

تأثیر کاربری اراضی روی فراوانی نسبی و ترکیب جوامع باکتریایی خاک

قباد جلالی^۱، امیر لکزیان^{۲*}، علیرضا آستارایی^۳، علی اکبر حداد مشهد ریزه^۴، مهدی آزادوار^۵ و عیسی اسفندیارپور بروجنی^۶

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۲)

چکیده

تغییر کاربری اراضی یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی بوده که ضمن اثرگذاری روی جوامع ریزجانداران خاک، نقش محوری در اکثر فرآیندهای بیوژئوشیمیایی و اکولوژیکی ایفا می‌کنند. به منظور بررسی تأثیر تغییر کاربری اراضی (از مراتع بوت‌زار به کشاورزی) روی فراوانی نسبی و ترکیب جوامع باکتریایی خاک، مطالعه‌ای با استفاده از روش Real-time PCR در سه کاربری اراضی (باغ، زراعی و بوت‌زار) در دشت جیرفت انجام شد. در هر کاربری ۱۲ نمونه خاک سطحی از عمق ۱۰ سانتی‌متری جمع‌آوری و برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن‌ها اندازه‌گیری شدند. استخراج و خالص‌سازی DNA از نمونه‌های خاک با استفاده از کیت نوکلئواسپین سویل (NucleoSpin® Soil kit) انجام شد. با استفاده از دستگاه Real-time PCR و طبق روش منحنی استاندارد نسبی، مقایسه کمی غلظت نسبی و دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک به ترتیب برای بررسی فراوانی نسبی و ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف انجام شد. نتایج بررسی غلظت و کیفیت DNA های استخراج شده از نمونه‌های خاک نشان داد که استخراج و خالص‌سازی DNA با استفاده از کیت نوکلئواسپین سویل مطلوب بود. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه ناپارامتریک کروسکال والیس (در سطح آماری پنج درصد) نشان داد که کاربری اراضی روی فراوانی نسبی و ترکیب جوامع باکتریایی خاک اثر معنی‌دار داشت؛ به طوری که میانگین فراوانی نسبی جوامع باکتریایی خاک در کاربری باغ بیش‌تر و با دو کاربری دیگر تفاوت معنی‌دار داشت. همچنین ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری بوت‌زار با دو کاربری دیگر تفاوت معنی‌دار داشت. به طور کلی در دشت جیرفت تغییر کاربری اراضی از بوت‌زار به باغ و از بوت‌زار به باغ و زراعی به ترتیب سبب افزایش فراوانی نسبی و تغییر معنی‌دار ترکیب جوامع باکتریایی خاک شده است.

واژه‌های کلیدی: DNA ژنومی خاک، 16S rDNA باکتریایی خاک، Real-time PCR، دشت جیرفت

جلالی ق، لکزیان امیر، آستارایی ع، حداد مشهد ریزه ع، آزادوار م، اسفندیارپور بروجنی ع. ۱۳۹۸. تأثیر کاربری اراضی روی فراوانی نسبی و ترکیب جوامع باکتریایی خاک. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۷ شماره ۱. ص: ۱-۱۵.

۱- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک- دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد گروه علوم خاک- دانشگاه فردوسی مشهد (مکاتبه کننده)

۳- دانشیار گروه علوم خاک- دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استادیار گروه زیست‌شناسی- دانشگاه فردوسی مشهد

۵- استادیار گروه گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان

۶- دانشیار گروه علوم خاک- دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان

*پست الکترونیک: lakzian@um.ac.ir

مقدمه

در مقایسه با سیستم‌های آبی، خاک یکی از پیچیده‌ترین مجموعه‌های پویای ریزجانداران بیوسفر را در خود جای می‌دهد (Curtis *et al.*, 2002). اندازه‌های مختلف ذرات خاک و نحوه آرایش و قرارگیری آن‌ها منجر به ایجاد یک محیط فیزیکی بسیار متنوع و ناهمگن شده است. ترکیب و تنوع ریزجانداران با تنوع ویژگی‌های محیط خاک نظیر ویژگی‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی در ارتباط است (Ranjard *et al.*, 2003).

علاوه بر ویژگی‌های ذاتی خاک، بسیاری از عوامل مانند اثر ریزوسفر^۱، آلاینده‌های خاک و کاربری اراضی روی ترکیب و تنوع ریزجانداران خاک نقش دارند (Kennedy & Gewin, 1997). پژوهش‌گران بسیاری گزارش کرده‌اند که فعالیت‌های انسانی نظیر تغییر کاربری اراضی و شیوه‌های مدیریتی می‌توانند اثرات قابل توجه و درازمدت روی ویژگی‌های خاک نظیر عناصر غذایی، کربن آلی، بافت و pH (Lauber *et al.*, 2008) و هم‌چنین روی ترکیب و تنوع جوامع ریزجانداران خاک داشته باشند (Marschner *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2002; Miethling *et al.*, 2003; Jangid, *et al.*, 2008). از طرفی پژوهش‌های پیشینی نشان داده‌اند که فعالیت‌های کشاورزی مانند تأثیر کاربردهای طولانی مدت کودهای آلی و غیرآلی (Wang *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011; Kamaa *et al.*, 2008) و اثرات بلند مدت روش‌های مدیریتی (مانند شخم، تناوب زراعی و مدیریت بقایای گیاهی) (Govaerts *et al.*, 2007) ترکیب جوامع باکتریایی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اخیراً روش‌های متانژنومیک^۲ مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۳ (PCR)، به‌طور فزاینده‌ای برای مطالعه جوامع ریزجانداران خاک استفاده شده‌اند (Kent & Triplett, 2002). این روش‌ها بر پایه اسیدهای نوکلئیکی بوده که مستقیماً از بوم‌سازگان‌های پیچیده‌ای از قبیل خاک جدا شده‌اند. در این روش‌ها DNA کل ریزجانداران به‌طور مستقیم از نمونه‌های زیست محیطی استخراج شده و ارزیابی‌های ژنتیکی روی آن انجام می‌شود. اطلاعات حاصله از این روش‌ها تصویر بسیار دقیق‌تری از ترکیب و نقش ریزجانداران نشان داده که امکان دستیابی به این اطلاعات با روش‌های قدیمی کشت ریزجانداران فراهم

نبود (Peixoto *et al.*, 2002; Tabatabaei & Pourmazaheri, 2013).

روش PCR کمی^۴ (qPCR) یکی از روش‌های متانژنومیک مبتنی بر PCR که موجودات زنده خاص به‌دست آمده از الگوهای DNA مخلوط و پیچیده مانند خاک توسط اندازه‌گیری توده محصول PCR شناسایی و کمی می‌شوند. qPCR می‌تواند با استفاده از سه روش متفاوت، یعنی بیش‌ترین تعداد احتمالی (MPN)^۵، PCR رقابتی^۶ و PCR زمان واقعی^۷، انجام شود (Heid *et al.*, 1996). در روش Real-time PCR از رنگ‌های فلوروژنیک غیراختصاصی پیوند شده^۸ با DNA، از قبیل سایبرگرین^۹ (Klein, 2002)، یا کاوشگرهای هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلوروژنیک با تشخیص اختصاصی توالی^{۱۰}، مانند TaqMan استفاده می‌شود (Heid *et al.*, 1996). افزایش در فلورسانس در طی PCR نشان دهنده افزایش قطعات DNA تازه تولید شده بوده و برای تخمین مقدار DNA در نمونه‌ها استفاده می‌شود (Tevfik Dorak, 2007).

