

A comparative study of culture dependent and independent techniques (metagenomics) of bacterial communities associated with Persian oak tree

Elahe Ahmadi 

PhD Candidate, Department of Silviculture and forest ecology, Gorgan university of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: ahmadi_silva@yahoo.com

Davoud Azadfar 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Silviculture and forest ecology, Gorgan university of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: Azadfar@gau.ac.ir

Mojegan Kowsari 

Assistant Professor, Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. E-mail: kowsari@abrii.ac.ir

Gholamreza Salehi Jouzani 

Professor, Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. E-mail: gsalehi@abrii.ac.ir

Masood Tohidfar 

Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail: gtohidfar@yahoo.com

Abstract

Objective

During the last decade, about 20-30% of the Zagros forests have faced a problem called oak decline. The aim of present study was to investigate the bacterial diversity in the healthy and declined forest areas by comparing two methods culture-dependent and culture-independent methods.

Materials and methods

Sampling was done from different tissue and soil of oak trees in the forests of Ilam province. In the culture-based method, using microbiological and molecular methods the bacteria in the samples were isolated and identified to the genus and species level. In order to study metagenomics in culture-independent method, total microbial DNA was extracted directly from

the samples and prepared metagenomic library using conventional and index primer, the diversity of bacterial was examined using Illumina's Miseq platform and then the results of the two methods were compared.

Results

Based on the culture-based method, only 3 phylum were identified, while in the metagenomics method, 9416 OTUs were obtained, that were divided into 12 phylum. In both methods, 3 families of *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* and *Xanthomonadaceae* were observed as the dominant families. The species diversity within a sample (Alpha diversity) was higher in the rhizosphere sample and in the Eyvan and Gale jar areas than other samples. The species diversity between samples (Beta diversity) was in Eyvan, Gale jar, Chavar, Tangedalab and Arghavan appear more similar to each other than the sites samples. Bacterial community of stems and leaves were more similar and also bulk and rhizosphere were more similar in bacterial species composition.

Conclusions

In the metagenomics method, very few species are identified, while in the culture method, the probability of this is low. Also, in the culture-independent method, alpha and beta diversity can be studied more comprehensively. In the culture-based method, the bacterial population can be identified up to the species level, while in the culture-independent method, it is usually identified up to the genus level. Therefore, it is suggested to use a combination of two methods simultaneously in studies of microbial communities.

Keywords: Bacterium, Diversity, Oak Decline, Phylogeny, Metagenome.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ahmadi E, Azadfar D, Kowsari M, Salehi Jouzani G (2022) A comparative study of culture dependent and independent techniques (metagenomics) of bacterial communities associated with Persian oak tree. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 21-46.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (1), 21-46.

DOI: 10.22103/jab.2021.18560.1356

Received: December 01, 2021.

Accepted: December 26, 2021.


Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors


مقایسه تنوع جمعیت باکتری‌های همراه بلوط ایرانی در دو روش شناسایی مبتنی بر کشت و مستقل از کشت (متاژنومیکس)

الهه احمدی 


دانشجوی دکتری، گروه جنگلشناسی و اکولوژی جنگل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: ahmadi_silva@yahoo.com

داود آزادفر 


*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه جنگلشناسی و اکولوژی جنگل دانشکده علوم جنگل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: Azadfar@gau.ac.ir

مژگان کوشری 

استادیار، گروه بیوتکنولوژی میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، کرج، ایران. رایانامه: kowsari@abrii.ac.ir

غلامرضا صالحی جوزانی 

استاد، گروه بیوتکنولوژی میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، کرج، ایران. رایانامه: gsalehi@abrii.ac.ir

مسعود توحیدفر 

دانشیار، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: gtohidfar@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰

چکیده

هدف: در طی یک دهه گذشته حدود ۳۰-۲۰ درصد جنگلهای زاگرس با معضلی به نام زوال بلوط مواجه شده‌اند. تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع باکتریایی مناطق جنگلی سالم و زوال یافته از طریق مقایسه نتایج دو روش مبتنی بر کشت و مستقل از کشت طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها: از بافت‌های مختلف درختان بلوط و خاک اطراف آنها در جنگل‌های مناطق مختلف استان ایلام نمونه برداری انجام شد. در روش مبتنی بر کشت با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و مولکولی، باکتری‌های موجود در نمونه‌ها جدا سازی و شناسایی تا سطح جنس و گونه شناسایی شدند. به منظور مطالعه متاژنومیکس در روش مستقل از کشت، DNA میکروبی به طور مستقیم از نمونه‌ها استخراج و با آماده سازی کتابخانه متاژنومی با استفاده از آغازگرهای عمومی و نشانگر، تنوع باکتریایی با استفاده از پلتفرم Miseq کمپانی Illumina مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه نتایج دو روش مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج: بر اساس روش مبتنی بر کشت، تنها ۳ فیلوم شناسایی شد، در صورتیکه در روش متاژنومیکسی، تعداد OTU ۹۴۱۶ بدست آمد که به ۱۲ فیلوم تقسیم بندی شدند. در هر دو روش ۳ خانواده *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* و *Xanthomonadaceae* به عنوان خانواده‌های غالب مشاهده شدند. تنوع گونه‌ایی در یک نمونه (تنوع آلفا) در نمونه رایزو سفر و در مناطق ایوان و گله جار نسبت به سایر نمونه‌ها بیشتر بود که در روش مبتنی بر کشت نیز این دو منطقه از تنوع گونه‌ای بیشتر برخوردار بودند. تنوع گونه‌ایی در بین نمونه‌ها (تنوع بتا) در مناطق ایوان، گله جار، چوار، تنگ‌دالاب و ارغوان از نظر ترکیب گونه‌ای مشابه بودند. اما جامعه باکتریایی ساقه و برگ نسبت به سایر نمونه‌ها شباهت بیشتری داشتند و بالک و رایزوسفر هم از نظر ترکیب گونه‌ای شباهت بیشتری با یکدیگر داشتند.

نتیجه‌گیری: در روش متاژنومیکس جنس‌های با تنوع خیلی کم هم شناسایی می‌شود در صورتیکه در روش مبتنی بر کشت احتمال این موضوع ضعیف است. ضمناً در روش مستقل از کشت می‌توان تنوع آلفا و بتا را به شکل جامع‌تری بررسی کرد. در روش مبتنی بر کشت می‌توان جمعیت باکتریایی را تا سطح گونه شناسایی کرد در صورتیکه در روش مستقل از کشت معمولاً تا سطح جنس شناسایی می‌شود. لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات بررسی جوامع میکروبی ترکیب دو روش مبتنی و مستقل از کشت همزمان استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: باکتریوم، تنوع زیستی، زوال بلوط، فیلوژنی، متاژنوم.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: احمدی الهه، آزادفر داود، کوثری مژگان، صالحی جوزانی غلامرضا، توحیدفر مسعود (۱۴۰۱) مقایسه تنوع جمعیت باکتریهای همراه بلوط ایرانی در دو روش شناسایی مبتنی بر کشت و مستقل از کشت (متاژنومیکس). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۱)، ۲۱-۴۶.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

یکی از رخداد‌های تلخی که در سال‌های اخیر در جنگل‌های زاگرس به وقوع پیوسته و هر روز بر وسعت آن افزوده می‌شود، زوال یا خشکیدگی بلوط است. گفته می‌شود این عارضه جنگل‌های بلوط ۱۱ استان کشور، حدود ۱۱۳۰۰۰۰ هکتار از رویشگاه‌های زاگرسی را تحت تأثیر قرار داده است (گزارش اسفند ماه سال ۱۳۹۲ سازمان جنگل‌ها و مراتع کشور). فاکتورهای احتمالی و اثر متقابل آنها که منجر به زوال بلوط می‌شود را می‌توان تغییر شرایط زیست‌محیطی مانند خشکسالی‌های پی‌درپی و هجوم ریزگردها، ضعف فیزیولوژیک درخت در اثر تنش‌های محیطی، حمله عوامل زیستی از قبیل نیمه انگل‌ها و حشرات آفت (چوبخوارها و پوستخوارها) و عوامل بیماری‌زا (قارچی یا باکتریایی) برشمرد (Pourhashemi et al. 1399; Bedrood et al. 1400; Zhou et al. 2015; Penton et al. 2014; Denman et al. 2016). از بین فاکتورهای زیستی تأثیر بسیار مهم عامل باکتریایی در بروز پدیده زوال بلوط به اثبات رسیده است (Ahmadi et al. 2018; Alidadi et al. 2019; Delfan et al. 2021).

روش‌های شناسایی جوامع میکروبی به دو دسته روش‌های وابسته به کشت (روش‌های کلاسیک میکروبیولوژی) و روش‌های مستقل از کشت (متاژنومیکس) تقسیم می‌شوند (Rosselli and Squartini 2015). به طور معمول شناسایی جوامع میکروبی دخیل در زوال بلوط با استفاده از روش‌های مرسوم وابسته به کشت صورت گرفته است (Ahmadi et al. 2018; Brady et al. 2014; Denman et al. 2010). در سال‌های اخیر محققین با استفاده از روش‌های مستقل از کشت نشان داده‌اند که نمونه‌های دارای علائم و بدون علائم درختان بلوط زوال یافته در سطح دنیا حاوی جوامع متنوعی از باکتری‌هایی هستند که قبلاً از طریق روش‌های مبتنی بر کشت شناسایی نشده بودند (Fadiji and Babalola 2020; Citlali et al. 2018; Nahid et al. 2014; Doonan et al. 2019; Denman et al. 2018; Lin et al. 2014). همچنین از نتایج آنالیز متاژنوم می‌توان به فراوانی و پراکنش جمعیت‌های میکروبی و جمعیت غالب در نمونه‌های مورد بررسی پی برده و سطوح مختلف تنوع ژنتیکی آلفا و بتا را در چندین جامعه میکروبی به طور همزمان و مقایسه‌ای مورد مطالعه قرار داد (Delmont et al. 2011; Zhou et al. 2015). اگرچه روش‌های وابسته به کشت عموماً بخش کوچکی از تنوع را بازیابی می‌کنند، اما آنها هنوز جزء حیاتی در توسعه و تحقیقات جوامع میکروبی هستند (Stefani et al. 2015). جداسازی میکروبی امکان ارزیابی فیزیولوژی و خواص جدایه در شرایط آزمایشگاهی را فراهم می‌کند و مبنایی برای تفسیر مجموعه داده‌های متاژنومی و کمک به شناسایی ژن‌هایی که می‌توانند در احیا و زوال بلوط موثر باشند، فراهم می‌کند.

