مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ٦، شماره ۲، پاییز و زمستان ٩٦
صفحه ۳۰۷-۲۹۳

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

# بررسی تاثیر قارچکش ایپرودیون–کاربندازیم (رورال تی اس) بر ساختار جمعیت باکتری‌های ریزوسفر خیار به روش Illumina MiSeq sequencing

# Evaluation of the effects of fungicide Iprodione-Carbendazim (Rovral TS) on cucumber rhizosphere bacterial structure by Illumina MiSeq sequencing

رباب اعزازی[۱]، مسعود احمدزاده*[۱]، محمد جوان‌نیکخواه[۱]، رضا صالحی محمدی[۲]، کلادیو دوناتی[۳]

Ezazi Robab[1], Ahmadzadeh Masoud [1]*, Javan Nikkhah Mohammad [1], Salehi Mohammadi Reza[2] and Donati Claudio[3]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استاد گروه گیاهپزشکی، ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۳- استاد زیست‌شناسی محاسباتی، موسسه ادموند ماخ، سان‌میکله، ترنتو، ایتالیا

1- Ph.D. Student, Professor and Professor of Plant Pathology, Respectively, 2- Assistant Professor of Horticultural Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

3 Computational Biology Unit, Fondazione Edmund Mach, San Michele all' Adige, Trento, Italy

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ahmadz@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹٦/۱۱/۱٦ – تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۲۹)

## چکیده

**مطالعه تاثیرات قارچکش‌ها بر جوامع میکروبی ریزوسفر و خاک به دلیل نقش مهم و برجسته میکروارگانیسم‌ها در سلامت گیاه و خاک، بسیار حائز اهمیت است. در این پژوهش، تاثیر قارچکش رورال تی اس بر دینامیک و ساختار جمعیت باکتری‌های ریزوسفر خیار به روش توالی‌یابی نسل بعدی مبتنی بر ژن 16S rRNA (ناحیه V4) با استفاده از روش Illumina MiSeq sequencing، در سه مرحله رشدی گیاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از بین ۲٦ شاخه و ۳۵۲ جنس باکتریایی شناسایی شده برای ۱۸ نمونه، در مجموع شاخه Proteobacteria و جنس *Pseudomonas* بیشترین فراوانی را داشتند. کاربرد قارچکش رورال تی اس سبب تغییر در ساختار و دینامیک جمعیت باکتریایی شد؛ کاهش فراوانی نسبی جنس *Pseudomonas* در مرحله اواسط گلدهی در تیمار قارچکش و مرحله آخر گلدهی در نمونه‌های شاهد مشاهده شد. علاوه بر این، فراوانی نسبی جنس‌های *Sphingopyxis*، *Sphingobacterium* و *Chryseobacterim* در گیاهان تیمار شده با قارچکش در هر سه مرحله، بیشتر از گیاهان شاهد بود. تجزیه و تحلیل شاخص‌های تنوع نشان داد که در مجموع خاک ریزوسفری گیاهان شاهد از تنوع بیشتری نسبت به خاک ریزوسفری گیاهان تیمار شده با رورال‌تی‌اس برخوردار بودند (شانون=۵/۳۳)، ولی از نظر غنای گونه سهم خاک مربوط به تیمار رورال تی‌اس بیشتر بود (Chao1=۲٤۳٤/۱۷). علاوه بر این، مرحله رشدی گیاه بر تعداد OTU، شاخص تنوع و غنای گونه‌ای (صرفنظر از نوع تیمار)، معنی‌دار بوده و خاک ریزوسفری گیاهان در مرحله قبل از گلدهی از بیشترین تعداد OTU، تنوع و غنا برخوردار می‌باشد.**

**واژه‌های کلیدی**

باکتری،
خیار،
قارچکش،
متاژنومیکس،

## مقدمه

در کشاورزی مدرن، قارچکش‌ها به صورت گسترده به منظور کنترل بیماری‌های قارچی گیاهان استفاده می‌شوند. قارچکش‌ها براساس سرکوب کردن سوخت‌وسازهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی قارچ‌های بیمارگر طراحی شده‌اند، بنابراین تاثیر آنها بر میکروارگانیسم‌های غیرهدف ساکن خاک نیز دور از انتظار نیست (Yu *et al.* 2009). ایپرودیون-کاربندازیم با نام تجاری رورال تی اس (Rovral TS) طیف اثر گسترده‌ای علیه اکثر قارچ‌های واقعی داشته و یکی از پرمصرف‌ترین قارچکش‌ها جهت کنترل طیف وسیعی از بیماری‌های قارچی در مزارع و گلخانه‌های ایران محسوب می‌شود. رورال تی اس ترکیبی از دو قارچکش ایپرودیون (۳۷٪) و کاربندازیم (۱۷٫۵٪) می‌باشد (Jafari *et al.* 2017)؛ ایپرودیون قارچکشی تماسی از گروه دی‌کربوکسیمید بوده که از سنتز گلیسرول و رشد هیف از طریق اختلال در انتقال سیگنال ممانعت می‌کند. کاربندازیم قارچکشی سیستمیک از گروه بنزیمیدازول بوده و از طریق جلوگیری از سنتز بتاتوبولین و در نتیجه ممانعت از تقسیم میتوز، مانع از رشد قارچ می‌شود (Yang *et al.* 2011).

جوامع میکروبی خاک، به واسطه دخالت در چرخه عناصر غذایی و بیوشیمیایی، پایداری دراز مدت خاک و مقاومت در برابر فرسایش نقش مهمی در بهبود کیفیت خاک ایفا می‌کنند (Topp 2003; Prashar *et al.* 2014). در محیط ریزوسفر، میکروارگانیسم‌ها از طریق معدنی‌کردن عناصر، سرکوب بیمارگرها، افزایش تحمل به استرس گیاه و تولید تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، تاثیرات مثبتی بر سلامت گیاه می‌گذارند (Figueiredo *et al.* 2011; Berendsen *et al.* 2012). در سیستم‌های کشاورزی این تاثیرات مثبت بر سلامت گیاه منجر به افزایش عملکرد می‌شود.

نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که مصرف کاربندازیم سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های نیتروژناز (Chalam *et al.* 1996)، دهیدروژناز و فسفاتاز (Sousa *et al.* 2004) خاک می‌شود. مطالعه شاخص تنوع باکتری‌ها در خاک تیمار شده با کاربندازیم با استفاده از تکنیک‌های DGGE و TGGE نشان داد که مصرف مداوم کاربندازیم سبب کاهش تنوع جامعه میکروبی خاک می‌شود (Wang *et al.* 2009a; 2012). ایپرودیون یک قارچکش پرمصرف بوده و بقایای آن در آب (Sauret *et al.* 2006)، خاک (Leistra & Matser 2004) و محصولات زراعی و باغی (Angioni *et al.* 2012) گزارش شده است. طبق گزارش سازمان کشاورزی آمریکا در سال ۲۰۱٤ (U.S. Department of Agriculture, 2014) ایپرودیون به عنوان فراوان‌ترین ماده شیمیایی در میوه‌های وارداتی آمریکا ردیابی شد. تحقیقات انجام گرفته در رابطه با تاثیر ایپرودیون روی جمعیت میکروبی بیانگر تغییر ساختار جمعیت میکروبی به واسطه کاربرد ایپرودیون می‌باشد؛ Wang و همکاران (2004) تغییر تنوع جمعیت میکروبی با استفاده از تکنیک DGGE را گزارش کردند. آنالیز فلورسین دی استات ((fluorescein (FDA diacetate) کاهش فعالیت میکروبی و آنالیز فسفولیپید اسید چرب (PLFAs) کاهش تنوع میکروبی را با کاربرد ایپرودیون که به منظور کنترل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی سیر استفاده شده بود، را نشان داد (Minambres *et al.* 2010). در تحقیقی جامع، Zhang و همکاران (2017) گزارش کردند که کاربرد مکرر ایپرودیون سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های خاک شامل بتاگلوکوسیداز (β-glucosidase)، اوره‌از (urease)، اسید فسفاتاز (acid phosphatase)، آلکالین فسفاتاز (alkaline phosphatase) و آریل‌سولفاتاز (arylsulphatase) شده است؛ همچنین نتایج پی‌سی‌آر کمی با استفاده از ژن 16S rRNA، بیانگر کاهش فراوانی جمعیت باکتری‌ها خاک در مقایسه با نمونه شاهد بود. بررسی‌های بیشتر با استفاده از روش Illumina MiSeq نشان داد که کاربرد ایپرودیون سبب افزایش گروه پروتئوباکتریا (Proteobacteria) و کاهش اسیدوباکتریا (Acidobacteria) و کلروفلکسی (Chloroflexi) شده است.

