نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد یازدهم، شماره سوم، ۱۴۰۰
۱-۲۷
http://ejsms.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejsms.2021.18825.2012
(مقاله کامل علمی- مروری)

کاربرد روش PCR-DGGE در مطالعه اثر فعالیت‌های زراعی بر جوامع میکروبی خاک

ناهید معرف‌زاده*[۱] و هادی خاطری[۱]
[۱]استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، کرمانشاه، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸

چکیده

کشاورزی فشرده سبب کاهش حاصلخیزی خاک شده و اثرهای زیان‌باری بر سلامت انسان و محیط‌زیست داشته است؛ بنابراین، استفاده از شیوه‌های کشاورزی کم‌نهاده و سازگار با محیط‌زیست مانند کشاورزی پایدار برای رسیدن به پایداری لازم جهت تأمین مواد غذایی، ضروری است. از راهبردهای مهم کشاورزی پایدار، حفظ و تقویت جوامع میکروبی مفید موجود در خاک است. این موجودات با فعالیت‌های گوناگون خود (مانند تجزیه بقایا، معدنی نمودن و تثبیت مواد غذایی برای رشد گیاه، تولید هورمون‌های گیاهی، تجزیه آلاینده‌ها، تقویت رشد گیاه و مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی)، نقش‌های بسیار مهمی در عملکرد و پایداری بوم‌نظام‌های خشکی‌زی ایفا می‌کنند. شناخت عوامل مؤثر بر این جوامع، به‌ویژه شیوه‌های مختلف مدیریت زمین‌های کشاورزی، کمک می‌کند تا آن‌ها را به سمت بهبود حاصلخیزی خاک، رشد و سلامت مطلوب گیاه و افزایش بهره‌وری و ثبات بوم‌نظام‌های کشاورزی مدیریت نماییم. برای انتخاب مناسب‌ترین روش‌های کشاورزی که موجب حفظ تنوع و تقویت جوامع میکروبی مفید خاک می‌شوند و نیز اجتناب از اقداماتی که نابودی و کاهش تنوع میکروارگانیسم‌های آن را به دنبال دارند، به روش‌هایی سریع، قابل‌اعتماد، حساس و اختصاصی نیاز است که اطلاعات جامعی در مورد اثر فعالیت‌های زراعی مختلف بر ساختار و تنوع این جوامع از جمله بخش غیر قابل‌کشت آن ارائه نمایند. در میان تکنیک‌های مولکولی، روش‌های بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌طور گسترده برای بررسی تنوع و ساختار میکروارگانیسم‌های خاک مورد استفاده قرار گرفته‌اند و polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)، یکی از شناخته‌شده‌ترین و پرکاربردترین این روش‌ها به شمار می‌آید. بیش از دو دهه است که روش PCR-DGGE، با موفقیت برای بررسی اثر عملیات زراعی مختلف بر تنوع و ساختار میکروارگانیسم‌های موجود در خاک‌های مختلف یا در یک خاک تحت مدیریت‌های زراعی مختلف به‌کار رفته است. با وجود در دسترس بودن نسل جدید فن‌آوری‌های توالی‌یابی دارای توان بالا در مطالعه جوامع میکروبی خاک، روش PCR-DGGE به دلیل مزیت‌های مختلف و نیاز به زحمت، هزینه و زمان کم‌تر و ارائه فوری مؤلفه‌ها به دو صورت کیفی و نیمه‌کمی، هم‌چنان روشی مهم برای بررسی تأثیر اقدامات و مدیریت‌های مختلف کشاورزی بر جوامع میکروبی به‌شمار می‌آید. با کمک یافته‌های حاصل از این تکنیک می‌توان بهترین روش‌های مدیریتی را در کشاورزی انتخاب کرد و راه را برای تحقق کشاورزی پایدار و امنیت تأمین مواد غذایی هموار نمود. در این نوشته به برخی منابع و پژوهش‌هایی که در آن‌ها از قابلیت

* مسئول مکاتبه: n.moarrefzadeh@razi.ac.ir

PCR-DGGE جهت بررسی تأثیر مدیریت‌های کشاورزی و فعالیت‌های زراعی گوناگون بر ترکیب و تنوع جوامع میکروبی خاک استفاده شده و نیز بخشی از نتایج حاصل از آن‌ها اشاره گردیده است. هم‌چنین ویژگی‌ها، مزیت‌ها، محدودیت‌ها و اصول انجام این روش ذکر شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: بوم‌نظام، تنوع، ساختار جامعه، کشاورزی پایدار، میکروارگانیسم‌ها

مقدمه

با ادامه افزایش جمعیت جهان در قرن حاضر، ضرورت نیاز به تأمین پایدار مواد غذایی بیش‌تر احساس می‌شود (۲۹). طی سال‌های متمادی، بشر جهت افزایش تولید محصولات کشاورزی از شیوه‌های کشاورزی فشرده استفاده نموده که وابستگی زیادی به نهاده‌هایی مانند کودها و سموم شیمیایی دارند. از سوی دیگر کاربرد نادرست و غیراصولی این نهاده‌ها، سبب تخریب خاک و کاهش حاصلخیزی آن شده و اثرهای بسیار زیان‌باری بر سلامت انسان و محیط‌زیست داشته است (۱۱۸). به‌طور قطع چنین روشی قادر نخواهد بود پایداری و ثبات لازم را در تداوم تولید غذا همگام با افزایش تقاضا فراهم نماید، در نتیجه در حال حاضر ضرورت بیش‌تری جهت استفاده از عملیات کشاورزی کم‌نهاده و سازگار با محیط‌زیست مانند کشاورزی پایدار احساس می‌شود (۲۹). کشاورزی پایدار، مدیریت و بهره‌برداری از بوم‌نظام‌های کشاورزی است به‌نحوی‌که تنوع زیستی، حاصلخیزی، ظرفیت باززایی، قدرت حیاتی و توان عملکردی را در آن حفظ نماید، تا بتواند – در حال حاضر و در آینده– عملکردهای زیست‌محیطی، اقتصادی و اجتماعی مهم را در سطوح محلی، ملی و جهانی تحقق بخشیده و به بوم‌نظام‌های دیگر صدمه نرساند (۳۰). یکی از راهبردهای مهم کشاورزی پایدار، حفظ و احیای جوامع میکروبی زنده، متنوع و فعال در خاک و ریزوسفر گیاهان است (۵ و ۴۳). میکروارگانیسم‌های خاک نه‌تنها بخش وسیعی از تنوع زیستی زمین را تشکیل می‌دهند (۵۰ و ۱۰۳) بلکه با فرآیندهای میکروبی گوناگون خود مانند تجزیه بقایای موجود در خاک، چرخه مواد غذایی (۲ و ٤٤) و معدنی نمودن و تثبیت این مواد برای رشد گیاه، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن (٤٤ و ۷۱)، پویایی عناصر بی‌تحرک (۸٤)، تولید هورمون‌های گیاهی، تأثیر بر رشد و گسترش ریشه (٤۲)، تجزیه زیستی آلاینده‌های محیطی، تقویت رشد گیاه (۷۱) و مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی برای محافظت از محصول و سلامت و رشد گیاه (۹۸ و ۱۲۱)، نقش‌های بسیار مهمی در عملکرد و پایداری بوم‌نظام‌های خشکی‌زی ایفا می‌کنند (۳۱ و ۱۰۳). شناخت عوامل مؤثر بر این جوامع اهمیتی کاربردی دارد (۳۸) چون به ما کمک خواهد نمود تا این جوامع را به سمت افزایش حاصلخیزی خاک (۲)، رشد و سلامت مطلوب گیاه (۹) و درنتیجه، افزایش بهره‌وری و بهبود ثبات بوم‌نظام‌های کشاورزی مدیریت نماییم (۱۳۲). بررسی‌های متعدد نشان داده‌اند که فراوانی، ساختار، تنوع و فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک، تحت‌تأثیر عوامل مختلف محیطی (مانند دما، رطوبت، pH، شوری، مواد آلی، دسترسی به مواد غذایی و نوع خاک) (۲، ٤۲ و ۱۰۳)، فاکتورهای گیاهی مانند سن یا مرحله رشدی، گونه، رقم یا ژنوتیپ همان گونه گیاه (٤۲، ٤۷ و ۵۱)، عوامل زیستی مانند شکار یا رقابت و نیز فعالیت‌های انسانی و طبیعی (۱۰۳ و ۱۳۳) قرار می‌گیرد. اقدامات بشر به‌ویژه شیوه‌های مختلف مدیریت زمین‌های کشاورزی ممکن است با

تأثیر مستقیم و غیرمستقیم بر محیط خاک و خواص مختلف آن، ترکیب و تنوع جوامع میکروبی موجود در آن را تغییر دهند (۲، ٤۹ و ۱۳۳). بنابراین برای انتخاب صحیح‌ترین و اصولی‌ترین مدیریت‌های زراعی که با حفظ ساختار جامعه میکروبی و حمایت از جوامع مفید و متنوع آن، سبب تضمین کارایی خاک و ثبات درازمدت بوم‌نظام کشاورزی می‌شوند، لازم است از تأثیر چنین عملیاتی بر جوامع میکروبی خاک آگاهی داشته باشیم.

از زمان شروع تحقیقات میکروبیولوژی خاک، روش‌های مختلفی جهت بررسی ساختار و تنوع جوامع میکروبی آن به‌کار رفته‌اند (۳۱). کِشت نمونه‌های محیطی روی محیط‌های کشت عمومی یا انتخابی، روشی مهم برای کمیت‌سنجی و بررسی تنوع میکروب‌های قابل‌کشت است (۱۵)، ولی این روش به‌دلیل برخی نقاط ضعف مانند تفکیک و تکرارپذیری ضعیف، بررسی‌های پرزحمت، زمان‌بر و دشوار بودن به‌خصوص هنگام آماده‌سازی محیط‌ها و شمارش کلنی‌ها و عدم وضوح آن‌ها به‌دلیل شرایط رشدی پیچیده میکروارگانیسم‌ها، برای مطالعه تنوع و ساختار جوامع میکروبی در خاک به‌قدر کافی کارآمد نبوده و تنها امکان بررسی بخش کوچکی از جامعه میکروبی خاک (یک تا ۱۰ درصد) را فراهم می‌نماید (۲۸، ۲۹، ۷٤ و ۱۰۰). شیوه‌های بیوشیمیایی بر اساس آنالیز پروفایل اسیدهای چرب فسفولیپید[1] یا متیل استر اسید چرب[2] و روش‌های استفاده از منابع کربن انحصاری مانند سیستم شناسایی بیولوگ[3] نیز علاوه بر محدودیت‌های خاص خود (۲۹) نسبت به آنالیز جامعه بر اساس اسید نوکلئیک قدرت تفکیک کم‌تری دارند (۱۹). با کاربرد روش‌های مولکولی غیر مبتنی بر کشت و آنالیز دی‌ان‌ای که به‌طور مستقیم از نمونه‌های خاک و ریزوسفر گیاه استخراج می‌شود، می‌توان تا حدود زیادی بر محدودیت‌های ذکرشده غلبه نمود (۲۲، ۱۰۹). به‌طورکلی روش‌های مولکولی، در مقایسه با تکنیک‌های مبتنی بر کشت، سریع‌تر، اختصاصی‌تر و قابل‌اطمینان‌ترند (۲) و به دانشمندان برای مطالعه ساختار، تنوع (۳، ٤۱، ٥٦)، دینامیک جوامع میکروبی (۹۹) و پاسخ آن‌ها به محیط‌های در حال تغییر (۹۰) کمک بسیاری نموده‌اند. طی دو دهه گذشته، در میان تکنیک‌های مولکولی غیر مبتنی بر کشت، اکثراً روش‌های بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) شامل PCR-DGGE[4]، TGGE[5]، T-RFLP[6]، SSCP[7]، RISA[8]، ARISA[9]، LH-PCR[10] و آنالیز توالی کتابخانه‌های کلون ژن 16S rRNA به‌طور گسترده برای بررسی تنوع و ساختار میکروارگانیسم‌های خاک مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳۱، ۹۹ و ۱۳۲). از بین این روش‌ها، PCR-DGGE یکی از شناخته‌شده‌ترین و پرکاربردترین ابزارهای مولکولی است که در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی برای مطالعات اکولوژی و بررسی جوامع میکروبی خاک کاربردی گسترده دارد (۹۰ و ۱۲۷).

با توجه به مطالب ذکرشده و تأثیر مهمی که فعالیت‌های کشاورزی مختلف بر جوامع میکروبی خاک و ریزوسفر و به‌تبع آن پایداری سیستم‌های کشاورزی دارند، در این نوشته مروری، علاوه بر ویژگی‌ها، مزیت‌ها، محدودیت‌ها و اصول انجام روش PCR-DGGE، به‌طور خلاصه به برخی پژوهش‌ها که در آن‌ها از کارایی این روش جهت بررسی تأثیر

1- Phospholipid fatty acid, PLFA
2- Fatty acid methyl ester, FAME
3- Biolog

4- Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis
5- Temperature gradient gel electrophoresis
6- Terminal restriction fragment length polymorphism
7- Single-strand conformational polymorphism
8- Ribosomal internal spacer analysis
9- Automated RISA
10- Length heterogeneity-PCR

مدیریت‌ها و فعالیت‌های زراعی گوناگون بر ترکیب و تنوع جوامع میکروبی خاک استفاده شده و نتایج حاصل از آن‌ها اشاره شده است. در ادامه متن، PCR-DGGE به‌اختصار DGGE نوشته شده است.