در این مطالعه روش مرسوم وابسته به کشت با روش مستقل از کشت متاژنومیکس به منظور شناسایی جوامع باکتری مقایسه شد. هدف تحقیق حاضر مقایسه تنوع جمعیت باکتری‌های بلوط ایرانی در دو روش شناسایی مبتنی بر کشت و مستقل از کشت و شناسایی نقاط قوت و محدودیت‌های هر تکنیک بود. فرضیه این مطالعه بر این ۳ اصل استوار بود: ۱- روش‌های متاژنومیکس نسبت به روش وابسته به کشت باکتری‌های بیشتری در نمونه‌ها شناسایی کند ۲- نتایج روش مبتنی بر کشت با نتایج روش

مستقل از کشت همبستگی دارد ۳- ویژگی‌های خاص جوامع میکروبی شناسایی شده از طریق متازنومیکس، نتایج کشت باکتریایی را پیش‌بینی می‌کند.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش و نمونه‌برداری: زوال یا خشکیدگی بلوط در جنگل‌های غرب کشور اقلیم منطقه را تحت تاثیر قرار داده است. از میان ۱۱ استان زاگرسی، جنگل‌های بلوط استان ایلام بیشترین میزان تاثیر و خسارت را دیده‌اند. بنابراین در این تحقیق، استان ایلام برای بررسی باکتریوم درختان در نظر گرفته شد. با توجه به نقشه پهنه‌بندی خشکیدگی در استان ایلام ۸ شهر استان به عنوان مناطق نمونه‌برداری انتخاب شدند. از هر درخت از ریزو سفر، فیلو سفر (ریشه، ساقه و برگ) و خاک اطراف درختان بلوط نمونه برداری صورت گرفت. نمونه‌ها با کامیون یخچال دار به آزمایشگاه بخش بیوتکنولوژی میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی منتقل و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان آنالیز نگهداری شدند. به منظور نمونه برداری از ریشه‌ها، چهار قطعه ریشه به طول ۱۵-۱۰ سانتی متر از حفره ایجاد شده پیرامون هر درخت جدا سازی شد. به منظور نمونه برداری ساقه و برگ از هر درخت سه قطعه شاخه به طول ۳۰-۲۰ و قطر ۳/۵-۱/۵ سانتی متر انتخاب و جدا سازی شد. نمونه‌های خاک از دو ناحیه شامل خاک اطراف ریشه (رایزوسفر) و خاک اطراف درخت (Bulk) تهیه شدند. نمونه‌ها با استفاده از قیچی باغبانی، بیلچه و دستکش استریل جدا سازی شدند. نمونه برداری از درختی به درخت دیگر قیچی باغبانی و بیلچه استریل شدند.

تجزیه و تحلیل میکروبیولوژیک باکتری‌ها با استفاده از تکنیک مبتنی بر کشت: در هر ۸ منطقه ۳ درخت به طور تصادفی انتخاب و مجموعاً از ۲۴ درخت نمونه برداری شد. تعداد ۱۲۰ نمونه از بافت ریشه، ساقه و برگ ($3 \times 24 = 72$) و خاک بالک و رایزوسفر ($2 \times 24 = 48$) مناطق مورد مطالعه جدا سازی شد. نمونه‌های بافت جمع‌آوری شده با استفاده یک تیغه استریل به قطعات یک سانتی متری تقسیم شده و با استفاده از اتانول ۸۰٪ به مدت ۱۵ ثانیه و سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۱ تا ۲ دقیقه و در پایان با دو بار شستشو با آب مقطر استریل شدند. جهت جدا سازی سویه‌ها از بافت‌های گیاهی از روش Mahon et al. (2001) استفاده شد و به منظور جدا سازی باکتری از نمونه‌های خاک و رایزوسفر از روش Mahon et al. (2011) استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوبه شدند. شایان ذکر است که خالص سازی در طی چند مرحله و در زمان‌های مختلف پس از کشت انجام شد (Schaad et al. 2001). با توجه به اینکه شمار باکتری‌های جدا سازی شده بسیار زیاد بود، لازم بود تا با غربالگری اولیه آنها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی - باکتریولوژیکی، هم به یک دسته‌بندی درباره ویژگی‌های فنوتیپی آنها رسید و هم در فرایند پایین دستی مولکولی از دید اقتصادی در آزمون‌های مولکولی صرفه‌جویی کرد. ویژگی‌های فنوتیپی باکتری‌های مورد بررسی می‌تواند ما را در یافتن پاتوبیوارهای عوامل بیمارگر و دسته‌بندی بهتر آنها یاری نمایند. به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌هایی که با استفاده از روش میکروبیولوژی جدا سازی و خالص

Zhou et al. سازی شدند، DNA کل هر جدایه استخراج شد. جهت استخراج DNA ژنومی جدایه‌های مورد بررسی، از روش (1996) استفاده شد. به منظور شناسایی مولکولی و بررسی خصوصیات فیلوژنتیکی جدایه‌های باکتریایی از روش تکثیر و توالی‌یابی ژن 16S rRNA استفاده شد. به منظور تکثیر ناحیه ژن 16S rRNA، از ترکیب آغازگرهای 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) به همراه 1541R (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) به عنوان آغازگرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) استفاده شد (White et al. 1990). برنامه و پروتکل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز هم در ۴۰ سیکل اجرا شد (Saito et al. 1987). محصول PCR حاصل به منظور توالی‌یابی و مطالعات روی توالی‌ها، به مرکز توالی‌یابی ماکروژن کره جنوبی ارسال شد و پس از توالی‌یابی قطعات تکثیری، به منظور شناسایی جنس و گونه‌ها از نرم افزارهای Pro ver. 1.7.6 Chromas و Vector NTI و Blast استفاده شد. پس از BLAST توالی سوبه‌ها، با توالی‌های موجود در بانک ژن (پایگاه داده NCBI) مقایسه شدند. برای ارزیابی توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های مورد بررسی و توالی‌های اخذ شده از بانک ژن ترسیم شجره‌های فیلوژنتیکی آنها، از نرم افزار Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver.7.0) MEGA 6.0 تحت سیستم عامل ویندوز استفاده شد (Tamura et al. 2007). توالی‌های به دست آمده و مرجع با کمک برنامه ClustalW (Thompson et al. 1994) صف‌بندی و سپس در برنامه BioEdit نسخه ۷ تنظیم گردید (Hall 1999). برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در شجره‌های حاصل، تجزیه و تحلیل اعتبار سنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید (Felsenstein 1985).

تجزیه و تحلیل مولکولی باکتری‌ها با استفاده از تکنیک مستقل از کشت: آنالیز متاژنوم در سه مرحله انجام

شد: (۱) استخراج DNA متاژنومی از نمونه‌های مختلف و بررسی کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ و ژل الکتروفورز آگارز (۲) آماده سازی کتابخانه متاژنومی با استفاده از پرایمرهای عمومی و اختصاصی و (۳) آنالیز توالی‌ها بر اساس سیستم ایلومینا می اسک (Illumina MiSeq) و پایپ لاین چایم ۲ (QIIME^۲ 2). در این تحقیق به منظور استخراج DNA متاژنومی از روش (Ahmadi et al. 2018) استفاده شد. مراحل ساخت کتابخانه متاژنومی متشکل از دو مرحله PCR است. مرحله اول تکثیر با استفاده از پرایمرهای عمومی در شناسایی باکتری (ناحیه V1-V3 ژن 16S rRNA) به همراه دو پرایمر با نام آداپتورهای اتصال به فلوسل (P5 grafting, P7 grafting PCR primer/flowcell capture site) صورت گرفت و مرحله دوم با استفاده از پرایمرهای حاوی توالی ایندکس (پرایمرهای نشاندار ۸ نوکلئوتیدی) همراه با پرایمرهای اتصال به فلوسل بر روی محصول PCR اول صورت گرفت (O'Donnell et al. 2016). در PCR مرحله اول، از DNAهای استخراج شده از ۴۰ نمونه برگ، ریشه، ساقه و خاک بلوط به عنوان DNA الگو استفاده شد و با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F و 534R ناحیه V1-V3 ژن 16S rRNA شناسایی جامعه باکتری صورت گرفت (Balint et al. 2016; Jaric et al. 2013). در PCR مرحله دوم، یک

^۱ National center for Biotechnology Information

^۲ Quantitative Insights into Microbial Ecology

ماکرولیتر از محصول PCR مرحله اول به عنوان DNA الگو استفاده شد. PCR مرحله دوم در سه تکرار صورت گرفت (Frank et al. 2008). محصول واکنش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. قطعات تکثیر شده (کتابخانه متاژنومی) به منظور توالی یابی Paired-end با استفاده از پلت فرم توالی یابی Miseq (Illumina, Inc. San Diego, CA, USA) به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد.

