

مقایسه روش‌های HRM و DGGE جهت بررسی ترکیب جوامع

باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف

قباد جلالی¹، امیر لکزیان، علیرضا آستارایی و محبوبه مظهري

استادیار گروه علوم خاک - دانشگاه جیرفت؛ gh.jalali@ujiroft.ac.ir

استاد گروه علوم خاک - دانشگاه فردوسی مشهد؛ lakzian@um.ac.ir

دانشیار گروه علوم خاک - دانشگاه فردوسی مشهد؛ astaraei@um.ac.ir

استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج؛ mahboobeh.mazhari@kia.ac.ir

دریافت: 1400/1/24 و پذیرش: 1400/10/29

چکیده

تغییر کاربری اراضی یکی از مهمترین فاکتورهایی است که جوامع ریزجانداران خاک را تحت تأثیر قرار داده که نقش محوری در اکثر فرایندهای بیوژئوشیمیایی و اکولوژیکی ایفا می‌کنند. به منظور بررسی تأثیر تغییر کاربری اراضی (از مراتع بوته‌زار به کشاورزی) روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک، مطالعه‌ای با استفاده از آنالیز تفکیک‌پذیری بالای ذوب (HRM) و روش ژل الکتروفورز با شیب واسرشت‌ساز (DGGE) در سه کاربری اراضی باغی، زراعی و مرتع بوته‌زار در دشت جیرفت انجام شد. برای آنالیز HRM از نرم‌افزار جانبی دستگاه Real-time PCR که مجهز به این تکنیک است، استفاده شد. DGGE با استفاده از سیستم جهانی تشخیص جهش انجام شد. نتایج تکنیک HRM و همچنین نتایج رج‌بندی با استفاده از روش مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک (NMDS) و بر پایه حضور یا عدم حضور باندهای DGGE در نمونه‌های خاک نشان دادند که تغییر کاربری اراضی از مراتع بوته‌زار به کشاورزی (باغ و زراعی) سبب تغییر معنی‌دار در ترکیب جوامع باکتریایی خاک شده است. همچنین با توجه به نتایج هر دو روش، ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی کشاورزی (باغ و زراعی) نسبت به کاربری مرتع بوته‌زار دارای شباهت بیشتری بود. از آنجایی که آنالیز HRM در مقایسه با تکنیک DGGE کم هزینه‌تر، راحت‌تر و دارای انحراف کمتر می‌باشد، جهت مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین نمونه‌های مختلف پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: DNA ژنومی خاک، 16S rDNA باکتریایی خاک، Real-time PCR، مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک (NMDS)

¹ نویسنده مسئول، آدرس: جیرفت، دانشگاه جیرفت، گروه علوم خاک

مقدمه

متفاوت بر اساس تحرک الکتروفوریتیک بخشی از مولکول ذوب شده DNA تفکیک می‌شوند. تفاوت‌ها در توالی بازها، تفاوت‌های موجود در ویژگی‌های ذوب را کنترل می‌کند. بنابراین، هریک از باندها در ژل DGGE شکل‌های متفاوتی از یک ژن مشخص را نشان می‌دهند، که این ممکن است ناشی از اختلاف خیلی جزئی درون توالی باشد (مویزر و همکاران، 1993).

نتایج پژوهش‌های زیادی نشان داده است که آنالیز مولکولی با استفاده از تجزیه و تحلیل DGGE از تکثیر قطعات 16S rDNA یک ابزار قدرتمند در مطالعه تنوع باکتریایی در محیط‌های پیچیده مانند خاک است (اسمیت و همکاران، 2001؛ لانگ و همکاران، 2010). با وجود محدودیت‌های این روش، نتایج نشان می‌دهد که PCR-DGGE روش قابل اعتماد برای بررسی تفاوت‌ها و شباهت‌ها در ساختار جوامع ریزجانداران است. در نتیجه این روش به‌طور گسترده برای تجزیه و تحلیل ساختار و ترکیب جوامع ریزجانداران خاک استفاده شده است (دی لپیتای و همکاران، 2004).

یکی دیگر از روش‌های متازنومیک، روش‌های مبتنی بر Real-time PCR می‌باشند. پژوهش‌گران بسیاری از تکنیک Real-time PCR برای کمی‌سنجی باکتری‌های خاک و ژن‌های مرتبط با کارکردهای آن‌ها استفاده نموده‌اند (کوب و همکاران، 2003؛ فوتی و همکاران، 2007؛ احمد سلیمان و همکاران، 2017). فیروز و همکاران (2005) که با استفاده از Real-time PCR فراوانی نسبی گروه‌های تاکسونومیک اصلی باکتری‌ها را در خاک بررسی کردند، بیان داشتند که این تکنیک درک جامع و ارزیابی دقیقی از ترکیب جوامع باکتریایی خاک فراهم می‌کند. یکی از روش‌های مبتنی بر Real-time PCR که می‌تواند برای بررسی ترکیب و ساختار ریزجانداران خاک استفاده شود، روش آنالیز تفکیک‌پذیری بالای ذوب⁸ (HRM) می‌باشد. این روش به‌عنوان یکی از قویترین روش‌های

اخیراً روش‌های متازنومیک¹ مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز² (PCR)، به‌طور فزاینده‌ای برای مطالعه جوامع ریزجانداران خاک استفاده شده‌اند (کنت و تریپلت، 2002). این روش‌ها بر پایه اسیدهای نوکلئیکی هستند که مستقیماً از اکوسیستم‌های پیچیده‌ای از قبیل خاک جدا می‌شوند. در این روش‌ها DNA کل ریزجانداران به‌طور مستقیم از نمونه‌های زیست محیطی استخراج شده و ارزیابی‌های ژنتیکی بر روی آن به انجام می‌رسد. اطلاعات حاصله از این روش‌ها تصویر بسیار دقیق‌تری از ترکیب و نقش ریزجانداران به ما نشان می‌دهد که امکان گرفتن چنین اطلاعاتی با روش‌های قدیمی کشت ریزجانداران دور از ذهن بود (طباطبایی و پورمظاهری، 1391).

یکی از روش‌های متازنومیک مبتنی بر PCR که برای بررسی ساختار جوامع ریزجانداران از جمله باکتری‌های خاک به‌کار می‌رود، روش ژل الکتروفورز با شیب واسرشت‌ساز³ (DGGE) است. مویزر و همکاران (1993) DGGE را برای تخمین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ریزجانداران پیچیده تشریح کردند. به‌طور مثال در این روش قطعات ژن 16SrDNA (پروکاریوت‌ها⁴) یا قطعات ژن 18S rDNA (یوکاریوت‌ها⁵) در ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید که دارای شیب افزایشی از غلظت ماده واسرشت‌کننده (اوره⁶ و فرمامید⁷) است، مورد الکتروفورز قرار می‌گیرند. همچنین اگر ژن‌های خاص، از قبیل ژن‌های کد کننده فرایندهای متابولیکی متفاوت، در آنالیزهای DGGE استفاده شوند، می‌توان اطلاعاتی در مورد فراوانی انواع مختلف موجودات زنده که در یک جمعیت شامل این ژن‌ها هستند، به‌دست آورد (ناکاتسو، 2007). در این روش قطعه‌هایی از DNA با اندازه یکسان ولی توالی بازی

1. Metagenomics

2. Polymerase chain reaction (PCR)

3. Denaturing gradient gel electrophoresis

4. Prokaryotes

5. Eucaryotes

6. Urea

7. Formamide

⁸ High Resolution Melting (HRM) analysis

همکاران، 2010). همچنین شواهد تحقیقاتی نشان داده‌اند، فعالیت‌های کشاورزی مانند تاثیر کاربردهای طولانی مدت کودهای آلی و غیرآلی (هو و همکاران، 2017) و اثرات بلند مدت روش‌های مدیریتی (مانند شخم، تناوب زراعی و مدیریت بقایای گیاهی) (گوارتث و همکاران، 2007) ترکیب جوامع باکتریایی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. لذا با فرض اینکه کاربری اراضی روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک تأثیرگذار می‌باشد، این پژوهش با هدف مقایسه تکنیک‌های HRM و PCR-DGGE جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک متأثر از تغییر کاربری اراضی (در 50 سال اخیر از مراتع بوته‌زار به کشاورزی) در منطقه خشک و نیمه خشک دشت جیرفت انجام شد.