پژوهش‌گران بسیاری از روش Real-time PCR برای کمی‌سنجی باکتری‌های خاک و ژن‌های مرتبط با کارکردهای آن‌ها استفاده نموده‌اند. به‌طور مثال این روش به‌طور موفقیت‌آمیزی در زمینه کمی‌سنجی کل باکتری‌های خاک به‌کار رفته است. در این راستا، نگی و همکاران (Nagy *et al.*, 2005) با استفاده از Real-time PCR تعداد کپی‌های 16S rDNA باکتریایی در پوسته زیستی خاک در اراضی بیابانی را بررسی نمودند. هم‌چنین این روش برای بررسی گروه‌های خاص باکتری‌های خاک مانند اکسیدکننده‌های آمونیاک (Hermansson & Lindgren, 2001)، اکسیدکننده‌های متان (Kolb *et al.*, 2003) و احیاءکننده‌های گوگرد (Foti *et al.*, 2007) به‌ترتیب با بررسی ژن‌های *amoA*، *pmoA* و *dsrA* استفاده شده است. هرمانسون و لیندگرین (Hermansson & Lindgren, 2001) بیان داشتند که روش Real-time PCR پتانسیل بالای برای کمی‌سنجی باکتری‌های خاک دارد.

4-Quantitative PCR (qPCR)

5-Most probable number (MPN)-PCR

6-Competitive PCR

7-Real-time PCR

8-Non-specific DNA binding dyes as fluorescent reporters

9-SYBER Green

10-Sequence-specific, dual-labeled fluorogenic hybridization probes

1-Rhizosphere

2-Metagenomics

3-Polymerase chain reaction (PCR)

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 سیب‌زمینی و پیاز) و باغ (مرکبات) بود، انتخاب شد (شکل ۱). هر سه کاربری مربوط به اراضی شرکت کشت و صنعت جیرفت بوده و طبق بررسی‌های صورت گرفته از عدم تغییر کاربری مورد نظر در ۴۰ سال اخیر اطمینان حاصل شد (در واقع کاربری‌های زراعی و باغ فعلی جزئی از کاربری مراتع بوته‌زار بوده که حداقل در ۴۰ سال اخیر تحت کشت و کار قرار گرفته‌اند).

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی طرح‌ریزی شد. تیمارهای این آزمایش شامل سه نوع کاربری اراضی (بوته‌زار، زراعی و باغ) و تکرارهای آن شامل ۱۲ نمونه مرکب خاک از هر کاربری اراضی، بودند. برای نمونه‌برداری خاک، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار ArcGIS^۳ لایه‌های اطلاعات مکانی (نقشه) و اطلاعات توصیفی (جداول) مانند محدوده اراضی و توپوگرافی، تهیه شد. سپس با بازدیدهای صحرائی، مکان کاربری‌های اراضی مورد نظر انتخاب و شبکه‌بندی با فواصل ۵۰ متر برای تعیین موقعیت نقاط نمونه‌برداری در سیستم‌تصویر UTM^۴ ایجاد شد. این نقاط دارای مختصات جغرافیایی بودند که از طریق نرم‌افزار Datatrac از کامپیوتر به سامانه موقعیت‌یابی جهانی^۵ (GPS) انتقال داده شدند. نهایتاً در دی‌ماه ۱۳۹۳ با استفاده از GPS و مختصات جغرافیایی نقاط نمونه‌برداری، ۱۲ نمونه مرکب خاک از عمق صفر تا ۱۰ سانتی‌متر (هر نمونه مرکب متشکل از ده نمونه فرعی) از هر کاربری اراضی جمع‌آوری شد

آن‌ها حساسیت بالا، تکرارپذیری، نتایج واقعی و ظرفیت بالای انجام تعداد زیاد نمونه در زمان کم را از مزایای این روش در مقایسه با سایر روش‌های کمی PCR ذکر نمودند. فیرر و همکاران (Fierer *et al.*, 2005) با استفاده از Real-time PCR فراوانی نسبی گروه‌های تاکسونومیک اصلی باکتری‌ها را در خاک بررسی کردند و بیان داشتند که این روش درک جامع و ارزیابی دقیقی از ترکیب جوامع باکتریایی خاک فراهم می‌کند.

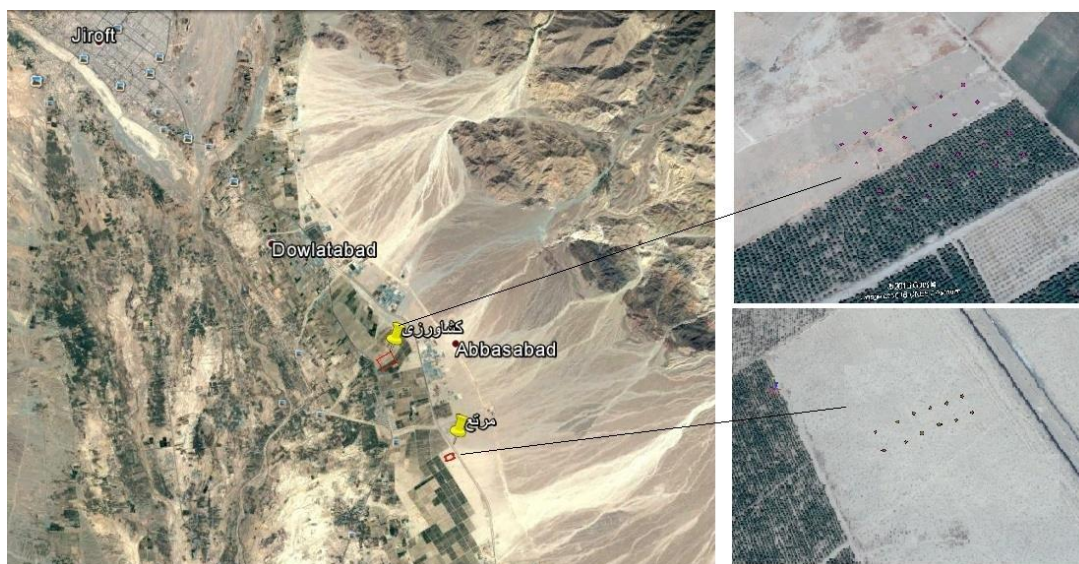
به‌طور کلی اطلاعات کمی در مورد فراوانی و ترکیب جوامع باکتریایی خاک در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران وجود دارد. با فرض اینکه کاربری اراضی روی فراوانی و ترکیب جوامع باکتریایی خاک تأثیرگذار می‌باشد، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر تغییر کاربری اراضی (در ۴۰ سال اخیر از مراتع بوته‌زار به کشاورزی) روی فراوانی نسبی و ترکیب جوامع باکتریایی خاک در منطقه خشک و نیمه خشک دشت جیرفت با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها

معرفی منطقه مورد مطالعه: منطقه مورد مطالعه در دشت جیرفت (۶۵۰ متر ارتفاع از سطح دریا) قرار دارد. دشت جیرفت از جمله کم ارتفاع‌ترین دشت‌های داخلی ایران می‌باشد. این دشت دارای آب و هوای خشک می‌باشد و یکی از مهم‌ترین دشت‌های استان کرمان به لحاظ کشاورزی می‌باشد (Geography Organization of Armed Forces, 2005). منطقه مورد مطالعه (محدوده نمونه‌برداری خاک) در موقعیت جغرافیایی $29^{\circ} 31'$ تا $28^{\circ} 28'$ تا $28^{\circ} 33'$ شمالی و $57^{\circ} 52'$ تا $57^{\circ} 18/2'$ شرقی واقع شده است. بر اساس نقشه ۱:۱۰۰۰۰۰ مؤسسه تحقیقات خاک و آب، رژیم‌های رطوبتی و حرارتی خاک منطقه مورد مطالعه به ترتیب اریدیک^۱ و هایپرترمیک^۲ می‌باشند (Banaei, 2001). میانگین بارندگی سالیانه در این شهرستان ۱۴۰ میلی‌متر، میانگین رطوبت نسبی آن حدود ۵۵ درصد و بیشینه و کمینه دمای آن به ترتیب، ۴۸ و یک درجه سانتی‌گراد می‌باشند.