آنالیزهای آماری و مولکولی در بررسی باکتری‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل با سه تکرار، با استفاده از

مدل خطی تعمیم یافته (Generalized Linear Model) در نرم افزار SPSS (SPSS 20, IBM North America,) (New York, USA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین، برای انجام مقایسه زوج میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ استفاده شد (Denman et al. 2016). به منظور ارزیابی توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های مورد بررسی و ترسیم شجره‌های فیلوژنتیکی آنها، از نرم افزار MEGA 6.0 تحت سیستم عامل ویندوز استفاده شد (Tamura et al. 2007). به منظور آنالیز داده‌های متاژنوم از پکیج نرم افزار Qiime2 استفاده شد (Caporaso et al. 2010). در نرم افزار Qiime2 توالی‌ها با استفاده از الگوریتم DADA^۲ کنترل کیفی می‌شود (Callahan et al. 2016). به توالی‌های کنترل کیفی شده ASVs^۴ گفته می‌شود. به منظور کاهش خوانش‌های تکراری ASVs، برای هر گروه ASVs تکراری، یک توالی نماینده انتخاب می‌شود. این توالی نماینده OTU^۵ نامیده می‌شود (Callahan et al. 2016). OTUها بر اساس پایگاه داده‌های مرجع Greengenes Blast می‌شوند (DeSantis et al. 2006). تنوع آلفا (تنوع گونه‌ای در یک نمونه) با اندازه‌گیری غنای شانون با استفاده از فانکشن "estimate_richness" در پکیج phyloseq v. 1.22.3 نرم افزار R و از آنالیز واریانس چند متغیره یا پرمآنوا محاسبه شد (Anderson 2001). به منظور بررسی تنوع بتا (تنوع گونه‌ای در بین نمونه‌ها) از پلات رسته‌بندی به منظور بررسی همبستگی مولفه‌ها (تجزیه به مولفه‌های اصلی^۶) در بین انواع نمونه‌ها، بر اساس Unweighted UniFrac در سه محور، با استفاده از پکیج وگان در نرم افزار R استفاده شد (Dixon 2003; Oksanen et al. 2016). اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های مختلف برای بررسی تنوع بتا با استفاده از آزمون کروسکال – والیس (Kruskal-Wallis) ارزیابی می‌شود. ترکیب، تنوع و توزیع تاکسونومیک جامعه باکتریایی در فاکتورهای مورد بررسی و اثر متقابل این فاکتورها، با استفاده از نقشه حرارتی از طریق فانکشن "plot_heatmap" در پکیج phyloseq v. 1.22.3 ترسیم شد.

^۲ Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2

^۴ Amplicon Sequence Variants

^۵ Operational Taxonomic Unit

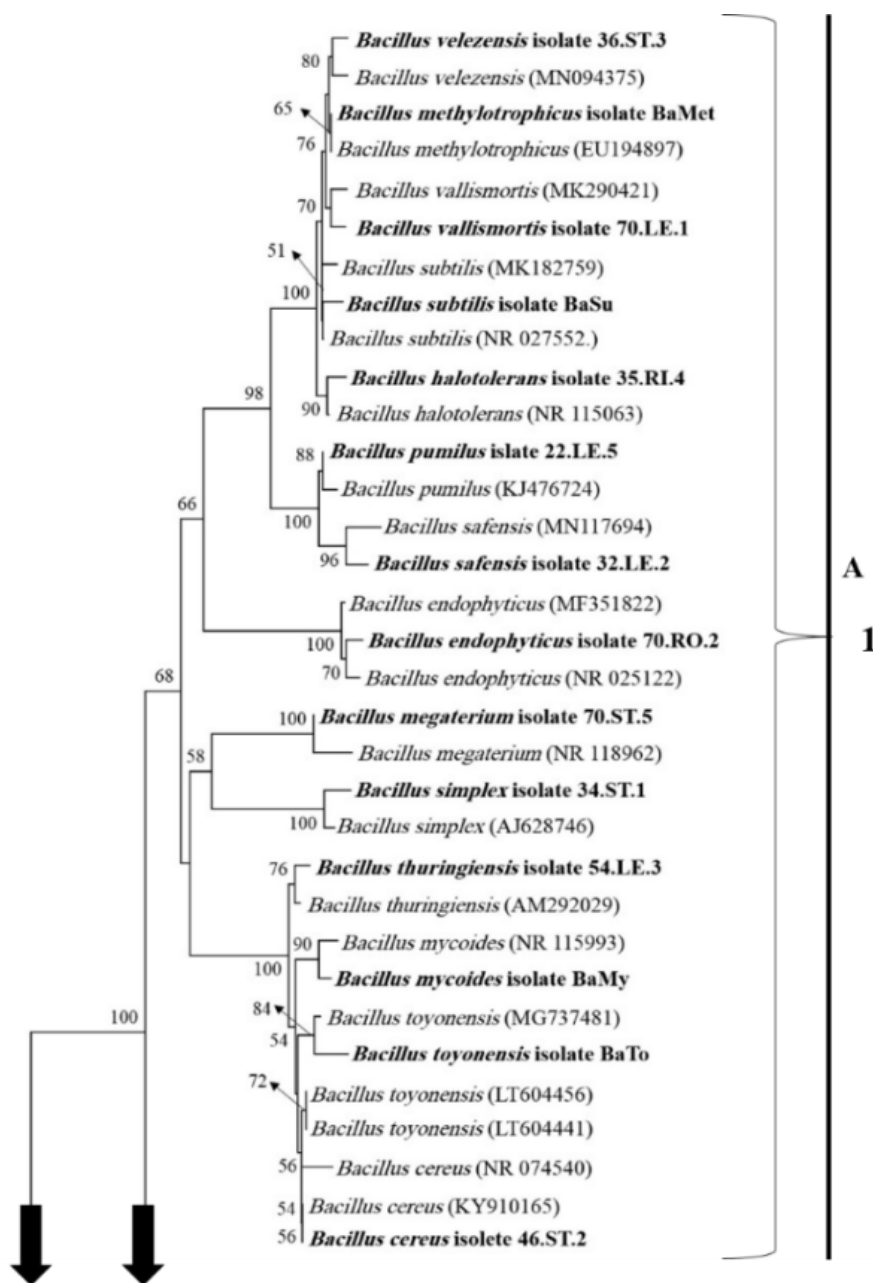
^۶ Principal Coordinates Analysis

نتایج و بحث

جداسازی، خالص‌سازی، شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنی جدایه‌های باکتری در روش مبتنی بر

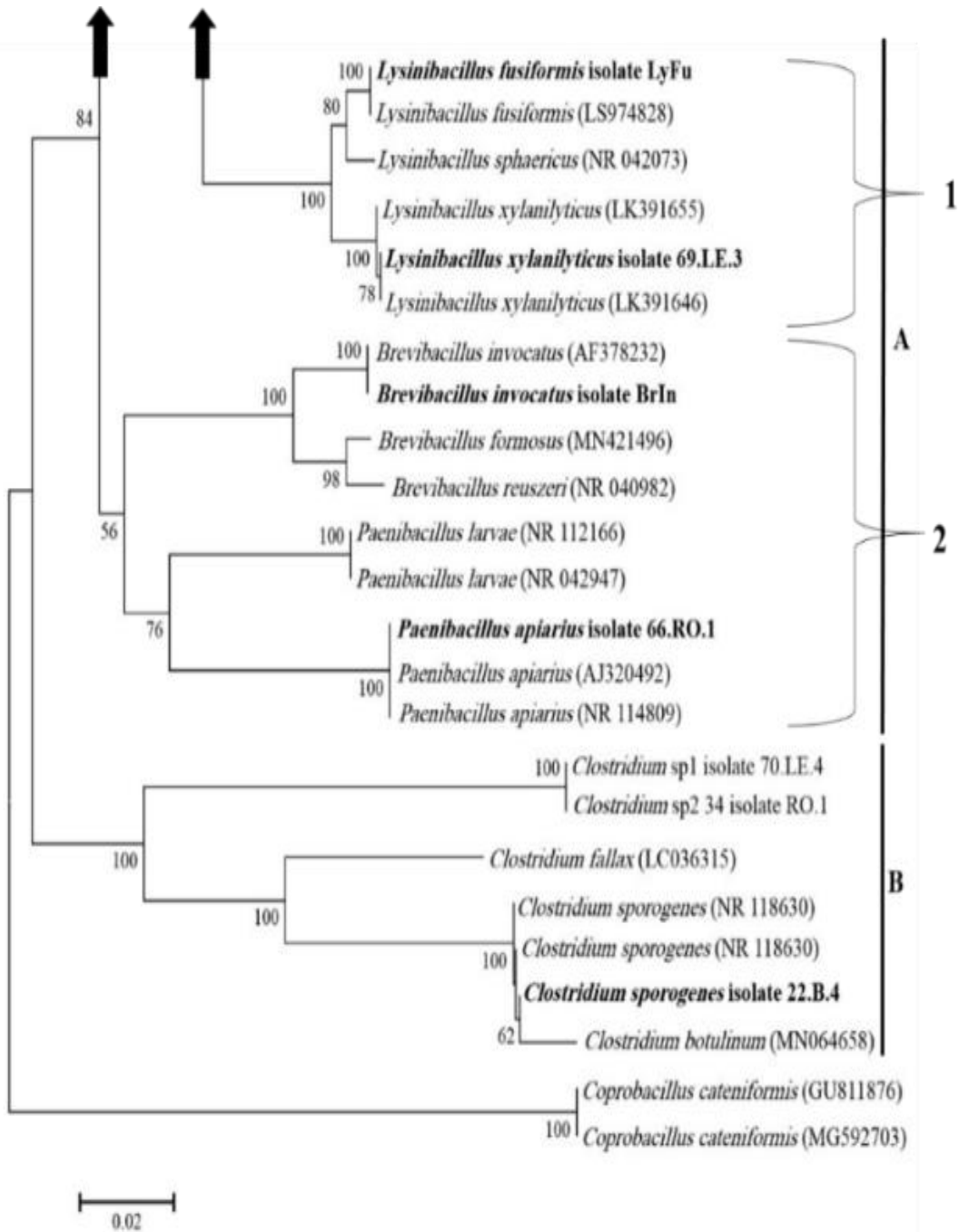
کشت: در مرحله جداسازی جدایه‌ها کلنی‌های متنوعی از باکتری بر روی محیط کشت ظاهر شد. بعد از جداسازی حدود ۳٪ کلنی‌های باکتری یا در طی مراحل واکشت‌های متوالی جهت خالص‌سازی از بین رفتند یا در اثر نگهداری در بانک میکروبی در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس دیگر رشد نکردند. این کلنی‌ها از آنالیز و ادامه روند آزمایش حذف شدند. بنابراین تعداد ۹۴۸ کلنی خالص شده مورد مطالعه قرار گرفت. از بین ۹۴۸ کلنی، ۳۸۶ کلنی به طور تصادفی با در نظر گرفتن ویژگی‌های مورفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی گروه‌بندی شدند. از بین ۳۸۶ کلنی تعداد ۱۴۳ کلنی براساس گروه‌های مورفولوژیک تشکیل شده برای آنالیزهای پایین دستی مولکولی انتخاب شدند. ترسیم تبارنمای فیلوژنتیکی با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به ۱۴۳ جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه و توالی‌های استخراج شده از پایگاه داده NCBI صورت گرفت (شکل ۱ الف و ب). بر اساس روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه، در ۱۰ جنس شامل ۲۵ گونه مختلف قرار گرفتند (جدول ۱). جدایه‌ها متعلق به شاخه‌های *Firmicutes* و *Proteobacteria* بودند. در شاخه^۷ *Firmicutes* جدایه‌ها متعلق به راسته^۸ *Bacillales* و *Colestridiales* بودند. در راسته *Bacillales* دو کلاد^۹ شامل خانواده‌های *Bacillaceae* و *Paenibacillaceae* و راسته *Colestridiales* دارای یک کلاد شامل خانواده *Clostridiaceae* می‌باشد (شکل ۱ الف). راسته *Colestridiales* دارای یک کلاد شامل خانواده *Clostridiaceae* می‌باشد (شکل ۱ الف). جدایه‌های متعلق به شاخه *Proteobacteria* در سه رده شامل *Gamaproteobacteria*، *Betaproteobacteria* و *Epsilonproteobacteria* قرار گرفتند (شکل ۱ ب). در رده *Gamaproteobacteria* جدایه‌ها در ۴ راسته شامل *Pseudomonadales*، *Enterobacterales* و *Lysobacterales* تفکیک شدند (شکل ۱ ب).