مواد و روش‌ها

معرفی منطقه مورد مطالعه

منطقه مورد مطالعه در دشت جیرفت (650 متر ارتفاع از سطح دریا) در موقعیت جغرافیایی $28^{\circ} 28' 40''$ تا $28^{\circ} 52' 6''$ شمالی و $57^{\circ} 30' 8''$ تا $58^{\circ} 4' 27''$ شرقی واقع شده است. بر اساس نقشه 1:1000000 مؤسسه تحقیقات خاک و آب، رژیم‌های رطوبتی و حرارتی خاک این منطقه به ترتیب اریدیک⁴ و هایپرترمیک⁵ می‌باشند (بنایی، 1380). میانگین بارندگی سالیانه در این شهرستان 140 میلی‌متر، میانگین رطوبت نسبی آن حدود 55 درصد و بیشینه و کمینه دمای آن به ترتیب، 48 و یک درجه سلسیوس می‌باشند.

نمونه‌برداری خاک

در منطقه دشت جیرفت (بخش مرکزی، دهستان دولت آباد، روستای علی آباد سازمان)، یک سطح ژئومرفولوژیک غالب (دشت آبرفتی) که دارای کاربری‌های مراتع بوته‌زار (بوته‌زارهای مجاور اراضی کشاورزی که به دلیل محدودیت آب آبیاری تاکنون کشت نشده بودند)، زراعی (عمدتاً تحت کشت سیب زمینی و پیاز) و باغی (مرکبات) بود، انتخاب شد (شکل 1). هر سه

توسعه یافته در تشخیص مولکولی در سال‌های اخیر مطرح شده است. HRM آنالیز تغییرات ژنتیکی (انواع موتاسیون‌ها مانند موتاسیون‌های تک نوکلئوتیدی و متیلاسیون‌ها) را مقدور می‌سازد و قابلیت آن در حدی است که تفریق تفاوت‌های ژنتیکی در حد یک تک نوکلئوتید را نیز دارا می‌باشد. این روش نمونه‌های اسید نوکلئیک را بر اساس توالی، طول و درصد گوانین به اضافه سیتوزین (G+C) متمایز می‌سازد. بنابراین با توجه به تفاوت در دمای ذوب مورد نیاز برای ذوب هر نوکلئوتید می‌توان با استفاده از تحلیل منحنی ذوب (در حد تفاوت سویه¹ هم منحنی تفاوت را نشان می‌دهد)، تفاوت‌های ژنتیکی نمونه‌ها را با بهره‌گیری از دستگاه‌های Real-time PCR که مجهز به تکنیک HRM می‌باشند، بررسی نمود. از مزیت‌های این روش می‌توان به سرعت بالا در آنالیز نمونه‌ها، دقت و حساسیت بالا در ردیابی تغییرات و تنوع ژنتیکی²، در دسترس بودن نمونه‌ها به‌خاطر سالم ماندن پس از پایان آنالیز، امکان استفاده دوباره یا استفاده از سایر فنون روی نمونه‌ها و ردیابی جهش‌ها³ اشاره کرد. بر همین اساس پیش‌بینی می‌شود در آینده‌ای نه‌چندان دور، این فن به‌عنوان یک روش مرسوم و پرکاربرد در آزمایشگاه‌های علوم مولکولی و به‌ویژه ژنتیک مولکولی مورد استفاده قرار گیرد (نوری دلویی و فرجی، 1394).

از آنجایی که اطلاعات کمی در مورد ترکیب جوامع ریزجانداران خاک در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران وجود دارد و همچنین از طرفی پژوهش‌گران بسیاری گزارش کرده‌اند که فعالیت‌های انسانی نظیر تغییر کاربری اراضی و شیوه‌های مدیریتی می‌توانند اثرات قابل توجه و دراز مدت روی ویژگی‌های خاک نظیر عناصر غذایی، کربن آلی، بافت و pH (لاوبر و همکاران، 2013) و همچنین روی ترکیب و تنوع جوامع ریزجانداران خاک داشته باشند (مارشسز و همکاران، 2001؛ والیس و

1. Strain

2. Genetic variation

3. Mutation tracking

4. Aridic

5. Hyperthermic

سامر (اولسن و سامر، 1982)، پتاسیم قابل جذب گیاه در خاک به روش عصاره گیری با استات آمونیوم یک نرمال (هلمک و اسپارکس، 1996) و عناصر کم مصرف (روی، آهن، منگنز و مس) قابل جذب گیاه در خاک (استخراج با عصاره گیر DTPA⁷) اندازه گیری شدند (لیندسی و نورول، 1978).

استخراج DNA از نمونه های خاک

برای استخراج و خالص سازی DNA از نمونه های خاک از کیت نوکلئواسپین سویل⁸ استفاده شد. غلظت DNA های استخراجی از نمونه های خاک، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ⁹ در طول موج 260 نانومتر، تعیین شد. همچنین جهت بررسی کیفیت DNA های استخراجی، شاخص های میزان خلوص DNA (نسبت های جذب نوری DNA در طول موج های 260 به 280 نانومتر و 260 به 230 نانومتر) اندازه گیری شدند (ناث و همکاران، 2012).

تکثیر قطعات 16S rDNA

برای تکثیر قطعات 16S rDNA باکتری های خاک از جفت آغازگر همگانی باکتریایی¹⁰ (341F/534R) که منطقه متغیر¹¹ V3 توالی های 16S rDNA باکتریایی را تکثیر می کند، استفاده شد. برای اطمینان از تفکیک مناسب قطعات تکثیر شده در DGGE پیش رو، یک کلمپ (گیره) غنی از گوانین و سیتوزین¹² (توالی 40 بازی) به انتهای 5' آغازگر رفت¹³ (341F) اضافه شد. این توالی غنی از GC به عنوان یک ناحیه با دمای ذوب بالا عمل کرده و از جدا شدن کامل دو رشته DNA جلوگیری می کند (مویزر و همکاران، 1993).

کاربری مربوط به اراضی شرکت کشت و صنعت جیرفت بودند و طبق بررسی های صورت گرفته از عدم تغییر کاربری مورد نظر در 50 سال اخیر اطمینان حاصل شد.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی طرح ریزی شد. تیمارهای این آزمایش شامل سه نوع کاربری اراضی (بوته زار، زراعی و باغی) و تکرارهای آن شامل سه نمونه مرکب خاک از هر کاربری اراضی، بودند. جهت نمونه برداری خاک، ابتدا با بازدیدهای صحرائی، مکان کاربری های اراضی مورد نظر انتخاب و شبکه بندی با فواصل 50 متر جهت تعیین موقعیت نقاط نمونه برداری در سیستم تصویر¹ UTM با استفاده از نرم افزار ArcGIS² ایجاد شد. نهایتاً در دی ماه 1393 با استفاده از GPS و مختصات جغرافیایی نقاط نمونه داری، سه نمونه مرکب خاک (هر نمونه مرکب متشکل از چهار نمونه فرعی بود که به فاصله 50 متر از هم قرار داشتند) از عمق صفر تا 10 سانتی متر از هر کاربری اراضی جمع آوری شد.