3-Aeronautical Reconnaissance Coverage Geographic Information System (ArcGIS)
4-Universal Transverse Mercator (UTM) coordinate system
5-Global Positioning System (GPS)

1-Aridic
2-Hyperthermic



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی کاربری‌های اراضی انتخاب شده در دشت جیرفت
Figure 1. Geographical location of the selected land uses in Jiroft plain

(قرائت با دستگاه فلیم فتومتر کورنینگ^۶ ۱۰۰، انگلستان) (Helmke & Sparks, 1996)، و عناصر کم‌مصرف (آهن، روی، منگنز و مس) قابل جذب گیاه در خاک (استخراج با عصاره‌گیر DTPA و قرائت با دستگاه جذب اتمی مدل AA3110، کمپانی پرکین‌المر^۷ آمریکا) اندازه‌گیری شدند (Lindsay & Norvell, 1978).

مقادیر میانگین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در سه کاربری اراضی مورد نظر در جدول ۱ ارائه شده است. بررسی دانه‌بندی خاک نشان داد که بافت لایه سطحی در کاربری باغ و زراعی کلاس لوم شنی^۸ و در کاربری بوته‌زار کلاس شن^۹ بود. به‌طور خلاصه در کاربری کشاورزی (باغ و زراعی) نسبت به مراتع بوته‌زار، مقادیر عناصر غذایی پرمصرف (نیترژن کل، فسفر قابل دسترس و پتاسیم قابل دسترس) و کم‌مصرف قابل دسترس (آهن، روی، منگنز و مس)، کربن آلی، سیلت، رس، هدایت الکتریکی عصاره اشباع (ECe)، کربنات کلسیم معادل (CCE) و رطوبت وزنی اولیه خاک بیش‌تر و مقادیر pH و شن کم‌تر بودند.

آنالیز آزمایشگاهی - الف) ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک: بخشی از نمونه‌ها برای استخراج DNA در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سایر نمونه‌ها پس از اندازه‌گیری درصد وزنی رطوبت اولیه خاک، هواخشک شده و بعد از کوبیده شدن با چکش پلاستیکی، از الک دو میلی‌متری عبور داده شدند. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مهم و تأثیرگذار خاک روی فراوانی و ترکیب جوامع باکتریایی با روش‌های معمول آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند؛ به‌طوری‌که بافت خاک با روش هیدرومتری^۱ (Bouyoucos, 1962)، کربنات کلسیم معادل^۲ به روش خنثی‌سازی با اسید کلریدریک و تیتراژ کردن با سود (Loeppert & Suarez, 1996)، نیترژن کل به روش کج‌دال^۳ (Bremner, 1960)، کربن آلی کل به روش والکلی - بلاک (Walkley & Black, 1934)، pH و هدایت الکتریکی^۴ به‌ترتیب در گل اشباع (Thomas, 1996) و عصاره اشباع خاک (Rhoades, 1996) (قرائت با دستگاه مولتی‌متر مدل WTW 340i، آلمان)، فسفر قابل جذب گیاه در خاک به روش اولسن و سامر (قرائت با دستگاه اسپکتوفتومتری مدل نوواسپکت^۵، انگلستان) (Olsen & Sommers, 1982)، پتاسیم قابل جذب گیاه در خاک به روش عصاره‌گیری با استات آمونیوم یک نرمال

6-Corning
7-PerkinElmer, Inc., USA
8-Sandy loam
9-Sand

1-Hydrometer
2-Calcium carbonate equivalent (CCE)
3-Kjeldahl
4-Electrical conductivity of soil saturation extract (ECe)
5-Pharmacia LKB. Novaspect II

جدول ۱- مقادیر میانگین برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف

Characteristic	Shrubland	Farmland	Orchard land
Total organic carbon (%)	0.04	0.07	0.17
CCE (%)	4.14	5.36	3.87
pH	8.09	7.91	7.71
ECe (dS m ⁻¹)	0.67	0.91	2.25
Sand (%)	97.11	70.23	54.23
Clay (%)	0.00	0.91	1.14
Silt (%)	2.89	28.86	44.63
Textural class	Sand	Sandy loam	Sandy loam
Initial moisture content (%)	1.85	6.78	12.24
Total N (%)	31.58	57.10	105.14
Available P (mg kg ⁻¹)	1.23	11.79	13.25
Available K (mg kg ⁻¹)	92.83	305.43	269.16
Available Fe (mg kg ⁻¹)	1.21	3.62	3.97
Available Zn (mg kg ⁻¹)	0.14	0.66	0.72
Available Mn (mg kg ⁻¹)	1.19	2.28	2.43
Available Cu (mg kg ⁻¹)	0.09	0.35	0.48

همگانی باکتریایی^۸ (341F/534R) که منطقه متغیر^۹ V3 (به طول تقریبی ۱۹۳ جفت باز^{۱۰}) توالی‌های 16S rDNA باکتریایی را تکثیر می‌کند (Muyzer *et al.*, 1993)، استفاده شد.

برای تهیه نمونه‌های استاندارد (پنج نمونه)، ابتدا مقادیر مساوی (دو میکرولیتر) از همه نمونه‌های DNA خاک (۱۲ نمونه از هر کاربری، مجموعاً ۳۶ نمونه) با هم مخلوط شدند و غلظت نمونه DNA مخلوط (۱۸ نانوگرم بر میکرولیتر) با نانودراپ تعیین شد. سپس پنج غلظت مختلف از نمونه DNA مخلوط، به‌عنوان نمونه‌های استاندارد در نظر گرفته شدند، که شامل دو، شش، ۱۸، ۳۶ و ۴۵ نانوگرم بر میکرولیتر بودند. به‌طوری‌که برای نمونه‌های استاندارد ۴۵ و ۳۶ به‌ترتیب ۲/۵ و دو میکرولیتر از نمونه استاندارد ۱۸ به‌عنوان الگوی اولیه برای تکثیر Real-time PCR استفاده شد. از نمونه استاندارد ۱۸، رقت یک سوم تهیه و نمونه استاندارد شش به‌دست آمد. هم‌چنین از نمونه شش، رقت یک سوم تهیه و نمونه استاندارد دو به‌دست آمد. از سه نمونه استاندارد ۱۸، شش و دو، یک میکرولیتر برای Real-time PCR استفاده شد (Bustin *et al.*, 2009).

واکنش‌های Real-time PCR در حجم نهایی^{۲۰} میکرولیتر به‌صورت دوتایی در پلیت ۹۶ چاهکی^{۱۱} انجام

(ب) استخراج DNA از نمونه‌های خاک: برای استخراج و خالص‌سازی DNA از نمونه‌های خاک از کیت نوکلئواسپین سویل^۱ با توجه به دستورالعمل شرکت^۲ تولید کننده آن استفاده شد. غلظت DNA های استخراجی از نمونه‌های خاک، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ^۳ کمپانی ترمو ساینتیفیک^۴ (مدل 2000c) و طول موج ۲۶۰ نانومتر، برحسب نانوگرم بر میکرولیتر تعیین شد. هم‌چنین برای بررسی کیفیت DNA های استخراجی، نسبت‌های جذب نوری DNA در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر (شاخص‌های میزان خلوص DNA)، اندازه‌گیری شدند (Knauth *et al.*, 2012).