^۷ Branch^۸ Order^۹ Clade



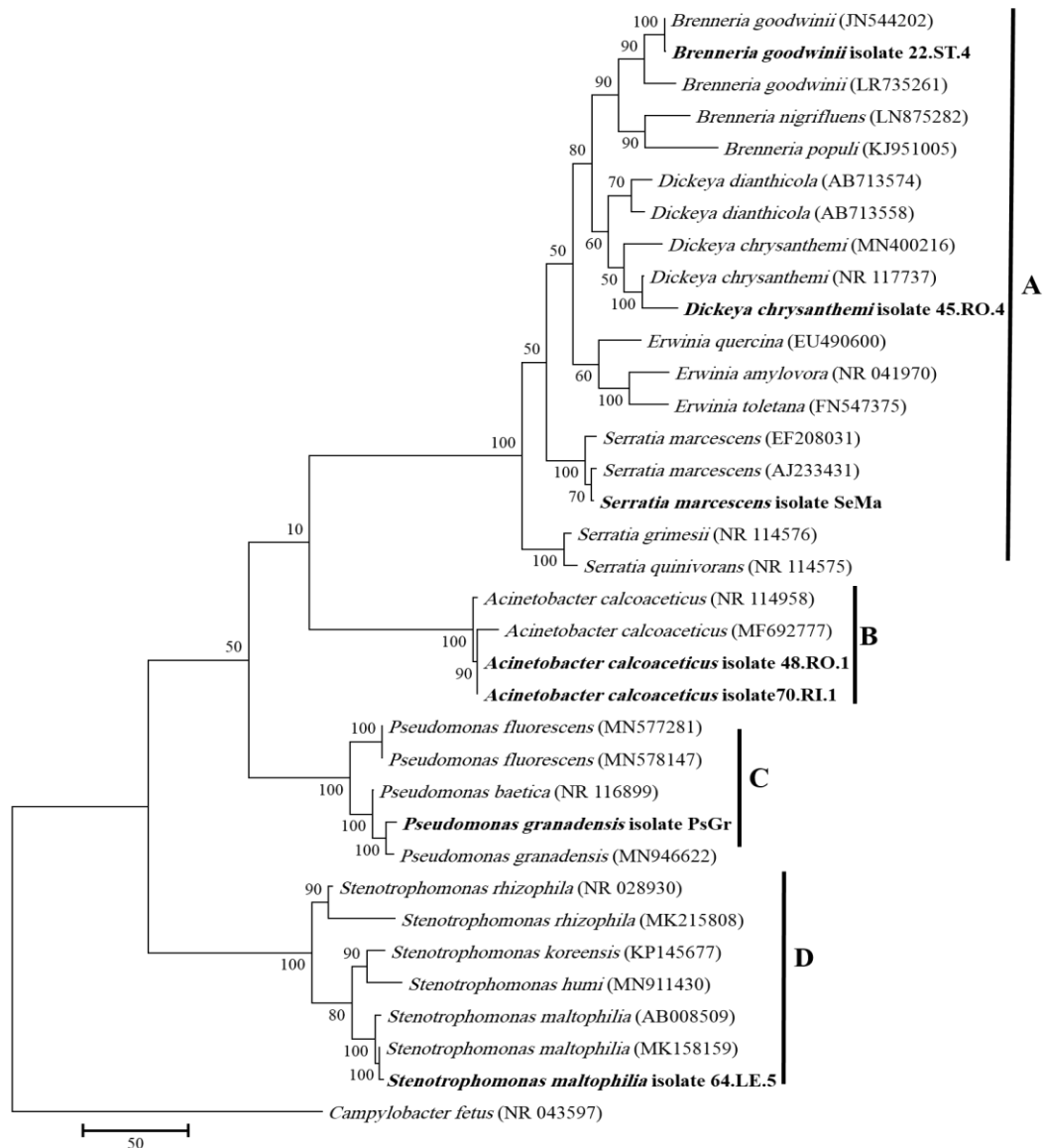
شکل ۱. تبارنمای ترسیم شده براساس توالی ناحیه 16S-rRNA و به روش neighbor-joining در نرم افزار MEGA ver. 6.0 الف: شاخه Firmicutes ب: رده Proteobacteria آزمون اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار انجام شده است.

Figure 1. Phylogenetic tree derived from the neighbour-joining model in MEGA software (Version 6.0) based on the 16S rRNA gene sequences of the Firmicutes (a) and Proteobacteria (b) strains. The bootstrap analysis with 1,000 replicate data sets was performed.



ادامه شکل ۱.

Figure 1. Continued

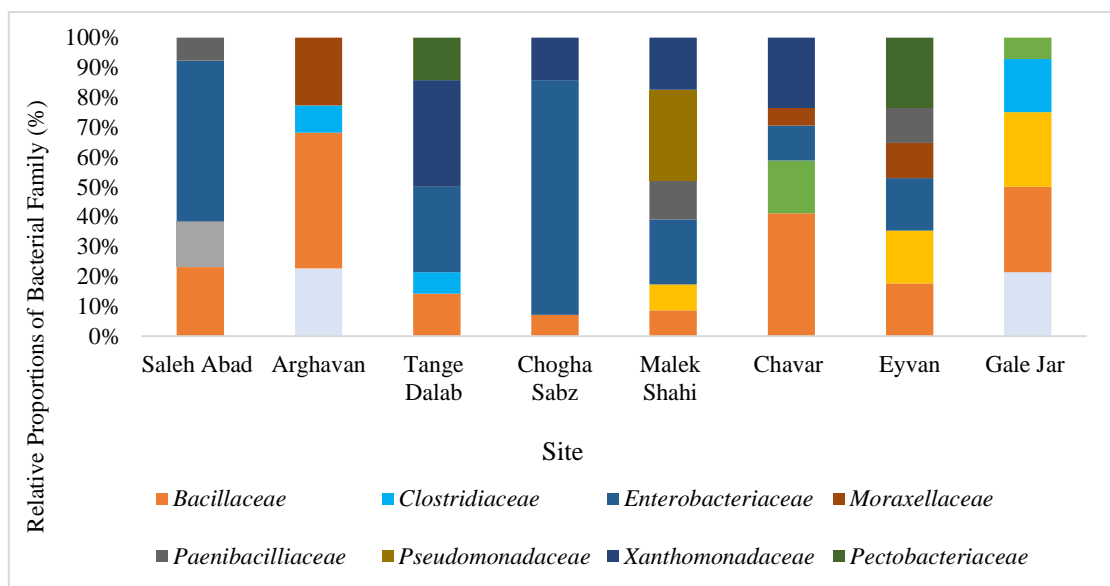


ادامه شکل ۱.