آنالیز آزمایشگاهی

ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک

برخی از ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک با روش های معمول آزمایشگاهی به شرح زیر اندازه گیری شدند. نیتروژن کل به روش کجلدال³ (برمنر، 1960)، کربن آلی کل به روش والکلی و بلاک (والکلی و بلاک، 1934)، بافت خاک با روش هیدرومتری⁴ (بویوس، 1962)، کربنات کلسیم معادل⁵ به روش خشتی سازی با اسید کلریدریک و تیت کردن با سود (لوپرت و سوارز، 1996)، pH و قابلیت هدایت الکتریکی⁶ به ترتیب در گل اشباع (توماس، 1996) و عصاره اشباع خاک (روآدز، 1996)، فسفر قابل جذب گیاه در خاک به روش اولسن و

⁷ Diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)

⁸ NucleoSpin® Soil kit, Macherey-Nagel, Duren, Germany

⁹ NanoDrop spectrophotometer, Thermo Scientific, Scientific, Wilmington DE. USA

¹⁰ Universal bacterial primers

¹¹ V3 hypervariable region

¹² GC-rich clamp

¹³ Forward primer

¹ Universal Transverse Mercator (UTM) coordinate system

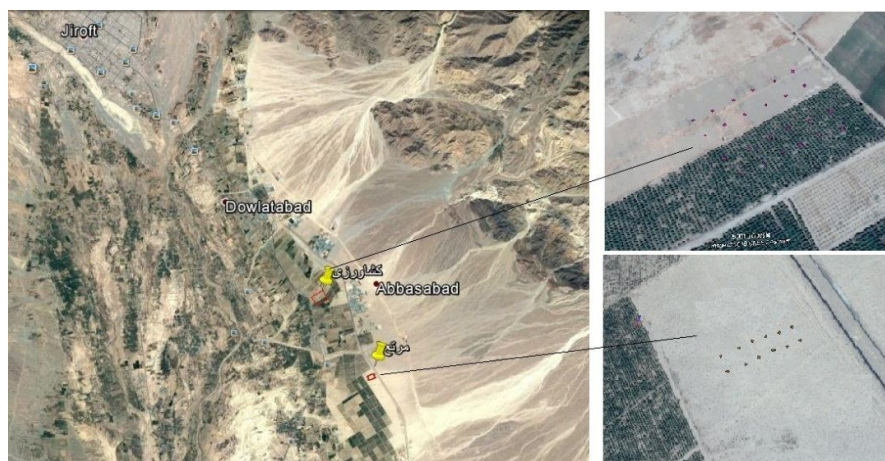
² Aeronautical Reconnaissance Coverage Geographic Information System (ArcGIS)

³ Kjeldahl

⁴ Hydrometer

⁵ Calcium carbonate equivalent (CCE)

⁶ Electrical Conductivity of soil saturation extract (ECe)



شکل 1- موقعیت جغرافیایی کاربری‌های اراضی انتخاب شده در دشت جیرفت

محصولات تکثیر یافته تا زمان بارگذاری در ژل آگارز، در دمای منفی 20 درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی ترکیب جوامع باکتریایی با روش HRM
با استفاده از روش HRM، مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف با استفاده از دستگاه³ Real-time PCR انجام شد. مشابه PCR ساده، برای تکثیر قطعات rDNA 16S باکتریایی خاک از جفت آغازگر همگانی باکتریایی (341F/534R) اما بدون کلمپ GC، استفاده شد.

واکنش‌های Real time PCR در حجم نهایی 20 میکرولیتر به صورت دوتایی انجام شدند. مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش شامل کیت مستر میکس اوآگرین⁴ (غلظت نهایی 1X)، آغازگرهای رفت و برگشت (341F/534R) در غلظت نهایی 8 پیکومول، آب دیونیزه و DNA الگو (یک میکرولیتر) بودند.

برنامه دو مرحله‌ای (تکثیر و ذوب) انجام واکنش به صورت ذیل تنظیم شد: مرحله واسرشت اولیه به مدت 15 دقیقه در دمای 95 درجه سلسیوس، سپس 40 چرخه شامل؛ مرحله واسرشت در دمای 94 درجه سلسیوس

مواد مورد استفاده جهت انجام PCR در حجم نهایی 50 میکرولیتر شامل؛ آغازگرهای رفت و برگشت (غلظت نهایی هر کدام 20 پیکومول)، کیت مستر میکس رد¹ (غلظت نهایی 1X)، DNA الگو (دو میکرولیتر) و آب دیونیزه بودند. پس از اضافه کردن هر یک از اجزای مخلوط واکنش، میکروتیوب‌ها داخل دستگاه ایجاد کننده چرخه‌های دمایی² قرار گرفتند و برنامه زمانی و دمایی PCR پس از مقایسه برنامه‌های مختلف به صورت Touchdown-PCR تنظیم شد. به طوریکه مرحله واسرشت اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای 95 درجه سلسیوس انجام شد، سپس 35 چرخه شامل؛ مرحله واسرشت در دمای 94 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها (در 20 چرخه‌ی Touchdown، مرحله اتصال در شیب دمایی 55-65 درجه سلسیوس (0/5) درجه سلسیوس در هر چرخه کاهش دما) و 15 چرخه بعدی در دمای 55 درجه سلسیوس) به مدت 30 ثانیه و مرحله گسترش در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه انجام شدند. پس از اتمام PCR،

³ BioRad CFX96 Real-Time Detection System, USA

⁴ 5x HOT FIREPol® EvaGreen®HRM Mix, Solis BioDyne, Estonia

¹ Taq DNA Polymerase 2X Master Mix Red (1.5mM MgCl₂) (Ampliqon, Denmark)

² Bio-Rad T100 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

ژل رنگ آمیزی شده روی سطح نورانی قرار داده شد و با دوربین عکاسی حرفه ای عکس برداری صورت گرفت (هوشینو و ماتسوموتو، 2007؛ واکلین و همکاران، 2008).

ب) تجزیه و تحلیل نتایج DGGE

برای تشخیص باند و مقدار شدت باند، از تجزیه و تحلیل تصویر ژل DGGE، با نرم افزار GelCompar II 6.6 استفاده شد. این نرم افزار پس از تفریق یا کاهش پس زمینه، موقعیت و تعداد کل باند و شدت نسبی باندهای منفرد را برای هر نمونه تعیین می کند. هر باند به نمایندگی از گروه های فردی از گونه های با دمای ذوب مشابه استنباط می شود و شدت باند، فراوانی نسبی گروه تحت شرایطی که PCR انجام شده است را نشان می دهد. همچنین پس از انجام مراحل پیش نیاز روی تصویر ژل DGGE توسط نرم افزار، آنالیز خوشه بندی تشابه نمونه ها که بر اساس ضریب تشابه دایس³ و با الگوریتم خوشه بندی⁴ UPGMA بود، استخراج شد (واکلین و همکاران، 2008).

علاوه بر آنالیز خوشه بندی، جهت مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی (حضور یا عدم حضور باندهای DGGE) در خاک های کاربری های اراضی مختلف، با استفاده از نرم افزار PAST3 روش رج بندی⁵ مقیاس گذاری چند بعدی غیر متریک⁶ (NMDS) بر اساس شاخص تشابه اقلیدسی (فاصله بین قرارگیری نمونه ها بیان کننده شباهت یا عدم شباهت بین الگوهای DGGE مربوطه می باشد)، مورد بررسی قرار گرفت (هرنسم و همکاران، 2005).

نتایج و بحث

ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک

مقادیر میانگین ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک در سه کاربری اراضی مورد نظر در جدول یک ارائه شده است. بررسی دانه بندی خاک نشان داد که بافت لایه

به مدت 25 ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها در دمای 60 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه و مرحله گسترش در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه (اندازه گیری میزان فلورسنت در این دما انجام شد). بلافاصله پس از اتمام مرحله تکثیر، الگوی ذوب قطعات تکثیر شده در شیب دمایی 95-55 درجه سلسیوس (با اندازه گیری تغییرات فلورسنت نمونه ها در هر 0/5 درجه سلسیوس و 15 ثانیه توقف در آن دما) بررسی و منحنی های ذوب توسط برنامه جانبی دستگاه Real-time PCR ترسیم شدند. همچنین برای انجام آنالیز HRM از نرم افزار¹ جانبی دستگاه که ویژه این روش است، استفاده شد.