(ج) آنالیز کمی روش Real-time PCR: آنالیز کمی Real-time PCR طبق روش منحنی استاندارد نسبی^۵ و با توجه به استاندارد MIQE^۶ انجام شد (Bustin *et al.*, 2009). با استفاده از این روش، مقایسه کمی غلظت نسبی و دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک به‌ترتیب برای مقایسه فراوانی نسبی و ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف با استفاده از دستگاه Real-time PCR (مدل^۷ ABI 7300) انجام شد. برای تکثیر قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک از جفت آغازگر

1-NucleoSpin® Soil kit

2-Macherey-Nagel, Duren, Germany

3.NanoDrop spectrophotometer

4-Thermo Scientific, Wilmington DE, USA

5-Relative standard curve method

6-Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

7-Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Thermo

Fisher Scientific corporation, USA

8-Universal bacterial primers

9-V3 hypervariable region

10-Base pairs (bp)

11-96 well plate

منحنی تکثیر را قطع می‌کند، چرخه آستانه^۸ یا Ct می‌نامند. Ct در واقع چرخه‌ای است که مقدار فلورسانس در ابتدای فاز نمایی منحنی تکثیر است. Ct با مقدار الگوی اولیه رابطه عکس دارد یعنی هرچه مقدار الگو برای تکثیر بیش تر باشد مقدار Ct کم تر است (Hoseini *et al.*, 2014). به منظور کمی‌سنجی فراوانی نسبی جوامع باکتریایی خاک، منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت DNA (محور افقی) و چرخه آستانه (Ct) (محور عمودی) ترسیم شد. از شیب منحنی استاندارد برای محاسبه راندمان واکنش تکثیری استفاده شد (Mamnoon *et al.*, 2015). هم‌چنین از چرخه‌های آستانه برای هر نمونه DNA خاک که به صورت دوتایی بود، میانگین گرفته شد و سپس با قرار دادن عدد محاسبه شده در معادله منحنی استاندارد، مقادیر الگوی اولیه (مشابه با واحدی که برای نمونه‌های استاندارد تعریف شده بود) برای نمونه‌های DNA خاک به دست آمد.

نتایج و بحث

ارزیابی غلظت و کیفیت DNA استخراج شده: نتایج حاصل از بررسی غلظت و کیفیت DNA های استخراج شده از نمونه‌های خاک سه کاربری اراضی به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که میانگین غلظت DNA در کاربری باغ (۳۰/۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر) بیش تر از کاربری زراعی (۱۲/۳۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و بوته‌زار (۷/۶۰ 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 ۱/۵۳، ۱/۵۶ و ۱/۶۱ بود. این نسبت برای DNA خالص باید بیش تر از دو باشد، اما تا حدود ۱/۵ قابل قبول است (Knauth *et al.*, 2012). مقادیر کم تر بیانگر مقادیر معنی‌داری از ناخالصی بوده و غلظت واقعی DNA کم تر از مقدار محاسبه شده است. هم‌چنین به غیر از ناخالصی هیومیک اسید، پروتئین، ساکارویدها و دیگر ناخالصی‌ها می‌توانند در مقادیر پایین این نسبت دخیل باشند. میانگین نسبت A260/A280

شدند. مواد مورد نیاز برای انجام واکنش شامل مستر میکس سایبرگرین^۱ (۱۰ میکرولیتر)، از آغازگرهای رفت (341F) و برگشت (534R) با غلظت ۱۰ میکرومولار (۱۰ پیکومول بر میکرولیتر) هر کدام ۰/۸ میکرولیتر، آب دیونیزه ۷/۴ میکرولیتر و DNA الگو یک میکرولیتر بودند (قابل ذکر است برای نمونه‌های استاندارد که مقدار DNA الگو بیش از یک میکرولیتر بود مخلوط واکنش جداگانه تهیه شد). اجزاء تشکیل دهنده مستر میکس سایبرگرین شامل TEMPase Hot Start DNA Polymerase، SYBER Green، DNTPs، Optimized buffer system و MgCl₂ بودند.

برنامه دو مرحله‌ای (تکثیر و ذوب) انجام واکنش به صورت ذیل تنظیم شد. مرحله واسرشت^۲ اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۴۰ چرخه شامل: مرحله واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال^۳ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش^۴ در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (اندازه‌گیری میزان فلورسنت در این دما انجام شد). هم‌چنین بلافاصله پس از اتمام مرحله تکثیر، الگوی ذوب قطعات تکثیر شده در شیب دمایی ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد (با اندازه‌گیری تغییرات فلورسنت نمونه‌ها در هر ۰/۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ ثانیه توقف در آن دما) بررسی و منحنی‌های ذوب توسط برنامه جانبی دستگاه Real-time PCR ترسیم شدند.

پس از پایان Real-time PCR، منحنی‌های تکثیر بررسی و حد مینا^۵ و آستانه^۶ تنظیم شدند. هر دستگاه از الگوریتم‌های مختلفی برای تعیین حد مینا و آستانه استفاده می‌کند. در این پژوهش حد مینا و آستانه به صورت خودکار و با استفاده از تنظیمات پیش فرض دستگاه تنظیم شدند. به طوری که حد آستانه در ابتدای فاز نمایی^۷ تکثیر (با راندمان تکثیر پایدار) در نظر گرفته شد. خط آستانه تنها از نقطه‌ای عبور می‌کند که این خط همه نمودارها را در فاز نمایی قطع کند، پس برای همه نمونه‌ها یک آستانه انتخاب شد. چرخه‌ای را که در آن خط آستانه

1. RealQ Plus 2x master mix green, Ampliqon, Denmark
2. Denaturation
3. Annealing
4. Extension
5. Baseline
6. Threshold line
7. Exponential phase

8-Threshold cycle (Ct)

میانگین نسبت‌های جذب نوری DNA (A260/A230 و A260/A280) نمونه‌های خاک هر سه کاربری اراضی در حد مطلوب بود. لذا DNA های استخراجی دارای مقدار کمی ناخالصی از جمله هیومیک اسید و پروتئین بودند.

برای نمونه‌های خاک کاربری باغ، زراعی و بوته‌زار به ترتیب ۱/۸۶، ۱/۸۸ و ۱/۸۴ بود. حد مطلوب این نسبت که بیانگر خلوص DNA است، بین ۱/۸-۱/۹ بایستی باشد. مقادیر کم‌تر از ۱/۸ بیانگر آلودگی پروتئین است و مقادیر بیش‌تر بیانگر آلودگی RNA می‌باشد (Hoshino & Matsumoto, 2007).