روش‌های بررسی تنوع میکروبی بسیار متنوع می‌باشد؛ ساده‌ترین و ابتدایی‌ترین روش، استفاده از محیط کشت انتخابی و شمارش مستقیم سلول‌های زنده می‌باشد (Tabacchioni *et al.* 2000). اما با این روش منحصرا جمعیت هتروتروف باکتری‌ها که فقط نزدیک به یک درصد از جمعیت باکتری‌های خاک را تشکیل می‌دهند، مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (Schloss & Handelsman

(2005. امروزه با توسعه تکنیک‌های توالی‌یابی با توان بالا یا توالی‌یابی نسل بعدی (Next-Generation Sequencing: NGS)، امکان مطالعه تنوع و ترکیب جوامع باکتری‌هایی با استفاده از مواد ژنتیکی آنها بدون استفاده از روش‌های کشت آزمایشگاهی میسر شده است (Will *et al.* 2010). ژن 16S rRNA به عنوان یک ژن کلیدی و مارکر، در مطالعه تنوع فیلوژنتیکی و ساختار تاکسونومیکی پروکاریوت‌ها (باکتری‌ها و آرکی‌باکتری‌ها) به کار می‌رود (Langille *et al.* 2013)؛ علاوه بر این، توالی‌یابی نسل بعدی مبتنی بر ژن 16S rRNA، در مطالعات اکولوژی میکروبی با استفاده از دانش متاژنومیکس به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Oulas *et al.* 2015).

براساس بررسی‌های انجام شده، تاکنون نقش قارچکش ایپرودیون-کاربندازیم بر جمعیت میکروبی خاک و ریزوسفر صورت نگرفته است. این قارچکش، با نام تجاری رورال تی اس، به دلیل طیف تاثیر گسترده، یکی از پرمصرف‌ترین قارچکش‌ها در گلخانه‌های خیار در ایران محسوب می‌شود. در گلخانه‌های خیار منطقه ورامین، از این قارچکش به منظور مبارزه با بیماری‌های خاکزاد، برای ضدعفونی کردن خاک (قبل و بعد از انتقال نشا) استفاده می‌شود. در این تحقیق، تاثیر قارچکش ایپرودیون-کاربندازیم بر دینامیک و ساختار جمعیت باکتری‌های ریزوسفر خیار به روش توالی‌یابی نسل بعدی مبتنی بر ژن 16s rRNA در سه مرحله رشدی گیاه مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### آماده‌سازی گلخانه، اعمال تیمار و پرورش گیاهان در شرایط گلخانه

در این تحقیق، از خاک مزرعه با سابقه کشت خیار (مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، واقع در محمدشهر کرج) برای کشت گیاهان خیار استفاده شد. ابتدا خاک از عمق ۰-۳۰ سانتیمتری مزرعه جمع‌آوری و به گلخانه تحقیقاتی منتقل شد. قبل از کشت گیاهان، نمونه خاک جهت تعیین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی به آزمایشگاه خاکشناسی جهاد دانشگاهی ارسال شد. گلدان‌های پلاستیکی ۱۰ لیتری (با قطر ۲۵ و ارتفاع ۳۰ سانتیمتر) با خاک پر شده و یک عدد بذر خیار، رقم storm، برای هر گلدان در نظر گرفته شد. در این تحقیق از قارچکش ایپرودیون-کاربندازیم با نام تجاری رورال تی اس تهیه شده از شرکت آریا شیمی استفاده شد؛ بدین منظور، چند روز قبل از کاشت بذر، گلدان پر شده با خاک با محلول یک در هزار قارچکش رورال تی اس (مقدار توصیه شده و مورد استفاده در گلخانه) آبیاری شده و سپس اقدام به کشت مستقیم بذر خیار گردید. آبیاری با محلول قارچکش ۲۰ روز بعد از کاشت بذر تکرار شد. در تیمار شاهد آبیاری با آب معمولی انجام شد. نگهداری از گیاهان در شرایط گلخانه (دمای ۲۵±۳ °C) انجام شد و آبیاری و کوددهی (با استفاده از کود کامل NPK) و سمپاشی علیه آفات (با استفاده از سم ایمیداکلوپراید (کنفیدور) برای کنترل مگس سفید) برای رشد مطلوب انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح بلوک کاملا تصادفی شامل دو تیمار و در سه تکرار که هر تکرار سه مشاهده‌ای (شامل سه گلدان) بود، انجام شد.

### نمونه‌برداری از خاک ریزوسفر

نمونه‌برداری در سه مرحله (قبل از گلدهی، اواسط گلدهی و پایان برداشت) انجام شد. به منظور به دست آوردن خاک ریزوسفری در هر مرحله، ریشه گیاه از گلدان خارج گردیده و با تکان دادن، خاک‌های غیرریزوسفری حذف شدند (به دلیل برداشت کامل سیستم ریشه گیاه، نمونه‌برداری در هر مرحله از گلدان‌های متفاوت انجام شد). سپس ریشه به همراه خاک چسبیده به آن که خاک ریزوسفری می‌باشد، در لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی بافر فسفات استریل قرار داده شده و با استفاده از دستگاه ورتکس تکان داده شدند، سپس بقایای ریشه برداشته شده و محلول گل‌آلود با دور ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و رسوب به‌دست آمده به عنوان خاک ریزوسفری به فریزر ۸۰- °C منتقل شده و تا زمان استخراج DNA در آنجا نگهداری شد (Li *et al.* 2014). در مجموع ۱۸ نمونه خاک ریزوسفری حاصل شد که نه عدد مربوط به گیاهان شاهد و نه عدد مربوط به گیاهان تیمارشده با رورال تی اس بودند (هر نمونه خاک ریزوسفری، مجموع خاک ریزوسفری سه گیاه بود).

**استخراج DNA، تکثیر ناحیه V4 ژن 16S rRNA و توالی‌یابی Illumina MiSeq**

استخراج DNA کل، از ۲۵۰ میلی‌گرم خاک ریزوسفری با استفاده از کیت استخراج DNA از خاک (Power soil DNA extraction MO BIO, USA)، مطابق دستور شرکت سازنده انجام شد. سپس کیفیت و غلظت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل ND-8000 8-Sample Spectrophotometer) تعیین شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- °C نگهداری شد. به منظور بررسی ساختار جمعیت باکتری‌های ریزوسفری، ناحیه V4، ژن 16S rRNA با استفاده از آغازگر مستقیم 515F modified (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) و آغازگر معکوس 806R modified (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) (Walters et al. 2015) در دستگاه ترموسیکلر مطابق دستورالعمل ارائه شده شرکت Illumina تکثیر شد؛ برنامه حرارتی تکثیر شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه و سپس ۲۵ چرخه با برنامه ۳۰ ثانیه در ۹۵ °C، ۳۰ ثانیه در ۵۵ °C و ۳۰ ثانیه در ۷۲ °C بود و در پایان نگهداری به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ °C به منظور بسط نهایی انجام گرفت؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ µl شامل ۵ µl از هر آغازگر (۱ ng/µl)، ۱۲/۵ µl از محلول آماده 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix، ۲/۵ µl از DNA (۵ ng/µl) انجام شد.

پس از اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، لازم است قطعات اضافی پرایمر و همچنین قطعات پرایمر-دایمر از محصول PCR حذف شوند، بدین منظور مرحله پاکسازی (PCR Clean- Up 1) با استفاده از کیت AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, USA) مطابق پروتوکل ارائه شده توسط شرکت سازنده، حذف شده و قطعه تکثیر شده V4 خالص‌سازی می‌شود. در مرحله بعد، توالی‌های الحاقی (آداپتور) و شاخص‌ها (indices) با استفاده از کیت Nextera XT Index Kit طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به انتهای قطعات تکثیر شده و خالص‌شده V4 متصل می‌شوند. بدین ترتیب که ابتدا ۵ µl از محصول PCR خالص‌سازی شده به عنوان DNA الگو برداشته و سپس ۵ µl از آغازگرهای ایندکس ۱ و ۲، ساخت شرکت ایلومینا با توالی و کد مشخص، به همراه ۲۵ µl از محلول آماده PCR " x KAPA HiFi HotStart ReadyMix 2" و ۱۰ µl آب مقطر استریل اضافه شد؛ اسامی نمونه‌ها و کد آغازگرهای ایندکس در جدول ۱ آورده شده است (لازم به یاداوری است که توالی آغازگرهای ایندکس ۱ و ۲ برای هر نمونه اختصاصی هستند و به عنوان بارکد اختصاصی برای تفکیک و شناسایی نمونه‌ها استفاده می‌شود). برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مشابه برنامه مورد استفاده در مرحله اول بود، با این تفاوت که تعداد چرخه‌ها به ۸ چرخه کاهش یافته بود. سپس مرحله PCR Clean- Up 2 به منظور عاری‌سازی قطعه تکثیر شده V4 که توالی‌های آداپتور به آن در مرحله قبلی متصل شده‌اند، انجام شد. پس از انجام هر PCR و عمل PCR Clean-Up، کیفیت و اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از دستگاه TapeStation System 2000 اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که یک میکرولیتر از محصول PCR با سه میکرولیتر از بافر مخصوص با نام D1000 Sample Buffer مخلوط و به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه ورتکس تکان داده شدند، سپس میکروتیوب حاوی DNA و بافر در دستگاه TapeStation System 2000 قرار داده می‌شود. اندازه، غلظت و کیفیت نمونه بارگذاری شده به صورت جدول و گراف‌هایی به‌واسطه نرم‌افزار نصب شده (TapeStation Analysis Software) قابل رویت می‌باشد.