بررسی ترکیب جوامع باکتریایی با روش DGGE

الف) روش انجام کار

DGGE با استفاده از سیستم جهانی تشخیص جهش² (Dcode) در ژل هایی با اندازه 16 در 16 سانتی متر و ضخامت یک میلی متر انجام شد. پس از کارهای مقدماتی از جمله ساخت محلول های مورد نیاز، ژل پلی آکریل آمید هشت درصد (نسبت آکریل آمید به بیس آکریل آمید: 37/5 به یک) آماده شد. این ژل شامل یک شیب شیمیایی خطی 40 تا 60 درصد از عوامل واسرشت کننده بود (واسرشت کننده 100 درصد از ترکیب اوره هفت مولار به اضافه فرمامید دیونیزه 40 درصد تهیه می شود). پس از قرار دادن ژل پلی آکریل آمید مربوطه در بافر TAE 1X تانک الکتروفورز سیستم Dcode، مقدار مساوی (25 میکرولیتر) از قطعات rDNA 16S تکثیر شده، بر روی ژل بارگذاری شد. همچنین 25 میکرولیتر از مخلوط محصولات PCR مربوط به باکتری های خالص (به عنوان یک لدر که متشکل از هشت گونه باکتری بود) نیز بر روی ژل بارگذاری شد. پس از آن الکتروفورز به مدت 17 ساعت با ولتاژ 100 ولت و در دمای 60 درجه سلسیوس اجرا شد. در نهایت پس از اتمام الکتروفورز، ژل با استفاده از روش نترات نقره رنگ آمیزی شد. سپس

³ Dice similarity coefficient

⁴ Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean

⁵ Ordination method

⁶ non-metric multidimensional scaling (NMDS)

¹ Precision Melt Analysis™ Software - Bio-Rad

² DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

مطلوب این نسبت که بیانگر خلوص DNA است، بین 1/8-1/9 بایستی باشد. مقادیر کمتر از 1/8 بیانگر آلودگی پروتئین است و مقادیر بیشتر بیانگر آلودگی RNA می‌باشد (هوشینو و ماتسوموتو، 2007).

میانگین نسبت‌های جذبی A260/A280 و A260/A230 نمونه‌های خاک هر سه کاربری اراضی در حد مطلوب بود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که DNA های استخراجی دارای مقدار کمی ناخالصی از جمله هیومیک اسید و پروتئین بوده‌اند.

محصولات PCR ناحیه V3 قطعات 16S rDNA باکتریایی (باند تقریباً 230 جفت بازی) نمونه‌های DNA خاک بر روی ژل آگارز دو درصد و همراه با DNA لدر³ 100bp الکتروفورز شدند. نتایج نشان داد تکثیر قطعات 16S rDNA نمونه‌های خاک هر سه کاربری اراضی به‌خوبی انجام شده است. قطعات به‌دست آمده از عمل PCR به‌منظور جدا کردن توالی‌های نوکلئوتیدی مختلف 16S rDNA به‌وسیله تکنیک DGGE مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی ترکیب جوامع باکتریایی با روش HRM

پیش از انجام بررسی آنالیزهای HRM بایستی منحنی-های تکثیر و ذوب Real-time PCR بررسی شوند تا از صحت نتایج اطمینان حاصل نمود.

الف) منحنی‌های تکثیر

در شکل دو منحنی‌های تکثیر نمونه‌های DNA خاک سه کاربری اراضی در طی چرخه‌های تکثیر ارائه شده است. این منحنی‌ها تغییرات فلورسانس را در طی چرخه‌های تکثیر Real-time PCR نشان می‌دهند. همان‌طور که در شکل دو مشاهده می‌شود در همه نمونه‌ها تکثیر به‌خوبی صورت گرفته است و در منحنی تکثیر هر نمونه می‌توان فازهای تکثیر را مشخص کرد.

سطحی در کاربری باغی و زراعی کلاس لوم شن¹ و در کاربری بوته‌زار کلاس شن² بود. به‌طور خلاصه در کاربری کشاورزی (باغی و زراعی) نسبت به مراتع بوته‌زار، مقادیر کربن آلی، سیلت، رس، قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع (ECe)، کربنات کلسیم معادل (CCE)، عناصر غذایی پرمصرف (نیترژن کل، فسفر قابل دسترس و پتاسیم قابل دسترس) و کم‌مصرف قابل دسترس (آهن، روی، منگنز و مس)، و رطوبت وزنی اولیه خاک بیشتر و مقادیر pH و شن کمتر بودند.

استخراج DNA ژنومی خاک و تکثیر قطعات 16S DNA

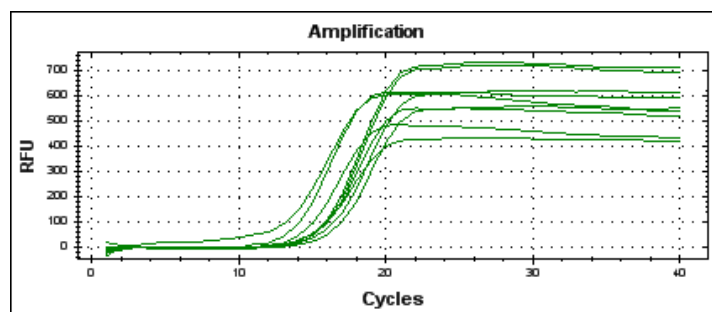
جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک با دو تکنیک HRM و DGGE نیاز است که DNA ژنومی خاک از کیفیت مناسبی برخوردار باشد و همچنین تکثیر قطعات 16S rDNA به خوبی انجام شده باشد. نتایج حاصل از بررسی غلظت DNA استخراج شده از نمونه‌های خاک سه کاربری اراضی به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ نشان داد که میانگین غلظت DNA در نمونه‌های خاک کاربری باغ، زراعی و بوته‌زار به ترتیب 30/10، 12/30 و 7/60 نانوگرم بر میکرولیتر بود. همچنین نتایج بررسی کیفیت DNA های استخراج شده با محاسبه نسبت‌های جذب نوری DNA (A260/A230 و A260/A280) نشان داد که میانگین نسبت A260/A230 برای نمونه‌های خاک کاربری باغ، زراعی و بوته‌زار به ترتیب 1/53، 1/56 و 1/61 بود. این نسبت برای DNA خالص باید بیشتر از 2 باشد، اما تا حدود 1/5 قابل قبول است (ناث و همکاران، 2012). مقادیر کمتر بیانگر مقادیر معنی‌داری از ناخالصی است و غلظت واقعی DNA کمتر از مقدار محاسبه شده است. همچنین به‌غیر از ناخالصی هیومیک اسید، پروتئین، ساکاروئیدها و دیگر ناخالصی‌ها می‌توانند در مقادیر پایین این نسبت دخیل باشند. میانگین نسبت A260/A280 برای نمونه‌های خاک کاربری باغ، زراعی و بوته‌زار به ترتیب 1/86، 1/88 و 1/84 بود. حد

1. Sandy loam
2. Sand

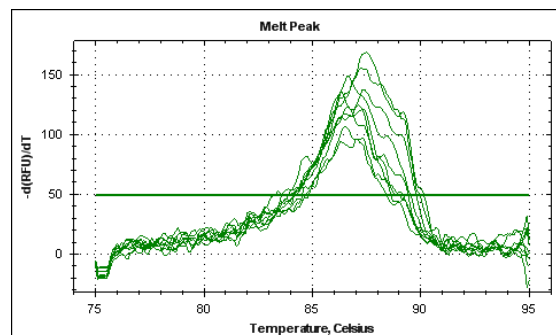
3. 100 bp DNA Ladder, DENAzist Asia, Iran

جدول 1- مقادیر میانگین برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک در کاربری های اراضی مختلف