مراحل انجام و اصول روش DGGE: روش DGGE از شش مرحله اصلی شامل جمع‌آوری نمونه، استخراج اسید نوکلئیک از نمونه، تکثیر ژن مورد نظر با PCR، جداسازی واحدهای تکثیری PCR توسط DGGE، آشکارسازی پروفایل‌ها و آنالیز داده‌ها تشکیل شده است (۹۹). در درجه اول باید اطمینان حاصل شود که نمونه دی‌ان‌ای مورد استفاده به عنوان الگو برای تکثیر توسط PCR، نماینده جامعه مورد نظر باشد و این مسأله ممکن است به توسعه راهبردهای نمونه‌برداری که تغییرات مکانی و فصلی را در جوامع میکروبی در نظر می‌گیرند، نیاز داشته باشد (۱۰٤). پس از استخراج اسید نوکلئیک از نمونه، تکثیر ژن هدف با PCR، امکان ردیابی آن روی ژل را فراهم خواهد نمود (۹۹). قطعات DNA دو رشته‌ای تکثیر شده که دارای طول مساوی اما توالی‌های مختلف (۱۲٦) و محتوا و پراکنش GC متفاوت بوده و ممکن است واکنش ذوب متفاوتی داشته باشند، توسط الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید حاوی گرادیانی خطی از غلظت فزاینده‌ای از مواد شیمیایی واسرشت‌کننده دی‌ان‌ای مانند اوره و فرمامید به حرکت در می‌آیند (٤۸). هنگامی‌که این محصولات ضمن حرکت در ژل به نقطه واسرشت شدن خود می‌رسند، شروع به تفکیک شدن نموده و حرکتشان در طول ژل در موقعیت‌های مختلف متوقف می‌شود. تفاوت حتی یک نوکلئوتید واحد در بین قطعات، رفتارهای نسبی مربوط به واسرشت شدن آن‌ها را تغییر داده و امکان ردیابی آن‌ها توسط DGGE را فراهم می‌کند (۹۲). به‌منظور جلوگیری از واسرشت شدن کامل محصولات و حرکت قطعات تک‌رشته‌ای به خارج از ژل، یک توالی طولانی غنی از GC که ذوب نمی‌شود، به انتهای '5 یکی از آغازگرهای مورد استفاده در PCR وصل شده و به هر واحد تکثیری ایجاد شده در طول PCR متصل می‌شود (٤۸ و ۱۲٦). تصاویر ژل‌های DGGE شامل مجموعه‌ای از باندها با شدت‌های مختلف‌اند و باندها ازنظر تئوری نشانگر قطعات دی‌ان‌ای میکروارگانیسم‌های معین با ترکیبات جفت بازی متفاوت هستند (٦). معمولاً تعداد باندها برای تخمین غنای گونه‌ها به کار می‌رود، اما در بیش‌تر خاک‌ها فقط نماینده جمعیت‌هایی است که در جامعه غالب می‌باشند و نشان‌دهنده غنای کل نیست (۱۷). شدت باند نیز معمولاً با فراوانی یا تراکم نسبی محصولات مختلف PCR در یک نمونه مطابقت دارد (۱۷). در نهایت برای مقایسه ساختار و تنوع جوامع میکروبی موجود در نمونه‌های مختلف به‌دست‌آمده از محیط می‌توان انگشت‌نگاری DGGE را با آنالیز آماری و محاسبه شاخص‌های تنوع زیستی مانند آنالیز پی‌سی‌ای[1]، شاخص‌های تنوع سیمپسون و شانون، آنالیز خوشه‌ای و غیره ترکیب نمود (۲۷ و ۹۰).

ویژگی‌ها و مزایای روش DGGE: اولین بار DGGE در پزشکی جهت شناسایی جهش‌های ژنی استفاده شد (۱۲). مویزر و همکاران (۱۹۹۳) اولین کسانی بودند که از این روش جهت آنالیز جامعه میکروبی خاک استفاده نمودند (۹۷). از آن زمان تاکنون، این روش به‌طور گسترده برای آنالیز جوامع میکروبی در زیستگاه‌های متنوع و بوم‌نظام‌های طبیعی یا مصنوعی مختلف به‌کار گرفته شده است. در میان تکنیک‌های دارای دقت بالا و مرسوم برای بررسی تنوع میکروبی، DGGE از روش‌های مقرون به صرفه انگشت‌نگاری است (۱٦) که به دلیل قابل‌اعتماد و توانمند بودن (۱۱ و ۱۰۲) و نیز داشتن قابلیت توصیف فیلوژنتیکی سریع و قوی و خلق پروفایل

1- PCA, Principal component analysis

ساختاری جوامع میکروبی، نسبت به بسیاری از تکنیک‌های انگشت‌نگاری مزایای مختلفی دارد (۳۱). از آن‌جا که این روش توان عملیاتی بالایی دارد، نمونه‌های متعددی را می‌توان در یک ژل جا داد و امکان مقایسه بین نمونه‌ها و تجزیه‌وتحلیل آماری آن‌ها را فراهم کرد (۱۰، ٤٨ و ۹۹) و برای تعیین سطح تشابه در ساختار جامعه و بررسی جابجایی یا تغییر در ترکیب جامعه، پروفایل‌های حاصل از نمونه‌ها و تیمارهای مختلف را مقایسه نمود (۱۰٤). ازنظر تئوری با این روش می‌توان دو مولکول را که تنها در یک باز منفرد تفاوت دارند، تفکیک کرد (۱۰، ۹۹ و ۱۰۰). بنابراین روشی بسیار حساس است (۱۳٦) و چون به کشت وابسته نیست، نسبت به روش‌های کِشت مرسوم، تنوع میکروبی بیش‌تری را آشکار می‌کند (۱۱ و ۹۹). برای افزایش اختصاصی تجزیه‌وتحلیل در این روش، می‌توان از آغازگرهای اختصاصی مربوط به آرایه‌ها یا گروه‌های عملکردی مختلف استفاده کرد (۱۰٤) و امکان دسترسی به گروه‌های میکروبی که فراوانی کم‌تری دارند را فراهم نمود و با ایجاد پروفایل‌هایی با پیچیدگی کم‌تر، به درک بهتری از نمونه‌های پیچیده محیطی دست یافت (۳٦) یا می‌توان اعضای جامعه را با استفاده از هیبریداسیون ژل‌های بلات شده توسط پروب‌های الیگونوکلئوتیدی اختصاصی گروه یا آرایه شناسایی کرد (۳۱ و ۱۰٤). هم‌چنین با توجه به این‌که باندهای افتراقی مربوط به ژل‌های DGGE قابل برش، تکثیر مجدد و توالی‌یابی هستند، می‌توان با کلون نمودن و تعیین توالی نوکلئوتیدی باندهای مربوطه، جمعیت‌های مرتبط با این تغییرات و یا تفاوت‌ها را در جامعه شناسایی نمود (۱۰، ۳۱، ۹۹ و ۱۰۰).

علاوه بر تجزیه‌وتحلیل جوامع میکروبی بر اساس دی‌ان‌ای استخراج‌شده از خاک، می‌توان برای تخمین بخش فعال جامعه از DGGE بر اساس توالی‌های مشتق شده از آران‌ای نیز استفاده کرد. در بسیاری از پژوهش‌ها، DGGE بر اساس تجزیه‌وتحلیل توالی ژن‌های کدکننده rRNA استفاده شده است ولی امکان آنالیز بر اساس سایر توالی‌ها و ازجمله توالی‌های ژن‌های عملکردی کدکننده پروتئین‌های دخیل در فرآیندهای مهم خاک نیز وجود دارد (۱۲٦).

با این‌که ثابت شده توالی‌یابی‌های نسل بعدی[1] نسبت به DGGE برای غربال اولیه نمونه‌های محیطی امیدبخش‌تر هستند، اما قیاس‌هایی که میان این روش‌ها توسط برخی پژوهشگران صورت گرفته، نکات مثبتی را در مورد کارایی DGGE روشن نموده است. به‌عنوان‌مثال در یک پژوهش اکثر باکتری‌های موجود در کنسرسیوم توسط DGGE نیز با موفقیت شناسایی شدند و حتی هنگام ارزیابی تشابه نسبی ترکیب‌های جوامع باکتریایی، DGGE در مقایسه با آنالیز NGS نتایج بهتری عرضه کرد (۱۱۱). در مطالعه دیگری هنگام مقایسه این روش با NGS درجه خاصی از مکمل بودن میان این دو مشاهده و تأیید شد که روش کلون‌سازی DGGE منسوخ نشده است (٦۹). لیو و همکاران (۲۰۱۷) نیز از نظر تنوع گونه‌های قارچی میان DGGE و NGS تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردند (۸۰). علاوه بر این در مطالعات متعددی که به‌تازگی انجام شده‌اند، از کارایی این روش برای توصیف جوامع میکروبی کمپلکس در خاک نیز استفاده نموده‌اند (۱۸، ٦۲ و ۷۲).

با توجه به مطالب ذکرشده به نظر می‌رسد در پژوهش‌هایی که در آن‌ها به دنبال ارزیابی ثبات تنوع یا ساختار جامعه میکروبی در پاسخ به تغییرات و اختلالات محیطی (مانند فعالیت‌های کشاورزی و شیوه‌های مختلف مدیریت زراعی) و مقایسات مکانی و زمانی جوامع خاک در داخل و بین تیمارهای مختلف هستیم، DGGE روش مناسبی باشد. در ادامه به برخی پژوهش‌های انجام شده توسط این روش و

1- Next-generation sequencing, NGS

برخی نتایج قابل‌توجه حاصل از آن‌ها اشاره شده است.

کاربردهای گوناگون روش DGGE در کشاورزی

کاربرد روش DGGE جهت مطالعه اثر کشاورزی و مدیریت‌ها و سیستم‌های مختلف کشت و تناوب بر جوامع میکروبی خاک: چنان‌که پیش‌تر ذکر شد، فعالیت‌های کشاورزی صورت گرفته توسط بشر ممکن است با تحت‌تأثیر قرار دادن بسیاری از خواص خاک، ترکیب و تنوع جوامع میکروبی آن را تغییر دهند (۲، ٤۹، ۵۰ و ۱۳۳). یکی از روش‌هایی که قادر است به سؤالات ما در این زمینه پاسخ دهد، DGGE است. به‌عنوان‌مثال در یک پژوهش (۱۳۱) ساختار و تنوع جامعه باکتریایی بین خاک‌های تحت مدیریت کشاورزی فشرده و خاک‌هایی که در آن‌ها کشاورزی انجام نشده بود، توسط این روش مقایسه گردید. نتایج حاصل نشان‌دهنده تغییر تنوع (کاهش ۳۰ درصدی واحدهای تاکسونومیکی عملکردی غالب باکتریایی) در مناطق تحت مدیریت کشاورزی فشرده نسبت به مناطق کشت نشده و هم‌چنین تفاوت ساختاری واضح میان آن‌ها بود. این نتایج به روشنی مشخص نمود کشاورزی از عوامل مهم و تأثیرگذار بر ساختار و تنوع جوامع میکروبی خاک است (۱۳۱).

برای توسعه سیستم‌های تولید محصول مناسب و پایدار، لازم است از وضعیت و تغییرات حاصل در ساختار و تنوع میکروبی خاک تحت مدیریت‌ها و سیستم‌های مختلف کشت آگاهی داشته باشیم (۷۰) تا بتوانیم بهترین گزینه را انتخاب نماییم. در این زمینه نیز از DGGE در مطالعات مختلف استفاده شده است. به‌عنوان نمونه در یک پژوهش جوامع باکتریایی و قارچی خاک در کشت‌های گُل بریده در سه نوع عملیات مدیریت مرسوم، اکولوژیکی (با هدف حفظ خصوصیات خاک، بهینه‌سازی چرخه مواد مغذی، کاهش کاربرد کود و سم و بهینه‌سازی کارایی این نهاده‌ها) و میانه (شامل ترکیب مدیریت مرسوم و اکولوژیکی) بررسی گردیدند. مدیریت اکولوژیکی و میانه باعث افزایش تنوع باکتری‌های خاک شدند و ترکیب باکتری‌های تحت مدیریت اکولوژیکی، شباهت کم‌تر و تنوع بیش‌تری نسبت به مدیریت مرسوم داشت. از سوی دیگر بین غنای باکتریایی موجود در خاک تحت مدیریت اکولوژیکی با سابقه قبلی استفاده بیش از حد از سموم آفت‌کش و خاک‌های تحت مدیریت میانه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت که احتمالاً می‌تواند بیانگر این واقعیت باشد که کاربرد مفرط سموم، اثر منفی طولانی‌مدتی بر جوامع باکتریایی مناطق مورد مطالعه داشته است (۱۱۲). در یک آزمایش‌های مزرعه‌ای سه تا پنج‌ساله نیز که توسط کیهارا و همکاران (۲۰۱۲) در دو منطقه نیمه‌مرطوب و یک منطقه نیمه‌خشک در کنیا انجام شد، سیستم‌های کشت مخلوط ذرت–سویا، تناوب این دو محصول و کشت ممتد ذرت توسط این روش مقایسه گردیدند. طبق نتایج، کِشت مخلوط بهترین عملکرد را در بهبود تنوع میکروبی خاک داشت (٦۷). در آزمایش دیگری (۱۳۵) ده محصول بهاری رایج در شمال چین برای کشت یک‌دست و چهار مورد از آن‌ها برای کشت مخلوط با بادام‌زمینی پس از برداشت در مزارع گندم انتخاب شدند. نتایج نشان داد گونه‌های زراعی و سیستم‌های کشت، تأثیر قابل‌توجهی بر تنوع جامعه‌ی باکتریایی خاک ریزوسفر دارند، به‌گونه‌ای که این تنوع در سیستم‌های کشت مخلوط نسبت به کشت یک‌دست بیش‌تر بود. مشاهده‌ی برخی باندهای اختصاصی در پروفایل‌های DGGE مربوط به کشت مخلوط (ترکیب بادام‌زمینی با گندم‌سیاه، سورگوم یا ارزن) و توالی‌یابی و شناسایی آن‌ها نشان داد این شیوه کِشت سبب افزایش اختصاصی برخی گونه‌های باکتریایی غیر قابل‌کشت در خاک ریزوسفر شده که برای بهبود حاصلخیزی خاک سودمند هستند. این

مسأله می‌تواند نشان‌دهنده رابطه احتمالی بین افزایش عملکرد در محصولات کشت مخلوط و میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با کشت یک دست باشد. نویسندگان بر اساس این پژوهش نتیجه‌گیری نمودند که کِشت مخلوط نه‌تنها برای ترکیب جوامع باکتریایی موجود در خاک ریزوسفر مفید است، بلکه سورگوم، ارزن و گندم‌سیاه را می‌توان به‌صورت مخلوط با بادام‌زمینی در مزارع شمال چین در نظر گرفت. بنابراین از پروفایل‌های DGGE علاوه بر انتخاب بهترین سیستم کشت، برای توصیه الگوی کِشت مناسب نیز می‌توان استفاده نمود.