## نتایج

**همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن *SQS1***

نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز استخراج RNA نشان داد که RNA کیفیت خوبی دارد. در PCR با استفاده از cDNA بیان کننده ژن، تنها یک باند به‌طول تقریبی ۱۲۴۲ bp تشکیل شد که مطابق با طول قطعه مورد انتظار (شکل ۱، الف) و نشان‌دهنده اختصاصی بودن آغازگرها بود. آزمون غربالگری سریع از بین همسانه‌های رشد کرده در محیط حاوی آمپی‌سیلین انجام شد. همسانه‌هایی که نتیجه غربالگری سریع آن‌ها مثبت بوده و بالاتر از ناقل خالی قرار داشتند، با استفاده از Colony PCR برای ورود ژن *SQS1* نیز تأیید شدند. برش آنزیمی دوگانه DNA پلاسمیدی با دو آنزیم *Xba*I و *Bam*HI نیز باند ۱۲۴۲ bp را نشان داد (شکل ۱،ب).

نتایج توالی‌یابی قطعه همسانه‌سازی شده نشان داد، cDNA بیان کننده ژن *SQS1* به‌طور کامل جداسازی شده است. توالی با کدون ATG آغازشده و با کدون TAG خاتمه یافته و یک پروتئین ٤١٣ اسیدآمینه‌ای را بیان می‌کند. یافته‌های کامل این توالی در بانک داده NCBI ثبت و با شماره دسترسی KT987235.1 در دسترس است. این ژن ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به سکوالن سینتاز گونه *glabra* ثبت‌شده در NCBI به شماره دسترسی D86409.1 و BAA13083.1 دارد. نتایج هم‌ردیف سازی چندگانه توالی اسیدآمینه‌ای و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با SQS سایر گیاهان با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 با روش nieghbor joining انجام شد و نتایج درخت فیلوژنتیکی نشان داد که بیشترین تشابه را با SQS1 جنس *Glycyrrhiza* دارد (شکل ۲).

**بررسی بیوانفورماتیکی پروتئین SQS1**

نتایج تجزیه با نرم‌افزار Protparam نشان داد فرمول مولکولی توالی پروتئینی SQS1، $C_{2117}H_{3359}N_{567}O_{602}S_{27}$ است. وزن مولکولی محاسبه‌شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی‌شده این توالی به‌ترتیب ٤٧/٣ کیلودالتون و ٨/١٨ است. شاخص ناپایداری پروتئین ٤٣/٢٠ محاسبه شد که جزء پروتئین‌های ناپایدار است (شاخص پروتئین‌هایی پایدار کمتر از ٤٠ است) و ممکن است پروتئین برای پایداری نیاز به پردازش بعد از ترجمه داشته باشد. شاخص آلیفاتیک، به‌عنوان یک عامل مهم در ارزیابی مقاومت پروتئین در برابر حرارت، ۹۷/۷۷ محاسبه شد. متوسط میزان آبدوستی-آب‌گریزی ۰/۰٦۷- است. از مجموع کل اسیدهای آمینه، ٤٨ اسیدآمینه بار منفی (Asp + Glu) و ٥١ اسیدآمینه بار مثبت (Arg + Lys) دارند. الگوی آب‌گریزی-آبدوستی با نرم‌افزار ProtScale به روش (Kyte and Doolittle, 1982) نشان داد که کمترین امتیاز ۲/٤٧٨- در موقعیت ۳۵۱ (پرولین) و بیشترین امتیاز ۳/۹۱۱ در موقعیت ۳۹۵ (لوسین) زنجیره پلی‌پتیدی است. دمین‌های آب‌گریز در بالا و دمین‌های آب‌دوست در زیرخط صفر قرار دارند (شکل ۳، الف). الگوی آب‌گریزی-آبدوستی نقش مهمی در پیش‌بینی ساختار دوم و تقسیم نواحی عملکردی پروتئین دارد. بررسی ساختار دوم پروتئین با نرم‌افزار SOPMA نشان داد که این پروتئین دارای ۲۸۲ مارپیچ α (٦٨/٢٨ درصد)، ۳۱ رشته قابل‌تعمیم (۷/۵۱ درصد)، ۱۹ پیچ β (٤/٦٠ درصد) و ۸۱ پیچ تصادفی (۱۹/٦۱ درصد) است. بررسی جایگاه درون-سلولی با نرم‌افزار Softberry، نشان داد که محل فعالیت پروتئین در ارتباط با شبکه آندوپلاسمی است. برنامه SignalP نسخه چهار وجود سیگنال پپتیدی در پروتئین را مشخص نکرد.

**جدول ۱**- لیست نمونه‌های DNA و آغازگرهای مورد استفاده در Index-PCR

**Table1**- List of DNA samples and primers used in Index-PCR

| DNA sample | Index Primers | DNA sample | Index Primers | DNA sample | Index Primers |
|---|---|---|---|---|---|
| CB1* | N719_S505 | CE1 | N720_S502 | FM1 | N716_S506 |
| CB2 | N719_S506 | CE2 | N720_S503 | FM2 | N716_S507 |
| CB3 | N719_S507 | CE3 | N720_S505 | FM3 | N716_S508 |
| CM1 | N719_S508 | FB1 | N716_S502 | FE1 | N716_S510 |
| CM2 | N719_S510 | FB2 | N716_S503 | FE2 | N716_S511 |
| CM3 | N719_S511 | FB3 | N716_S505 | FE3 | N718_S502 |

*: C: نمونه‌های شاهد، F: نمونه‌های روورال تی اس، B: نمونه‌های قبل از گلدهی، M: نمونه‌های اواسط دوره گلدهی، E: نمونه‌های آخر دوره گلدهی

*: C: Control samples, F: Rovral TS samples, B: Before flowering samples, M: Middle of flowering samples, E: End of flowering samples

در ادامه DNA بارکددار خالص شده به نسبت ۱:۱۰۰۰ با استفاده از TE 1X و ماده فلورومتریک پیکوگرین رقیق شده و قرائت غلظت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه BioTek Synergy 2 در طول موج nm ٤٨٥ اندازه‌گیری و با استفاده از نرم‌افزار Gen5 به صورت جدول دریافت گردید. در مرحله بعد به منظور تهیه کتابخانه NGS، غلظت تمامی نمونه‌های DNA با استفاده از TE 1X تا غلظت ng/ml ۲۵ رقیق و دوباره غلظت با استفاده از از دستگاه BioTek Synergy 2 بررسی شد؛ سپس µl ۵ از هر نمونه برداشته و در یک ویال با بقیه نمونه‌ها مخلوط و کیفیت و میانگین اندازه قطعه DNA کتابخانه تهیه شده با استفاده از دستگاه TapeStation System 2000 اندازه‌گیری شد. قبل از ارسال کتابخانه تهیه شده برای توالی‌یابی، تعیین کیفیت و غلظت DNA آن با تکنیک Real-Time PCR و با استفاده از کیت KAPA Library Quantification انجام شد (Anonymous, 2013). توالی یابی کتابخانه DNA، با روش paired-end sequencing با استفاده از تکنولوژی ایلومینا (Illumina Miseq) در مرکز زیست‌شناسی دانشگاه ترنتو (CIBIO, University of Trento-Italy) انجام شد.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها**

پس از دریافت نتایج توالی‌یابی، پردازش داده‌های خام با استفاده از نرم‌افزار MICCA (Version 1.6.0) انجام شد (Albanese *et al.* 2015). ابتدا حذف توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس، غربالگری کیفی و حذف خوانش‌های کوتاه، کلاستربندی با روش denovo_greedy انجام شد و واحدهای تاکسونومیکی کاربردی (OTUs: operational taxonomic units) با آستانه همسانی ٪۹۷ مشخص شد؛ شناسایی توالی‌های مربوط به هر OTU با استفاده از RDP (Ribosomal Database Project) و به روش همردیف‌سازی چندگانه (MSA) انجام شد. همچنین شاخص‌های تنوع آلفا و بتا با استفاده از نرم‌افزار آماری R، بسته‌های phyloseq، ggplot2 و vegan (McMurdie & Holmes 2013) محاسبه و نمودارهای مربوط رسم گردید.

**ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مورد استفاده**

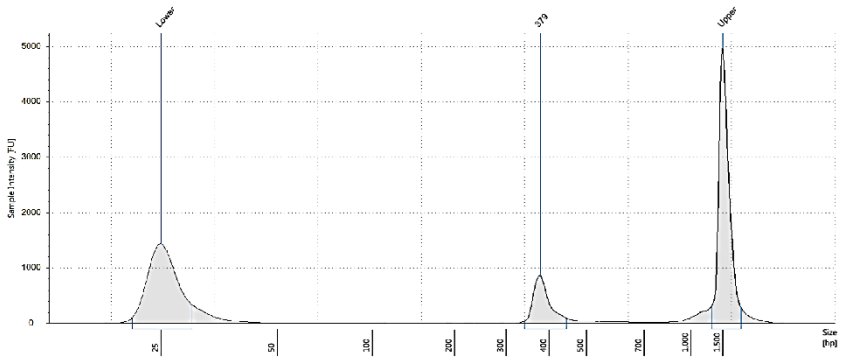
با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیزهای شیمیایی و فیزیکی نمونه‌های خاک مورد آزمایش، بافت خاک رسی-لومی، pH خاک ۷/۵، هدایت الکتریکی ۱/۳ دسی‌زیمنس بر سانتیمتر، درصد کربن آلی و مواد آلی به ترتیب ۲/۳ و ۹/۳ ٪، نیتروژن کل ۰/۲، فسفر و پتاسیم قابل جذب به ترتیب ٦٨/٣ و ٢٤٥/٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بود.

## نتایج

**نتایج حاصل از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز**

استفاده از دستگاه TapeStation System 2000 به منظور اندازه‌گیری کیفیت و اندازه قطعه تکثیر شده در مقایسه با الکتروفورز روش بسیار سریع و دقیقی می‌باشد. گراف به دست آمده از اولین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تکثیر قطعه‌ای به طول ۳۷۹bp و غلظت ng/µl ۱/۷۳ که مربوط به ناحیه V4 ژن 16S rRNA می‌باشد، را نشان می‌دهد (شکل ۱a)؛ شکل ۱b ، مربوط به Index-PCR است که وجود قطعه‌ای به طول bp ٤٣٤ را نشان می‌دهد، افزایش طول قطعه به دلیل اضافه‌شدن قطعات الحاقی در این مرحله می‌باشد. گراف حاصل از Real Time PCR در واقع میانگین طول ناحیه V4 همراه با توالی‌های الحاقی، در کتابخانه تهیه شده را نشان می‌دهد (شکل ۱c).

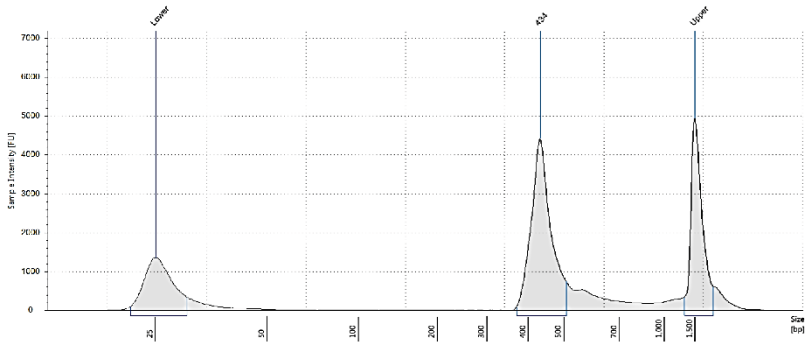
a)




**Sample Table**

| Well | Conc. [ng/µl] | Sample Description | Alert | Observations |
|---|---|---|---|---|
| A1 | 1.73 | Robab per pur A1 V4 | ⚠ | Caution! Expired ScreenTape |

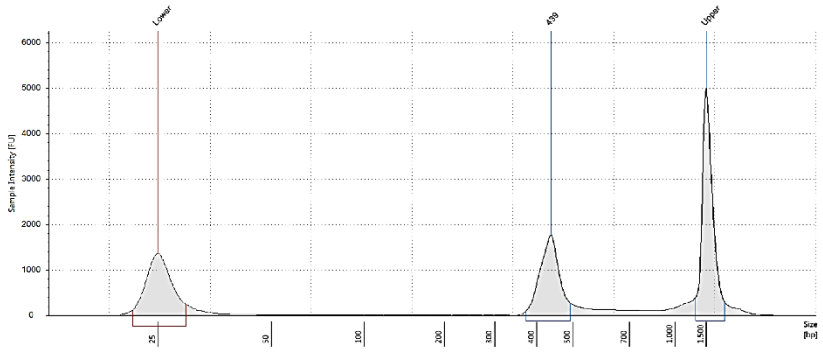
b)




**Sample Table**

| Well | Conc. [ng/µl] | Sample Description | Alert | Observations |
|---|---|---|---|---|
| A1 | 10.0 | Lib Robab index pur V4 A1 | ⚠ | Caution! Expired ScreenTape |

c)




**Sample Table**

| Well | Conc. [ng/µl] | Sample Description | Alert | Observations |
|---|---|---|---|---|
| A1 | 4.23 | Pool Robab V4 | ⚠ | Caution! Expired ScreenTape |

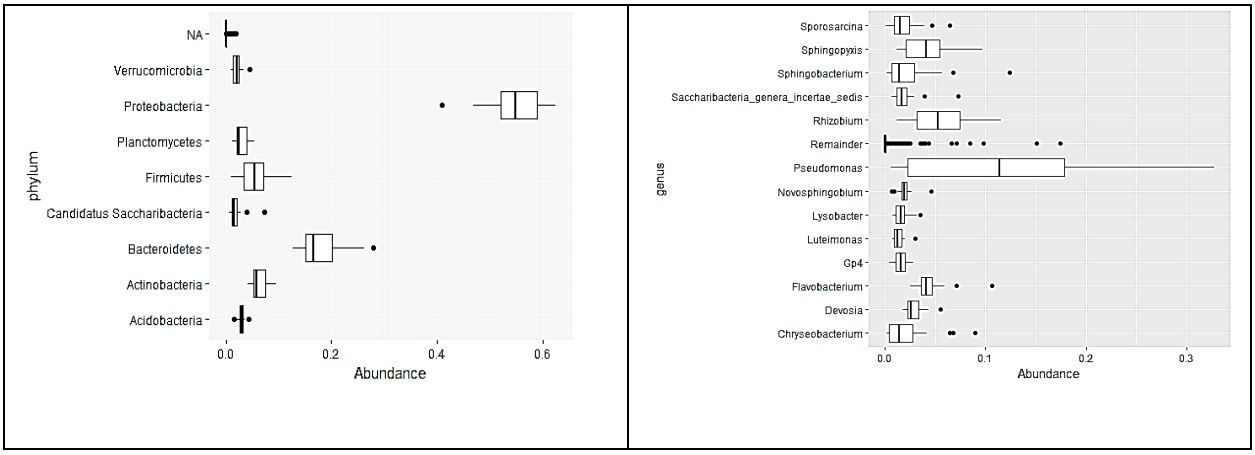
**شکل ۱**- گراف به دست آمده از دستگاه TapeStation System 2000 ؛ قطعه تکثیر شده به طول bp ۳۷۹ مربوط به ناحیه V4 ژن 16s rRNA (a)؛ قطعه تکثیر شده به طول bp ٤٣٤ مربوط به Index-PCR (b)؛ قطعه‌ای به طول bp ٤٣٩ مربوط به میانگین کتابخانه تهیه شده (c)

**Fig. 1**- Graph derived from TapeStation System 2000; an amplicon with 379 bp refer to V4 region of 16s rRNA gene (a); an amplicon with 434 bp refer to Index-PCR (b); an amplicon with 439 bp refer to mean of prepared library (c)

### ترکیب جمعیت باکتری‌های ریزوسفر خیار در تیمار رورال‌تی‌اس و شاهد

مجموعا ۷۱۸۰۶۳ خوانش (Read) از ناحیه V4 ژن 16S rRNA (میانگین ۳۹۸۹۲ خوانش به ازای هر نمونه) از توالی‌یابی نمونه‌های خاک ریزوسفری با استفاده از سیستم توالی‌یابی Illumina Miseq حاصل شد. تجزیه و تحلیل توالی‌های به دست آمده نشان می‌دهد برای ۱۸ نمونه، مجموعا ٤٥٨٠ واحد تاکسونومیکی کاربردی (OTU) حاصل شد که متعلق به ۲٦ شاخه و ۳۵۲ جنس باکتریایی می‌باشند. اعضای شاخه Proteobacteria بیشترین فراوانی را داشته و در میان جنس‌های باکتریایی، جنس *Pseudomonas* غالب بود (شکل ۲).