ویژگی	اراضی باغی	اراضی زراعی	اراضی بوته زار
Characteristic	Orchard land	Farmland	Shrubland
کربن آلی کل (Total organic carbon) (%)	0/17	0/07	0/04
کربنات کلسیم معادل (CCE) (%)	3/87	5/36	4/14
واکنش خاک (pH)	7/71	7/91	8/09
قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع (ECe) (dSm ⁻¹)	2/25	0/91	0/67
شن (Sand) (%)	54/23	70/23	97/11
رس (Clay) (%)	1/14	0/91	0/00
سیلت (Silt) (%)	44/63	28/86	2/89
مقدار رطوبت اولیه (Initial moisture content) (%)	12/24	6/78	1/85
نیترژن کل (Total N) (mg kg ⁻¹)	105/14	57/10	31/58
فسفر قابل دسترس (Available P) (mg kg ⁻¹)	13/25	11/79	1/23
پتاسیم قابل دسترس (Available K) (mg kg ⁻¹)	269/16	305/43	92/83
آهن قابل دسترس (Available Fe) (mg kg ⁻¹)	3/97	3/62	1/21
روی قابل دسترس (Available Zn) (mg kg ⁻¹)	0/72	0/66	0/14
منگنز قابل دسترس (Available Mn) (mg kg ⁻¹)	2/43	2/28	1/19
مس قابل دسترس (Available Cu) (mg kg ⁻¹)	0/48	0/35	0/09

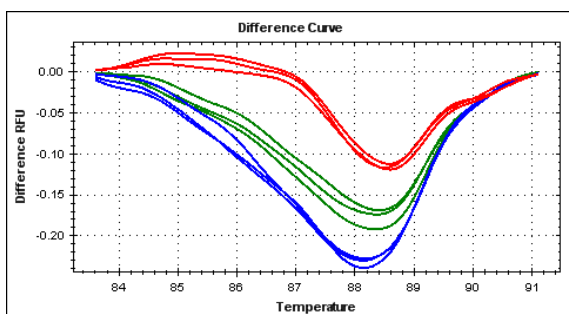
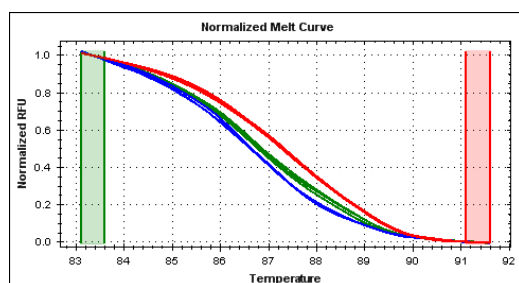


شکل 2- منحنی های تکثیر حاصل از Real-time PCR برای قطعات 16S rDNA باکتریایی در نمونه های DNA خاک سه کاربری اراضی. محورهای X و Y به ترتیب تعداد چرخه و واحد فلورسانس نسبی¹ (RFU) را نشان می دهند.



شکل 3- منحنی های ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی در نمونه های DNA خاک سه کاربری اراضی با Real-time PCR. محورهای X و Y به ترتیب دما (°C) و مشتق تغییرات فلورسانس را نشان می دهند. شدت پیک در هر نمونه متناسب با مقدار قطعات تکثیر شده است.

¹ Relative fluorescence unit (RFU)



Sample	Cluster	Percent Confidence
SI1	Cluster 01	98.1
SI2	Cluster 01	98.4
SI3	Cluster 01	98.5
OI1	Cluster 02	97.4
OI2	Cluster 02	99.2
OI3	Cluster 02	98.8
FI1	Cluster 03	97.8
FI2	Cluster 03	98.7
FI3	Cluster 03	96.8

شکل 4- مقایسه منحنی‌های هم‌طراز شده (شکل بالا) و difference (شکل وسط) به‌دست آمده از آنالیز HRM قطعات 16S rDNA نمونه‌های خاک سه کاربری اراضی باغ (OL) (سبز رنگ)، زراعی (FL) (آبی رنگ) و مرتع (SL) (قرمز رنگ). شکل پایین، آنالیز خوشه‌بندی حاصل از نتایج HRM را نشان می‌دهد.

ب) منحنی‌های ذوب¹

(منطقه متغیر V3 توالی‌های 16S rDNA باکتریایی به طول تقریبی 193 جفت باز) تکثیر یافته است.

ج) منحنی‌های HRM

نتایج نشان داد که ترکیب جوامع باکتریایی خاک در بین هر سه کاربری اراضی تفاوت‌هایی دارد. همان‌طور که در شکل چهار مشاهده می‌شود، منحنی‌های هر سه نمونه معرف هر کاربری در کنار هم قرار گرفته‌اند. منحنی‌های نمونه‌های معرف کاربری باغ (سبز رنگ) و زراعی (آبی رنگ) نسبت به مرتع (قرمز) در فاصله نزدیکتری نسبت به هم قرار گرفته‌اند، که نشان دهنده

با تحلیل منحنی ذوب هر نمونه می‌توان وجود باندهای غیراختصاصی و دایمر پرایمر² را تشخیص داد. در شکل سه منحنی‌های ذوب نمونه‌های DNA خاک ارائه شده است. در منحنی‌های ذوب باید تنها یک پیک مشاهده گردد. وجود تنها یک پیک کشیده و با دامنه‌ای محدود برای منحنی ذوب هر نمونه DNA خاک دلالت بر این دارد که واکنش شرایط مناسب برای تکثیر اختصاصی ژن هدف را دار بوده و فقط قطعه اختصاصی مورد نظر

¹ Melting curve analysis

² Primer dimer

خاک های تحت کاربری زراعی و باغی با هم بیشتر است. نتایج نشان داد نیمرخ های DNA باکتریایی خاک حاوی تعداد زیادی باندهای با شدت کم و نزدیک به یکدیگر همراه با تعداد کمی باندهای غالب درخشان بودند. این موضوع احتمالاً به دلیل ناهمگنی بالای DNA هایی بود که مستقیماً از خاک استخراج شده و نشان دهنده پیچیدگی ترکیب جوامع باکتریایی خاک می باشد (نائو و همکاران، 2012؛ دینگ و همکاران، 2013).

نیمرخ باندهای DNA، بررسی جمعیت های پیچیده در نمونه های خاک را امکان پذیر می کند، زیرا به طور کلی هر یک از ژنوتیپ ها یا گونه های باکتریایی یک باند مجزا را تولید می کنند. علاوه بر این، شدت باندهای DNA همبستگی قوی با فراوانی نسبی گونه های باکتریایی مختلف دارند. به هر حال این واقعیت باید در نظر گرفته شود که رابطه بین باندها در یک نیمرخ و تعداد گونه های باکتریایی در یک نمونه به سادگی نسبت یک به یک نیست، زیرا برآورد بیش از حد یا برآورد کمتر از تعداد واقعی گونه های باکتریایی می تواند در این روش رخ دهد. همچنین، از آنجایی که 16S rDNA به عنوان یک الگو برای عمل تکثیر PCR استفاده می شود، نیمرخ های DGGE نشان دهنده DNA تکثیر شده مربوط به هم ریزجانداران زنده و هم مرده می باشند (هوشینو و ماتسوموتو، 2007).

کرچیو و همکاران (2004) و والیس و همکاران (2010) پاسخ جوامع باکتریایی خاک را نسبت به روش های مدیریتی مختلف مورد بررسی قرار دادند. آنها زمانی که DNA را مستقیماً از خاک استخراج کردند، الگوی باندهای DNA مشابه با این پژوهش را گزارش کردند. آنها پیشنهاد کردند که باندهای درخشان¹ احتمالاً نشان دهنده حضور تعداد محدودی از انواع باکتری های از نظر اکولوژیکی به خوبی سازگار شده و غالب در خاک می باشند. از طرف دیگر، باندهای روشن² زیاد احتمالاً نشان دهنده جمعیت فراوان و یکسان در هر خاک است.

شباهت بیشتر ترکیب جوامع باکتریایی خاک در این دو کاربری اراضی است. آنالیز خوشه بندی نیز نشان می دهد که سه نمونه معرف هر کاربری در یک خوشه مجزا می باشند (شکل چهار، آنالیز خوشه بندی).