تناوب محصول یکی از روش‌های مدیریت زراعی با منشأ بسیار کهن بوده (۵۷) و دارای فواید مختلفی مانند حفظ ساختار و ماده آلی و نیز کاهش فرسایش خاک (در اثر کشت ممتد محصولات ردیفی) (٦١ و ۱۰۷) و ایجاد اختلال در چرخه‌های زندگی عوامل بیماری‌زا است (۲۵). بسیاری از میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و ریزوسفر برای رشدشان به مواد رها شده از گیاه وابسته‌اند. بنابراین گونه‌ها و یا ژنوتیپ‌های گیاهی گوناگون که در تناوب انتخاب می‌شوند، به دلیل تفاوت در رهاسازی منابع کربن و انرژی مختلف به محیط خاک، احتمالاً قادرند به‌طور انتخابی میکروارگانیسم‌هایی که ترکیبات تراوش شده خاصی مصرف می‌کنند (۵۹) را تحریک و به ریزوسفر خود جذب کرده (۵۸) و در شکل دادن به این جوامع (۲۷) و ایجاد تفاوت در تعداد، ساختار و تنوع جوامع میکروبی مفید و مضر خاک نقش داشته باشند (۷، ۷۵، ۱۰۸ و ۱۲۸). از DGGE می‌توان جهت مطالعه اثر تناوب یا گونه گیاهی کشت‌شده بر جوامع میکروبی و یا انتخاب بهترین و مناسب‌ترین گونه‌های گیاهی جهت دست‌کاری جوامع میکروبی موجود در ریزوسفر به نفع گیاه و در جهت افزایش سلامت آن بهره برد. به عنوان نمونه در یک مطالعه نُه‌ساله، پروفایل‌های DGGE مربوط به جوامع باکتریایی و قارچی خاک غیرریزوسفری متعلق به چهار سیستم تناوب با گونه‌های گیاهی مختلف (شامل کشت ممتد کلم، تناوب کلم-کاهو، تناوب کلم-تربچه و تناوب سه‌ساله) مقایسه شد. نتایج حاصل به‌وضوح نشان‌دهنده اثر سیستم‌های مختلف تناوب محصول روی ترکیب این جوامع بود (۱۲۳). هم‌چنین بررسی‌های مارچنر و همکاران (۲۰۰۱) بر اساس این تکنیک نیز بیانگر اثرهای انتخابی گونه‌های گیاهی (لوبیا چشم‌بلبلی، کلزا و سورگوم) بر ترکیب جامعه کل باکتریایی و شکل‌گیری و توسعه جوامع باکتریایی خاص بود و آن‌ها مقدار و ترکیب تراوش‌های ریشه را تعیین‌کننده اصلی تفاوت در ساختار جامعه بیان نمودند (۸۹). بااین‌حال، در مورد برخی گیاهان (خیار و جو)، جوامع باکتریایی ریزوسفر تحت‌تأثیر گونه‌های گیاهی قرار نگرفتند. این پژوهشگران بیان نمودند شاید کوتاه بودن دوره آزمایش (۸۸) و هم‌چنین وجود تعاملات پیچیده میان گونه گیاه و نوع خاک، گزارش‌های مغایر در مورد اهمیت گونه گیاه در تعیین ساختار جامعه باکتریایی در ریزوسفر را توضیح دهد (۸۹). در پژوهش دیگری که توسط DGGE و qPCR انجام گردید، مشخص شد با تبدیل مزارع دارای سابقه کشت طولانی‌مدت گندم به مزارع سیب‌زمینی ترشی، تغییراتی در ساختار و فراوانی جامعه قارچی خاک ایجاد شده است. هم‌چنین این تبدیل کشت، طی یک دوره کوتاه (یک تا سه سال) با کاهش برخی بیمارگرهای قارچی گندم و تقویت قارچ‌های مفید، اثرات مثبتی بر جوامع قارچی موجود در خاک گذاشت. این نتایج به روشنی نشان داد تناوب کشت گندم با سیب‌زمینی ترشی می‌تواند به‌منظور سرکوب عوامل بیماری‌زای گندم و تحریک گونه‌های قارچی مفید گیاهان اتخاذ شود (۱۳۹). مطالعات متعدد دیگر نیز بر اساس پروفایل‌های

DGGE تأیید نموده‌اند ساختار و تنوع جامعه کل باکتری‌ها (۲۹، ۳۹ و ۱۲۰) و نیز برخی جمعیت‌های باکتریایی خاص مانند جنس *Pseudomonas* (۲۱، ۲۳، ۳۹ و ۹۵) و *Bacillus* (۳۹) نیز تحت‌تأثیر گونه گیاهی یا نوع گیاه انتخاب شده در تناوب قرار می‌گیرند.

کاربرد روش DGGE جهت مطالعه اثر خاک‌ورزی و شیوه‌های مختلف آن بر جوامع میکروبی خاک: خاک‌ورزی روشی رایج در کشاورزی مدرن است که با اهداف مختلفی مانند آماده‌سازی بستر بذر، کنترل علف‌های هرز، جلوگیری از تبخیر، افزایش نفوذ آب و کنترل فرسایش انجام می‌شود (٦٥ و ١٠٥). سیستم‌های مختلف خاک‌ورزی شامل خاک‌ورزی مرسوم و خاک‌ورزی حفاظتی (۵۵) روی محیط فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی خاک که محل زندگی میکروارگانیسم‌هاست، تأثیر گذاشته و ممکن است بتوانند با تحت‌تأثیر قرار دادن گروه‌های مختلف موجودات به شیوه‌های متفاوت، منجر به تغییراتی در ترکیب و تنوع جوامع میکروبی آن شوند (۲، ٦٨، ۷۳، ۹۱ و ۱۲۲). برای پاسخ به برخی سؤالات در مورد اثرهای کلی خاک‌ورزی و یا بررسی اثر آن نسبت به سایر فعالیت‌های زراعی بر جوامع میکروبی مختلف و نیز مقایسه اثر سیستم‌های مختلف خاک‌ورزی بر جوامع میکروبی، از روش DGGE استفاده شده است. به‌عنوان‌مثال سالس و همکاران (۲۰۰٦) توسط این روش اثر خاک‌ورزی بر جامعه باکتری‌های جنس *Burkholderia* را بررسی نموده و پی بردند که خاک‌ورزی از فاکتورهای کلیدی تغییر در ساختار این جامعه در خاک بوده است (۱۱۰). پژوهش کیهارا و همکاران (۲۰۱۲) در کنیا، که در بالا به آن اشاره شد، نیز بیانگر این واقعیت بود که خاک‌ورزی نسبت به مدیریت بقایا و کودهای آلی و سیستم‌های کشت، بیش‌ترین تغییرات را در ترکیب جامعه باکتریایی و قارچی به وجود آورده است. هم‌چنین ساختار این جوامع بین سیستم‌های کم خاک‌ورزی و خاک‌ورزی مرسوم در مناطق نیمه مرطوب کاملاً متفاوت بود (٦٧). در یک پژوهش در گندم زمستانه نیز مقایسه جوامع میکروبی خاک‌های تحت رژیم کم خاک‌ورزی نسبت به خاک‌ورزی مرسوم مشخص نمود خاک‌های تحت رژیم کم خاک‌ورزی تنوع بیش‌تری را در خود جای داده‌اند (۳۵). هم‌چنین در یک مطالعه دیگر مشاهده شد که ساختار و تنوع جامعه قارچ‌های میکوریزی آربوسکول‌دار موجود در ریشه ذرت، در خاک‌های تحت دو رژیم خاک‌ورزی معمولی و بدون خاک‌ورزی تفاوت دارد. توالی‌یابی باندهای غالب پروفایل DGGE نمایانگر این حقیقت بود که اکثر گونه‌های میکوریزی آربوسکول‌دار موجود در مزرعه مورد بررسی در هر دو سیستم خاک‌ورزی به *Glomus* spp. تعلق داشتند (٩٤).

یکی از کاربردهای جالب DGGE که می‌تواند در کشاورزی پایدار بسیار شایان توجه باشد، استفاده از آن جهت بررسی اثر شدت‌های مختلف خاک‌ورزی بر جوامع میکروبی خاک است. به‌عنوان‌مثال، در یک پژوهش در برزیل، تأثیر ٢٦ و ١٠ ساله شدت‌های مختلف خاک‌ورزی (بدون خاک‌ورزی و یا تیمارهای شامل انواع مختلف ادوات خاک‌ورزی مانند دیسک و کولتیواتور) بر تنوع جوامع باکتریایی خاک به کمک DGGE بررسی شد. در سیستم بدون خاک‌ورزی همواره تنوع نسبت به سایر تیمارهای خاک‌ورزی، به‌طور قابل‌توجهی بیش‌تر بود و با تشدید و مُخل‌تر شدن شیوه‌های خاک‌ورزی، تنوع باکتریایی کاهش یافت. این بررسی به‌وضوح نشان داد که خاک‌ورزی شدید می‌تواند با از بین بردن گروه‌هایی از باکتری‌ها، به عملکرد خاک لطمه بزند. نویسندگان این پژوهش توصیه کردند می‌توان از بررسی تنوع میکروبی حاصل توسط DGGE به‌عنوان شاخصی زیستی جهت

بررسی تغییرات تنوع ناشی از خاک‌ورزی استفاده کرد (۱۱۷). جالب آن‌که پژوهش‌های دیگر نیز تأیید نموده‌اند که با کاهش شدت خاک‌ورزی، بسیاری از شاخص‌های مهم کیفیت و عملکرد خاک ممکن است بهبود یابند (٤٥، ٤٦، ٦٦). بررسی‌های پیکسوتو و همکاران (۲۰۱۰) بر اساس این روش نیز تأیید نمود که کاربرد طولانی‌مدت سیستم‌های بدون خاک‌ورزی نسبت به خاک‌ورزی مرسوم سبب افزایش تنوع و تفاوت ساختار جامعه کل باکتری‌ها در عمق ۰ تا ۵ سانتی‌متری خاک شده و این تفاوت، ارتباط معنی‌داری با تغییرات شیمیایی و بیوشیمیایی در خاک داشته است (۱۰٦). هم‌چنین با مشخص شدن تفاوت قابل‌توجه این دو سیستم از نظر ساختار جوامع باکتریایی خاص مانند جنس *Pseudomonas* که اعضای آن با نقش‌های کیفی و عملکردی مهم مانند زیست‌پالایی، بهبود رشد گیاه و کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی یکی از مهم‌ترین گروه‌های باکتریایی خاک هستند (٢٤ و ٣٨) چنین نتیجه‌گیری شد که شدت‌های مختلف خاک‌ورزی قادرند جمعیت‌های غالب میکروبی خاصی را در میان جوامع باکتریایی خاک برگزینند.

کاربرد روش DGGE جهت مطالعه اثر رقم یا ژنوتیپ گیاهی کشت‌شده بر جوامع میکروبی خاک: هدف از استراتژی‌های اصلاح نباتات، تولید و کاشت محصولاتی با عملکرد بالاست. اما عواملی از قبیل وضعیت فیزیولوژیک، رقم یا ژنوتیپ گیاه، با فراهم نمودن محیطی انتخابی برای میکروارگانیسم‌ها، قادرند اثرهای مختلف و گاه اساسی روی جوامع میکروبی مربوط به ریشه و تنوع آن‌ها اعمال نمایند (۵۱). بنابراین برای توسعه سیستم‌های موفق‌تر و پایدارتر تولید محصول، علاوه بر پژوهش در زمینه تأثیر گونه‌ها، بهتر است از اثر ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی بر جوامع میکروبی خاک نیز آگاهی داشته باشیم. این پژوهش‌ها در برخی موارد به کمک DGGE انجام شده و نتایج مختلفی از عدم تأثیر تا مشاهده اثرهای واضح بر جوامع میکروبی به‌دست‌آمده است. به‌عنوان‌مثال آنالیز پروفایل‌های DGGE جوامع قارچ‌ها و باکتری‌های ریزوسفر سه ژنوتیپ ماش (با سطوح مختلف تحمل به خشکی) نشان‌دهنده عدم اثر آشکار ژنوتیپ بر ترکیب و تنوع جوامع مذکور در خاک بوده است (۲۷). داسیلوا و همکاران (۲۰۰۳) نیز با این روش تنها اختلاف کمی در ساختار جمعیت گونه‌های باکتریایی جنس *Paenibacillus* مرتبط با چهار رقم ذرت مشاهده کرده و دریافتند ارقام دارای مراحل رشدی شبیه‌تر، ساختار جامعه نسبتاً مشابه‌تری دارند (۲٦). اما در مقابل برخی پژوهشگران دریافتند با وجود تأثیر قوی‌تر مرحله رشدی گیاه، ژنوتیپ نیز توانسته روی ترکیب جامعه باکتری‌های درون‌رُست[1] (۸۷) و باکتری‌های موجود در ریزوسفر ژنوتیپ‌های مختلف سیب‌زمینی شیرین (۸٦) تأثیر بگذارد و جالب آن که بر اساس آزمون کشت جدایه‌های باکتریایی نیز پراکنش ویژه‌ای از این جدایه‌ها در میان ژنوتیپ‌های این گیاه مشاهده شد (۸۷). برخی پژوهشگران دیگر نیز طی بررسی اثر ده رقم برنج روی باکتری‌های خاک به کمک DGGE به این نتیجه رسیدند که ژنوتیپ گیاه، ترکیب جوامع مختلف باکتریایی را در میان ارقام مختلف برنج تعیین می‌کند و اثر ژنوتیپ گیاه کشت‌شده به‌احتمال زیاد ناشی از تأثیر آن روی ریشه‌زایی و تراوش‌های ریشه بوده که به‌طور مستقیم روی کلنیزاسیون و وضعیت مواد غذایی جوامع باکتریایی همراه ریشه تأثیر می‌گذارد. ازآن‌جاکه اثر ژنوتیپ در پروفایل‌های DGGE جوامع باکتریایی بسیار کمپلکس (مانند کل باکتری‌ها، α و β- پروتئوباکتری‌ها) کم و در جوامع اکتینومیست‌ها و جنس *Pseudomonas* برجسته بود، این واقعیت

1- Endophyte

آشکار شد که هر جامعه باکتریایی به‌طور متفاوت به برخی اثرات مانند ژنوتیپ پاسخ می‌دهد (۵۱).