ساختار و فراوانی جمعیت باکتری‌های ریزوسفر گیاهان شاهد و تیمار شده با قارچکش رورال تی اس در سطح رده و جنس، در شکل ۳ نشان داده شده است.




**شکل ۲**- مقایسه فروانی نسبی مهم‌ترین شاخه‌های باکتریایی (سمت چپ) و جنس‌های باکتریایی (سمت راست). نمودار براساس فراوانی نسبی OTU های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار R، رسم شده است.

**Fig. 2**. Comparing relative abundance of the most important bacterial phylum (left side) and bacterial genus (right side). The graphs was created based on relative abundance of OUTs using R software.

تنوع رده‌ها و جنس‌های باکتریایی و تفاوت در فراوانی آنها در گیاهان شاهد و تیمار و هم از نظر دوره‌های نمونه‌برداری، در تصویر کاملا مشهود است. شکل ۳a، فراوانی نسبی دوازده رده مهم را نشان می‌دهد، ملاحظه می‌شود نمونه‌های شاهد در مرحله اواسط گلدهی و اواخر گلدهی به ترتیب از بیشترین و کمترین فراوانی نسبی اعضای شاخه Proteobacteria برخوردار هستند. رده Alphaproteobacteria و سپس Gammaproteobacteria بیشترین فراوانی را در بین اعضای شاخه Proteobacteria را داشته و رده Betaproteobacteria با فراوانی کمتری ردیابی شدند. فراوانی نسبی باکتری‌های رده Bacilli در نمونه‌های تیمار رورال تی اس کمتر از نمونه‌های شاهد بوده و بیشترین فراوانی آن مربوط به نمونه‌های شاهد در مرحله آخر گلدهی می‌باشد. نکته قابل توجه دیگر، حضور باکتری‌های متعلق به شاخه Candidatus Saccharibacteria با فراوانی بیشتر در نمونه‌های تیمار شده با رورال تی اس در مرحله اواسط گلدهی در مقایسه با گیاهان شاهد می‌باشد.

بررسی نمودار فراوانی جنس‌های باکتریایی (شکل ۳b) نشان می‌دهد در مرحله قبل از گلدهی در هر دو تیمار (CB و FB) فراوانی جنس *Pseudomonas*، بسیار پایین می‌باشد، در مرحله اواسط گلدهی، به طور محسوس فراوانی جمعیت این جنس افزایش پیدا کرده، اما ملاحظه می‌شود افزایش فراوانی جنس *Pseudomonas* در تیمار قارچکش، کمتر از تیمار شاهد می‌باشد. در مرحله آخر گلدهی، فراوانی جمعیت *Pseudomonas* کلنیزه کننده ریزوسفر در گیاهان تیمار شده با قارچکش بیشتر از گیاهان شاهد می‌باشد. جنس مهم دیگر از گروه آلفاپروتئوباکتریا، جنس *Rhizobium* می‌باشد که همانند جنس سودوموناس در مرحله قبل

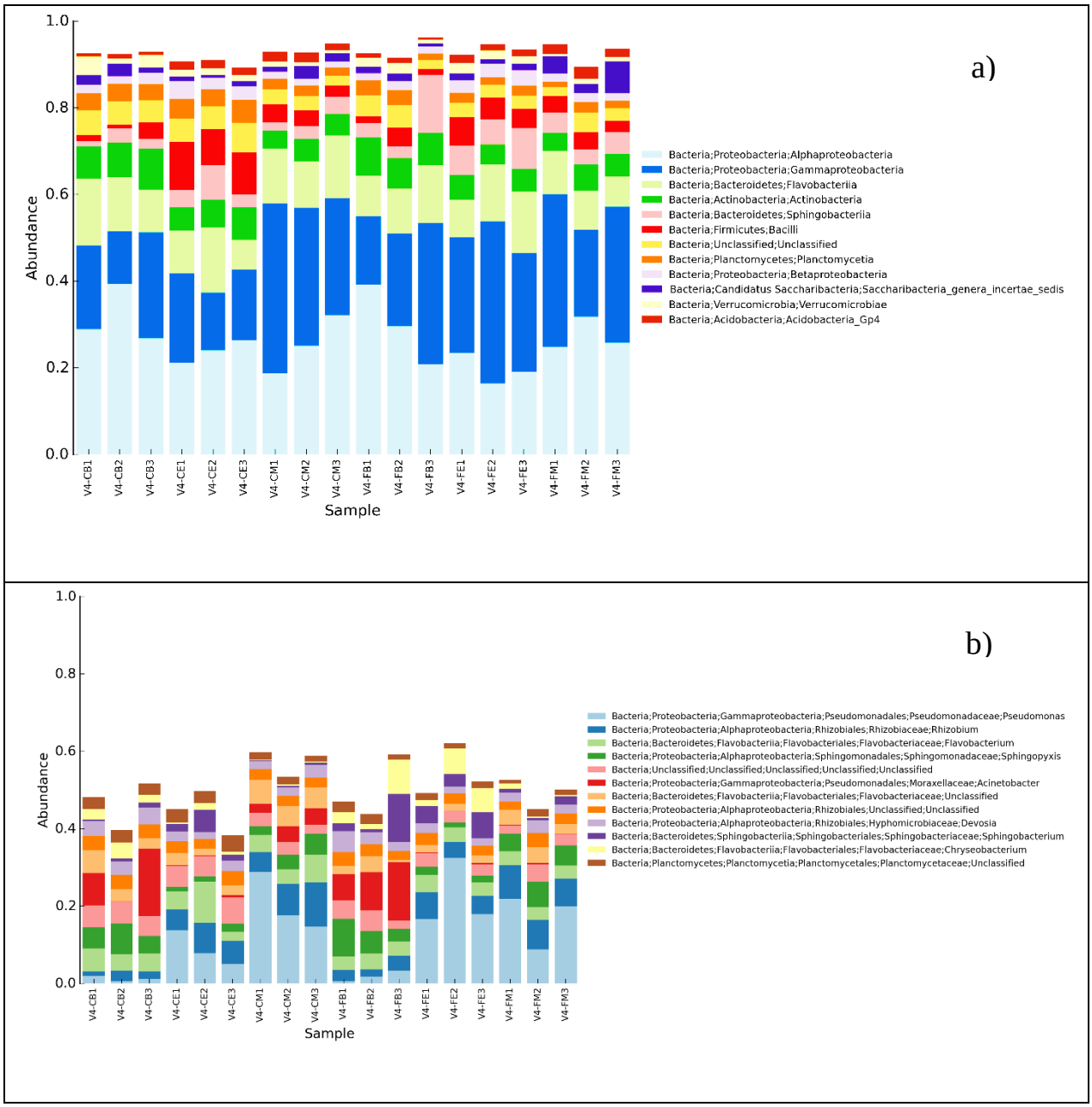
از گلدهی با جمعیت کمتری در ناحیه ریزوسفر حضور داشته اما با گذشت زمان، در هر دو تیمار جمعیت این جنس افزایش پیدا می‌کند به طوری که بیشترین فراوانی نسبی در محله اواسط گلدهی دیده می‌شود. جمعیت این جنس در مرحله آخر گلدهی کاهش پیدا کرده و در تیمار شاهد بیشتر از تیمار قارچکش می‌باشد. نمودار نشان می‌دهد که فراوانی جنس *Flavobacterium* در هر سه مرحله رشدی در هر دو تیمار تغییری پیدا نکرده است ولی فراوانی نسبی آن در تیمار قارچکش در هر سه مرحله کمتر از گیاهان شاهد می‌باشد. جنس مهم دیگر از گروه پروتئوباکتریا، خانواده Sphingomodanaceae، جنس *Sphingopyxis* می‌باشد که ملاحظه می‌شود در هر دو تیمار با گذشت زمان فراوانی آن کاهش پیدا کرده است و بیشترین فراوانی در مرحله قبل از گلدهی مشاهده می‌شود؛ در مرحله اواسط گلدهی، فراوانی این جنس در تیمار قارچکش بیشتر از تیمار شاهد می‌باشد. در مرحله آخر جمعیت این جنس در تیمار قارچکش و شاهد تفاوت مشهودی نشان نمی‌دهد. جنس *Acinetobacter* از رده گاماپروتئوباکتری در اوایل دوره رشدی با جمعیت خوبی در ریزوسفر گیاهان، اعم از شاهد و تیمار شده با قارچکش حضور داشته اما با گذشت زمان جمعیت آن به شدت کاهش پیدا کرده است؛ طوری که فراوانی نسبی در مرحله اواسط گلدهی در تیمار قارچکش بسیار ناچیز بوده، اما در تیمار شاهد، فراوانی این جنس بسیار بیشتر از تیمار قارچکش می‌باشد.