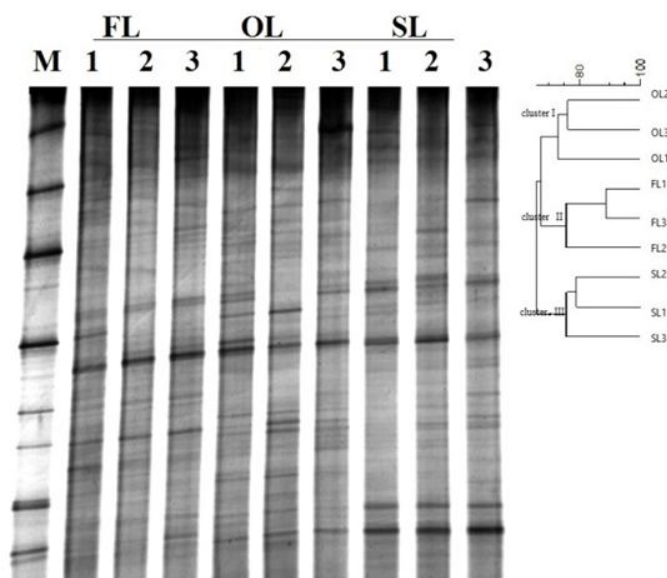
با توجه به نتایج بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک مبتنی بر آنالیز دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک با روش HRM می توان بیان کرد که تغییر کاربری اراضی از مراتع بوته زار به کشاورزی (باغ و زراعی) سبب تغییر معنی دار در ترکیب جوامع باکتریایی خاک شده است. به طور کلی با توجه به نتایج می توان نتیجه گرفت نمونه های خاک کاربری باغ و زراعی نسبت به کاربری مرتع بوته زار دارای باکتری های مشابه بیشتری می باشند.

بررسی ترکیب جوامع باکتریایی با روش DGGE

عمل DGGE قطعات 16S rDNA نمونه های خاک به عنوان یک روش کیفی و نیمه کمی به منظور ارزیابی ترکیب جمعیت باکتریایی خاک تحت کاربری های مختلف استفاده شد. الگوهای باندهای DGGE حاصل از تکثیر PCR ناحیه V3 توالی های 16S rDNA در شکل پنج ارائه شده است. عمل DGGE توالی های 16S rDNA به دست آمده از نمونه های خاک نشان دهنده تفاوت در تعداد باندها و فواصل مختلف قطعات منتقل شده در ژل و در نتیجه تفاوت آشکار در ترکیب جوامع باکتریایی خاک تحت همه کاربری های اراضی بود. همان طور که در شکل پنج نمایان است، نمونه های خاک کاربری های مختلف دارای بعضی باندهای یکسانی (اما شدت باند متفاوت) می باشند. همچنین الگوهای باندهای در سه نمونه معرف هر کاربری به شدت تکرار پذیری دارند و مشابه با یکدیگر می باشند. شباهت مشاهده شده در نیمرخ های باندهای DNA نمونه های تکرار به دست آمده از یک کاربری اراضی نشان می دهد که ساختار جوامع باکتریایی خاک بین کاربری های اراضی مختلف نسبت به درون یک کاربری اراضی یکسان تفاوت بیشتری دارد. علاوه بر این به طور مشاهده ای، شباهت های الگوهای باندهای بین

¹ Bright

² Light



شکل 5- الگوهای بانندی DGGE حاصل از قطعات 16S rDNA به‌دست آمده از نمونه‌های خاک کاربری زراعی (FL)، کاربری باغی (OL) و کاربری مرتع (SL). شماره‌های 1، 2 و 3 نشان دهنده نمونه‌های تکرار می‌باشند. M نشانگر 16S rDNA باکتریایی می‌باشد. آنالیز مقایسه‌ای الگوهای بانندی DGGE با استفاده از ضریب تشابه Dice و براساس آنالیز خوشه‌بندی UPGAMA انجام گرفت.

می‌آیند. نتایج خوشه‌بندی نشان داد که میزان تشابه بین الگوهای بانندی نه نمونه خاک 68/5 درصد بود. همچنین نتایج این آنالیز نشان داد که ترکیب جوامع باکتریایی بین کاربری‌های مختلف تفاوت‌هایی دارد، به‌طوری‌که سه نمونه خاک معرف هر کاربری تشکیل یک خوشه مجزا را دادند (شکل پنج). خوشه یک شامل سه نمونه کاربری باغی بود که حداقل شاخص تشابه را داشتند (74/0 درصد). سه نمونه کاربری زراعی خوشه دو و سه نمونه کاربری مرتع خوشه سه را تشکیل دادند. نمونه‌های خاک کاربری زراعی تشابه بیشتری نسبت به هم داشتند (80/1) در مقایسه با نمونه‌های خاک کاربری مرتع (76/9).

مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی (حاصل از نتایج DGGE) در کاربری‌های اراضی مختلف با روش مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک (NMDS)

علاوه بر آنالیز مقایسه‌ای الگوهای بانندی DGGE براساس آنالیز خوشه‌بندی UPGAMA، با روش NMDS (بر اساس شاخص تشابه اقلیدسی) ترکیب جوامع باکتریایی (حضور یا عدم حضور باندهای DGGE) در

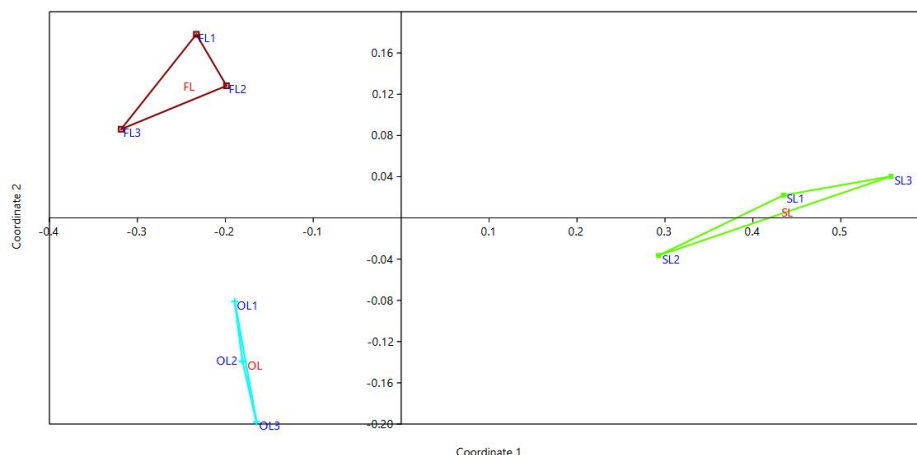
بر اساس نتایج به‌دست آمده، خاک‌های کاربری‌های اراضی مورد مطالعه شامل انگشت‌نگاری (نیمرخ باندهای DNA) به‌شدت پیچیده‌ای بودند و بنابراین محاسبه دقیق تعداد کل باندها تقریباً غیرممکن بود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که انگشت‌نگاری DGGE تنها اعضای غالب جمعیت را شناسایی می‌کند و این روش پیچیدگی کل سیستم را نشان نمی‌دهد (تائو و همکاران، 2012). بنابراین در این پژوهش باندهای به‌دست آمده از ژل DGGE، به‌عنوان اعضای باکتریایی غالب در خاک‌های کاربری‌های مختلف منطقه مورد مطالعه در نظر گرفته شدند.

آنالیز مقایسه‌ای الگوهای بانندی DGGE با استفاده از ضریب تشابه Dice و براساس آنالیز خوشه‌بندی UPGAMA در شکل پنج نیز آورده شده است. تعداد و تشابه باندهای مشاهده شده در هر پروفایل در مقایسه با پروفایل‌های دیگر اساس این روش است. بنابراین به‌منظور بررسی ساختار جوامع باکتریایی میان نمونه‌های خاک خوشه‌ها براساس شاخص تشابه یا تفاوت به‌دست

توانست تفاوت های موجود میان نمونه های خاک سه کاربری اراضی را نشان دهد.

نتایج این آنالیز به صورت پلات دو بعدی در شکل شش ارائه شده است. همان طور که نمایان است، نمونه های خاک معرف هر کاربری در مختصات جداگانه ای روی پلات حضور دارند و از نمونه های دو کاربری دیگر تفکیک شده اند. می توان گفت که نوع کاربری اراضی اثر معنی داری روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک داشته است. از فاصله قرارگیری بین نمونه های کاربری های مختلف که در واقع نمایانگر شباهت و یا عدم شباهت بین الگوهای DGGE (این الگوها یا باندها معرف گونه های باکتریایی خاک می باشند)، می توان نتیجه گرفت که شباهت بین نمونه های معرف کاربری زراعی و باغی بیشتر (چون در فاصله نزدیک تری نسبت به هم قرار دارند) از حالتی است که این دو کاربری با کاربری مرتع مقایسه می شوند.