کاربرد روش DGGE جهت مطالعه اثر گیاهان تراریخت بر جوامع میکروبی خاک: یکی از جنبه‌هایی که توجه برخی پژوهشگران را به خود جلب نموده، مطالعه اثر گیاهان تراریخت یا اصلاح ژنتیکی شده بر جوامع میکروبی خاک است. گیاهان تراریخت با هدف افزایش مقاومت گیاه در برابر آفات، بیماری‌ها، علف‌کش‌ها، تنش‌های محیطی و نیز بهبود صفات کیفی و کمی گیاه و هم‌چنین توانایی تولید ترکیبات صنعتی و دارویی ایجاد می‌شوند (۳۳ و ۷۶) اما این احتمال وجود دارد که این گیاهان به دلیل انتشار محصولات تراژن یا ترکیبات تغییریافته تراوش‌های ریشه، جوامع میکروبی ریزوسفر را تغییر دهند (۱۳ و ۵۳). با توجه به حساس بودن میکروفلور ریشه گیاهان به عوامل محیطی (۱۳) لازم است پیش از کاربرد گسترده گیاهان تراریخت، اثرهای آن‌ها بر جوامع میکروبی خاک بررسی گردد که در این زمینه هم از کارایی DGGE برای بررسی تأثیر احتمالی چنین گیاهانی بر جامعه بومی ریزوسفر گیاه استفاده شده و نتایج مختلفی حاصل گردیده است.

گیاهان تراژن بیان‌کننده پروتئین‌های Cry باکتری *Bacillus thuringiensis* (محصولات Bt) که موجب کاهش کاربرد حشره‌کش‌ها و ریسک آلودگی ناشی از تیمارهای شیمیایی می‌شوند، از پتانسیل بسیار خوبی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات برخوردارند (۱۳) ولی همواره این نگرانی وجود دارد که محصولات Bt به دلیل رهاسازی و ماندگاری پروتئین‌های Cry لاروکُش در خاک، اکوسیستم‌های طبیعی یا کشاورزی را در معرض خطر قرار دهند. جهت ارزیابی نوعی پنبه Bt کنترل‌کننده کرم غوزه پنبه روی جوامع میکروبی خاک، پس از سه سال کشت و در شش مرحله رشدی گیاه، ریزوسفر پنبه‌های Bt و والد غیر تراریخت‌شان توسط پروفایل‌های DGGE گروه‌های ائوباکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها مقایسه گردید. نتایج حاصل تفاوت معنی‌داری در اندازه جمعیت و ساختار جامعه هیچ‌یک از میکروارگانیسم‌های مذکور در خاک ریزوسفر پنبه Bt و والد غیر تراریختش آشکار ننمود (۱۳۸). هم‌چنین مقایسه جوامع باکتریایی Alpha و Betaproteobacteria و اکتینومیست‌های ریزوسفر دو لاین سیب‌زمینی تراژن تولیدکننده T4- لیزوزیم[1] (که با هدف محافظت در برابر بیماری‌های باکتریایی تولید شده بودند) با شاهد غیر تراژن، طی سه سال متوالی و در سه مرحله رشد گیاه، نشان داد بیان T4-لیزوزیم اثری بر ترکیب جامعه ریزوسفر و فراوانی گونه‌های باکتریایی مذکور نداشته است (۵۳). در بررسی جوامع باکتریایی پنج رقم مختلف سیب‌زمینی (از جمله یک رقم دست‌کاری ژنتیکی شده) نیز با وجود مشاهده تأثیر ارقام مختلف روی ساختارهای جوامع باکتریایی ریشه، اثری از گیاهان تراریخت بر این جوامع مشاهده نشد (۵۸). در مقابل، واینرت و همکاران (۲۰۰۹) جوامع دو رقم اصلاح ژنتیکی شده سیب‌زمینی (دارای زیازانتین[2] بیش‌تر در غده‌ها) و رقم والد آن‌ها را به همراه شش رقم دیگر در سه مرحله رشدی گیاه بررسی کرده و میان جوامع باکتریایی و به‌ویژه جوامع قارچی رقم والد و دو رقم اصلاح ژنتیکی شده آن، تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده نمودند. هرچند با مقایسه همه ژنوتیپ‌های گیاهی مشاهده شد اثر ارقام مختلف روی این جوامع نسبت به اثر اصلاحات ژنتیکی، بیش‌تر بوده است (۱۲۹). هم‌چنین بر اساس این تکنیک مشخص شده که گاه اثر ژنوتیپ و گیاهان تراریخت روی کل جوامع میکروبی نبوده بلکه به جوامع میکروبی خاصی

1- T4-lysozyme
2- Zeaxanthin

محدود می‌شود. به‌عنوان‌مثال مقایسه ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی و قارچی ریزوسفر و خاک غیرریزوسفری یک رقم سیب‌زمینی والد غیر تراژن و لاین تراژن آن (با ترکیب نشاسته تغییریافته) و یک رقم غیرتراریخت و غیرخویشاوند دیگر، تفاوت معنی‌داری میان جوامع عمومی قارچ‌ها و باکتری‌ها نشان نداد، اما با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به جنس *Pseudomonas*، تفاوت‌های قابل‌توجهی بین ترکیب ریزوسفر لاین سیب‌زمینی تراژن و رقم والد آن مشاهده گردید (۹۳). جمع‌بندی دانسته‌ها و نتایج موجود در مورد تأثیر گیاهان تراریخت بر جامعه میکروبی ریزوسفر می‌تواند نشان‌دهنده این حقیقت باشد که این اثر ممکن است به گیاه خاص، تراریخت، شرایط مورد نظر (۱۳) و نیز گروه میکروبی خاص بستگی داشته باشد. مسأله‌ای که اکثر مطالعات در آن اشتراک دارند این است که نمی‌توان تشخیص داد که آیا اثرهای مشاهده شده ناشی از تغییر ژنتیکی مد نظر، به‌دلیل تغییرات ناخواسته در ویژگی‌های گیاه تراریخت و یا به علت تفاوت در شیوه‌های کشاورزی می‌باشند (۹۳) اما درهرصورت به‌کارگیری آزمون‌های معتبر مانند DGGE برای ارزیابی این اثرها حائز اهمیت است (۱۳).

کاربرد روش DGGE جهت مطالعه اثر کودها و اصلاح‌کننده‌های آلی و معدنی بر جوامع میکروبی خاک: یکی از متداول‌ترین عملیاتی که در زمین‌های کشاورزی اعمال می‌شود، استفاده از کودهای معدنی و آلی است. توانایی گروه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها برای تهیه اشکال مختلف مواد غذایی موجود در خاک می‌تواند متفاوت باشد؛ بنابراین کاربرد کودهای مختلف علاوه بر بهبود تغذیه گیاه، افزایش عملکرد محصول و حاصلخیزی خاک ممکن است رشد و رقابت میکروبی (۸۳) و ساختار و فعالیت میکروارگانیسم‌های مختلف ساکن خاک را تحت‌تأثیر قرار دهد (۱۱۵). هم‌چنان که پژوهش‌های سالس و همکاران (۲۰۰۶) بر اساس DGGE نشان داد کوددهی یکی از عوامل اساسی تغییر در ساختار جامعه باکتری‌های جنس *Burkholderia* در خاک بوده است (۱۱۰). هم‌چنین به دلیل استفاده گسترده از کودها به‌ویژه کودهای شیمیایی، لازم است اثرهای کاربرد آن‌ها بر جوامع میکروبی خاک با به‌کارگیری روش‌های قابل‌اعتمادی مانند DGGE بررسی و از نتایج حاصل برای افزایش حاصلخیزی خاک استفاده گردد (۵۲). به کمک این روش در یک مطالعه اثر ورمی‌کمپوست غنی از اسید هیومیک، ورمی‌کمپوست نرمال و کودهای شیمیایی بر ساختار میکروبی خاک نخودفرنگی طی دو ماه بررسی شد (۸۵). حداکثر تنوع و غنای باکتریایی و قارچی در خاک‌های حاوی ورمی‌کمپوست غنی از اسید هیومیک پس از ۱۲ روز و در مقابل کم‌ترین مقادیر شاخص‌های مذکور پس از دو ماه و در خاک‌هایی که کودهای شیمیایی در آن‌ها به‌کار رفته بود، مشاهده شد. این پژوهش به‌وضوح نشان‌دهنده اثرهای منفی کودهای شیمیایی روی تنوع میکروبی خاک و اهمیت و تأثیر مثبت نهاده‌های آلی بر عکس‌العمل جوامع میکروبی خاک در مقایسه با کودهای شیمیایی بود. در پژوهش دیگری اثر نوعی کود آلی زیستی (حاوی باکتری آنتاگونیست *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 اضافه شده به ترکیب آلی کود آمینواسیدی و کمپوست کود خوکی) توسط DGGE بررسی شد. کاربرد کود آلی مذکور نه‌تنها سبب افزایش عملکرد محصول گردید، بلکه جامعه باکتری‌های ریزوسفری در این تیمار کودی، غنا و تنوع بیش‌تری نسبت به شاهد داشت (۳٤). در یک آزمایش مزرعه‌ای دیگر، روش DGGE جهت تأثیر کاربرد طولانی‌مدت کودهای معدنی و آلی به کار رفته و مشخص گردید به‌طورکلی، کاربرد کود به‌ویژه کودهای آلی، سبب افزایش تنوع ریبوتیپ‌های باکتریایی و قارچی شده است. ساختار جامعه

باکتریایی و قارچی نیز میان خاک‌های تیمار شده با کودهای آلی و معدنی متفاوت بود که شاید به دلیل تغییر خواص شیمیایی خاک و وضعیت حاصلخیزی آن و نیز اختلاف در تراوش‌های ریشه، که منبع مهمی از کربن خاک برای میکروارگانیسم‌ها بوده اما خود نیز تحت‌تأثیر وضعیت مواد غذایی گیاه قرار دارند، باشد. از سوی دیگر، در خاک‌های کوددهی شده برخی ریبوتیپ‌های خاص، بیش‌تر یافت شدند که نشان‌دهنده شرایط مساعد برای تکثیر و فعالیت گونه‌های میکروبی خاص بود. هم‌چنین تاکسون‌های قارچی و باکتریایی غالب یافت شده در خاک‌های تیمار شده با کودهای معدنی یا آلی، متفاوت بودند. در درازمدت، چنین تغییراتی می‌توانند منجر به تغییر کیفیت و عملکرد خاک‌ها و توسعه برخی میکروارگانیسم‌ها و سرکوب برخی دیگر شوند. هم‌چنین نتایج این آزمایش نشان داد کوددهی با فسفر، نیتروژن و کربن آلی خاک اثر مهمی روی جامعه قارچی و باکتریایی خاک دارند و عدم تأمین فسفر در هنگام کوددهی ممکن است در طولانی‌مدت تنوع باکتریایی را به‌طور قابل‌توجهی کاهش دهد (۸۳). هم‌چنین در پژوهش دیگری به کمک DGGE، با بررسی اثر کاربرد هشت‌ساله فسفر بر جوامع میکروبی خاک در تک‌کشتی‌های یونجه مشاهده شد با وجود عدم تأثیر کاربرد فسفر بر غنای گونه‌ای، این عنصر یکی از عوامل تعدیل‌کننده ساختار جوامع باکتریایی و قارچی ریزوسفر بوده است (۸).

از DGGE برای بررسی اثر کودها بر جوامع درون‌رُست گیاه نیز استفاده شده است. به‌عنوان‌مثال اثر کاربرد و عدم کاربرد کود NPK در سه گونه مهم علفی باریک برگ نشان داد کوددهی توانسته ساختار جوامع باکتریایی درون‌رُست را در دو گونه از آن‌ها به‌طور قابل‌توجه تغییر دهد. بنابراین تأثیر کوددهی ممکن است اختصاصی گیاه نیز باشد (۱۳۰).

علاوه بر کودها، اصلاح‌کننده‌های آلی و معدنی نیز برای جوامع میکروبی و محصولات زراعی، محیطی غنی از مواد غذایی فراهم نموده و بنابراین ممکن است با ایجاد تغییراتی در جوامع میکروبی، به‌نوبه خود بر کیفیت خاک و تغذیه گیاهان تأثیر بگذارند. به‌ویژه اصلاح‌کننده‌های آلی با اثر بر کل جوامع میکروبی (۱۱۳) یا دست‌کاری جوامع آنتاگونیست‌های موجود در خاک قادرند ترکیب بالقوه مؤثری برای بیوکنترل بیمارگرهای گیاهی خاکزاد فراهم نمایند (٥٤). بنابراین کاربرد روش‌هایی مانند DGGE جهت آگاهی یافتن از اثر افزودن اصلاح‌کننده‌های آلی یا معدنی در طی یک دوره زمانی کمک می‌کند دریابیم آیا چنین عملی خواهد توانست کیفیت خاک را برای کِشت پایدار حفظ نموده یا بهبود بخشد؟ (۷۰).