اعضای یک جنس طبقه بندی نشده متعلق به خانواده Flavobactericeae، بیشترین فراوانی را در مرحله اواسط گلدهی داشته و در مرحله آخر گلدهی جمعیت آن کاهش پیدا کرده است، این روند در هر دو تیمار برقرار بوده ولی در مجموع فراوانی این گروه در تیمار شاهد بیشتر از گیاهان تیمار شده با رورال‌تی‌اس بود. در مورد راسته Rhizobiales ملاحظه می‌شود جنس *Devosia* و یک جنس طبقه‌بندی نشده (unclassified) در مرحله قبل از گلدهی ریزوسفر گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با رورال تی اس را با جمعیت خوبی کلنیزه کرده، اما با گذشت زمان جمعیت آنها در ریزوسفر کاهش پیدا کرده است. جنس *Sphingobacterium* در گیاهان شاهد در مرحله آخر گلدهی، بیشترین فراوانی را دارد و جمعیت آن در مراحل قبل و اواسط گلدهی بسیار ناچیز می‌باشد. در تیمار قارچکش نیز چنین نتیجه‌ای صادق می باشد با این تفاوت که فراوانی جمعیت آن در گیاهان تیمارشده با قارچکش به نسبت بیشتر از مرحله مشابه در گیاهان شاهد می‌باشد.

جنس *Chrysobacterium* (از شاخه Bacterioidetes) در تیمار شاهد در مرحله قبل از گلدهی با فراوانی بیشتری در ریزوسفر ردیابی شد ولی در مرحله اواسط گلدهی، جمعیت آن به شدت کاهش پیدا کرد. در مرحله آخر گلدهی، افزایش کمی در جمعیت آن مشاهده می‌شود. در تیمار قارچکش جمعیت این جنس با فراوانی بیشتری در مرحله قبل و آخر گلدهی در ریزوسفر گیاهان تیمار شده با قارچکش ردیابی شد ولی همانند گیاهان شاهد در مرحله اواسط گلدهی جمعیت آن خیلی پایین است.

**تنوع و غنای گونه در خاک ریزوسفر گیاهان شاهد و تیمار شده با رورال‌تی‌اس**

به منظور بررسی تنوع درون جمعیت (alpha diversity) شاخص‌های shanon، Chao1 و تعداد OTU مشاهده شده محاسبه شد (Lemos *et al*. 2011)؛ مقادیر این شاخص‌ها برای نمونه‌های مورد بررسی در جدول ۲ آورده شده است؛ گیاهان شاهد در مرحله قبل از گلدهی (CB) بیشترین میانگین شاخص تنوع (shanon=۵/٦۲) و غنای گونه (Chao1=۲٦۵۲/۸) را داشته و گیاهان شاهد در مرحله اواسط گلدهی (CM) کمترین این مقادیر را دارا می‌باشد. در مجموع خاک ریزوسفری گیاهان شاهد از تنوع بیشتری نسبت به خاک ریزوسفری گیاهان تیمار شده با رورال تی اس برخوردار بودند (shanon=۵/۳۳)، ولی از نظر غنای گونه سهم خاک مربوط به تیمار رورال تی اس بیشتر بود (Chao1=۲٤۳٤/۱۷). همچنین ملاحظه می‌شود تاثیر زمان نمونه‌برداری بر تعداد OTU، شاخص تنوع و غنای گونه‌ای (اعم از نوع تیمار)، معنی‌دار بوده و خاک ریزوسفری گیاهان در مرحله قبل از گلدهی از بیشترین تعداد OTU، تنوع و غنا برخوردار می‌باشد؛ مقادیر این شاخص‌ها در مرحله اواسط گلدهی بسیار کاهش پیدا کرده و حتی نسبت به مرحله آخر گلدهی نیز کمتر می‌باشد (جدول ۲).




**شکل ۳**- فراوانی نسبی رده‌های باکتریایی (a) و جنس‌های باکتریایی (b) غالب درون و بین تیمارهای مختلف

*: C: نمونه‌های شاهد، F: نمونه‌های روورال تی اس، B: نمونه‌های قبل از گلدهی، M: نمونه‌های اواسط دوره گلدهی، E: نمونه‌های آخر دوره گلدهی

**Fig. 3.** Relative abundance of dominant bacterial class (a) and bacterial genus (b) within and between different treatments
*: C: Control samples, F: Rovral TS samples, B: Before flowering samples, M: Middle of flowering samples, E: End of flowering samples

همچنین تنوع بین جمعیت‌ها (beta diversity) با استفاده از روش Bray-Curtis (Gower and Blasius, 2005) بررسی شد. شکل ٤ نمودار تجزیه مولفه اصلی (PCA) به روش فوق را نشان می‌دهد. ملاحظه می‌شود جمعیت‌های باکتریایی براساس زمان‌های مختلف رشدی گیاه (قبل از گلدهی، اواسط و آخر گلدهی) به خوبی از هم تفکیک شده‌اند. علاوه براین، تفکیک نمونه‌های تیمار شاهد از تیمار قارچکش در مرحله آخر گلدهی واضح می‌باشد.

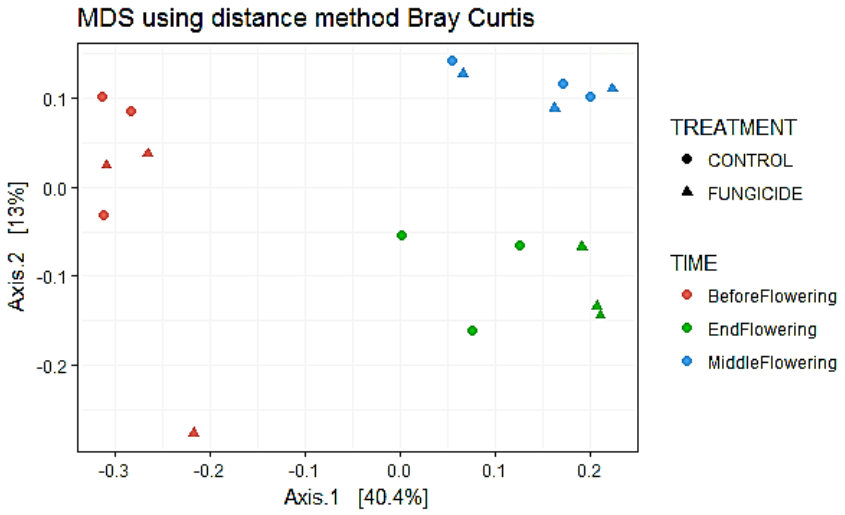
**جدول ۲**- شاخص‌های مربوط به تنوع (alpha diversity) در نمونه‌های مختلف

**Table 2**- diversity indices (alpha diversity) in different samples

| treatment | observed OTU | Chao1 | Shannon |
|---|---|---|---|
| CB* | 2147 | 2652.8 | 5.62 |
| CM | 1525 | 2090.61 | 4.81 |
| CE | 1906 | 2423.69 | 5.57 |
| FB | 2184 | 2633 | 5.26 |
| FM | 1796 | 2304.1 | 4.94 |
| FE | 1760 | 2365.36 | 4.82 |
| Total C | 1859.33 | 2389 | 5.33 |
| Total F | 1913.33 | 2434.17 | 5.01 |
| Total BF | 2165.5 | 2642.92 | 5.44 |
| Total MF | 1660.5 | 2197.36 | 4.87 |
| Total EF | 1833 | 2394.52 | 5.19 |

*: C: نمونه‌های شاهد، F: نمونه‌های رورال‌تی‌اس، B: نمونه‌های قبل از گلدهی، M: نمونه‌های اواسط دوره گلدهی، E: نمونه‌های آخر دوره گلدهی اعداد به صورت میانگین گزارش شده‌اند.