خاک های کاربری های اراضی مختلف مورد بررسی قرار گرفت (شکل شش). فاصله بین قرارگیری نمونه ها بیان کننده شباهت یا عدم شباهت بین الگوهای DGGE مربوطه می باشد (هرنسا و همکاران، 2005). نتایج پژوهش والیس و همکاران (2010) نشان داد آنالیزهای مبتنی بر حضور یا عدم حضور باندهای DGGE یا براساس تعداد باندها به خوبی جمعیت های باکتریایی خاک های تحت کاربری های متفاوت را از هم جدا کرد. تابع زوال در روش مقیاس بندی چند بعدی غیر متریک به نام استرس شناخته می شود. مقدار استرس نشان دهنده این است که آیا تفاوت بین داده ها به خوبی توسط بای پلات استخراجی از این روش توضیح داده شده است یا خیر. اگر مقدار استرس کمتر از 0/2 باشد نتایج این آنالیز مورد قبول است (ریتز و همکاران، 2004). در این پژوهش مقدار استرس 0/15 بود، در نتیجه روش NMDS به خوبی



شکل 6- پلات دو بعدی روش NMDS، حاصل از مقایسه نمونه های خاک کاربری زراعی (FL)، کاربری باغی (OL) و کاربری مرتع (SL) براساس ترکیب جوامع باکتریایی.

مقایسه نتایج HRM و DGGE

استفاده از سه روش HRM، DGGE و توالی یابی¹ قطعات ژن 16S rRNA بررسی نمودند. نتایج آن ها نشان داد که هر سه روش به طور مشابه ای توانستند میزان شباهت یا تفاوت بین تیمارهای مورد نظر را نشان دهند.

هر دو روش توانستند تفاوت در ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین سه کاربری اراضی مورد نظر را نشان دهند. هلمز و همکاران (2014) ترکیب جوامع باکتریایی خاک را بین شش تیمار (علف کش و کود) مختلف با

¹ 454-based 16SrRNA gene amplicon sequencing

داشت. همچنین بوسیو و همکاران (2005) براساس آنالیز DGGE قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک گزارش کردند که ساختار این ریزجانداران تحت تأثیر عملیات‌های مدیریتی مختلف تغییر می‌کند. مارشنر و همکاران (2001) اثر پنچ تیمار مختلف را بر ساختار جوامع باکتریایی و یوکاریوتی خاک بررسی کردند و نشان دادند که تیمارهای مختلف موجب تغییرات قابل توجهی در ساختار هر دو جوامع، به‌ویژه در خاک‌های با مقدار کم کربن آلی شدند. به‌طورکلی نتایج نشان داد ترکیب جوامع باکتریایی خاک شاخص حساسی نسبت به پایداری کاربری اراضی می‌باشد (زو و همکاران، 2006).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک از دو روش DGGE و HRM استفاده شد، که هر دو روش توانستند تفاوت‌های موجود بین خاک‌های سه کاربری اراضی را نشان دهند. با توجه به محدودیت‌های تکنیک PCR سنتی استفاده شده در روش DGGE، آنالیز HRM به‌دلیل دقت بیشتر، کم هزینه‌تر بودن، راحتی کار و بایاس یا انحراف کمتر می‌تواند جهت مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین تیمارهای مختلف پیشنهاد شود. این پژوهش موجب بهبود درک ما از اثرات تغییر کاربری اراضی بر ترکیب جوامع باکتریایی خاک در مناطق خشک و نیمه خشک کشور شد. با این حال هدف‌های قابل توجهی برای کارهای بیشتر وجود دارد. عوامل محدودکننده جدی بر سر راه آنالیز کمی و کیفی ترکیب جوامع ریزجانداران خاک وجود دارد. از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به عدم دسترسی به تجهیزات مناسب و هزینه‌های سنگین بسیاری از روش‌های آزمایشگاهی اشاره کرد. در پایان قابل ذکر است که نتایج این پژوهش قابل تعمیم به مناطق با شرایط غیرمشابه نیست. چون در اثر عوامل مختلف از جمله اقلیم، ویژگی‌های متفاوت خاک، پوشش گیاهی و درصد مواد آلی متفاوت، ممکن است نتایج دیگری حاصل شود.

همچنین آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که HRM به‌دلیل سریع بودن و دقت کافی، می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مؤثر برای روش‌های مبتنی بر الکتروفورز ژل مانند DGGE که زمان بر و هزینه‌بر هستند به‌کار رود. همچنین سونی و گل (2010) از سه روش HRM، DGGE و کلونینگ¹ ژن 16S rRNA برای بررسی ترکیب جوامع باکتریایی در سیستم‌های مختلف خاک در غرب هند استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که اختلاف‌های بین نمونه‌های خاک را هر سه روش به یک میزان نشان دادند.

دلایل تفاوت ترکیب جوامع باکتریایی در کاربری‌های اراضی مختلف

تفاوت ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف تحت تأثیر عوامل بسیاری است که در تعامل با یکدیگر می‌باشند. برای مثال خاک‌ها در کاربری‌های اراضی مختلف تحت پوشش گیاهی متفاوتی می‌باشند و این موضوع کاملاً شناخته شده است که ریزوسفر گونه‌های گیاهی مختلف دارای جمعیت‌های باکتریایی با ترکیب گونه‌ای متفاوت می‌باشد (لاوبر و همکاران، 2013؛ بووینو و همکاران، 2014). نوع پوشش گیاهی، مقدار و نوع ترکیبات شیمیایی می‌توانند به‌عنوان فاکتورهای مهم، روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک اثرگذار باشند (لیو و همکاران، 2010؛ شن و همکاران، 2010). همچنین بین کاربری‌های اراضی مختلف کیفیت و کمیت مواد آلی آزاد شده از ریشه در خاک می‌تواند متفاوت باشد، در نتیجه گونه‌های باکتریایی که با این محیط‌ها سازگار شده‌اند تفاوت‌هایی دارند (زو و همکاران، 2006). حتی پژوهش‌های بسیاری نشان داده‌اند که کاربرد عملیات‌های مدیریتی مختلف در یک کاربری می‌تواند ترکیب جوامع باکتریایی خاک را تحت تأثیر قرار دهد (لاوبر و همکاران، 2013). برای مثال نتایج تیبی و اشلوتر (2007) نشان داد تغییرات قابل توجهی در ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین مزارع تحت مدیریت مرسوم، مزارع تحت کشاورزی آلی کوتاه مدت و بلند مدت وجود

¹Cloning of 16SrRNA gene

فهرست منابع:

1. بنایی، ح.م. 1380. نقشه منابع و استعداد خاک های ایران. مؤسسه تحقیقات خاک و آب. تهران، ایران.
طباطبایی، م. و پورمظاهری، ه. 1391. متاژنومیکس و کاربرد آن در شناسایی تنوع ژنتیکی اکوسیستم های میکروبی. مجله ژنتیک نوین، دوره هفتم، شماره 4. صفحه 313-324.
2. نوری دلویی، م.ر. و فرجی، ک. 1394. فن ذوب DNA با تفکیک بالا و کاربردهای راهبردی آن به ویژه در ژنتیک مولکولی. فصلنامه افق دانش، دوره 22، شماره 1. صفحه 77-88.
3. Ahmad Suleiman A.K., Pylro V.S., and Wurdig Roesch L.F. 2017. Replacement of native vegetation alters the soil microbial structure in the Pampa biome. *Scientia Agricola*, 74: 77-84.
4. Bevivino A., Paganin P., Bacci G., Florio A., Pellicer M.S., Papaleo M.C., Mengoni A. Ledda L., Fani R., Benedetti A., and Dalmastrì C. 2014. Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLoS ONE*, 9(8): e105515.
5. Bossio, D.A., Girvan, M.S., Verchot, L., Bullimore, J., Borelli, T., Albrecht, A., Scow, K.M., Ball, A.S., Pretty, J.N., and Osborn, A.M. 2005. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology*, 49: 50-62.
6. Bouyoucos G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal*, 54: 464-465.
7. Bremner J.M. 1960. Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*, 55: 11-33.
8. Crecchio, C., Gelsomino, A., Ambrosoli, R., Minati, J.L. and Ruggiero, P. 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1873-1883.
9. De Liphay, J.R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J., and Sorensen, S.J. 2004. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1607-1614.
10. Ding, G.C., Piceno, Y.M., Heuer, H., Weinert, N., Dohrmann, A.B., Carrillo, A., Andersen, G.L., Castellanos, T., Tebbe, C.C., and Smalla, K. 2013. Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semiarid ecosystem. *PLoS ONE*, 8(3): e59497.
11. Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., and Jackson R.B. 2005. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4117-4120.
12. Foti M., Sorokin D.Y., Lomans B., Mussman M., Zacharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., and Muyzer G. 2007. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied Environmental Microbiology*, 73: 2093-2100.
13. Govaerts B., Mezzalama M., Unno Y., Sayre K.D., Luna-Guido M., Vanherck K., Dendooven L., and Deckers, J. 2007. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Applied Soil Ecology*, 37: 18-30.
14. Helmke P.A., and Sparks D.L. 1996. Lithium, sodium, potassium, rubidium, and cesium. In: Sparks D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis-Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series No. 5. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 551-574.

15. Hernesmaa, A., Björklöf, K., Kiikkilä, O., Fritze, H., Haahtela, K., and Romantschuk, M. 2005. Structure and function of microbial communities in the rhizosphere of Scots pine after tree-felling. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 777-785.
16. Hjelms M.H., Hansen L.H., Blum J., Feld L., Holben W.E., and Jacobsen C.S. 2014. High-Resolution Melt Analysis for Rapid Comparison of Bacterial Community Compositions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 3568-3575.
17. Hoshino, Y.T., and Matsumoto, N. 2007. DNA- versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 434-444.
18. Hu J., Lin X., Wang J., Dai J., Chen R., Zhang J., and Wong, M.H. 2011. Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer. *Journal of Soils and Sediments*, 11: 271-278.
19. Kent, A.D., and Triplett, E.W. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 56: 211-236.
20. Knauth S., Schmidt H., and Tippkootter R. 2012. Comparison of commercial kits for the extraction of DNA from paddy soils. *Letters in Applied Microbiology*, 56: 222-228.
21. Kolb S., Knief C., Stubner S., and Conrad R. 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 2423-2429.
22. Lauber C.L., Ramirez K.S., Aanderud Z., Lennon J., and Fierer N. 2013. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME Journal*, 7: 1641-1650.
23. Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., and Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2407-2415.
24. Lindsay W.L., and Norvell W.A. 1978. Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42(3): 421-428.
25. Liu, E., Yan, C., Mei, X., He, W., Bing, S.H., Ding, L., Liu, Q., Liu, S., and Fan, T. 2010. Long term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in northwest China, *Geoderma*, 158: 173-180.
26. Loeppert R.H., and Suarez, D.L. 1996. Carbonate and gypsum. In: Sparks D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis-Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series No. 5. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 437-474.
27. Long, L.K., Yao, Q., Guo, J., Yang, R.H., Huang, Y.H., and Zhu, H.H. 2010. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with five selected plant species from heavy metal polluted soils. *European Journal of Soil Biology*, 46:288-294.
28. Marschner P., Yang C-H., Lieberei R., and Crowley D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1437-1445.
29. Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
30. Nakatsu, C.H. 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal*, 71: 562-571.
31. Olsen S.R., and Sommers L.E. 1982. Phosphorus. In: Page A.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis-Part 2. Chemical and Microbiological Properties-Agronomy Monograph 9*, 2nd

- Ed. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 403-430.
32. Rhoades J.D. 1996. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. In: Sparks D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis-Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series No. 5. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 417-435.
 33. Ritz, K., Mac Nicol, J.W., Nunan, N., Grayston, S., Millard, P., Atkinson, A., Gollotte, A., Habeshaw, D., Boag, B., and Clegg, C.D. 2004. Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in upland grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 191-205.
 34. Shen, J.P., Zhang, L.M., Guo, J.F., Ray, J.L., and He, J.Z. 2010. Impact of long-term fertilization practices on the abundance and composition of soil bacterial communities in Northeast China, *Applied Soil Ecology*, 46: 119-24.
 35. Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., and Wernars, K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2284-2291.
 36. Soni R., and Goel R. 2010. Triphasic approach to assessment of bacterial population in different soil systems. *Ekologija*, 56: 99-104.
 37. Tao, S.Q., Xia, Q., Zhu, L., Chen, J.J., Wang, Y.N., and Qin, B. 2012. Analysis of the bacterial communities in lime concretion black soil upon the incorporation of crop residues. *Open Journal of Soil Science*, 9: 312-319.
 38. Tebbe C.C., and Schloter M. 2007. Discerning the diversity of soil prokaryotes (Bacteria and Archaea) and their impact on agriculture. In: Benckiser G. and Schnell S. (Ed.), *Biodiversity in agricultural production systems. CRC Press, Taylor and Francis Group*, UK, pp. 81-100.
 39. Thomas G.W. 1996. Soil pH and soil acidity. In: Sparks D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis-Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series No. 5. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 475-490.
 40. Wakelin, S.A., Macdonald, L.M., Rogers, S.L., Gregg, A.L., Bolger, T.P., and Baldock, J.A. 2008. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 803-813.
 41. Walkley A., and Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37: 29-38.
 42. Wallis, P.D., Haynes, R.J., Hunter, C.H., and Morris, C.D. 2010. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Applied Soil Ecology*, 46: 147-150.
 43. Webster G., Embley T.M., and Prosser J.I. 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of β -Proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Applied Environment Microbiology*, 68: 20-30.
 44. Xue D., Yao H., and Huang C. 2006. Microbial biomass, N mineralization and nitrification, enzyme activities, and microbial community diversity in tea orchard soils. *Plant and Soil*, 288: 319-331.

Comparison of HRM and DGGE methods to study the composition of soil bacterial communities indifferent land uses

G. Jalali¹, A. Lakzian, A. R. Astarai, and M. Mazhari

Assistant Professor, Department of Soil Science, University of Jiroft;

E-mail: gh.jalali@ujiroft.ac.ir

Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad;

E-mail: lakzian@um.ac.ir

Associate Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad;

E-mail: astarai@um.ac.ir

Assistant Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj Islamic Azad

University; E-mail: mahboobeh.mazhari@kia.ac.ir

Received: April, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

Land use change is one of the most important factors influencing soil microbial communities which play a pivotal role in most biogeochemical and ecological processes. In order to determine the effect of land use on the composition of soil bacterial communities, High Resolution Melt (HRM) analysis and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) were used in three different land uses (orchard land, farmland and shrub land) in Jiroft plain, Iran. In the case of HRM analysis, a real-time PCR device equipped with this technique was used. DGGE technique via DCodeTM Universal Mutation Detection System was conducted to evaluate the composition of soil bacterial communities. The results of HRM as well as the ordination results based on the presence or absence of DGGE bands in soil samples using non-metric multidimensional scaling (NMDS) method showed that the land-use change from shrub land to agriculture (orchard and farm) had a significant effect on the soil bacterial community composition. According to the results of both methods, the soil bacterial community composition in agricultural lands (orchard and farm) was more similar than shrub land. Since HRM analysis is less expensive, easier and has less bias compared to DGGE technique, it is recommended to compare the composition of soil bacterial communities in different samples.

Keywords: Genomic DNA from soil, Soil bacterial 16S rDNA, Real-time PCR, Non-metric multidimensional scaling (NMDS)

¹Corresponding author: Soil Science Department, University of Jiroft, Jiroft.