در یک پژوهش، اثرهای کوتاه‌مدت ترکیبات مختلف کاه، دو نوع بیوچار (از اصلاح‌کننده‌های خاک که نوع پایداری از کربن آلی است) و کودهای شیمیایی در مقایسه با کاربرد تنهای کودهای شیمیایی بررسی شد. بر اساس انگشت‌نگاری DGGE، تنوع و غنای گونه‌ای در خاک‌های دارای بیوچار بیش‌تر از خاک‌های فاقد بیوچار بود. بنابراین بیوچار توانست حاصلخیزی خاک را بهبود بخشد. اثرهای مثبت کاربرد هم‌زمان بیوچار و کودهای شیمیایی بر خصوصیات خاک و ساختار جامعه میکروبی نیز مشاهده گردید (۵۲). در مقابل، در یک پژوهش گلدانی با کمک DGGE مشخص شد اضافه نمودن بیوچار کاه ذرت به خاک تا اندازه‌ای باعث کاهش تنوع باکتری‌ها شد اما به‌صورت انتخابی سبب تقویت و تسهیل رشد باکتری‌های مفید برای تبدیل‌شدن به جامعه غالب گردید. نویسندگان بیان نمودند این مسأله می‌تواند سازمان‌دهی جامعه باکتریایی را افزایش داده و منجر به جامعه باکتریایی پایدارتری گردد که نسبت به آشفتگی‌ها و تغییرات محیطی مقاوم است (۷۹).

گاه از DGGE جهت بررسی اثر کودها و اصلاح‌کننده‌های آلی و معدنی بر وقوع بیماری‌های گیاهی استفاده شده است؛ به‌عنوان‌مثال در پژوهشی که در بخش فوق به آن اشاره گردید (۳٤)، استفاده از کود آلی حاوی باکتری آنتاگونیست *B. amyloliquefaciens* NJN-6 علاوه بر مزایای ذکر شده، سبب کاهش قابل‌توجه بروز بیماری پژمردگی فوزاریومی موز در اراضی تازه کشت‌شده نیز گردیده است (۳٤) و تأییدکننده مطالعاتی است که در آن‌ها ذکر شده بین تنوع میکروبی و بازدارندگی از بیماری‌ها در خاک رابطه مثبتی وجود دارد (۱٤، ۳۷ و ۱۲۸). در یک آزمایش دیگر اثرهای کاربرد کمپوست ضایعات ماشین پنبه‌پاک‌کنی به عنوان یک اصلاح‌کننده آلی نسبت به کاربرد اصلاح‌کننده مصنوعی روی جامعه میکروبی توسط DGGE بررسی شد. اصلاح‌کننده آلی نه‌تنها باعث کاهش بیماری پوسیدگی سختینه‌ای (ناشی از *Sclerotium rolfsii*) گردید، بلکه تنوع جامعه باکتریایی را به‌طور قابل‌توجهی در مقایسه با اصلاح‌کننده مصنوعی بالاتر نگه داشت. جالب آن‌که همبستگی منفی معنی‌داری بین شیوع پوسیدگی سختینه‌ای و شاخص تنوع DGGE وجود داشت (۷۸).

کاربرد روش DGGE جهت مطالعه اثر مایه‌های زیستی بر جوامع میکروبی خاک: تلقیح مایه‌های زیستی یا میکروبی به خاک به‌طورکلی با هدف بهبود حاصلخیزی و بهره‌وری خاک (۱۱٦)، بهبود رشد گیاه و یا مقابله با بیماری‌های گیاهی (۱) انجام می‌شود. گرچه تأثیر مثبت مایه‌های زیستی روی گیاه به‌خوبی تصدیق شده، بااین‌حال واردسازی آن‌ها به خاک چه از طریق تلقیح بذر و چه کاربرد مستقیم، ممکن است سبب مداخله در تعادل بیولوژیکی ریزوسفر گردیده و تغییرات ناچیز تا شدیدی در ترکیب جوامع میکروبی ساکن خاک به‌وجود آورد (۱۱٦). بنابراین لازم است قبل از کاربرد گسترده آن‌ها، اثرهای غیر هدفمندشان روی این جوامع بررسی شود. DGGE یکی از روش‌هایی است که در این زمینه به پژوهشگران یاری رسانده است. به‌عنوان‌مثال در یک آزمایش، پس از تلقیح سویه وحشی *Pseudomonas fluorescens* دارای قابلیت بیوکنترلی علیه آلودگی‌های پیتیومی و یک سویه اصلاح ژنتیکی شده آن، تغییرات حاصل در جوامع باکتریایی و قارچی ریزوسفر گیاهان نخودفرنگی، گندم و چغندرقند توسط این روش بررسی شد. نتایج نشان داد تلقیح هر دو سویه، تأثیر ناچیزی بر تنوع این جوامع داشته است (۱۲٤). در پژوهش دیگری، جهش‌یافته‌های مقاوم به ریفامپیسین باکتری‌های آنتاگونیست *Pseudomonas putida* QC14-3-8 و *Serratia grimesii* L16-3-3 که در شرایط آزمایشگاه به‌ترتیب علیه باکتری *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* و قارچ *Verticillium dahliae* فعالیت آنتاگونیستی نشان داده بودند، به ریزوسفر و اطراف غده‌های سیب‌زمینی[1] وارد شده و اثر آن‌ها بر جامعه باکتریایی توسط DGGE بررسی شد. در هیچ‌یک از زمان‌های نمونه‌برداری، تفاوت معنی‌داری میان ترکیب کل جامعه باکتریایی ریزوسفر و اطراف غده‌های سیب‌زمینی مایه‌زنی شده و مایه‌زنی نشده مشاهده نگردید. علاوه بر این هیچ‌کدام از سویه‌های باکتریایی وارد شده به اعضای غالب در جامعه باکتریایی تبدیل نشدند (۸۲). در مقابل، وقتی گروهی از پژوهشگران (٦۰)، اثرهای تلقیح دوگانه جدایه‌های *Bacillus subtilis* و *Trichoderma harzianum* با پتانسیل آنتاگونیستی علیه پژمردگی فوزاریومی را روی جوامع باکتریایی ریزوسفر گوجه‌فرنگی بررسی نمودند دریافتند تلقیح دوگانه، تغییرات مشخصی در ساختار جامعه باکتریایی ساکن نسبت به شاهد تلقیح نشده به وجود آورده است. علاوه بر این، در مقایسه با

1- Geocaulosphere

تلقیح منفرد این جدایه‌ها، بالاترین مقادیر شاخص‌های تنوع در تیمار ترکیبی این دو عامل مشاهده شد که نشان‌دهنده اثر مثبت این دو عامل بیوکنترل روی فراوانی جامعه باکتریایی ریزوسفر گیاه میزبان بود. تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی باندهای DGGE به‌دست آمده از نمونه‌های خاک ریزوسفر گیاهانی که تحت تیمار تلقیح دوگانه قرار گرفته بودند، وجود گونه‌های مهم اکولوژیکی که مربوط به میکروارگانیسم‌های بالقوه مفید بودند را آشکار نمود و به‌وضوح نمایانگر تأثیر خوب این عوامل بیوکنترلی به‌صورت تغییر مثبت در فراوانی باکتری‌های مفید و بهبود سلامت خاک به‌دلیل کاهش پژمردگی فوزاریومی بود (۶۰).

از DGGE جهت بررسی دلایل اثربخشی مایه‌های زیستی نیز استفاده شده است. به‌عنوان‌مثال گزارش شده ترکیب برخی سویه‌های باکتریایی مانند *Streptomyces rubrogriseus* HDZ-9-47 (۶۴) و یا *Pseudomonas reinekei* SN21 (۷۷) با تدخین زیستی[1] حاصل از بقایای برخی گیاهان، باعث افزایش اثربخشی آن‌ها در برابر نماتود بیماری‌زای *Meloidogyne incognita* می‌شود (۶۴). جهت پی بردن به دلیل اثربخشی و کارایی بهتر ترکیب این موارد، تأثیر ترکیب عوامل مذکور بر جوامع میکروبی خاک و نماتودها در مزرعه توسط DGGE بررسی شد. نتایج نشان داد کاربرد ترکیبی موارد فوق، با دست‌کاری جوامع میکروبی و غنی نمودن میکروارگانیسم‌های مفید خاک، سبب کاهش برخی از بیمارگرهای گیاهی خاکزاد ازجمله *M. incognita* شده است (۶۳).

کاربرد روش DGGE جهت مطالعه اثر سموم و آفت‌کش‌ها بر جوامع میکروبی خاک: اگرچه استفاده از سموم و ترکیبات مختلف در کنترل آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز مؤثر بوده است، اما با افزایش کاربرد این ترکیبات در کشاورزی، همواره این نگرانی وجود دارد که آن‌ها با اثرهای غیرهدفمند خود علاوه بر آفات هدف، جوامع میکروبی مفید که وظایف و کارکردهای مهمی در خاک دارند را نیز تحت‌تأثیر قرار داده و در نهایت به عملکردهای مهم خاک و سلامت و کیفیت آن آسیب برسانند (۱۹ و ۱۳۷). به همین دلیل برخی مطالعات توسط DGGE به بررسی اثرهای غیر هدفمند سموم بر جوامع میکروبی خاک پرداخته‌اند. به‌عنوان‌مثال، اثر کاربرد دو سم شیمیایی پرکاربرد کلرپیریفوس و سایپرمترین و یک آفت‌کش بیولوژیکی (آزادیراکتین) با دوزهای متفاوت روی جوامع میکروبی توسط DGGE و q-PCR بررسی شد. طبق نتایج حاصل، حتی در دوزهای توصیه‌شده، سه ترکیب مورد آزمایش، اثر نامطلوبی روی فراوانی و ساختار جامعه باکتریایی داشتند. تغییرات کیفی و کمی مشاهده شده در جوامع باکتریایی ساکن و فعال ریزوسفر گذرا نبوده و در سراسر بلوغ گیاه ادامه داشت. نکته مهم این بود که اگرچه آزادیراکتین با توجه به منشأ بیولوژیکی‌اش از نظر زیست‌محیطی ترکیبی ایمن محسوب می‌شود، اما این مطالعه اثرهای مضر و غیرهدفمند آن بر ساختار جامعه میکروبی ریزوسفر را آشکار کرد و بر لزوم انجام آنالیزهای مناسب ارزیابی ریسک ترکیبات به‌کار رفته در کشاورزی قبل از انتشار آن‌ها به محیط‌زیست تأکید نمود (۱۱۹). در مقابل، در پژوهش دیگری بررسی اثر دو آفت‌کش سیستمیک متالاکسیل و ایمیداکلوپرید روی جوامع قارچی و باکتریایی اپی‌فیت از طریق DGGE و کلونینگ نشان داد این سموم باعث ایجاد تغییرات خفیفی در ساختار جوامع قارچی و باکتریایی می‌شوند (۹۶).

هم‌چنین گزارش شده تنوع قارچی حاصل از آنالیز DGGE می‌تواند برای ارزیابی تأثیر کنترلی تیمارهای قارچ‌کش در خاک مفید باشد. به‌عبارت‌دیگر، روش

1- Biofumigation

تشخیصی DGGE می‌تواند کارایی استفاده از قارچ‌کش‌ها را مقدور سازد (۱۲۵).

علاوه بر این، در برخی پژوهش‌ها از DGGE جهت بررسی اثر کاربرد مقادیر مختلف سموم بر جوامع میکروبی خاک استفاده شده است. مثلاً در یک پژوهش ٤٢ روزه اثر تیمار خاک با دو دوز مختلف آفت‌کش اندوسولفان، بر ساختار جامعه قارچی و باکتریایی بررسی گردید. پس از کاربرد این ترکیب تغییر مهمی در ساختار جامعه باکتریایی در هر دو دوز و تغییر ساختار جامعه قارچی در تیمار با دوز بالاتر مشاهده شد. هم‌چنین غلظت بالاتر اندوسولفان اثر بیش‌تری روی جامعه‌ی باکتریایی خاک داشت (۱۳۷). ژین‌یو و همکاران (۲۰۱۰) نیز اثر علف‌کش استوکلر و غلظت‌های مختلف آن بر جامعه قارچی را در مقیاس کوچک توسط DGGE بررسی نمودند. این علف‌کش نه‌تنها تغییر قابل‌توجهی در ساختار جامعه قارچی پدید آورد، بلکه زمان و میزان کاربرد استوکلر در خاک نیز این جامعه را تحت‌تأثیر قرار داد، به‌گونه‌ای که غلظت‌های بالاتر اثرهای بیش‌تری روی جوامع قارچ‌های خاک داشتند. هم‌چنین این مطالعه نشان داد استوکلر اثرهای طولانی‌مدتی بر ساختار قارچ‌های موجود در خاک داشته که جبران آن به‌کندی صورت می‌گیرد (۱۳٤).