*: C: Control samples, F: Rovral TS samples, B: Before flowering samples, M: Middle of flowering samples, E: End of flowering samples




**شکل ٤**- نمودار تحلیل مولفه اصلی (PCA) براساس ماتریس فاصله Bray-Curtis

**Fig. 4**. Principal components analysis (PCA) based on Bray-Curtis distance matric

## بحث

جوامع میکروبی خاک از اجزاء مهم اکوسیستم‌های خاکی بوده و نقش مهمی در تجزیه مواد آلی و چرخه عناصر غذایی ایفا می‌کنند و در نتیجه محتوای عناصر خاک و به دنبال آن، حاصلخیزی خاک را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Rutigliano *et al.* 2004)؛ از طرفی بسیاری از فعالیت‌های انسانی از قبیل شیوه‌های مدیریت زمین‌های کشاورزی روی فراوانی، ساختار، فعالیت و تنوع جوامع باکتریایی خاک تأثیر می‌گذارند (Zhang *et al.* 2004). ریزوسفر یکی از محیط‌های بسیار پیچیده زیستی می‌باشد و به دلیل غنی بودن از مواد غذایی، تراکم میکروبی در آن بسیار

بالا است. باکتری‌ها فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های ریزوسفر می‌باشند و با جمعیت بیش از $10^8$ CFU به ازای هر گرم خاک ریشه در آن حضور دارند (Egamberdieva *et al*. 2008). امروزه توالی‌یابی نسل بعدی با استفاده از ژن 16S rRNA برای مطالعه و مقایسه جوامع میکروبی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد، توالی‌یابی با استفاده از فن‌آوری Illumine MiSeq و به روش Paired-end sequencing به دلیل در اختیار قرار دادن داده‌های زیاد با هزینه نسبی کم و کیفیت بالا یکی از رایج‌ترین و بهترین روش‌های مورد استفاده می‌باشد (Tremblay *et al*. 2015).

نتایج این تحقیق بیانگر تغییر در فراوانی جنس‌ها و رده‌های باکتری‌های ریزوسفر خیار با کاربرد رورال تی اس می‌باشد؛ در مجموع، اعضای شاخه‌های Proteobacteria و Bacteridetes بیشترین فراوانی را در ریزوسفر خیار داشتند (شکل۳). برخی از اعضای این دو شاخه از نظر اکولوژیکی در گروه copiotrophic قرار دارند و فراوانی اعضای این دو شاخه به غنی بودن محیط ریزوسفر از کربن آلی که ماده غذایی مطلوب برای این گروه می‌باشد، مربوط می‌شود (Li *et al*. 2014). کاهش فراوانی نسبی جمعیت باکتری‌های جنس مهم *Pseudomonas* در مرحله اواسط گلدهی در نمونه‌های تیمار شده با رورال تی اس یکی از مهم‌ترین تغییرهای مشاهده شده می‌باشد. در مورد تاثیر رورال تی اس (کاربندازیم+ایپرودیون) و همچنین ایپرودیون روی جنس *Pseudomonas* طبق بررسی‌های انجام شده، گزارشی در دسترس نیست اما Fang و همکاران (2016) گزارش کردند که مصرف مکرر کاربندازیم سبب کاهش فراوانی نسبی بعضی جنس‌های باکتریایی از جمله *Pseudomonas* شده است. از طرف دیگر، جنس‌های *Sphingopyxis* و *Sphingobacterium* و جنس‌های متعلق به رده Candidatus Saccharibacteria با فراوانی بیشتر در مرحله اواسط گلدهی در تیمار رورال تی اس در مقایسه با شاهد یافت شدند که می‌توان این پدیده را به کاهش جمعیت سودوموناس مرتبط دانست که در شرایط کاهش جمعیت شرایط برای *Pseudomonas* توانسته‌اند جمعیت خود را افزایش دهند. از سویی دیگر، قارچکش‌های با طیف اثر وسیع مانند رورال تی اس با ممانعت از تکثیر قارچ‌ها، تاثیر غیرمستقیم بر ساختار جوامع باکتریایی دارند (Muñoz-Leoz *et al*. 2011; Verdenelli *et al*. 2012)، به دلیل برهمکنش‌های پیچیده بین جوامع میکروبی ریزوسفر، تعیین دقیق دلیل کاهش فراوانی *Pseudomonas* و سهم هر عامل بر اساس داده‌های موجود میسر نیست و نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. در مجموع، کاربرد رورال تی اس سبب افزایش فراوانی نسبی جمعیت جنس‌های *Sphingobacterium* و *Chryseobacterim* که متعلق به رده Bacterioidetes می‌باشند، در هر سه مرحله شده است (شکل ۲).

سنجش تنوع و پیچیدگی درون جوامع میکروبی با استفاده از شاخص‌هایی که در تئوری‌های اکولوژیکی توسعه یافته‌اند، میسر می‌باشد؛ تعداد OTU های مشاهده شده، شاخص Chao1 (نشان دادن غنای گونه) و شاخص شانون (برای نشان دادن تنوع گونه‌ای) از مهم‌ترین این شاخص‌ها می‌باشند (Barelli *et al*. 2015). در این تحقیق مشخص شد که مصرف رورال تی اس به منظور ضدعفونی خاک قبل از کاشت، تنوع جامعه باکتریایی را تا حدودی کاهش داده (شانون=۵/۰۱) و از طرفی منجر به افزایش ناچیزی در غنای گونه‌ها (Chao1= ۲٤۳٤/۱۷) و تعداد OTU شده است (جدول ۲). Wang و همکاران (2004) گزارش کردند که مصرف ایپرودیون در مقادیر و دفعات مجاز، تاثیر منفی بر جوامع باکتریایی خاک نداشته، اما استفاده مکرر آن سبب بروز تغییرات چشمگیری بر ساختار جوامع میکروبی خاک می‌شود. در تحقیق انجام گرفته توسط Zhang و همکاران (2017) نیز این موضوع اثبات شده و حتی گزارش شده که کاربرد مکرر و بیش از اندازه ایپرودیون سبب کاهش جمعیت باکتری‌های متعلق به شاخه‌های Chloroflexi و Acidobacteria می‌شود که به ترتیب در چرخه نیتروژن و تجزیه مواد آلی خاک نقش دارند. چنین یافته‌هایی در مورد مصرف کاربندازیم نیز صدق می‌کند. تغییر عمده در ساختار میکروبی خاک تیمارشده با کاربندازیم به روش TGGE (که به وجود یک جنس از زیرشاخه گاماپروتوباکتریا در خاک‌های تیمارشده مربوط می‌باشد) گزارش شد (Wang *et al*. 2012). کاهش جمعیت جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Arthrobacter*، *Mycobacterium*، *Streptococcus*، *Burkholderia* و *Corynebacterium* به واسطه مصرف بیش از حد توصیه شده کاربندازیم، منجر به تغییر در تنوع و فراوانی جمعیت باکتری‌های خاک شده است (Fang *et al*. 2016).

بررسی شاخص‌های تنوع درون و بین جمعیت با استفاده از شاخص‌های تنوع آلفا و بتا، نشان داد مرحله رشدی گیاه تاثیر معنی‌داری بر تنوع و فراوانی جمعیت باکتریایی ریزوسفر صرفنظر از نوع تیمار دارد (شکل٤). ۲۱٪-۵٪ از کربن تثبیت شده طی فرایند فتوسنتز در گیاهان شامل مواد قندی محلول، آمینواسیدها و یا متابولیت‌های ثانویه از طریق ترشحات ریشه وارد ریزوسفر شده که سبب ایجاد رقابت شدیدی بین جمعیت میکروبی به منظور استفاده از آنها می‌شود (Chaparro *et al*. 2013). مرحله رشدی گیاه یکی از عوامل تاثیرگذار بر کیفیت و کمیت مواد مترشحه و متعاقبا بر ساختار جمعیت میکروبی ریزوسفر می‌باشد (Li *et al*. 2014; Xu *et al*. 2009).

نتایج این تحقیق بیانگر تغییر در ساختار جمعیت باکتری‌های ریزوسفر خیار با کاربرد رورال تی اس (به مقدار توصیه شده) می‌باشد، اما تغییر ایجاد شده خیلی زیاد نبوده و نکته مهم گذرا بودن و عدم ثبات این تغییرات می‌باشد. در تایید این موضوع، نتایج تحقیق انجام شده به‌وسیله Wang و همکاران (2009b) نشان داد که مصرف کاربندازیم در مقدار توصیه شده ساختار جمعیت میکروبی را به طور موقتی تغییر داده و ۱۲٦ روز بعد از مصرف کاربندازیم، ساختار جمعیت میکروبی به حالت اولیه خود برگشته است. با توجه به نتایج این تحقیق و سایر پژوهش‌های انجام شده، بایستی در مصرف قارچکش‌ها که جز لاینفک کشاورزی امروزه هستند، احتیاط شده و به منظور جلوگیری از خطرات جانبی و عدم تاثیر روی موجودات غیرهدف، در مقادیر مجاز استفاده شوند.

## منابع

**Anonymous, 2013. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Illumina company, Available at:** https://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.htm.

**Albanese D, Fontana P, De Filippo C, Cavalieri D, Donati C. 2015.** MICCA: a complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. Scientific Reports 5:9743.

