما قابل اغماض بود.

هضم در کفشدوزک‌های آزمایش شده، ظاهراً حتی در یک وعده غذایی، بسیار سریع است. دستگاه گوارش شکارگر، شکار را تخریب کرده، اما به طور معمول در سایر مطالعات (Zhang et al. 2007; Nejstgaard et al. 2008)، مقدار شته ردیابی شده در  $t=0$  منعکس‌کنندهی مقدار شته خورده شده است. سرعت تخریب هدف در کفشدوزک‌ها و چند شکارگر دیگر از سخت‌بالپوشان مورد بررسی، نشان می‌دهد که ردیابی مثبت مقدار شته با استفاده از PCR قدیمی و qPCR، می‌تواند به آسانی بر اساس الگوی رژیم غذایی جمعیت شکارگر تغییر کند، به صورتی که نمونه-برداری در زمان‌های مختلف روز، منجر به برآوردهای متفاوتی از شکارگری می‌شود. الگوی نمایی تخریب مقدار

DNA شکار هدف ردیابی شده توسط qPCR در معده شکارگرها پس از هضم، مطابق با ناپدید شدن نسبت ثابتی از هدف مورد نظر در واحد زمان است. تخریب نمایی همچنین در بسیاری از موارد در ردیابی کمی آنتی ژن با استفاده از ELISA مشاهده شده است (Lovei et al. 1985; Sopp and Sunderland 1989). در مورد PCR معمولی، نرخ تخریب DNA مورد نظر در دسترس نیست، زیرا داده‌ها فقط حضور/عدم حضور را بیان می‌کنند. مدل‌های لجستیک می‌تواند برای تعیین کاهش قابلیت ردیابی، از جمله نیمه‌عمر قابلیت ردیابی مورد استفاده قرار گیرد (Chen et al. 2000 and Greenstone and Hunt 1993 and Sunderland 1996) برای آنتی‌بادی، (Greenstone et al. 2007 برای PCR).

نشان داده شده است که رژیم غذایی شکارگر پس از هضم شکار مورد نظر، بر ردیابی نشانگر شکار مورد نظر به روش ایمنی‌سنجی تاثیر می‌گذارد (Symondson and Liddell 1995, Fournier et al 2006)، اما در پژوهش‌های چاپ شده که از PCR معمولی استفاده کرده‌اند، مشاهده نشده است، بنابراین نتایج ما با استفاده از qPCR، هرچند جدید بوده، دور از انتظار نیست. هم شکار دنبال کرده (Hagler and Naranjo 1997; Symondson ) و هم گرسنگی (Hagler 1998; et al. 1999; Greenstone et al. 2007; Harwood et al. 2007) به طور معمول در پژوهش‌هایی برای تعیین نرخ ناپدید شدن نشانگر شکار مورد نظر مورد استفاده قرار می‌گیرند. Hed و همکاران (1991) دریافتند که یک رژیم غذایی دنبال‌کننده از شته‌ها به جای سیب برای کفشدوزک *Hippodamia convergens*، بر نسبت حمل قارچ پاتوژن *Discula destructive* (dogwood anthracnose) و آزادسازی اسپورهای زنده در مدفوع آن‌ها تاثیر می‌گذارد.

آزمایش‌های ما در مورد چندین پروتکل تثبیت‌کننده که به طور گسترده استفاده می‌شوند، نشان می‌دهد که نتایج qPCR به شدت به روش تثبیت و حفظ نمونه حساس است. بیش از 99 درصد از DNA، به راحتی از طریق روش‌های استفاده شده، مانند قرار دادن نمونه‌ها در اتانول گرم، خشک کردن سرد یا انجماد در دماهای نامشخص از بین می‌رود. به نظر می‌رسد که تمام این شیوه‌ها باعث ادامه یافتن فرآیندهای تخریبی هضم شکار با سرعت شگفت‌آور

می‌شود. همچنین مشاهده شد که هر دو روش انجماد خشک و استفاده از اتانول در دمای اتاق ممکن است منجر به نارسایی شود: که به عنوان مثال، در 32 نمونه از 120 نمونه از شکارگرهای منجمد شده‌ی خشک در دمای 20- درجه سلسیوس اتفاق افتاد. این نتایج، استفاده از اتانول 70٪ سرد شده در دمای 20- درجه سلسیوس را به عنوان تثبیت‌کننده/نگهدارنده انتخابی پیشنهاد می‌کند. با این‌حال، حتی دماهای پایین‌تر و محلول‌های احتمالا متفاوت، ممکن است سطح تشخیص را در تجزیه و تحلیل‌های محتوی معدی ژنتیکی بهبود بخشد. به عنوان مثال، حفظ بافت‌ها برای پژوهش‌های پزشکی و فیزیولوژیکی معمولا، به صورت انجماد شوک یا ناگهانی در ایزوپروپانول انجام می‌شود که یا از طریق تعلیق در نیتروژن مایع یا از طریق افزودن یخ خشک انجام می‌شود (Mager et al. 2007). برای استفاده PCR کمی در مطالعه پویایی شکارگری، نیازمند کالیبراسیون از جمله برآورد بسیاری از عوامل تعاملی است. اولین چالش، به حداقل رساندن تغییرات غیر ضروری و تعصب در جمع‌آوری داده‌ها می باشد، مانند موارد ناشی از نمونه‌برداری غیر عاقلانه (Harwood and Obrycki 2005) یا تثبیت نمونه‌ها کمتر از مقدار بهینه. چالش پیچیده‌تر، استفاده از آزمایش‌ها و مشاهدات اکولوژیکی برای برآورد مفید فاکتورهای مهم مانند رژیم غذایی پیش و پس از تغذیه، دما و غیره و ایجاد مدل‌های مناسب برای تکمیل این فاکتورها است، به طوری که نتایج، پاسخ‌های مربوط به فرآیندهای شکارگری اتفاق افتاده در مزرعه را فراهم کنند.