کاربرد روش DGGE جهت مطالعه اثر آفتاب‌دهی بر جوامع میکروبی خاک: در میان راهبردهای موجود برای ضدعفونی خاک، آفتاب‌دهی در بسیاری از کشورها رویکرد مهمی در برنامه‌های مدیریت آفات، بیماری‌های خاکزاد و علف‌های هرز محسوب می‌شود (٤٠). هم‌چنین این روش ممکن است تغییراتی در فعالیت و تراکم جوامع میکروبی خاک به وجود آورد و برخی از این تغییرات می‌توانند در نهایت منجر به ایجاد بازدارندگی در خاک گردند (٤). برای پی بردن به اثر آفتاب‌دهی بر بیمارگرهای گیاهی و یا اثرهای جانبی آفتاب‌دهی روی میکروفلور غیر بیماریزای خاک در برخی پژوهش‌ها از DGGE استفاده شده و در برخی از آن‌ها آفتاب‌دهی به عنوان فاکتور اصلی و در برخی دیگر به عنوان عامل فرعی ایجاد تغییر در جوامع میکروبی شناخته شده است. به‌عنوان‌مثال در یک تیمار ۷۲ روزه، اثرهای آفتاب‌دهی خاک به‌صورت تنها یا ترکیب با کود دامی به عنوان اصلاح‌کننده آلی بررسی شد. بر اساس پروفایل‌های DGGE مشخص گردید در خاک‌های اصلاح‌نشده یا اصلاح‌شده با ماده آلی، آفتاب‌دهی عامل اصلی تغییرات قابل‌توجه در ساختار جامعه یوباکتری‌ها، بتاپروتئوباکتری‌ها و اکتینومیست‌های بومی خاک به‌صورت وابسته به زمان بوده است. غنای باکتریایی در نمونه‌برداری‌های ١٦ و ٣٦ روزه افزایش یافته و به دنبال آن در نمونه‌برداری ۷۲ روزه کاهش یافت. این پژوهشگران بیان کردند دلیل این امر غیر از تأثیر مستقیم دما بر میکروفلور خاک، ممکن است تغییرات القاشده توسط آفتاب‌دهی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی زیستگاه‌های میکروبی خاک یا سایر عوامل اکولوژیکی مانند کاهش رقابت‌پذیری گونه‌های باکتریایی غلبه‌کننده، کاهش فشار تغذیه شکارگرهای میکروفون یا افزایش دسترسی به مواد غذایی باشد (٤٠). در پژوهش دیگری که بر پایه DGGE انجام گردید، افزودن کمپوست و آفتاب‌دهی خاک به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی سبب کاهش فراوانی بیمارگر *R. solanacearum* شد که نشان‌دهنده اثر مثبت کاربرد تیمارهای مذکور روی این بیمارگر خاکزاد بود. هم‌چنین در تیمارهای ذکرشده تغییراتی در ساختار جوامع باکتریایی بومی خاک (بتاپروتئوباکتری‌ها و یوباکتری‌ها) مشاهده شد. اما اثر مشاهده شده روی بیمارگر به‌وضوح به حضور کمپوست بستگی داشت. هم‌چنین این تأثیر می‌توانسته به دلیل تغییرات حاصل از تیمارهای مذکور روی ساختار و افزایش جامعه

میکروبی خاک، که منجر به سرکوب عوامل بیماری‌زا می‌شوند، باشد (۱۱۳).

محدودیت‌های DGGE: DGGE یکی از تکنیک‌های پرکاربرد برای مطالعه جامعه میکروبی خاک است (۶۳) اما مانند سایر روش‌های به‌کار رفته برای این منظور، دارای محدودیت‌هایی است که هنگام استفاده و تفسیر نتایج حاصل از آن باید در نظر گرفته شوند.

یکی از مشکلات ذاتی DGGE این است که با یک ژل واحد، تنها تعداد محدودی از نمونه‌ها قابل بررسی‌اند و همه نمونه‌ها را نمی‌توان روی یک ژل بارگذاری کرد. بنابراین، وجود اختلاف بین ژل‌های مختلف باعث کاهش تکرارپذیری نتایج می‌شود (۳۱) و دستورالعمل قابل اطمینانی برای مقایسه ژل‌های مختلف با هم در دسترس نیست. از سوی دیگر، همیشه تعداد و شدت باندهای مشاهده شده در یک پروفایل DGGE را نمی‌توان به عنوان تعداد و وضعیت دقیق جمعیت‌های یک جامعه تعبیر کرد، چون یک میکروارگانیسم ممکن است با داشتن چند اوپرون ژنی rDNA بیش از یک باند تولید کند (۸۱)، یا یک باند منفرد نمایانگر یک سویه میکروبی واحد نبوده بلکه نماینده چند جمعیت باشد (۹۹ و ۱۱۴) که این موضوع به دلیل حرکت هم‌زمان مولکول‌های دی‌ان‌ای دارای توالی‌های مختلف و قرار گرفتن آن‌ها در یک موقعیت است (۴۸). به دلایل ذکر شده، پارامترهای محاسبه شده با انگشت‌نگاری DGGE باید به‌عنوان نماینده جامعه میکروبی و نه سنجش قطعی آن تفسیر شوند (۸۱). هم‌چنین DGGE به‌خودی‌خود در جداسازی قطعات نسبتاً کوچک دی‌ان‌ای و حساسیت در ردیابی اعضای نادر جامعه محدودیت‌هایی دارد (۳۴). به گفته برخی دانشمندان (۹۷) اگر دی‌ان‌ای گونه هدف کمتر از یک درصد کل نمونه مورد نظر باشد، ممکن است توسط این روش قابل شناسایی نباشد. به همین دلیل باید در نظر داشت پروفایل DGGE نماینده موجودات غالب یک جامعه است و هنگام بررسی محیط‌های بسیار متنوع، احتمال دارد همیشه باندهای مجزا در الگوهایی که به‌طور ضعیف تفکیک شده‌اند، قابل تشخیص نباشند (۴۸). علاوه بر این، در برخی موارد قدرت وضوح پایین و شلوغی‌های پس‌زمینه در ژل‌ها وجود دارد (۶۳) که تفسیر نتایج را دشوار می‌نماید. هم‌چنین چون این روش مبتنی بر PCR است، خطاهای مرتبط با تکثیر PCR نیز ممکن است وارد آنالیز DGGE شوند (۳۲). البته برای غلبه بر این مشکل و مشکلات احتمالی دیگر، مهارت استفاده از DGGE به عنوان ابزاری جهت آنالیز جوامع میکروبی افزایش یافته است. به‌عنوان‌مثال، ترکیب این روش با سایر روش‌ها مانند توالی‌یابی باندها یا هیبریداسیون با پروب‌ها می‌تواند ابهام شناسایی باندها را کاهش دهد (۹۹). استفاده از آغازگرهای نشان‌دار شده با فلوئوروفور[1] نرمال‌سازی پروفایل‌های DGGE را در داخل و بین ژل‌ها تسهیل می‌کند (۱۰۱). کاربرد آنزیم *Pfu* دی‌ان‌ای پلیمراز نیز می‌تواند خطاهای مربوط به تکثیر در حین PCR را تا حد بسیار زیادی کاهش دهد (۲۰). در دسترس بودن چندین گزینه نرم‌افزاری برای مقایسه پروفایل‌های DGGE برای آنالیز خوشه‌ای نیز قیاس‌های ممکن برای انگشت‌نگاری‌های DGGE را قوت بخشیده و باعث افزایش قابلیت تلفیق پروفایل‌های DGGE با مجموعه داده‌ها می‌شود (۴۸).

نتیجه‌گیری

هدف اصلی سیستم‌های کشاورزی، تأمین امنیت غذایی و استفاده کارآمد از زمین‌های زراعی و نهاده‌های مزرعه‌ای است. به‌دلیل نقش مهم جوامع میکروبی موجود در خاک در در ثبات بوم‌نظام‌ها و بازده سیستم‌های زراعی، یکی از راهبردهای اساسی

1- Fluorophore

در کشاورزی پایدار، احیا و حفظ جوامع میکروبی زنده، فعال و متنوع در خاک است. رعایت اصول زراعی صحیح و استفاده معقول و مدبرانه از نهاده‌های مختلف کشاورزی، روشی مکمل برای تقویت خاک و حمایت از جوامع مفید آن جهت رسیدن به تولید پایدار محصولات زراعی است. برای دانستن صحیح‌ترین و اصولی‌ترین شیوه‌های کشاورزی که موجب حفظ تنوع و تقویت جوامع میکروبی می‌شوند و پرهیز از اقداماتی که نابودی و کاهش تنوع میکروارگانیسم‌های آن را به دنبال دارند، کسب دانش صحیح در مورد تأثیر این گونه فعالیت‌ها بر میکروارگانیسم‌های خاک و حاصلخیزی و کیفیت آن ضروری است. برای رسیدن به چنین آگاهی، دستیابی به روش‌هایی که قادر باشند دانسته‌های نسبتاً دقیق و جامعی در مورد تنوع و ساختار جوامع خاک میکروبی خاک‌های تحت تیمارهای مختلف کشاورزی ارائه دهند، اهمیت زیادی دارد. روش‌هایی که نسبتاً کم‌هزینه، ساده، سریع، قابل‌اعتماد، توانمند، حساس، تکرارپذیر و اختصاصی بوده و امکان بررسی بخش غیر قابل‌کشت جامعه میکروبی را نیز فراهم کنند. هم‌چنان که از مطالب ذکر شده در این مقاله مروری مشخص گردید، DGGE از تکنیک‌های بسیار رایج انگشت‌نگاری است که به‌دلیل داشتن خصوصیات مذکور، بیش از دو دهه است که با موفقیت جهت بررسی اثر فعالیت‌های زراعی مختلف مانند سیستم‌های مختلف کشت و تناوب، ارقام یا ژنوتیپ‌های گیاهی، خاک‌ورزی و شیوه‌های مختلف آن، کودها و اصلاح‌کننده‌های آلی و معدنی، مایه‌های زیستی، سموم و آفت‌کش‌ها و ... بر ساختار، تنوع و فراوانی و پویایی جوامع میکروبی خاک به کار رفته است.

در حال حاضر علی‌رغم برخی محدودیت‌های DGGE و توسعه نسل جدید فن‌آوری‌های توالی‌یابی دارای توان بالا در مطالعه جوامع میکروبی خاک، به‌دلیل مزیت‌های ذکرشده در این نوشته و نیاز به زحمت، هزینه و زمان کم‌تر نسبت به روش‌های توالی‌یابی و ارائه فوری مؤلفه‌ها به دو صورت کیفی و نیمه‌کمی و مقایسه مستقیم انگشت‌نگاری‌های مبتنی بر دی‌ان‌ای و آران‌ای برای مقایسه اعضای فعال و غالب جامعه، DGGE هم‌چنان روشی مهم برای غربال ابتدایی جهت ارزیابی اولیه نمونه‌ها، مقایسه سریع و اقتصادی نمونه‌های مختلف و تعیین تکنیک‌های مناسب برای تجزیه‌وتحلیل‌های کامل‌تر نمونه‌ها بر پایه توالی به شمار می‌آید. هرساله هم‌چنان پژوهش‌های بسیاری منتشر می‌شوند که بخش عمده فعالیت خود را در زمینه تأثیر اقدامات و مدیریت‌های مختلف کشاورزی بر جوامع میکروبی مختلف و توصیف جمعیت‌های میکروبی کمپلکس موجود در خاک با تکیه بر این تکنیک انجام داده و با استفاده از آن به دانسته‌های ارزشمندی دست می‌یابند که به‌واسطه آن‌ها می‌توان بهترین روش‌های مدیریتی ممکن را در کشاورزی انتخاب نموده و به این وسیله راه را برای تحقق اهداف کشاورزی پایدار و امنیت تأمین مواد غذایی موردنیاز جمعیت فزاینده بشر هموارتر نمود.

منابع

1. Abdel-Monaim, M. 2017. Application of date palm leaves compost (DPLC) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for controlling faba bean root rot disease in New Valley, Egypt. Agricultural Engineering International: CIGR Journal, 19: 5.138-146.

2. Ahemad, M., Zaidi, A., Khan, M.S., and Oves, M. 2009. Factors affecting the variation of microbial communities in different agro-ecosystems. P 301-324, In: M.S. Khan, A. Zaidi and J. Musarrat (eds.), Microbial Strategies for Crop Improvement. Springer, Berlin, Heidelberg.

3. Alabouvette, C., and Steinberg, C. 2006. The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. P 123-144, In: J. Eilenberg and H.M.T. Hokkanen (eds.), An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
4. Alabouvette, C., Hoeper, H., Lemanceau, P., and Steinberg, C. 1996. Soil suppressiveness to diseases induced by soilborne plant pathogens. P 371-413, In: G. Stotzky and J. M. Bollag (eds.), Soil Biochemistry. Marcel Dekker Inc, New York.
5. Altieri, M.A. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems & Environment, 74: 1-3. 19-31.
6. Andreote, F.D., Azevedo, J.L., and Araujo, W.L. 2009. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. Brazilian Journal of Microbiology, 40: 3.417-432.
7. Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., and Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology, 57: 1. 233-266.
8. Beauregard, M.S., Hamel, C., Atul, N., and St-Arnaud, M. 2010. Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in alfalfa. Microbial Ecology, 59: 2. 379-389.
9. Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Gotz, M., Costa, R., and Smalla, K. 2006. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. FEMS Microbiology Ecology, 56: 2. 250-261.
10. Bergsma-Vlami, M., Prins, M.E., Staats, M., and Raaijmakers, J.M. 2005. Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing pseudomonas species in the rhizosphere by denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 71: 2. 993-1003.
11. Bonanomi, G., Chiurazzi, M., Caporaso, S., Del Sorbo, G., Moschetti, G., and Felice, S. 2008. Soil solarization with biodegradable materials and its impact on soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry, 40: 8. 1989-1998.
12. Borresen, A.L., Hovig, E., and Brogger, A. 1988. Detection of base mutations in genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by transfer and hybridization with gene-specific probes. Mutation Research, 202: 1. 77-83.
13. Brusetti, L., Francia, P., Bertolini, C., Pagliuca, A., Borin, S., Sorlini, C., Abruzzese, A., Sacchi, G., Viti, C., and Giovannetti, L. 2005. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. Plant and Soil, 266: 1-2. 11-21.
14. Brussaard, L., de Ruiter, P.C., and Brown, G.G. 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. Agriculture, Ecosystems & Environment, 121: 3. 233-244.
15. Buée, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., and Jurkevitch, E. 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. Plant and Soil, 321: 1-2. 189-212.
16. Ccoscco, R.A., Sarmiento, V.H., and Villena, G.K. 2018. Microbial diversity assessment by PCR-DGGE analysis in National Sanctuary of Ampay in Perú. Advances in Biotechnology & Microbiology, 11: 3. 60-65.
17. Chandler, D.P., Fredrickson, J.K., and Brockman, F.J. 1997. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. Molecular Ecology, 6: 5. 475-482.
18. Chang, Tian, Shiau, Chen and Chiu. 2019. Influence of Thorny Bamboo Plantations on Soil Microbial Biomass and Community Structure in Subtropical Badland Soils. Forests, 10: 10. 854.