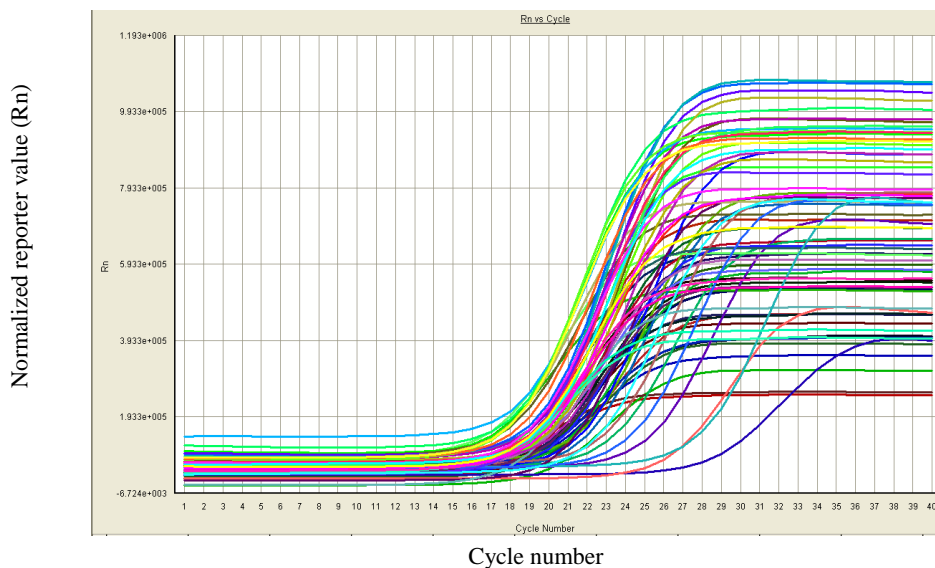
جدول ۲- ارزیابی غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های خاک در کاربری‌های اراضی مختلف

Table 2. Assessing the concentration and quality of DNA extracted from soil samples in the different land uses

Characteristic	Shrubland	Farmland	Orchard land
DNA concentration	7.60	12.30	30.10
260/230 nm absorbance ratio	1.61	1.56	1.53
260/280 nm absorbance ratio	1.84	1.88	1.86

بعدی، باید این منحنی‌ها بررسی شوند. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در همه نمونه‌ها تکثیر به خوبی صورت گرفته و در منحنی تکثیر هر نمونه می‌توان فازهای تکثیر را مشخص کرد.

بررسی منحنی‌های تکثیر، استاندارد و ذوب آنالیز کمی Real-time PCR (الف) منحنی‌های تکثیر: در شکل ۲ 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. پیش از انجام آنالیزهای



شکل ۲- منحنی‌های تکثیر حاصل از Real-time PCR برای قطعات 16S rDNA باکتریایی در نمونه‌های DNA خاک سه کاربری اراضی (محورهای X و Y به ترتیب تعداد چرخه و میزان فلورسانس نرمال شده (Rn) را نشان می‌دهند).

Figure 2. The amplification curves obtained from the Real-time PCR for bacterial 16S rDNA amplicons in soil DNA samples of three land uses (X- and Y-axes represent cycle number and normalized reporter value (Rn), respectively).

به طوری که این منحنی دارای شیب $3/44$ و پیوستگی (R^2) معادل $0/97$ و عرض از مبدأ برابر $25/37$ بود. میزان

(ب) منحنی استاندارد: پارامترهای مربوط به منحنی استاندارد (شکل ۳) مانند شیب و R^2 با مقادیر پیشنهاد شده و قابل قبول مطابقت داشت (Tevfik Dorak, 2007);

آنالیز واریانس ویژگی‌های بررسی شده با Real-time PCR: نتایج آزمون کولموگروف-اسمیرنوف^۷ برای بررسی توزیع نرمال داده‌های دو ویژگی مورد نظر (غلظت نسبی و دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک) نشان داد که داده‌های هر دو ویژگی از توزیع نرمال تبعیت نمی‌کنند. لذا از آزمون ناپارامتریک کروسکال والیس^۸ برای آنالیز واریانس استفاده شد (Mohammadi, 2006). نتایج آنالیز واریانس (در سطح آماری پنج درصد) نشان داد که کاربری اراضی روی غلظت نسبی و دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک تأثیر معنی‌دار داشت (جدول ۳). بنابراین در ادامه مقایسه میانگین‌ها با یکی از آزمون‌های مربوطه (جیمز-هاول^۹) انجام شد.

الف) غلظت نسبی قطعات 16S rDNA باکتریایی: نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین میانگین غلظت نسبی قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک در کاربری باغ (۱۵/۸۲) و بوته‌زار (۱۰/۱۲) تفاوت معنی‌دار وجود داشت (شکل ۵)، اما این ویژگی بین کاربری باغ و زراعی (۱۰/۳۳) و همچنین کاربری زراعی با بوته‌زار اختلاف معنی‌دار نداشت.

بررسی نتایج غلظت نسبی قطعات 16S rDNA باکتریایی در بین نمونه‌های خاک سه کاربری اراضی نشان دهنده این بود که فراوانی نسبی جوامع باکتریایی خاک در کاربری باغ بیش‌تر از دو کاربری دیگر است. از دلایل بیش‌تر بودن آن می‌توان به شرایط مساعد رطوبت خاک در کاربری باغ (در مقایسه با دو کاربری دیگر در تمام سال خاک از رطوبت کافی برخوردار است) اشاره کرد، که این شرایط باعث رشد و تکثیر بهتر باکتری‌های خاک شده و در نتیجه فراوانی نسبی آن‌ها بیش‌تر شده بود.

کارایی^۱ تکثیر انجام شده ۹۵ درصد بود. این معیارها نشان می‌دهند که این منحنی استاندارد از دقت و حساسیت لازم برای استفاده برای آنالیز کمی Real-time PCR برخوردار بود.

ج) تحلیل منحنی ذوب^۲: با تحلیل منحنی ذوب هر نمونه می‌توان وجود باندهای غیراختصاصی و دایمر پرایمر^۳ را تشخیص داد. همچنین با مقایسه منحنی‌های ذوب نمونه‌ها با هم موارد متفاوت مشخص می‌شوند. اساس این تست عمدتاً بر مبنای طول قطعه و درصد گوانین+سیتوزین^۴ (G+C) می‌باشد. با توجه به تفاوت در دمای ذوب مورد نیاز برای ذوب هر نوکلئوتید می‌توان با استفاده از تحلیل منحنی ذوب تفاوت‌های ژنتیکی نمونه‌ها را بررسی نمود (Noori-Dalooi & Faraji, 2016).

در شکل ۴ منحنی‌های ذوب نمونه‌های DNA خاک ارائه شده است. در منحنی‌های ذوب باید تنها یک اوج^۵ مشاهده شود. 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 دارا بوده و فقط قطعه اختصاصی مورد نظر (منطقه متغیر V3 توالی‌های 16S rDNA باکتریایی به طول تقریبی ۱۹۳ جفت باز) تکثیر یافته است.

هنگامی که منحنی‌های ذوب نمونه‌های خاک در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند، مشاهده می‌شود که پیک برخی از نمونه‌ها در دمای ذوب متفاوت رخ داده که نشان‌دهنده تفاوت در طول و درصد G+C قطعات تکثیر یافته در این نمونه‌ها است (Soni & Goel, 2010). لذا فرض شد که تحلیل دمای ذوب قطعات تکثیر شده 16S rDNA می‌تواند به‌عنوان یک ابزار غربال‌گری^۶ برای تعیین تغییرات در ترکیب جوامع باکتریایی بین نمونه‌های خاک کاربری‌های اراضی مختلف استفاده شود. این فرضیه با استفاده از بررسی ترکیب جوامع باکتریایی بین نمونه‌های خاک سه کاربری مورد نظر با استفاده از تحلیل دمای ذوب قطعات تکثیر شده 16S rDNA بررسی شد.