Figure 1. Continued

۲۵ گونه‌های شناسایی شده در این مطالعه متعلق به ۸ خانواده *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Paenibacillaceae*, *Moraxellaceae*, *Enterobacteriaceae* و *Xanthomonadaceae* بودند. از نظر فراوانی، خانواده *Bacillaceae* ۳۲/۲۴ درصد، *Enterobacteriaceae* ۲۱/۶۲ درصد و خانواده *Xanthomonadaceae* ۱۰/۱۳ درصد تعداد کل جدایه‌ها را تشکیل دادند که بیشترین جمعیت خانوادگی تشکیل

دهنده بودند (جدول ۱). مهمترین گونه های باکتری بیماریگر بلوط از جمله *B. goodwinii*، *D. chrysanthemi* و *S. maltophilia* و *B. pumilus marcescens* که قبلاً در تحقیقات دیگر گزارش شده بودند، در این مطالعه نیز جداسازی شدند. گونه های مذکور جزء فراوان ترین گونه ها در این مطالعه بودند. بیماری زایی این گونه های باکتریایی در گونه های بلوط مدیترانه ای و بلوط ایرانی به اثبات رسیده است (Ahmadi et al. 2019; Moradi-Amirabad et al. 2019; Poza-Carrion et al. 2008; Brady et al. 2014). این سه گونه قبلاً در بافتهای زوال یافته بلوط گزارش شده است (Brown et al. 2014; Denman et al. 2012; Denman et al. 2013). علاوه بر این، برخی از باکتریهای بیماریگر غیر بلوط مانند *P. granadensis* و *P. agglomerans* در مطالعه حاضر جدا شده اند که قبلاً به عنوان بیماریگر سایر گونه های درختی مانند گلابی و کاج شناخته شده بودند (Li et al. 2009; He et al. 2016; Arbuzova et al. 2014; Cruz et al. 2007). شکل ۲ فراوانی خانواده های باکتری را در مناطق مختلف نشان می دهد. از بین خانواده های شناسایی شده خانواده *Bacillaceae* در همه مناطق مشاهده شد. میزان خانواده های *Bacillaceae* و *Enterobacteriaceae* در هر ۸ منطقه نسبت به سایر خانواده ها اختلاف معنی دار داشت. خانواده *Bacillaceae* در منطقه ارغوان و خانواده *Enterobacteriaceae* در منطقه چقاسبز فراوانی بیشتری نسبت به سایر خانواده در دیگر مناطق داشتند. *Pseudomonadaceae* فقط در منطقه ملکشاهی مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲. پراکنش خانواده های باکتریایی در ۸ منطقه مورد مطالعه

Figure 2. Bacterial family distribution in eight sites

جدول ۱. گونه‌های باکتریایی مختلف جدا شده از اندامهای مختلف درختان بلوط در ۸ منطقه از استان ایلام

Table 1. Species of bacteria isolated from different samples of oak tree in eight site from Ilam province

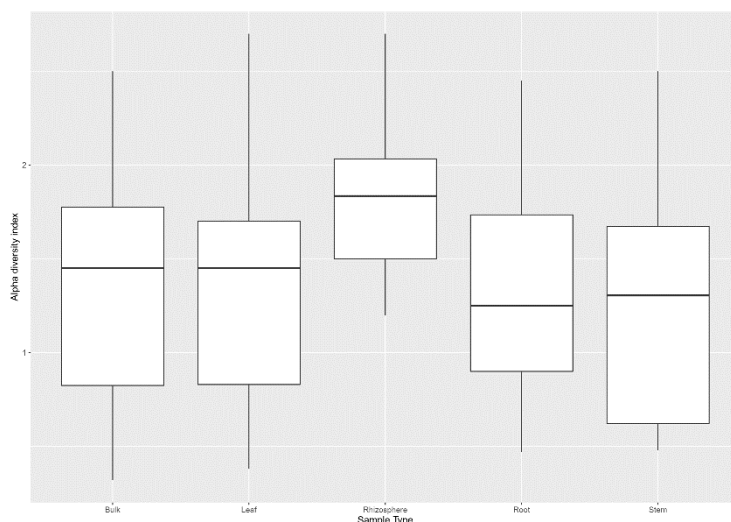
Species (Family)	Number of isolates in different sample*					Number of isolates in different sites**							
	Le	Ro	St	Rh	Bu	G	A	E	S	C	O	T	M
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (<i>Moraxellaceae</i>)	2	5	0	1	0	0	5	2	0	1	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i> (<i>Bacillaceae</i>)	2	0	2	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0
<i>Bacillus endophyticus</i> (<i>Bacillaceae</i>)	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus megaterium</i> (<i>Bacillaceae</i>)	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus methylotrophicus</i> (<i>Bacillaceae</i>)	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus mojavensis</i> (<i>Bacillaceae</i>)	2	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
<i>Bacillus mycoides</i> (<i>Bacillaceae</i>)	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus pumilus</i> (<i>Bacillaceae</i>)	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
<i>Bacillus safensis</i> (<i>Bacillaceae</i>)	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Bacillus simplex</i> (<i>Bacillaceae</i>)	0	0	3	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> (<i>Bacillaceae</i>)	1	1	2	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0
<i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bacillaceae</i>)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Bacillus toyonensis</i> (<i>Bacillaceae</i>)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Bacillus vallismortis</i> (<i>Bacillaceae</i>)	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Bacillus velezensis</i> (<i>Bacillaceae</i>)	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Brenneria goodwinii</i> (<i>Pectobacteriaceae</i>)	2	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	2	0
<i>Clostridium</i> Sp (<i>Clostridiaceae</i>)	2	1	0	0	5	5	2	0	0	0	0	1	0
<i>Dickeya chrysanthemi</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	1	2	4	0	2	0	0	3	0	2	3	1	0
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (<i>Bacillaceae</i>)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (<i>Bacillaceae</i>)	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Paenibacillus apiarius</i> (<i>Paenibacillaceae</i>)	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	0	4	6	0	4	0	0	0	4	0	5	0	5
<i>Pseudomonas granadensis</i> (<i>Pseudomonadaceae</i>)	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>Serratia marcescens</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	2	0	0	3	4	0	0	0	3	0	3	3	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (<i>Xanthomonadaceae</i>)	9	6	0	0	0	0	0	0	0	4	2	5	4

*Le: Leaf; Ro: Root; St: Stem; Rh: Rhizosphere, Bu: Bulk **G: Gale jar; A: Arghavan; E: Eyvan; S: Sale abad; C: Chavar; O: Chogha sabz; T: Tange dalab; M: Malek shahi

نتایج آنالیز بیوانفورماتیک جوامع باکتری در روش مستقل از کشت: در این مطالعه توالی‌های خام توسط پلت فرم مایسک ایلومینا دمانتیلکس شدند. تعداد کل فراوانی توالی‌ها ۹۴۱۶ بدست آمد که این توالی‌ها بعد از کنترل کیفی به واحدهای عملکردی تاکسونومی گروه‌بندی شدند. OTUهای نماینده هر گروه توالی بر اساس پایگاه داده‌های مرجع Greengenes با بلست کردن و بر اساس شباهت توالی‌ها با استفاده از Fast tree انتخاب شدند. فایل‌های FASTA همه‌ی توالی‌ها در پایگاه داده با ۹۷٪ شباهت خوشه‌بندی شد. یک توالی نماینده (OTU) از هر خوشه انتخاب شد. ۳۴۶ توالی نماینده در ۱۲ گروه (فیلم یا کلاس) طبقه‌بندی تاکسونومیک شد.

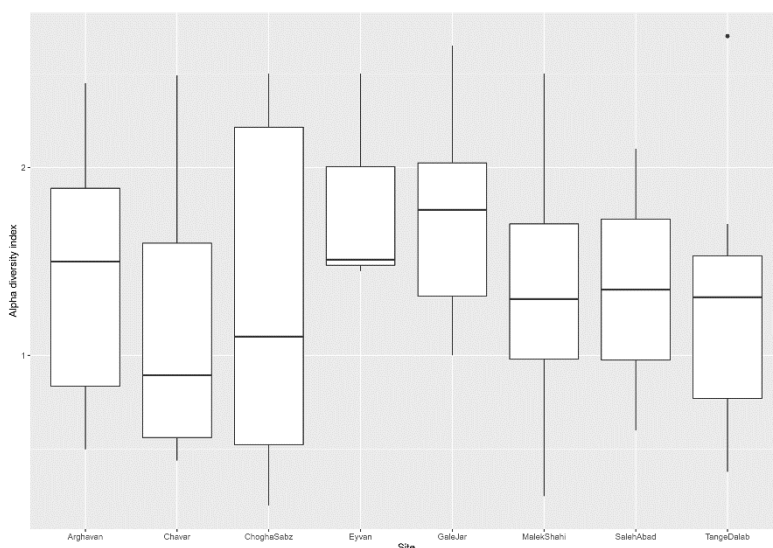
در آنالیز متاژنوم تنوع آلفا تنوع میکروارگانیه‌ها در یک نمونه یا یک محیط و تنوع بتا در بین نمونه‌ها (برگ، ریشه، ساقه، رایزوسفر و بالک) و بین محیط‌های مختلف (۸ منطقه نمونه برداری) بر اساس تعداد و فراوانی نسبی گونه‌ها (OTUها) تعریف می‌شود. در این مطالعه تنوع آلفا با استفاده از شاخص تنوع شانون بررسی شد. شکل ۳ آنالیزهای غنا و تنوع، اختلاف در جوامع باکتریایی را در بین نمونه‌های برگرفته از دو فاکتور منطقه و زیستگاه (نمونه‌های مختلف) را نشان می‌دهند. در بررسی تنوع آلفا در فاکتور نوع نمونه رایزوسفر نسبت به سایر نمونه‌ها از تنوع بیشتری برخوردار بود ($H_{Rhizosphere} = 2.05, P < 0.05$) و در بین نمونه‌های ریشه، ساقه، برگ و خاک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مشاهده کم بودن تنوع در نمونه‌های فیلو سفر نسبت به رایزوسفر و ریشه را می‌توان به این علت توضیح داد که باکتری‌های فیلو سفر گیاه مستقیماً در معرض اشعه‌های UV، اختلاف دمایی و آلودگی‌های محیطی قرار دارند بنابراین می‌تواند روی جمعیت باکتری تأثیر بگذارد (Bulgarelli et al. 2013; Czajkowski et al. 2010). همه این علتهای باعث کاهش تنوع در فیلو سفر می‌شود. از سوی دیگر رایزوسفر و محیط اطراف ریشه یکی از غنی‌ترین اکوسیستم‌های روی کره زمین است (Gans et al. 2005). زیرا که محیط واسطه‌ای است که اثر متقابل بین خاک و گیاه اتفاق می‌افتد (Hardoim et al. 2011). در تحقیق مشابهی که بر روی گونه درختی *Populus deltoids* صورت گرفت به این نتیجه رسیدند که تنوع جامعه باکتریایی در ریشه و رایزوسفر بیشتر از ساقه و برگ بود، در صورتیکه تنوع جامعه قارچی در ساقه و خاک بیشتر بود که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت داشت (Cregger et al. 2018). همچنین نتایج مشابهی بر روی گونه *Stellera chamaejasme* نیز به دست آمد (Jin et al. 2014).