19.Chen, Q., Yang, B., Wang, H., He, F., Gao, Y., and Scheel, R.A. 2015. Soil microbial community toxic response to atrazine and its residues under atrazine and lead contamination. Environmental Science and Pollution Research International, 22: 2. 996-1007.
20.Cline, J., Braman, J.C., and Hogrefe, H.H. 1996. PCR fidelity of *pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Research, 24: 18. 3546-3551.
21.Costa, R., Salles, J.F., Berg, G., and Smalla, K. 2006. Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants. Environmental Microbiology, 8: 12. 2136-2149.
22.Costa, R., Gotz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G., and Smalla, K. 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. FEMS Microbiology Ecology, 56: 2. 236-249.
23.Costa, R., Gomes, N.C., Krogerrecklenfort, E., Opelt, K., Berg, G., and Smalla, K. 2007. *Pseudomonas* community structure and antagonistic potential in the rhizosphere: insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. Environmental Microbiology, 9: 9. 2260-2273.
24.Costa, R., Gomes, N.C.M., Peixoto, R.S., Rumjanek, N., Berg, G., Mendonça-Hagler, L.C.S., and Smalla, K. 2006. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. Soil Biology and Biochemistry, 38: 8. 2434-2447.
25.Curl, E.A. 1963. Control of plant diseases by crop rotation. The Botanical Review, 29: 4. 413-479.
26.da Silva, K.R., Salles, J.F., Seldin, L., and van Elsas, J.D. 2003. Application of a novel Paenibacillus-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of Paenibacillus spp. in the maize rhizosphere. Journal of Microbiological Methods, 54: 2. 213-231.
27.de los Reyes, A.M.M., Ocampo, E.T.M., Manuel, M.C.C. and Mendoza, B.C. 2020. Analysis of the bacterial and fungal community profiles in bulk soil and rhizospheres of three mungbean [*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek] genotypes through PCR-DGGE. International Letters of Natural Sciences, 77: 1-26.
28.Doi, T., Hagiwara, Y., Abe, J., and Morita, S. 2007. Analysis of rhizosphere bacteria of rice cultivated in Andosol lowland and upland fields using molecular biological methods. Plant Root, 1: 66-74.
29.Doi, T., Morita, S., Abe, J., Zhu, S., and Yamagishi, J. 2009. Analaysis of determining factors on community structure of soil bacteria in volcano ash soil (Kanto Loan) farming field using PCR-DGGE method., Proceedings of the International Symposium “Root Research and Applications" (RootRAP), 2-4 September, Boku, Vienna, Austria.
30.Dordas, C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review_Agronomy for Sustainable Development. Agronomy for Sustainable Development, 28: 1. 33-46.
31.Dubey, R.K., Tripathi, V., Prabha, R., Chaurasia, R., Singh, D.P., Rao, C.S., El-Keblawy, A., and Abhilash, P.C. 2020. Methods for exploring soil microbial diversity. P 23-32, In: R.K. Dubey, V. Tripathi, R. Prabha, R. Chaurasia, D.P. Singh, C.S. Rao, A. El-Keblawy and P. C. Abhilash (eds.), Unravelling the Soil Microbiome-Perspectives for Environmental Sustainability. Springer, Cham, Switzerland.
32.El Sheikha, A.F. 2019. Molecular detection of mycotoxigenic fungi in foods: The case for using PCR-DGGE. Food Biotechnology, 33: 1. 54-108.
33.Fraley, R. 1992. Sustaining the food supply. Bio/Technology, 10: 1. 40-43.
34.Fu, L., Ruan, Y., Tao, C., Li, R., and Shen, Q. 2016. Continous application of bioorganic fertilizer induced resilient culturable bacteria community associated with banana Fusarium wilt suppression. Scientific Reports, 6: 27731.

35. Gajda, A.M., Czyż, E.A., Dexter, A.R., Furtak, K.M., Grządziel, J., and Stanek-Tarkowska, J. 2018. Effects of different soil management practices on soil properties and microbial diversity. International Agrophysics, 32: 1. 81-91.
36. Garbeva, P., van Veen, J.A., and van Elsas, J.D. 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. Microbial Ecology, 45: 3. 302-316.
37. Garbeva, P., Van Veen, J., and Van Elsas, J. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annual Review of Phytopathology, 42: 243-270.
38. Garbeva, P., Veen, J.A., and Elsas, J.D. 2004. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. FEMS Microbiology Ecology, 47: 1. 51-64.
39. Garbeva, P., Van Elsas, J., and Van Veen, J. 2008. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. Plant and Soil, 302: 1-2. 19-32.
40. Gelsomino, A., and Cacco, G. 2006. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. Soil Biology and Biochemistry, 38: 1. 91-102.
41. Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A.C., Cacco, G. and van Elsas, J.D. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Microbiological Methods, 38: 1-2. 1-15.
42. Gill, S., Azam, F., and Kharral, A. 2007. Root-induced changes in some biological and biochemical characteristics of soil sown to wheat (*Triticum aestivum* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pakistan Journal of Botany, 39: 6. 2195-2207.
43. Giri, B., Giang, P.H., Kumari, R., Prasad, R., and Varma, A. 2005. Microbial diversity in soils. P 19-55, In: A. Varma and F. Buscot (eds.), Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. Springer, Berlin Heidelberg.
44. Goh, K.M. 2002. Important roles of soil micro-organisms in organic farming, P 38-49 In: U. R. Sangakkara and Y.D.A. Senanayake (eds.), Proceedings of the Seventh International Conference on Kyusei Nature Farming, 15-18 January, Christchurch, New Zealand.
45. Govaerts, B., Sayre, K.D., and Deckers, J. 2006. A minimum data set for soil quality assessment of wheat and maize cropping in the highlands of Mexico. Soil and Tillage Research, 87: 2. 163-174.
46. Govaerts, B., Sayre, K.D., Lichter, K., Dendooven, L., and Deckers, J. 2007. Influence of permanent raised bed planting and residue management on physical and chemical soil quality in rain fed maize/wheat systems. Plant and Soil, 291: 1-2. 39-54.
47. Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D., and Edwards, A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry, 30: 3. 369-378.
48. Green, S.J., Leigh, M.B., and Neufeld, J.D. 2015. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. P 4137-4158, In: K.N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg.
49. Grossman, J.M., O'Neill, B.E., Tsai, S.M., Liang, B., Neves, E., Lehmann, J. and Thies, J.E. 2010. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. Microbial Ecology, 60: 1. 192-205.
50. Gupta, V., and Roget, D.K. 2004. Understanding soil biota and biological functions: management of soil biota for improved benefits to crop production and environmental health, P 1-7 In: R. Lines-Kelly (ed.), Proceedings of the Soil Biology in Agriculture, 11-12 August 2004, Tamworth Sustainable Farming Training Centre, Calala, Australia.

51. Hardoim, P.R., Andreote, F.D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L.S., and van Elsas, J.D. 2011. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. FEMS Microbiology Ecology, 77: 1. 154-164.
52. He, L.L., Zhong, Z.K., and Yang, H.M. 2017. Effects on soil quality of biochar and straw amendment in conjunction with chemical fertilizers. Journal of Integrative Agriculture, 16: 3. 704-712.
53. Heuer, H., Kroppenstedt, R.M., Lottmann, J., Berg, G., and Smalla, K. 2002. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. Applied and Environmental Microbiology, 68: 3. 1325-1335.
54. Hoitink, H., and Boehm, M. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. Annual Review of Phytopathology, 37: 1. 427-446.
55. Holland, J.M. 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. Agriculture, Ecosystems & Environment, 103: 1. 1-25.
56. Hovda, M.B. 2007. Application of PCR and DGGE to characterise the microflora of farmed fish. PhD Thesis. University of Bergen, Stavanger, Norway.
57. Howard, R.J. 1996. Cultural control of plant diseases: a historical perspective. Canadian Journal of Plant Pathology, 18: 2. 145-150.
58. Inceoglu, O., Falcao Salles, J., and van Elsas, J.D. 2012. Soil and cultivar type shape the bacterial community in the potato rhizosphere. Microbial Ecology, 63: 2. 460-470.
59. Inceoglu, O., Salles, J.F., van Overbeek, L., and van Elsas, J.D. 2010. Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. Applied and Environmental Microbiology, 76: 11. 3675-3684.
60. Jangir, M., Sharma, S., and Sharma, S. 2019. Target and non-target effects of dual inoculation of biocontrol agents against *Fusarium* wilt in *Solanum lycopersicum*. Biological Control, 138: 104069.
61. Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., and Steinberg, C. 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? Soil Biology and Biochemistry, 39: 1. 1-23.
62. Jia, Z., Hu, X., Xia, W., Fornara, D., Nannipieri, P., and Tiedje, J. 2019. Community shift of microbial ammonia oxidizers in air-dried rice soils after 22 years of nitrogen fertilization. Biology and Fertility of Soils, 55: 4. 419-424.
63. Jin, N., Lu, X., Wang, X., Liu, Q., Peng, D., and Jian, H. 2019. The effect of combined application of *Streptomyces rubrogriseus* HDZ-9-47 with soil biofumigation on soil microbial and nematode communities. Scientific Reports, 9: 1. 16886.
64. Jin, N., Xue, H., Li, W.J., Wang, X.Y., Liu, Q., Liu, S.S., Liu, P., Zhao, J.L., and Jian, H. 2017. Field evaluation of *Streptomyces rubrogriseus* HDZ-9-47 for biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. Journal of Integrative Agriculture, 16: 6. 1347-1357.
65. Kabir, Z. 2005. Tillage or no-tillage: Impact on mycorrhizae. Canadian Journal of Plant Science, 85: 23-29.
66. Karlen, D.L. 2004. Soil quality as an indicator of sustainable tillage practices. Soil and Tillage Research, 78: 2. 129-130.
67. Kihara, J., Martius, C., Bationo, A., Thuita, M., Lesueur, D., Herrmann, L., Amelung, W., and Vlek, P.L.G. 2012. Soil aggregation and total diversity of bacteria and fungi in various tillage systems of sub-humid and semi-arid Kenya. Applied Soil Ecology, 58: 0.12-20.
68. Kladivko, E.J. 2001. Tillage systems and soil ecology. Soil and Tillage Research, 61: 1-2. 61-76.

69. Krakova, L., Soltys, K., Budis, J., Grivalsky, T., Duris, F., Pangallo, D. and Szemes, T. 2016. Investigation of bacterial and archaeal communities: novel protocols using modern sequencing by Illumina MiSeq and traditional DGGE-cloning. Extremophiles, 20: 5. 795-808.
70. Krishnaraj, P., and Sabale, S. 2019. Effect of organic and inorganic fertilization on soil bacterial diversity associated with sole crop (Pigeon pea) and crop rotation (Green gram-Sorghum). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8: 6. 577-581.
71. Krupinsky, J.M., Bailey, K.L., McMullen, M.P., Gossen, B.D., and Turkington, T.K. 2002. Managing plant disease risk in diversified cropping systems. Agronomy Journal, 94: 2. 198-209.
72. Kuo, J., Wang, Y.W., Chen, M., Fuh, G., and Lin, C.H. 2019. The effect of paclobutrazol on soil bacterial composition across three consecutive flowering stages of mung bean. Folia Microbiologica, 64: 2. 197-205.
73. Lal, R. 1991. Tillage and agricultural sustainability. Soil and Tillage Research, 20: 2-4. 133-146.
74. Landa, B.B., de Werd, H.A., McSpadden Gardener, B.B., and Weller, D.M. 2002. Comparison of three methods for monitoring populations of different genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere. Phytopathology, 92: 2. 129-137.
75. Larkin, R.P. 2003. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. Soil Biology and Biochemistry, 35: 11. 1451-1466.
76. Levin, M.A., and Israeli, E. 1996. Engineered Organisms in Environmental Settings: Biotechnological and Agricultural Applications. CRC Press, Tokyo, Japan, 224p.
77. Li, G.J., Dong, Q.E., Ma, L., Huang, Y., Zhu, M.L., Ji, Y.P., Wang, Q.H., Mo, M.H., and Zhang, K.Q. 2014. Management of *Meloidogyne incognita* on tomato with endophytic bacteria and fresh residue of *Wasabia japonica*. Journal of Applied Microbiology, 117: 4. 1159-1167.
78. Liu, B., Gumpertz, M.L., Hu, S., and Ristaino, J.B. 2007. Long-term effects of organic and synthetic soil fertility amendments on soil microbial communities and the development of southern blight. Soil Biology and Biochemistry, 39: 9. 2302-2316.
79. Liu, J., Ding, Y., Ji, Y., Gao, G., and Wang, Y. 2020. Effect of maize straw biochar on bacterial communities in agricultural soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 104: 3. 333-338.
80. Liu, M., Tang, Y., Zhao, K., Liu, Y., Guo, X., Ren, D., Yao, W., Tian, X., Gu, Y., Yi, B., and Zhang, X. 2017. Determination of the fungal community of pit mud in fermentation cellars for Chinese strong-flavor liquor, using DGGE and Illumina MiSeq sequencing. Food Research International, 91: 80-87.
81. Lopez-Lozano, N.E., Carcaño-Montiel, M.G., and Bashan, Y. 2016. Using native trees and cacti to improve soil potential nitrogen fixation during long-term restoration of arid lands. Plant and Soil, 403: 1-2. 317-329.
82. Lottmann, J., Heuer, H., De Vries, J., Mahn, A., During, K., Wackernagel, W., Smalla, K., and Berg, G. 2000. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. FEMS Microbiology Ecology, 33: 1. 41-49.
83. Luo, P., Han, X., Wang, Y., Han, M., Shi, H., Liu, N., and Bai, H. 2015. Influence of long-term fertilization on soil microbial biomass, dehydrogenase activity, and bacterial and fungal community structure in a brown soil of northeast China. Annals of Microbiology, 65: 1. 533-542.
84. Mahajan, S., Kanwar, S.S., Kumari, P. and Sharma, S.P. 2007. Long-term effect of mineral fertilizers and amendments on microbial dynamics in