1-Efficiency= (10⁴-1/slope)-1)*100

2-Melting curve analysis

3-Primer dimer

4-Guanine plus Cytosine (G+C)

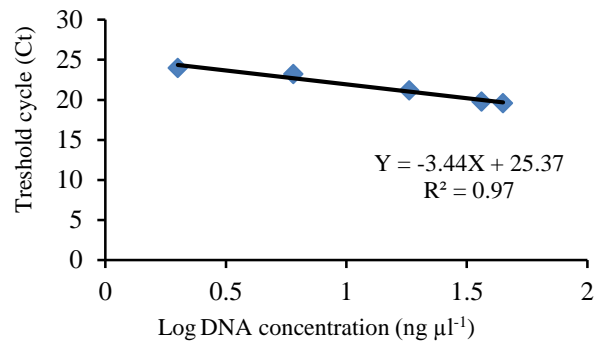
5-Peak

6-Screening

7-Kolmogorov-Smirnov test

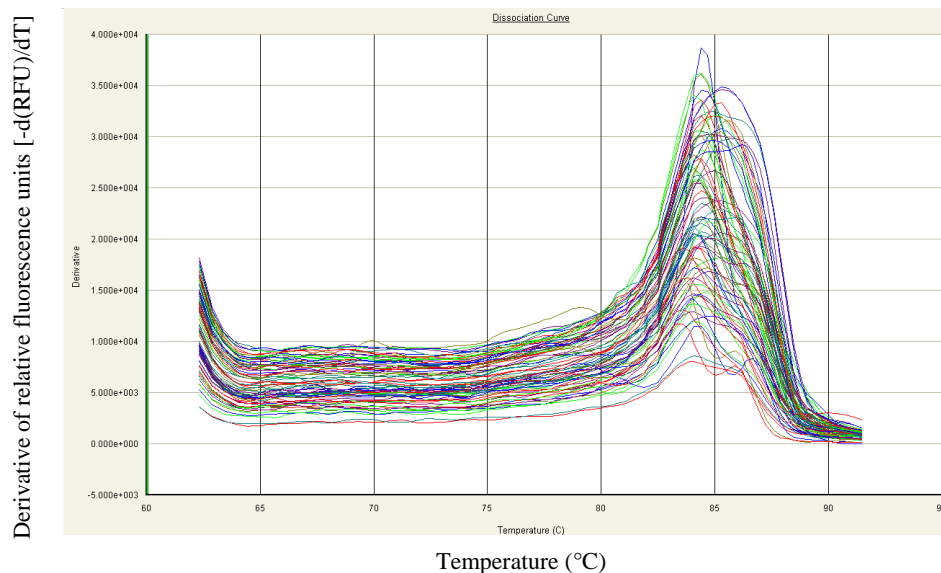
8-Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA

9-Games-Howell post-hoc test



شکل ۳- منحنی استاندارد برای کمی سازی نسبی قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک با Real-time PCR. منحنی به وسیله ترسیم مقادیر میانگین Ct در مقابل لگاریتم غلظت مشخص DNA ژنومیک خاک پنج نمونه استاندارد دو، شش، ۱۸، ۳۶ و ۴۵ نانوگرم بر میکرولیتر به دست آمد (آنالیز رگرسیون خطی معادله $Y = -3.44X + 25.37$ ($R^2 = 0.97$) را ارائه نمود).

Figure 3. Standard curve for relative quantification of soil bacterial 16S rDNA amplicons by real-time PCR. The curve was generated by plotting the means of the Ct values against the logarithm of a known concentration of genomic DNA from soil of five standard samples of 2, 6, 18, 36 and 45 ng/ μ l (Linear regression analysis rendered the equation $Y = -3.44X + 25.37$ ($R^2 = 0.97$)).



شکل ۴- 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 و مشتق تغییرات فلورسانس نسبی را نشان می دهند. شدت پیک در هر نمونه متناسب با مقدار قطعات تکثیر شده است).

Figure 4. The melting curves related to bacterial 16S rDNA amplicons of soil DNA samples in three land uses (X- and Y-axis represent temperature ($^{\circ}$ C) and derivative of relative fluorescence units [-d(RFU)/dT], respectively. The intensity of the peak in each sample is proportional to the amount of amplicons).

جدول ۳- آنالیز واریانس یک طرفه ناپارامتریک کروسکال-والیس ویژگی های اندازه گیری شده با Real-time PCR

Table 3. The Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA of the properties measured by Real-time PCR

Characteristic	Chi-square	Degrees of freedom	Monte Carlo significance testing
The relative concentration of 16S rDNA amplicons	9.04	2	0.008
The melting temperature of 16S rDNA amplicons	15.81	2	0.000

ترکیب جوامع باکتریایی، فراوانی آن‌ها نیز بین خاک ریزوسفری و خاک غیرریزوسفری تفاوت معنی‌دار داشت. (ب) **دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی:** نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین میانگین دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک در کاربری بوته‌زار با دو کاربری دیگر تفاوت معنی‌دار وجود داشت (شکل ۶).

یافته‌های پژوهش حاضر بر اساس دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک نشان داد که تغییر کاربری اراضی از مراتع بوته‌زار به کشاورزی (باغ و زراعی) سبب تغییر معنی‌دار در ترکیب جوامع باکتریایی خاک شده است. هرچند بین میانگین این ویژگی در کاربری باغ و زراعی تفاوت وجود داشت ولی این تفاوت در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار نبود. لذا می‌توان نتیجه گرفت نمونه‌های خاک کاربری باغ و زراعی نسبت به کاربری بوته‌زار دارای باکتری‌های مشابه بیش‌تری می‌باشند.

هلمز و همکاران (Hjelms *et al.*, 2014) ترکیب جوامع باکتریایی خاک را بین شش تیمار (علف‌کش و کود) مختلف با استفاده از سه روش تحلیل منحنی ذوب، DGGE و توالی‌یابی^۳ قطعات ژن 16S rRNA بررسی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که هر سه روش به‌طور مشابه‌ای توانستند میزان شباهت یا تفاوت بین تیمارهای مورد نظر را نشان دهند. هم‌چنین آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که تحلیل منحنی ذوب به‌دلیل سریع بودن و دقت کافی، می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مؤثر برای روش‌های مبتنی بر الکتروفورز ژل مانند DGGE که زمان‌بر و هزینه‌بر می‌باشند، به‌کار رود. هم‌چنین سونی و گل (Soni & Goel, 2010) از سه روش Real-time PCR، DGGE و کلونینگ^۴ 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. تفاوت ترکیب جوامع باکتریایی خاک در اراضی کشاورزی با مرتعی تحت تأثیر عوامل بسیاری است که در تعامل با یکدیگر می‌باشند. برای مثال خاک‌ها در کاربری‌های اراضی مختلف تحت پوشش گیاهی متفاوتی می‌باشند (Lauber *et al.*, 2013; Bevivino *et al.*, 2014). واید و همکاران (Waid *et al.*, 1999) بیان کردند که نوع پوشش

در راستای نتایج این پژوهش، در یک بوم‌سازگان نیمه‌خشک، دینگ و همکاران (Ding *et al.*, 2013) تأثیر تغییر کاربری (از اراضی بیابانی به مزارع کشاورزی) را بر فراوانی جوامع باکتریایی خاک مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که فراوانی جوامع باکتریایی خاک در اراضی کشاورزی بیش‌تر از اراضی بیابانی بود. هم‌چنین نتایج پژوهش کوبرل و همکاران (Koberl *et al.*, 20011) نشان داد که فراوانی جوامع باکتریایی خاک‌های تحت کاربری کشاورزی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از خاک‌های کشت نشده بیابانی بود. آن‌ها دلیل این تغییر را آبیاری پیوسته اراضی کشاورزی، تغییرات pH خاک، عملیات‌های مدیریتی کشاورزی از قبیل کاربرد کمپوست و هم‌چنین اثر ریزوسفر گیاه عنوان کردند.