**Angioni A, Porcu L, Dedola F. 2012.** Determination of famoxadone, fenamidone, fenhexamid and iprodione residues in greenhouse tomatoes. Pest Management Science 68:543–547.

**Barelli C, Albanese D, Donati C, Pindo M, Dallago C, Rovero F, Cavalieri D, Tuohy KM, Hauffe1 HC, De Filippo C. 2015.** Habitat fragmentation is associated to gut microbiota diversity of an endangered primate: implications for conservation. Scientific Reports 5:14862.

**Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA. 2012.** The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science 17:478–486.

**Chalam AV, Sasikala C, Ramana CV, Rao PR. 1996.** Effect of pesticides on hydrogen metabolism of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodopseudomonas palustris*. FEMS Microbiology Ecology 19(1):1–4.

**Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM. 2013.** Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. PloS ONE 8(2): e55731.

**Egamberdieva D, Kamilova F, Validov S, Gafurova L, Kucharova Z, Lugtenberg B. 2008.** High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. Environmental Microbiology 10(1): 1–9.

**Fang H, Han L, Cui Y, Xue Y, Cai L, Yu Y. 2016.** Changes in soil microbial community structure and function associated with degradation and resistance of carbendazim and chlortetracycline during repeated treatments. Science of the Total Environment 572:1203–1212.

**Figueiredo MDVB, Seldin L, de Araujo FF, Mariano RLR. 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications in: Maheshwari, D.K. (Ed.), Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 21-42.

**Gower J, Blasius J. 2005**. Multivariate prediction with nonlinear principal components analysis: Theory. Quality and Quantity 39: 359–372.

**Jafari M, Minaei S, Safaie N. 2017.** Detection of pre-symptomatic rose powdery-mildew and gray-mold diseases based on thermal vision. Infrared Physics & Technology 85:170–183.

**Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes J, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. 2013.** Predictive functional

profiling of microbial communities using 16S rRNANA marker gene sequences. Nature Biotechnology 1-10. 8.

**Leistra M, Matser AM. 2004.** Adsorption, transformation, and bioavailability of the fungicides carbendazim and iprodione in soil, alone and in combination. Journal of Environmental Science and Health 39: 1–17.

**Lemos LN, Fulthorpe RR, Triplett EW, Roesch LFW. 2011.** Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. Journal of Microbiological Methods 86: 42–51.

**Li XZ, Rui JP, Mao YJ, Yannarell A, Mackie R. 2014.** Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. Soil Biology and Biochemistry 68: 392–401.

**McMurdie PJ, Holmes S. 2013.** Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS ONE 8(4): 61217.

**Minambres GG, Conles MY, Lucini EI, Verdenelli RA, Meriles JM, Zygadlo JA. 2010.** Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26(1) 161–170.

**Oulas A, Pavloudi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, Arvanitidis C, Iliopoulos I. 2015.** Metagenomics: Tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. Bioinformatics and Biology Insights 9: 75–88.

**Prashar P, Kapoor N, Sachdeva S. 2014.** Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 13: 63–77.

**Rutigliano FA, Ascoli RD, De Santo AV. 2004.** Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover. Soil Biology & Biochemistry 36: 1719-1729.

**Sauret N, Mirabel P, Wortham H. 2006.** Development of an SPME–GC–MS/MS method for the determination of pesticides in rainwater: laboratory and field experiments. Environmental Pollution 139: 133–142.

**Schloss PD, Handelsman J. 2005.** Status of the microbial census. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 686–691.

**Sousa PJ, Rodrigues JML, Loureiro S, Soares AMVM, Jones SE, F¨orster B. et al. 2004.** Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME) – an instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on soil microbial parameters. Ecotoxicology 13(1): 43–60.

**Tabacchioni S, Chiarini L, Bevivino A, Cantale C, Dalmastri C. 2000.** Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. Microbial Ecololgy. 40: 169– 176.

**Topp E. 2003.** Bacteria in agricultural soils: Diversity, role and future perspectives. Canadian Journal of Soil Science. 83: 303–309.

**Tremblay J, Singh K, Fern A, Kirton ES, He S, Woyke T, Lee J, Chen F, Dangl JL, Tringe SG. 2015.** Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. Evolutionary and Genomic Microbiology 6: 1–15.

**U.S. Department of Agriculture, Agricultural Marketing Service, 2014.** Science & Technology. Pesticide Data Program.Available at. https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2013%20PDP%20Anuual%20Summary.pdf (verified on 4 December 2016).

**Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, Gilbert JA, Jansson JK, Caporaso JG, Fuhrman JA, Apprill A, Knight B. 2015.** Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. mSystems 1(1):1-10.

**Wang X, Song M, Wang Y, Gao C, Zhang Q, Chu X, Fang H, Yu Y. 2012.** Response of soil bacterial community to repeated applications of carbendazim. Ecotoxicology and Environmental Safety 75:33–39.

**Wang XG, Song M, Gao CM, Dong B, Zhang Q, Fang H, Yu YL. 2009a.** Carbendazim induces a temporary change in soil bacterial community structure. Journal of Environmental Sciences 21:1679–1683.

**Wang YS, Huang YJ, Chen WC, Yen JH. 2009b.** Effect of carbendazim and pencycuron on soil bacterial community. Journal of Hazardous Materials 172: 84–91.

**Wang YS, Wen CY, Chiu TC, Yen JH. 2004.** Effect of fungicide iprodione on soil bacterial community. Ecotoxicology and Environmental Safety 59:127–132

**Will C, Thürmer A, Wollherr A, Nacke H, Herold N, Schrumpf M, Gutknecht J, Wubet T, Buscot F, Daniel R. 2010.** Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology 76: 6751-6759.

**Xu Y, Wang G, Jin J, Liu J, Zhang Q, Liu X. 2009.** Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. Soil Biology and Biochemistry 41(5): 919–925.

**Yang C, Hamel C, Vujanovic V, Gan Y. 2011.** Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. ISRN Ecology 1–8.

**Yu YL, Chu XQ, Pang GH, Xiang YQ, Fang H. 2009.** Effects of repeated applications of fungicide carbendazim on its persistence and microbial community in soil. Journal of Environmental Sciences-China 21: 179–185.

**Zhang M, Wang W, Zhang Y, Teng Y, Xum Z. 2017.** Effects of fungicide iprodione and nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate on soil enzyme and bacterial properties. Science of the Total Environment 599–600: 254–263.

**Zhang WJ, Rui WY, Tu C, Diab HG, Louws FJ, Mueller JP, Creamer N, Bell M, Wagger MG, Hu S. 2004.** Responses of soil microbial community structure and diversity to agricultural deintensification. Pedosphere. 15(4): 440-447.

**Genetic Engineering and Biosafety Journal**
**Volume 6, Number 2**

# Evaluation the effects of fungicide Iprodione-Carbendazim (Rovral TS) on cucumber rhizosphere bacterial structure by Illumina MiSeq sequencing

**Ezazi Robab[1], Ahmadzadeh Masoud [1]*, Javan Nikkhah Mohammad [1], Salehi Mohammadi Reza[2] and Donati Claudio[3]**

1- Ph.D. Student, Professor and Professor of Plant Pathology, Respectively, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran
2- Assistant Professor of Horticultural Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran
3- Computational Biology Unit, Fondazione Edmund Mach, San Michele all Adige, Trento, Italy

* Corresponding author: ahmadz@ut.ac.ir

## Abstract

Studying the effects of fungicides on rhizosphere and soil microbial communities is very important due to the critical role of microorganisms in soil and plant health. In this study, the effects of fungicide Rovral TS on dynamic and structure of cucumber rhizospheric bacteria was investigated by Next-Generation Sequencing based on 16S rRNA gene (V4 region) by means of Illumina MiSeq sequencing in three plant growth periods. Results showed that among 26 identified phyla and 352 identified bacterial genera for 18 samples, Proteobacteria and Pseudomonas were most dominate phylum and genus, respectively. Application of Rovral TS was resulted the changes in bacterial structure and dynamic. Decrease of relative abundance of Pseudomonas in middle stage of flowering in fungicide treatment and in the last stage of control treatment was observed. Moreover, the relative abundance of Sphingopyxis, Sphingobacterium and Chryseobacterim in fungicide-treated plants were more than control plant in all three stages. Analysis of diversity indices revealed that diversity in the rhizospheric soil of control plant was more than fungicide-treated plants (shanon=5.33), while species richness in control soil was greater than fungicide treated (Chao1=2324.17). In addition, the effect of plant developing stages on OUT number, diversity and richness indices (regardless type of treatment) was significant and rhizospheric soil belongs to before flowering stages benefit more diversity and richness.

**Keywords:** microbe, cucumber, fungicide, metagenomics