an alfisol of Western Himalayas. Indian Journal of Microbiology, 47: 1. 86-89.
85. Maji, D., Misra, P., Singh, S., and Kalra, A. 2017. Humic acid rich vermicompost promotes plant growth by improving microbial community structure of soil as well as root nodulation and mycorrhizal colonization in the roots of *Pisum sativum*. Applied Soil Ecology, 110: 97-108.
86. Marques, J.M., da Silva, T.F., Vollu, R.E., Blank, A.F., Ding, G.C., Seldin, L., and Smalla, K. 2014. Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field-grown sweet potato plants. FEMS Microbiology Ecology, 88: 2. 424-435.
87. Marques, J.M., da Silva, T.F., Vollú, R.E., de Lacerda, J.R.M., Blank, A.F., Smalla, K., and Seldin, L. 2015. Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage. Applied Soil Ecology, 96: 273-281.
88. Marschner, P., Crowley, D., and Yang, C.H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. Plant and Soil, 261: 1/2. 199-208.
89. Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R. and Crowley, D. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry, 33: 11. 1437-1445.
90. Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., and Verstraete, W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. Environmental Microbiology, 10: 6. 1571-1581.
91. Mathew, R.P., Feng, Y., Githinji, L., Ankumah, R., and Balkcom, K.S. 2012. Impact of no-tillage and conventional tillage systems on soil microbial communities. Applied and Environmental Soil Science, 2012: 1-10.
92. Miller, K.M., Ming, T.J., Schulze, A.D., and Withler, R.E. 1999. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. BioTechniques, 27: 5. 1016-1030.
93. Milling, A., Smalla, K., Maidl, F.X., Schloter, M., and Munch, J.C. 2004. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. Plant and Soil, 266: 1-2. 23-39.
94. Mirás-Avalos, J.M., Antunes, P.M., Koch, A., Khosla, K., Klironomos, J.N., and Dunfield, K.E. 2011. The influence of tillage on the structure of rhizosphere and root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. Pedobiologia, 54: 4. 235-241.
95. Moarrefzadeh, N. 2014. Study on effect of some agronomic factors on the bacterial community structure of pseudomonads by PCR-DGGE. PhD Thesis. University of Tehran, Karaj, Iran. (In Persian)
96. Moulas, C., Petsoulas, C., Rousidou, K., Perruchon, C., Karas, P., and Karpouzas, D.G. 2013. Effects of systemic pesticides imidacloprid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. BioMed Research International, 2013: 1-8.
97. Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59: 3. 695-700.
98. Nadeem, S.M., Ahmad, M., Zahir, Z.A., Javaid, A., and Ashraf, M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. Biotechnology Advances, 32: 2. 429-448.
99. Nakatsu, C.H. 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. Soil Science Society of America Journal, 71: 2. 562-571.
100. Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., and Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science, 54: 4. 655-670.

101.Neufeld, J.D., and Mohn, W.W. 2005. Fluorophore-labeled primers improve the sensitivity, versatility, and normalization of denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 71: 8. 4893-4896.
102.Nicolaisen, M.H., and Ramsing, N.B. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. Journal of Microbiological Methods, 50: 2. 189-203.
103.Nkongolo, K.K., and Narendrula-Kotha, R. 2020. Advances in monitoring soil microbial community dynamic and function. Journal of Applied Genetics, 61: 2. 249-263.
104.O'Callaghan, M., Lorenz, N., and Gerard, E.M. 2006. Characterization of phylloplane and rhizosphere microbial populations using PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). P 99-115, In: J.E. Cooper and J.R. Rao (eds.), Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis. CAB International, Wallingford.
105.Opara-Nadi, O. 1993. Conservation tillage for increased crop production. P 83-94, In: FAO Information Division Editorial Group (ed.), Soil Tillage in Africa: Needs and Challenges, Rome, Italy.
106.Peixoto, R.S., Chaer, G.M., Franco, N., Reis Junior, F.B., Mendes, I.C., and Rosado, A.S. 2010. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. Antonie Van Leeuwenhoek, 98: 3. 403-413.
107.Peters, R.D., Sturz, A.V., Carter, M.R., and Sanderson, J.B. 2003. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. Soil and Tillage Research, 72: 2. 181-192.
108.Raaijmakers, J.M., Vlami, M., and de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie Van Leeuwenhoek, 81: 1-4. 537-547.
109.Rohini-Kumar, M., Osborne, J.W., and Saravanan, V.S. 2013. Comparison of soil bacterial communities of *Pinus patula* of Nilgiris, Western Ghats with other biogeographically distant pine forest clone libraries. Microbial Ecology, 66: 1. 132-144.
110.Salles, J.F., van Elsas, J.D., and van Veen, J.A. 2006. Effect of agricultural management regime on *Burkholderia* community structure in soil. Microbial Ecology, 52: 2. 267-279.
111.Samarajeewa, A.D., Hammad, A., Masson, L., Khan, I.U., Scroggins, R., and Beaudette, L.A. 2015. Comparative assessment of next-generation sequencing, denaturing gradient gel electrophoresis, clonal restriction fragment length polymorphism and cloning-sequencing as methods for characterizing commercial microbial consortia. Journal of Microbiological Methods, 108: 103-111.
112.Santamaría, J., Parrado, C.A., and López, L. 2018. Soil microbial community structure and diversity in cut flower cultures under conventional and ecological management. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 42:e0170016.
113.Schonfeld, J., Gelsomino, A., Overbeek, L.S., Gorissen, A., Smalla, K., and Elsas, J.D. 2003. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. FEMS Microbiology Ecology, 43: 1. 63-74.
114.Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., and Uchiyama, H. 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Biotechnology Letters, 23: 15. 1205-1208.
115.Sharma, R., Pooniya, V., Bisaria, V.S., Swarnalakshmi, K., and Sharma, S. 2020. Bioinoculants play a significant role in shaping the rhizospheric microbial community: a field study with *Cajanus cajan*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 36: 3. 44.

116.Sharma, S.K., Ramesh, A., Sharma, M.P., Joshi, O.P., Govaerts, B., Steenwerth, K.L., and Karlen, D.L. 2010. Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality. P 317-358, In: E. Lichtfouse (ed.), Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture. Springer, Dordrecht, Netherlands.

117.Silva, A., Babujia, L., Matsumoto, M., Guimarães, M., and Hungria, M. 2013. Bacterial diversity under different tillage and crop rotation systems in an oxisol of Southern Brazil. The Open Agriculture Journal, 7: 40-47.

118.Singh, B.K., Trivedi, P., Singh, S., Macdonald, C.A., and Verma, J.P. 2018. Emerging microbiome technologies for sustainable increase in farm productivity and environmental security. Microbiology Australia, 39: 1. 17.

119.Singh, S., Gupta, R., and Sharma, S. 2015. Effects of chemical and biological pesticides on plant growth parameters and rhizospheric bacterial community structure in *Vigna radiata*. Journal of Hazardous Materials, 291: 102-110.

120.Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., and Berg, G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Applied and Environmental Microbiology, 67: 10. 4742-4751.

121.Stafford, W.H., Baker, G.C., Brown, S.A., Burton, S.G., and Cowan, D.A. 2005. Bacterial diversity in the rhizosphere of Proteaceae species. Environmental Microbiology, 7: 11. 1755-1768.

122.Sumner, D.R., Doupnik, B., and Boosalis, M.G. 1981. Effects of reduced tillage and multiple cropping on plant diseases. Annual Review of Phytopathology, 19: 1. 167-187.

123.Suzuki, C., Takenaka, M., Oka, N., Nagaoka, K., and Karasawa, T. 2012. A DGGE analysis shows that crop rotation systems influence the bacterial and fungal communities in soils. Soil Science and Plant Nutrition, 58: 3. 288-296.

124.Timms-Wilson, T.M., Kilshaw, K., and Bailey, M.J. 2005. Risk assessment for engineered bacteria used in biocontrol of fungal disease in agricultural crops. Plant and Soil, 266: 1-2. 57-67.

125.Tsushima, S. 2014. Integrated control and integrated pest management in Japan: the need for various strategies in response to agricultural diversity. Journal of General Plant Pathology, 80: 5. 389-400.

126.Valášková, V., and Baldrian, P. 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. Plant, Soil and Environment, 55: 10. 413-423.

127.van Elsas, J.D., and Boersma, F.G.H. 2011. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. European Journal of Soil Biology, 47: 2.77-87.

128.van Elsas, J.D., Garbeva, P., and Salles, J. 2002. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. Biodegradation, 13: 1. 29-40.

129.Weinert, N., Meincke, R., Gottwald, C., Heuer, H., Gomes, N.C., Schloter, M., Berg, G., and Smalla, K. 2009. Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. Applied and Environmental Microbiology, 75: 12. 3859-3865.

130.Wemheuer, F., Wemheuer, B., Kretzschmar, D., Pfeiffer, B., Herzog, S., Daniel, R., and Vidal, S. 2016. Impact of grassland management regimes on bacterial endophyte diversity differs with grass species. Letters in Applied Microbiology, 62: 4. 323-329.

131.Wolińska, A., Górniak, D., Zielenkiewicz, U., Goryluk-Salmonowicz, A., Kuźniar, A., Stępniewska, Z., and Błaszczyk, M. 2017. Microbial biodiversity in arable soils is affected by agricultural practices. International Agrophysics, 31: 2. 259-271.

132.Wu, T., Chellemi, D.O., Martin, K.J., Graham, J.H., and Rosskopf, E.N. 2007. Discriminating the effects of agricultural land management practices on soil fungal communities. Soil Biology and Biochemistry, 39: 5. 1139-1155.

133.Wu, T., Chellemi, D.O., Graham, J.H., Martin, K.J., and Rosskopf, E.N. 2008. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. Microbial Ecology, 55: 2. 293-310.

134.Xin-Yu, L., Zhen-Cheng, S., Xu, L., Cheng-Gang, Z., and Hui-Wen, Z. 2010. Assessing the effects of acetochlor on soil fungal communities by DGGE and clone library analysis. Ecotoxicology, 19: 6. 1111-1116.

135.Yang, Z., Yang, W., Li, S., Hao, J., Su, Z., Sun, M., Gao, Z., and Zhang, C. 2016. Variation of bacterial community diversity in rhizosphere soil of sole-cropped versus intercropped wheat field after harvest. PLoS One, 11:3.e0150618.

136.Yuan, X., Xu, J., Chai, H., Lin, H., Yang, Y., Wo, X., and Shi, J. 2010. Differences of rhizo-bacterial diversity and the content of peimine and peiminine of *Fritillaria thunbergii* among different habits. Journal of Medicinal Plants Research, 4: 6. 465-470.

137.Zhang, J., Qin, J., Zhao, C., Liu, C., Xie, H., and Liang, S. 2015. Response of bacteria and fungi in soil microcosm under the presence of pesticide endosulfan. Water, Air, & Soil Pollution, 226: 4. 226:109.

138.Zhang, Y.J., Xie, M., Wu, G., Peng, D.L., and Yu, W.B. 2015. A 3-year field investigation of impacts of Monsanto's transgenic Bt-cotton NC 33B on rhizosphere microbial communities in northern China. Applied Soil Ecology, 89: 18-24.

139.Zhou, X., Zhang, J., Gao, D., Gao, H., Guo, M., Li, L., Zhao, M., and Wu, F. 2017. Conversion from long-term cultivated wheat field to Jerusalem artichoke plantation changed soil fungal communities. Scientific Reports, 7: 41502.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 11(3), 2021
http://ejsms.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejsms.2021.18825.2012

(Full Length Review Paper)

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Application of PCR-DGGE technique in studying the effect of agricultural activities on soil microbial communities

N. Moarrefzadeh[*1] and H. Khateri[1]
[1]Assistant Prof., Dept. of Plant Protection, Razi University, College of Agriculture, Kermanshah, Iran
Received: 02.03.2021; Accepted: 04.17.2021

Abstract

Intensive agriculture has reduced soil fertility and has had harmful effects on human health and the environment. Therefore, the use of low-input and environmentally-friendly agricultural methods such as sustainable agriculture is necessary to achieve the required sustainability in food supply. Preservation and revitalization of beneficial microbial communities in the soil, is one of the important strategies of sustainable agriculture. These microorganisms with diverse activities (such as residue decomposition, mineralization and fixation of nutrients for plant growth, production of plant hormones, decomposition of pollutants, plant growth and biological control of plant pathogens), play very important roles in the function and sustainability of terrestrial ecosystems. Understanding the factors affecting these communities particularly the different methods of managing agricultural lands helps to manage them towards improving soil fertility, optimal plant growth and health, and increasing the productivity and stability of agricultural ecosystems. For selecting the best cultivation methods that preserve the diversity and strengthen microbial communities as well as avoiding activities that lead to the destruction and reduction of its diversity of microorganisms, fast, reliable, sensitive and specific methods are needed that provide comprehensive knowledge about the effect of different agricultural activities on the structure and diversity of these communities, including its unculturable part. Among molecular techniques, polymerase chain reaction-based methods have been widely used to study the diversity and structure of soil microorganisms, and polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) is one of the most well-known and widely used methods. PCR-DGGE has been used successfully for more than two decades to investigate the effect of different crop managements on the diversity and structure of microorganisms in different soils or in a soil under different crop managements. Despite the availability of new generation of high-throughput sequencing technologies in the study of soil microbial communities, PCR-DGGE method due to various advantages with less hassle, cost and time and immediate presentation of components in both qualitative and semi-quantitative form is still an important way to study the impact of various agricultural practices and managements on microbial communities. With the help of the findings of this technique, the best management methods in agriculture could be selected and the way can be paved for the realization of sustainable agriculture and stable food supply. In this review, some researches and references that have used the efficacy of PCR-DGGE in studying the impact of various agricultural managements and activities on the composition and diversity of soil microbial communities and some of their results have been mentioned. The features, advantages, limitations, and principles of this method have also been outlined.

Keywords: Diversity, Ecosystem, Microorganisms, Population Structure, Sustainable Agriculture

* Corresponding Author; Email: n.moarrefzadeh@razi.ac.ir