باید توجه داشت که شباهت یا تفاوت در فراوانی جوامع باکتریایی خاک بین کاربری‌های اراضی مختلف به این معنی نیست که گونه‌های حاضر در این کاربری‌ها مشابه یا متفاوت می‌باشند (Ahmad Suleiman *et al.*, 2017).

نتایج احمد سلیمان و همکاران (Ahmad Suleiman *et al.*, 2017) که تغییرات فراوانی جوامع باکتریایی خاک را در اثر تغییر کاربری اراضی از جنگل به مرتع با Real-time PCR بررسی کرده بودند، نشان داد که فراوانی جوامع باکتریایی خاک بین دو کاربری جنگل و مرتع تفاوت معنی‌دار نداشت، اما ترکیب جوامع باکتریایی خاک که با روش^۱ RISA بررسی شده بود، تفاوت معنی‌دار نشان داد.

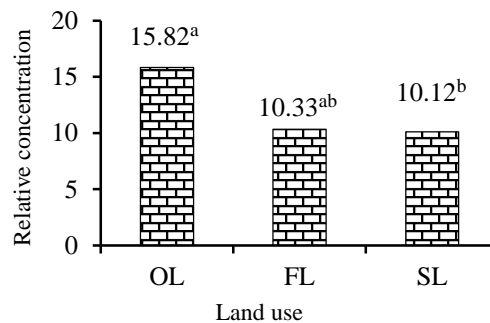
هم‌چنین نتایج پژوهش کریستوفورس و همکاران (Kristof Verthe *et al.*, 2003) (فراوانی و ترکیب متانوتروف‌ها را به‌ترتیب با استفاده از Real-time PCR و روش ژل الکتروفورز با شیب شیمیایی^۲ (DGGE) بین اراضی با و بدون کاربرد علف‌کش بررسی کرده بودند) نشان داد که فراوانی متانوتروف‌ها بین دو تیمار تفاوت معنی‌دار نداشت اما ترکیب این باکتری‌ها که با DGGE بررسی شده بود، تفاوت معنی‌دار نشان داد. از طرفی نتایج پژوهش حسین و همکاران (Hussain *et al.*, 2012) (فراوانی و ترکیب جوامع باکتریایی را به‌ترتیب با استفاده از Real-time PCR و DGGE در ریزوسفر برنج و خاک غیرریزوسفری بررسی کرده بودند) نشان داد که علاوه‌بر

3-454-based 16S rRNA gene amplicon sequencing
4-Cloning of 16S rRNA gene

1-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)
2-Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

عملیات‌های مدیریتی مختلف در یک کاربری می‌تواند ترکیب جوامع باکتریایی خاک را تحت تأثیر قرار دهد (Dong *et al.*, 2008; Lauber *et al.*, 2013). برای مثال نتایج تبه و اسکلاتر (Tebbe & Schloter, 2007) نشان داد تغییرات قابل توجهی در ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین مزارع تحت مدیریت مرسوم، مزارع تحت کشاورزی آلی کوتاه‌مدت و بلندمدت وجود داشت.

گیاهی، مقدار و نوع ترکیبات شیمیایی می‌توانند به‌عنوان فاکتورهای مهم، روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک اثرگذار باشند. همچنین بین کاربری‌های اراضی مختلف کیفیت و کمیت مواد آلی آزاد شده از ریشه گیاه در خاک می‌تواند متفاوت باشد، در نتیجه گونه‌های باکتریایی که با این محیط‌ها سازگار شده‌اند تفاوت‌های دارند (Xue *et al.*, 2006). حتی پژوهش‌های بسیاری نشان داده‌اند که کاربرد

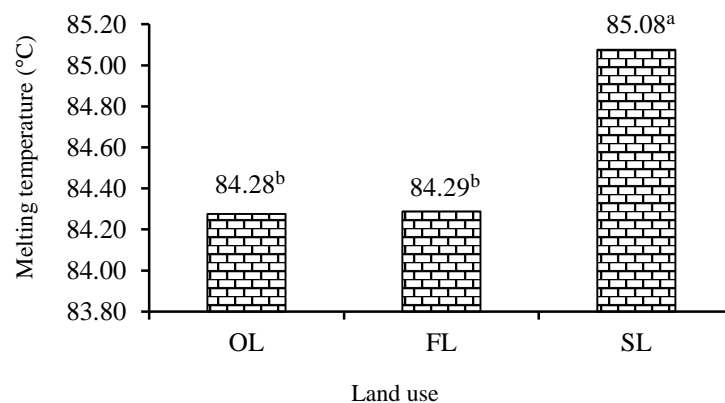


شکل ۵- مقادیر میانگین غلظت نسبی قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک در اراضی باغ (OL)، زراعی (FL) و بوته‌زار (SL)

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون جیمز-هاول اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) ندارند.

Figure 5. The mean values of relative concentration of soil bacterial 16S rDNA amplicons in orchard land (OL), farmland (FL) and shrubland (SL)

Means with common letters have no significant difference according to Games-Howell post-hoc test ($p < 0.05$).



شکل ۶- مقادیر میانگین دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک در اراضی باغ (OL)، زراعی (FL) و بوته‌زار (SL)

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون جیمز-هاول اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) ندارند.

Figure 6. The mean values of melting temperature of soil bacterial 16S rDNA amplicons in orchard land (OL), farmland (FL) and shrubland (SL)

Means with common letters have no significant difference according to Games-Howell post-hoc test ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

دیگر از جمله حاصلخیزی بیش‌تر خاک در اراضی باغ و زراعی نسبت به بوته‌زار بود. از طرفی، نتایج نشان داد که تغییر کاربری اراضی از مراتع بوته‌زار به کشاورزی سبب تغییر معنی‌دار در ترکیب جوامع باکتریایی خاک در هر دو کاربری باغ و زراعی شده است. هم‌چنین یافته‌ها نشان داد که شباهت یا تفاوت بین فراوانی جوامع باکتریایی خاک در بین کاربری‌های اراضی مختلف نمی‌تواند بازگوکننده ترکیب جوامع باکتریایی خاک باشد. به‌طوری‌که فراوانی نسبی جوامع باکتریایی خاک در کاربری زراعی و بوته‌زار تفاوت معنی‌دار نداشت ولی ترکیب جوامع باکتریایی بین این دو کاربری تفاوت معنی‌دار داشت. لذا بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، ترکیب جوامع باکتریایی خاک شاخص حساسی نسبت به تغییر کاربری اراضی می‌باشد.