در مقایسه تنوع آلفا در بین مناطق نمونه‌برداری، مناطق ایوان ($H_{Evan} = 2, P < 0.001$)، گله جار ($H_{GaleJar} = 2.08, P < 0.001$) و چقا سبز ($H_{ChoghaSabz} = 2.34, P < 0.001$) از تنوع بیشتری نسبت به سایر مناطق برخوردار بود. در دو تحقیقی که با استفاده از تکنیک مبتنی بر کشت به بررسی تنوع میکروبی (قارچ و باکتری) بر روی بلوط ایرانی صورت گرفت نیز به این نتیجه رسیدند که مناطق چقا سبز و گله جار از تنوع بالایی برخوردار هستند (Alidadi et al. 2019; Ahmadi et al. 2020). (شکل ۴).



شکل ۳. تنوع آلفا جامعه باکتریایی بر اساس OTU در انواع مختلف نمونه

Figure 3. Comparison of alpha-diversity indices of the sample type



شکل ۴. تنوع آلفا جامعه باکتریایی بر اساس OTU در مناطق مختلف نمونه برداری

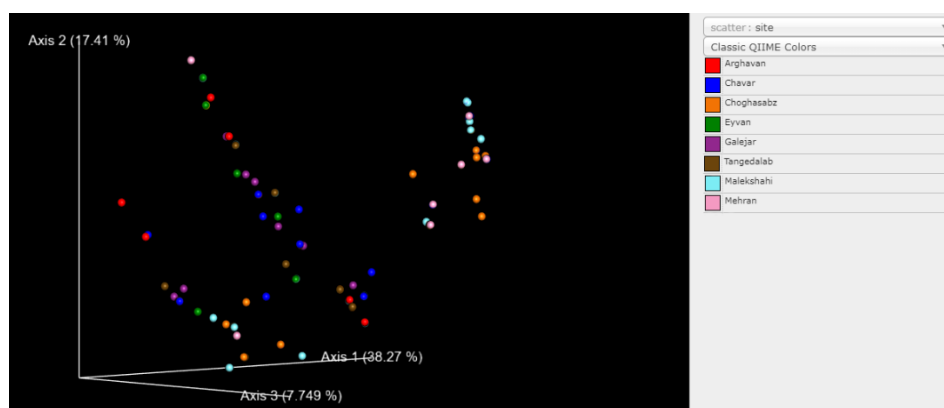
Figure 4. Comparison of alpha-diversity indices of the site sampled

در تنوع بتا به جای مقایسه فراوانی گونه‌ها، تنوع گونه‌ای دو یا چند مکان با صفات اکولوژیک مشابه را مقایسه کنند. در پلات PCoA هر نقطه نشان‌دهنده یک نمونه انفرادی است. P value نشان‌دهنده گروه‌هایی هستند که به طور معنی‌دار با هم اختلاف دارند و R value نشان‌دهنده این است که گروه‌ها نسبت به همدیگر چقدر اختلاف دارند. R value نزدیک صفر به این معنی است که بین گروه‌ها هیچ تفاوتی وجود ندارد درحالی‌که R value نزدیک یک نشان‌دهنده این است که تفاوت بین گروه‌ها

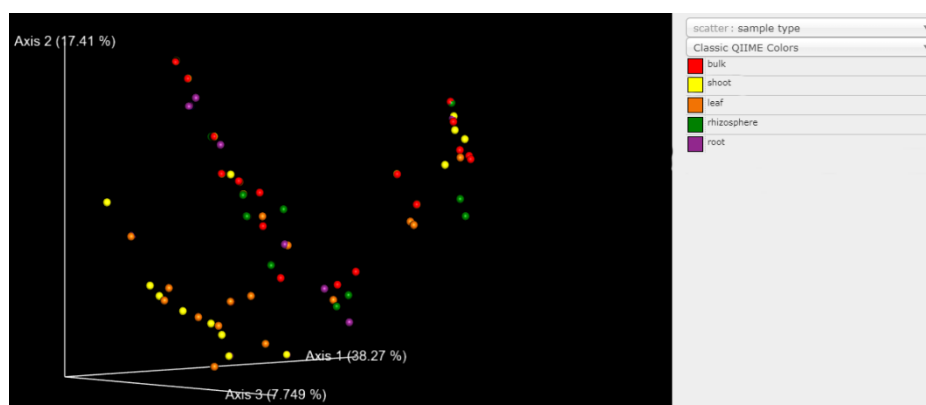
وجود دارد. هر پلات PCoA unweighted به وسیله نوع نمونه و مناطق مختلف نمونه برداری دسته بندی شد (شکل ۵). مناطق مختلف نمونه برداری به طور معنی دار بر روی ساختار جامعه باکتریایی تاثیر مثبت داشتند ($\text{adjusted } R^2 = 0.442, F = 20.2, P = 0.005$). در مناطق مختلف نمونه برداری بین ایوان، گله جار، چوار، تنگ دالاب و ارغوان از نظر ترکیب گونه ای مشابه هستند و مناطق صالح آباد، ملک شاهی و چقا سبز با سایر گروه ها از نظر ترکیب گونه ای با سایر مناطق اختلاف داشتند (شکل ۵ الف). مطالعات قبلی گزارش داده اند که باکتری های همراه با درختان در این مناطق، به ویژه آنهایی که مربوط به خانواده های *Enterobacteriaceae* و *Xanthomonadaceae* هستند، بیماری زا هستند و مشاهدات میدانی تأیید می کند که درختان مناطق تنگ دالاب و چقا سبز محور آلودگی بودند. نوع نمونه تاثیر کمی بر روی معنی داری بر روی ساختار جامعه باکتری داشت ($\text{adjusted } R^2 = 0.0255, F = 1.93, P = 0.0411$). اما جامعه باکتریایی ساقه و برگ نسبت به سایر نمونه ها شباهت بیشتری داشتند و بالک و رایزوسفر هم از نظر ترکیب گونه ای شباهت بیشتری با یکدیگر داشتند (شکل ۵ ب).

در این مطالعه ترکیب و تنوع میکروبیوم و توزیع تاکسونومیک در فاکتورهای مورد بررسی و میزان همپوشانی و تغییر در ترکیب جامعه باکتریایی اثر متقابل فاکتورها با استفاده از نقشه حرارتی نشان داده شد (شکل ۶). گونه های باکتریایی که فراوانترین جمعیت را در بررسی میکروبیوم درختان داشتند، الگوی کلی کلنی های باکتریایی در گونه درخت میزبان را نشان می دهد. بیش از نیمی از جوامع باکتریایی توالی یابی شده در سطح جنس شناسایی شدند. ماتریکس داده های میکروبیوم بر اساس حضور و عدم حضور گونه یا تاکسون تشکیل می شود که زیر مجموعه ای از تعداد کل تاکسون های باکتری است که نشان دهنده فراوانی نسبی تاکسون ها می باشد. بنابراین غالب باکس های نمودار حرارتی تاکسون ها به رنگ آبی تیره است زیرا در ماتریکس اکثر تاکسون ها دارای فراوانی کمی یا اصلا حضور ندارند. خانواده های باکتریایی که دارای جمعیت بیشتری هستند به رنگ آبی روشن دیده می شوند. از بین باکتری های شناسایی شده تعداد باکتری های گرم منفی بیشتر از تعداد باکتری های گرم مثبت بود. فیلوم *Proteobacteria* فراوان ترین فیلوم بین باکتری های شناسایی شده بود. سپس فیلوم *Firmicutes* و *Actinobacteria* نیز در حد کمتری حضور داشتند. با توجه به داده های توالی یابی و شکل ۶ تنوع جامعه ریشه و سپس ریزوسفر بیشتر از ساقه و برگ بود. که در تحقیق دیگری نیز به این نتیجه رسیده بودند (Wang et al. 2016). جامعه باکتری همراه با فیلوسفر (برگ و ساقه) اعضای خانواده *Proteobacteria*, *Enterobacteriaceae* مانند *Xanthomonadales* در برگ بیشتر از سایر نمونه ها بودند که نشان دهنده تمایل به دسترس بودن مواد غذایی در زیستگاهشان در برگ دارند (Haas et al. 2018). در نتایج تحقیقی که بر روی درختان نونل (*Picea abies*) صورت گرفت نیز به نتیجه مشابه دست پیدا کردند (Vorholt et al. 2012). *Proteobacteria* و *Firmicutes* در خاک بالک مشاهده شد که در تحقیق مشابه *Proteobacteria* در لایه ارگانیک و *Firmicutes* در لایه معدنی خاک بلوط فراوانتر بودند (Lladó et al. 2017). *Alphaproteobacteria* و *Gammaproteobacteria* در فیلوسفر غالب هستند که در تحقیقات دیگر هم به همین نتیجه اشاره کردند (Whipps et al.).

(2008). *Cyanobacteria* اغلب در برگ و ساقه مشاهده شدند که این فیلوم قدرت تثبیت کربن ازت و فتوسنتز را دارند (Singh 2014).