در منطقه خشک و نیمه‌خشک دشت جیرفت، تغییر کاربری اراضی از مراتع بوته‌زار به باغ سبب افزایش فراوانی نسبی جوامع باکتریایی خاک شده است. عواملی از جمله فراهمی رطوبت خاک در اثر آبیاری و افزایش نسبی حاصلخیزی خاک (در اثر عوامل متعدد از جمله مصرف کودهای آلی و شیمیایی) منجر به رشد و تکثیر بهتر باکتری‌های خاک شده‌اند. عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین فراوانی نسبی جوامع باکتریایی خاک در کاربری بوته‌زار و زراعی (اراضی کاربری زراعی در چند سال اخیر به دلیل کمبود آب آبیاری در منطقه مورد نظر، حداقل در نیمی از سال، بهار و تابستان، تحت کشت نمی‌باشند) نشان داد که تأثیر شرایط رطوبتی روی این مشخصه بیش‌تر از عوامل

References

- 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.
- Banaei, H.M. 2001. Map of Iran's soil resources and talent. *Soil and Water Research Institute*, Iran. (In Persian)
- Bevivino A., Paganin P., Bacci G., Florio A., Pellicer M.S., Papaleo M.C., Mengoni A., Ledda L., Fani R., Benedetti A., and Dalmasri C. 2014. Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLOS ONE*, 9(8): e105515.
- Bouyoucos G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal*, 54: 464-465.
- Bremner J.M. 1960. Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*, 55: 11-33.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. and Wittwer C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611-622.
- Curtis T.P., Sloan W.T., and Scannell J.W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 10494-10499.
- 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.
- Dong X., Ying Y.H., Yong G.E., and Yong H.C. 2008. Soil microbial community structure in diverse land use systems: A comparative study using Biolog, DGGE, and PLFA analyses. *Pedosphere*, 18(5): 653-663.
- 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.
- 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 and Environmental Microbiology*, 73: 2093-2100.
- Geography Organization of Armed Forces. 2005. Gazetteer of villages in Kerman province: the city of Jiroft. Vol. 5. 506p. (In Persian)
- 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.

- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., and Williams P.M. 1996. Real-time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994.
- 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.
- Hermansson A., and Lindgren P-E. 2001. Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 972-976.
- 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.
- Hoseini M., Montazeri F., Foroughmand A.M., Dehghani M.R., and Ghadimi H.R. 2014. Introduction to Genetic Testing – Applications, Advantages and Disadvantages. *Genetics in the Third Millennium*, 12(2): 3544-3563. (In Persian)
- 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.
- 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.
- Hussain Q., Pan G.X., Liu Y.Z., Zhang A., Li L.Q., Zhang X.H., and Jin Z.J. 2012. Microbial community dynamics and function associated with rhizosphere over periods of rice growth. *Plant, Soil and Environment*, 58: 55-61.
- Jangid K., Williams M.A., Franzluebbers A.J., Sanderlin J.S., Reeves J.H., Jenkins M.B., Endale D.M., Coleman D.C., and Whitman W.B. 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2843-2853.
- Kamaa M., Mburu H., Blanchart E., Chibole L., Chotte J.L., Kibunja C., and Lesueur D. 2011. Effects of organic and inorganic fertilization on soil bacterial and fungal microbial diversity in the Kabete long term trial, Kenya. *Biology and Fertility of Soils*, 47: 315-321.
- Kennedy A.C., and Gewin V.L. 1997. Soil microbial diversity: present and future considerations. *Soil Science*, 162: 607-617.
- 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.
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257-260.
- 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.
- Koberl M., Muller H., Ramadan E.M., and Berg G. 2011. Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. *PLOS ONE*, 6(9): e24452.
- 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.
- Kristof Verthe D.S., Reheul D., Bulcke R., Siciliano S.D., Verstraete W., and Top E.M. 2003. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 46: 139-146.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- Mamnoon B., Naserpour Farivar T., and Karimi Arzenani M. 2015. Application of Rapid and Sensitive Real Time PCR Technique in Detection of DNA Impurities in Recombinant Interferon. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 4(4): 382-391. (In Persian)
- 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.
- Miethling R., Ahrends K., and Tebbe C.C. 2003. Structural differences in the rhizosphere communities of legumes are not equally reflected in community level physiological profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1405-1410.
- Mohammadi J. 2006. Pedometrics, Vol 1: Classical statistic. *Pelk press*, Iran, 250p. (In Persian)
- 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.
- Nagy M.L., Perez A., and Garcia-Pichel F. 2005. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert (Organ Pipe Cactus National Monument, AZ). *FEMS Microbiology Ecology*, 54: 233-245.
- Noori-Dalooi M.R., and Faraji K. 2016. High Resolution Melt Analysis (HRM) and its Strategic Applications Especially in Molecular Genetics. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences*, 22(1): 77-88. (In Persian).
- 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.
- Peixoto R.S., Coutinho H.L.D., Rumjanek N.G., Macrae A., and Rosado A.S. 2002. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 316-320.
- Ranjard L., Lejon D.P.H., Mougél C., Schehrer L., Merdinoglu D., and Chaussod R. 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5: 1111-1120.
- 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.
- Soni R., and Goel R. 2010. Triphasic approach to assessment of bacterial population in different soil systems. *Ekologija*, 56: 99-104.
- Tabatabaei M., and Pourmazaheri H. 2013. Metagenomics and its application in identification of genetic diversity of microbial ecosystems. *Modern Genetics Journal*, 7(4): 313-324. (In Persian)
- 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.
- Tevfik Dorak, M. (Ed.). 2007. Real-time PCR. *CRC Press, Taylor and Francis Group*, UK, 333p.
- 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.
- Waid J.S. 1999. Does soil biodiversity depend upon metabiotic activity and influences? *Applied Soil Ecology*, 13: 151-158.
- 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.
- Wang G., Liu J., Qi X., Jin J., Wang Y., and Liu X. 2008. Effects of fertilization on bacterial community structure and function in a black soil of Dehui region estimated by Biolog and PCR-DGGE methods. *Acta Ecologica Sinica*, 28: 220-226.
- 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.
- 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.
- Yao H., Bowman D., and Shi W. 2006. Soil microbial community structure and diversity in a turfgrass chronosequence: land-use change versus turfgrass management. *Applied Soil Ecology*, 34: 209-218.

The Impact of Land Use on the Relative Abundance and Composition of Soil Bacterial Communities

Ghobad Jalali¹, Amir Lakzian^{2*}, Alireza Astaraei³, Aliakbar Haddad-Mashadrizheh⁴, Mehdi Azadvar⁵, Eisa Esfandiarpour⁶

(Received: April 2017

Accepted: January 2018)

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 relative abundance and composition of soil bacterial communities by using Real-time PCR, a study was carried out in three different land uses (orchard land, farmland and shrubland) in Jiroft plain, Iran. Number of 12 surface soil samples were collected from each land use and some soil physicochemical properties were measured. The NucleoSpin[®] Soil kit was used for extraction and purification of DNA from soil samples. Quantitative comparison of the concentration and melting temperature of 16S rDNA amplicons, respectively, for assessment of the relative abundance and composition of soil bacterial communities in different land uses were performed by using Real-time PCR system and based on the relative standard curve method. The results related to the concentration and quality of soil DNA indicated that extraction of DNA from soil samples by using NucleoSpin[®] Soil kit was favorable. As the results of Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA, land use had significant effect on the relative abundance and composition of soil bacterial communities at the level of 5%. Means comparison showed that the relative abundance of soil bacterial communities in orchard land use was higher than that of two other land uses. Furthermore, the composition of soil bacterial communities in orchard and farm land uses was significantly different from shrub one. It can be concluded that land-use changes in Jiroft plain from shrubland to orchard land, and from shrubland to orchard land and farmland have caused an increase in the relative abundance as well as a significant change in the composition of soil bacterial communities, respectively.

Keywords: Genomic DNA from soil, Jiroft plain, Soil bacterial 16S rDNA, Real-time PCR,

Jalali G., Lakzian A., Astaraei A., Haddad-Mashadrizheh A., Azadvar M. and Esfandiarpour E. 2019. The impact of land use on the relative abundance and composition of soil bacterial communities. *Applied Soil Research*, 7(1): 1-15.

1. Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad

2. Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad

3. Associate Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad

4. Assistant Professor, Department of Biology, Ferdowsi University of Mashhad

5. Assistant Professor, Department of Plant Protection, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center

6. Associate Professor, Department of Soil Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan

* Corresponding Author: Email lakzian@um.ac.ir.