(الف)



(ب)

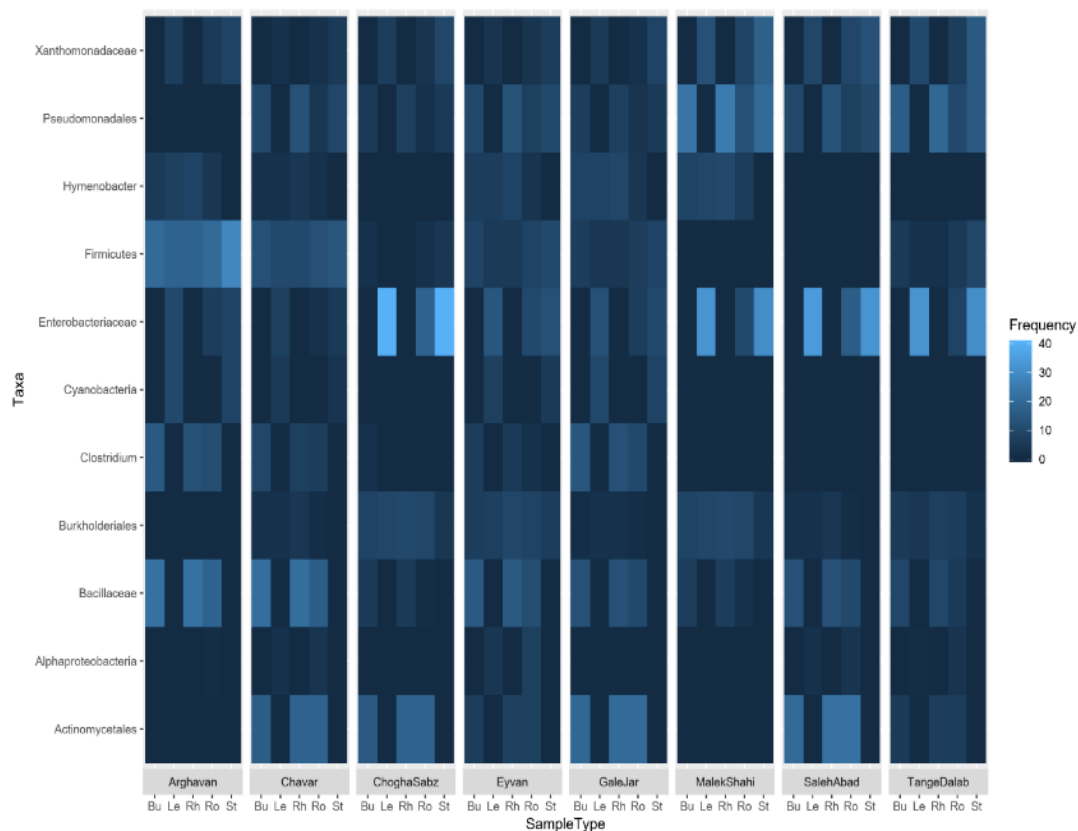
شکل ۵. آنالیز تنوع بتا میان گروهها پلات PCoA در مناطق مختلف (الف) و نوع نمونه (ب)

Figure 5. PCoA plots of beta diversity analysis of different site (A) sample type (B)

در تحقیقی که در جنگل‌های نوئل صورت گرفت بیان کردند که جمعیت *Cyanobacteria* ها در نمونه‌های ریشه و خاک بدلیل نامساعد بودن شرایط بهینه برای رشد این جنس از باکتری به شدت کاهش یافت (Haas et al. 2018). در بررسی میکروبیوم بین مناطق مختلف نمونه برداری (۸ شهرستان ایلام) مشاهده شد که در تمامی مناطق نمونه برداری شده باکتری‌های گرم منفی از جمله *Enterobacteriaceae*، *Xanthomonadales* و *Pseudomonadacea* وجود داشتند اما به ترتیب در مناطق ملک شاهی، چقاسبز، صالح آباد و تنگ دالاب از جمعیت بیشتری برخوردار بودند (شکل ۸) که نشان دهنده این است که این مناطق بیشتر در معرض خشکیدگی و زوال بلوط بودند. با توجه به تنوع میکروبیوم در مناطق مختلف نمونه برداری شکل ۸ می‌توان مشاهده کرد که شهرستان‌های شمالی مانند گله جار و ایوان از تنوع باکتریایی بیشتری برخوردار بودند. این نتیجه

می‌تواند به این علت باشد که در این استان‌ها شرایط آب و هوایی مساعدتر از استان‌های جنوبی هستند و خاک از رطوبت بیشتری برخوردار است و در شرایطی که خاک منطقه از لحاظ رطوبتی مساعد باشد تنوع باکتریایی را بالا می‌برد (Brockett et al. 2012). نتیجه دیگری که در بررسی میکروبیوم مناطق مختلف نمونه برداری مشاهده شد این بود که در مناطقی که در ارتفاع از سطح دریای بالاتری داشتند تنوع جامعه باکتریایی کاهش یافته بود. مناطقی مانند ملک شاهی که در ارتفاع ۲۶۰۰ متری و منطقه چقاسبز در ارتفاع ۲۷۴۰ متری قرار دارند تنوع میکروبی کمتری نسبت به سایر مناطق داشتند. در تحقیقی که به بررسی میکروبیوم در ارتفاع‌های مختلف پرداخته و به این نتیجه رسیدند که در ارتفاع ۱۰۰۰ متری جنگل سوزنی برگ به دلیل وجود لاشبرگ در کف جنگل تنوع میکروبی افزایش یافته اما با افزایش ارتفاع تنوع کاهش یافته است (Ping et al. 2017). نکته دیگری که از بررسی میکروبیوم مناطق به چشم می‌خورد، حضور جنس *Bacillaceae* در همه‌ی مناطق بود. اعضای این خانواده به طور کلی دارای گسترش و سببی از شرایط هستند اما در تحقیقی که (Ahmadi et al. 2019) در همین منطقه ایلام انجام دادند به این نتیجه رسیدند که گونه *B. pumillus* بر روی درختان این ناحیه بیماری‌زا هست احتمال اینکه در مناطقی که گسترش بیماری وجود دارد گونه‌هایی از *Bacillaceae* وجود داشته باشند که بیماری‌زا هستند زیاد است. میزان همپوشانی و تغییر در ترکیب جامعه باکتریایی در بین نمونه‌ها در مناطق مختلف نمونه‌برداری و زیستگاه نشان داده شد (شکل ۶). خانواده‌های باکتریایی موجود در نمونه‌های مناطق تنگ دالاب، صالح آباد، ملک شاهی و چقاسبز نسبت به سایر مناطق دارای فراوانی بیشتری هستند و از بین خانواده‌های باکتریایی خانواده *Enterobacteriaceae* در نمونه‌های برگ، ساقه و ریشه بیشترین فراوانی را در این مناطق به خود اختصاص داد و در نمونه‌های بالک و ریزوسفر مشاهده شدند و در همین مناطق خانواده‌های *Cyanobacteria*, *Clostridium* و *Hymenobacter* یا اصلا وجود نداشتند یا دارای فراوانی بسیار کم بودند. خانواده *Bacillaceae* در تمامی مناطق مشاهده شد اما فراوانی آن در مناطق ارغوان و چوار بیشتر از سایر مناطق بود. خانواده *Actinobacteria* در نمونه‌های برگ در تمامی مناطق وجود نداشت یا دارای فراوانی بسیار کمی بود. فراوانترین خانواده هم خانواده‌های *Enterobacteriaceae*، *Xanthomonaceae* و *Psuedmonaceae* در نمونه‌های ساقه در مناطق تنگ دالاب، صالح آباد نشان داده شد.

نتیجه‌گیری: تا به امروز، این مطالعه جامع‌ترین مقایسه روش‌های مبتنی بر کشت و مستقل از کشت در مناطق آلوده به زوال بلوط و اولین موردی است که جوامع باکتری را به صورت جامع بررسی می‌کند. استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت به منظور بررسی عملکرد و خواص جامعه میکروبی ضروری است. اما نسبت فراوانی جوامع میکروبی شناسایی شده توسط روش مبتنی بر کشت در نمونه‌های مختلف درختان مناطق سالم و زوال یافته نامشخص است. نتایج ما نشان داد که روش مستقل از کشت نه تنها آن بخش کوچکی از جوامع میکروبی شناسایی شده توسط روش قابل کشت را نشان می‌دهد بلکه بسیاری از فراوانترین میکروارگانیسم‌های غیر قابل کشت را می‌تواند شناسایی کند. این نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌هایی که از طریق کشت شناسایی می‌شوند، نمایانگر کل جامعه باکتریایی موجود در محیط مورد بررسی نیستند.



شکل ۶. نقشه حرارتی ۱۱ تا از فراوانترین خانواده‌هایی که هسته‌ی اصلی میکروبیوم گونه بلوط ایرانی را تشکیل می‌دهند. هر ستون نشان‌دهنده فراوانی نسبی میانگین‌گیری شده از سه تکرار از نمونه‌های فاکتور مناطق و نوع نمونه

Figure 6. Heat map depicting differences in estimated bacterial family abundance between sample type and sampling site. Bacterial families are shown vertically, with colored bars corresponding to the classes shown in Figures 6 a, b.

در این مطالعه با وجود استفاده از چندین محیط کشت تعداد گونه‌های منحصر به فرد، در روش مبتنی بر کشت محدود بود. بر اساس نتایج گونه‌های شناسایی شده تنها ۲٪ تنوع گونه‌ای را نشان داد در صورتیکه روش مستقل از کشت ۹۵٪ تنوع گونه‌ای را نشان داد. اگرچه در این مطالعه تنوع باکتریایی مناطق آلوده به زوال و سالم شناسایی شد اما بخش بزرگی از OTUهای باکتریایی که از طریق روش متاژنومیکس شناسایی شد در روش‌های قابل کشت بازایی نشدند. با بررسی نتایج متاژنومیکس برخی از عوامل محیطی و اکولوژیکی که فراوانی میکروبی را شکل می‌دهند، قابل بررسی هستند. به طور خلاصه، روش مستقل از کشت با وجود اینکه در مراحل اولیه پردازش داده‌ها توالی‌ها کنترل کیفیت می‌شوند و تعداد متوسطی از توالی‌های با کیفیت خوب مورد بررسی قرار می‌گیرند، نسبت به روش وابسته به کشت تعداد و غنای بیشتری از خانواده‌های باکتریایی را نشان می‌دهد (شکل شماره ۶). با

توجه به جدول ۱، نتایج نشان داده شده از روش مبتنی بر کشت و شکل ۶ نتایج نشان داده شده از روش مستقل از کشت خانواده های باکتریایی شناسایی شده در هر دو روش مشابه بودند. لذا پیشنهاد می شود در مطالعات بررسی جوامع میکروبی ترکیب دو روش مبتنی و مستقل از کشت همزمان استفاده مطالعه شود.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان / پژوهشگاه بیوتکنولوژی

کشاورزی به خاطر حمایت مالی / همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می شود.

References

- Ahmadi E, Kowsari M, Azadfar D, Salehi Jouzani, GR (2018) Rapid and economical protocols for genomic and metagenomic DNA extraction from oak (*Quercus brantii* Lindl.). Ann For Sci 75(2), 1-14.
- Ahmadi E, Kowsari M, Azadfar D, Salehi Jouzani, GR (2019) *Bacillus pumilus* and *Stenotrophomonas maltophilia* as two potentially causative agents involved in Persian oak decline in Zagros forests (Iran). For Pathol 49(5), e12541.
- Alidadi A, Kowsari M, Javan-Nikkhah M et al. (2019) New pathogenic and endophytic fungal species associated with Persian oak in Iran. Eur J Plant Pathol 155(3), 1017-1032.
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecol 26(1), 32-46.
- Arbuzova EN, Kulinich OA, Mazurin ES, Zinov'eva SV (2014) About of the etiology of pine wilt disease in Russia. Dokl Biol Sci 457(1), 244-247
- Bálint M, Bahram M, Eren AM et al. (2016) Millions of reads, thousands of taxa: microbial community structure and associations analyzed via marker genes. FEMS Microbiol Rev 40(5), 686-700.
- Bedrood F, Hedayat Gh, Valipour (2021) Application of the Logical Framework Analysis for planning and evaluation of oak decline's forest management plan. Iran J For Pop Res 29(1), 1-10.
- Brady C, Denman S, Kirk S et al. (2010) Description of *Gibbsiella quercinecans* gen. nov., sp. nov., associated with Acute Oak Decline. Syst Appl Microbiol 33, 444-450.
- Brady C, Hunter G, Kirk S et al. (2014) *Gibbsiella greigii* sp. nov., a novel species associated with oak decline in the USA. Syst Appl Microbiol 37, 417-422.
- Brockett BF, Prescott CE, Grayston SJ (2012) Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. Soil Biol Biochem 44(1), 9-20.
- Brown N (2013) Epidemiology of acute oak decline in Great Britain. PhD thesis, Imperial College London. pp. 260.

- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S et al. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* 64, 807-838.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ et al. (2016) DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13(7), 581-583.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7, 335-336.
- Citlali FG, Desgarnes D, Flores-Núñez VM, Partida-Martínez LP (2018) The microbiome of desert CAM plants: lessons from amplicon sequencing and metagenomics. In *Metagenomics* (pp. 231-254). Academic Press.
- Cregger MA, Veach AM, Yang ZK et al. (2018) The *Populus* holobiont: dissecting the effects of plant niches and genotype on the microbiome. *Microbiome* 6(1), 1-14.
- Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH (2007) *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol* 45(6), 1989-1992.
- Czajkowski R, De Boer WJ, Van Veen JA, Van Der Wolf JM (2010) Downward vascular translocation of a green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. (biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato. *Phytopathology* 100 (11), 1128-1137.
- Delfan S, Badehian Z, Zarafshar M, Graham JH (2021) Oak decline alters leaves and fruit of Persian oak (*Quercus brantii* Lindl.). *Flora* 284, e151926.
- Delmont TO, Robe P, Cecillon S et al. (2011) Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol* 101, 1315–1324.
- Denman S, Brady C, Kirk S, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P (2012) *Brenneria goodwinii* sp. nov., associated with acute oak decline in the UK. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 2451–2456.
- Denman S, Brown N, Kirk S et al. (2014) A description of the symptoms of Acute Oak Decline in Britain and a comparative review on causes of similar disorders on oak in Europe. *Forestry* doi:10.1093/forestry/cpu010.
- Denman S, Doonan J, Ransom-Jones E et al. (2018) Microbiome and infectivity studies reveal complex polyspecies tree disease in Acute Oak Decline. *ISME j* 12(2), 386-399.
- Denman S, Plummer S, Kirk S, et al (2016) Isolation studies reveal a shift in the cultivable microbiome of oak affected with Acute Oak Decline. *Syst Appl Microbiol* 39(7), 484-490.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N et al. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72, 5069-5072.

- Dixon P (2003) VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J Veg Sci* 14(6), 927-930.
- Doonan J, Denman S, McDonald JE, Golyshin PN (2019) Shotgun metagenomic sequencing analysis of soft-rot *Enterobacteriaceae* in polymicrobial communities. In *Metagenomics* (pp. 85-97). Humana Press, New York, NY.
- Fadiji AE, Babalola OO (2020) Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: a review. *J Microbiol Methods* 170, e105860.
- Frank DN, Pace NR (2008) Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* 24(1), 4-10.
- Gans J, Wolinsky M, Dunbar J (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309, 1387-1390.
- Haas JC, Street NR, Sjödin A et al. (2018) Microbial community response to growing season and plant nutrient optimisation in a boreal Norway spruce forest. *Soil Biol Biochem* 125, 197-209.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G et al. (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79(3), 293-320.
- He LX, Wu XQ, Xue Q, Qiu XW (2016) Effects of *Endobacterium* (*Stenotrophomonas maltophilia*) on pathogenesis-related gene expression of pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) and pine wilt disease. *Int J Mol Sci* 17(6), 778.
- Jaric M, Segal J, Silva-Herzog E et al. (2013) Better primer design for metagenomics applications by increasing taxonomic distinguishability. *BMC Proc* 7(7), 1-10.
- Jin H, Yang XY, Yan ZQ et al. (2014) Characterization of rhizosphere and endophytic bacterial communities from leaves, stems and roots of medicinal *Stellera chamaejasme* L. *Syst Appl Microbiol* 37(5), 376-385.
- Li B, Qiu W, Tan QM et al. (2009) Association of a *Bacillus* species with leaf and twig dieback of Asian pear (*Pyrus pyrifolia*) in China. *Plant Pathol* 91(3), 705-708.
- Lin X, Tfaily MM, Steinweg JM et al. (2014) Microbial Community Stratification Linked to Utilization of Carbohydrates and Phosphorus Limitation in a Boreal Peatland at Marcell Experimental Forest, Minnesota, USA. *Appl Environ Microbiol* 80 (11), 3518.
- Lladó S, López-Mondéjar R, Baldrian P (2017) Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiol Mol Biol Rev* 81(2), e00063-16.
- Mohan Singh S, Sahab Yadav L, Kumar Singh S et al. (2011). Phosphate solubilizing ability of two Arctic *Aspergillus niger* strains. *Polar Res* 30(1), 7283.

- Moradi-Amirabad Y, Rahimian H, Babaeizad V, Denman S (2019) *Brenneria* spp. and *Rahnella victoriana* associated with acute oak decline symptoms on oak and hornbeam in Iran. For Pathol 49(4), e12535.
- Nahid SH, Yasir S, Ali A (2012) Defining optimum metagenomic procedure for microbial diversity analysis in wheat rhizosphere. Adv Appl Sci Res 3(1), 407-411.
- O'Donnell JL, Kelly RP, Lowell NC, Port JA (2016) Indexed PCR primers induce template-specific bias in large-scale DNA sequencing studies. PLoS One 11(3), e0148698.
- Oksanen J, Guillaume Blanchet F, Kindt R et al. (2016) vegan: community ecology package. R package version 2.3-3.
- Penton CR, Gupta VSR, Tiedje JM et al. (2014) Fungal Community Structure in Disease Suppressive Soils Assessed by 28S LSU Gene Sequencing. PLoS ONE 9(4), e93893. doi:10.1371/journal.pone.0093893.
- Ping Y, Pan X, Li W et al. (2019) The soil bacterial and fungal diversity were determined by the stoichiometric ratios of litter inputs: evidence from a constructed wetland. Sci Rep 9(1), 1-7.
- Pourhashemi M, Sadeghi SMM (2020) A Review on Ecological Causes of Oak Decline Phenomenon in Forests of Iran. Iran J Appl Ecol 8(16), 148-164.
- Poza-Carrion C, Aguilar I, Gallego FJ et al. (2008) *Brenneria quercina* and *Serratia* spp. isolated from Spanish oak trees: molecular characterization and development of PCR primers. Plant Pathol 57, 308- 319.
- Rosselli R, Squartini A (2015) Metagenomics of Plant–Microbe Interactions. G. Sablok et al. (eds.), Advances in the Understanding of Biological Sciences Using Next Generation Sequencing (NGS) Approaches. (eds. Sablok, G., Kumar, S., Ieno, S., Kuo, J. & Varotto, C.) 63–78 (Springer International Publishing, 2015). doi: 10.1007/978-3-319-17157-9_5.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4, 406-425.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press St. Paul., Minnesota, USA 373 pp.
- Singh JS (2014) Cyanobacteria: a vital bio-agent in eco-restoration of degraded lands and sustainable agriculture. Clim Chang Environ Su 2(2), 133-137.
- Stefani FO, Bell TH, Marchand C et al. (2015) Culture-dependent and-independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. PLoS one 10(6), e0128272.

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10, 828–40.
- Wang X, Tang C, Severi J et al. (2016) Rhizosphere priming effect on soil organic carbon decomposition under plant species differing in soil acidification and root exudation. *New Phytol* 211(3), 864-873.
- Whipps J, Hand P, Pink D, Bending GD (2008) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol* 105(6), 1744-1755.
- White TJ, Bruns T, Lee SJW, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18, 315-322.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microb* 62, 316–322.
- Zhou J, He Z, Yang Y (2015) High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *MBio* 6(1), e02288-14.

