

ارزیابی فعالیت اکولوژیکی قارچ‌ها و آنزیم‌ها در ارتباط با کیفیت خاک در شیب ارتفاعی جنگل‌های هیرکانی (مطالعه موردی: حوزه آبخیز واز - استان مازندران)

محمد بیرانوند^{۱*}، مسلم اکبری نیا^۲، غلامرضا صالحی جوزانی^۳، جواد قره‌چاهی^۴

۱. دانشجوی دکتری علوم جنگل، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۲. دانشیار گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۳. استاد پژوهش، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۴. استادیار ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۵

چکیده

فعالیت قارچ‌ها و آنزیم‌ها از عوامل مهم و تأثیرگذار بر کیفیت خاک در زیست‌بوم‌های جنگلی به شمار می‌آیند. ارتفاع از سطح دریا با تأثیر بر شاخص‌های زیستی و غیرزیستی مؤثر بر فعالیت قارچ‌ها و آنزیم‌های خاک در ارزیابی فعالیت‌های اکولوژیکی اهمیت زیادی دارد. هدف این پژوهش، ارزیابی فعالیت اکولوژیکی قارچ‌ها و آنزیم‌های خاک در ارتباط با شاخص کیفیت خاک در امتداد یک شیب ارتفاعی در شش طبقه ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ متر از سطح دریا، در جنگل‌های حوزه آبخیز واز در استان مازندران است. در هر طبقه ارتفاعی نه قطعه نمونه ۴۰۰ متر مربعی به منظور بررسی ویژگی‌های پوشش درختی و خاک تعیین شد. شاخص‌های فیزیکوشیمیایی و آنزیمی خاک با روش‌های متداول آزمایشگاهی و انکوباسیون سنجش شدند. برای شناسایی ژنتیکی قارچ‌ها، ناحیه ITS با استفاده از آغازگرهای بارکددار با روش PCR تکثیر و با استفاده از روش‌های توالی‌یابی نسل جدید (next-generation sequencing) تعیین توالی شد. بررسی‌های خاک‌شناسی نشان داد که بیشترین کیفیت خاک در پایین‌ترین طبقه ارتفاعی با بیشترین فعالیت آنزیم لوسین‌آمینوپیتیداز، نیتروژن کل، دمای خاک و ترکیب متناسب قارچ‌های اکتومایکوریزی و ساپروتروفی دیده می‌شود. بیشترین درصد فراوانی قارچ‌های اکتومایکوریزی، مخمرها و بیشترین فعالیت آنزیم‌های آریل سولفاتاز و اسیدفسفاتاز در خاک‌های با شاخص کیفیت خاک متوسط در طبقه ارتفاعی ۱۵۰۰ متر دیده شد که همبستگی زیاد با مقدار کربن خاک نشان دادند. این درحالی است که فعالیت قارچ‌های ساپروتروفیکی و آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز و سلوبیوهیدرولاز در طبقات ارتفاعی بالا (۲۰۰۰ متر به بالا) دیده شد و بنابراین با شاخص کیفیت خاک ارتباط معکوس نشان دادند. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش ارتفاع از سطح دریا، شاخص کیفیت خاک و به همین ترتیب فعالیت قارچ‌های اکتومایکوریزی به‌واسطه نبود گونه‌های درختی همزیست و کاهش فعالیت آنزیم‌های وابسته به چرخه کربن و نیتروژن کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: اکتومایکوریز، تنفس میکروبی، توالی‌یابی ITS، خاک جنگل، فعالیت آنزیمی، متازنومیکس.

مقدمه

خاک اثر دارد [۱]. درک تعاملات پیچیده بین خاک و پوشش گیاهی در طول شیب ارتفاعی می‌تواند در پیش‌بینی عملکرد قارچ‌ها و آنزیم‌های خاک مؤثر باشد [۲]، [۳]. پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که کیفیت خاک، توزیع جوامع قارچی و فعالیت آنزیم‌های خاک در طبقات

ارتفاع از سطح دریا با تأثیر بر مؤلفه‌های زنده و غیرزنده زیست‌بوم‌های جنگلی در توزیع جوامع قارچ‌ها و کیفیت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۹۰۰۶۸۰۹۴

Email: m.bayranvand@gmail.com

مختلف ارتفاعی تفاوت نشان می‌دهند [۱].

قارچ‌ها ریزموجوداتی هستند که تجزیه‌کننده‌ها و پاتوژن‌های گیاهی و جانوری محسوب می‌شوند [۴، ۵] و اهمیت اساسی در روابط زیست‌بوم، چرخه کربن، مواد تغذیه‌ای گیاهان و موجودات خاک‌زی، کیفیت خاک و عملکرد گیاهان دارند [۲]. در مقایسه با دیگر گروه‌های میکروبی، قارچ‌ها ارتباطات پایدارتری بین سطوح زیر زمینی و رو زمینی به‌واسطه ارتباط مستقیم با ترکیبات کربنی در زیست‌بوم‌های جنگلی دارند [۴، ۶]. در این بین، قارچ‌های تجزیه‌کننده اکتومایکوریزها و ساپروتروف‌ها، ریزموجودات غالب در بیشتر خاک‌های جنگلی‌اند و بیشترین تأثیر را در تجزیه بسترهای چوبی و عناصر غذایی خاک دارند [۷]. درک رابطه قارچ‌های اکتومایکوریزی و ساپروتروفیتی با توجه به تأثیر اصلی آنها در چرخه‌های بیوژئوشیمیایی در زیست‌بوم‌های خاک‌زی در طول شیب ارتفاعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۲، ۶]. به‌طور کلی پوشش رو زمینی در زیست‌بوم‌های جنگلی در شرایط مختلف محیطی و شیب‌های ارتفاعی به‌شدت با قارچ‌ها در ارتباط هستند [۲، ۵]. برای مثال عوامل محیطی و در پی آن، ویژگی‌های ادافیکی قوی‌ترین عوامل پیش‌بینی‌کننده جوامع قارچی خاک در مقیاس جهانی‌اند [۸]. در این بین pH خاک، رطوبت، دما و نسبت C/N بر گیاهان و قارچ‌های مرتبط تأثیر می‌گذارند [۴، ۱]. در دنیای امروز تقاضای مداوم برای دستیابی به ژن‌های جدید، آنزیم‌ها و فعالیت‌های ریزجانداران به‌خوبی روشن است. به‌تازگی روش‌های توالی‌یابی متاژنومیک^۱ میکروبیوم خاک، امکان مطالعه کاربردی و گروه‌بندی دقیق ژنوم‌های متعلق به اجتماعات میکروبی مختلف از جمله قارچ‌ها را فراهم کرده است [۴]. در پژوهش حاضر از روش متاژنومیکس برای شناسایی دقیق گروه‌های اکولوژیکی قارچ‌ها در خاک‌های جنگلی و رابطه آنها با آنزیم‌ها و شاخص‌های خاک استفاده شده است.

بین توزیع جوامع قارچی و فعالیت‌های آنزیمی خاک وابستگی زیادی وجود دارد، به‌طوری که میکروارگانیزم‌های خاک‌زی نیازهای مختلف آنزیمی را تعیین می‌کنند [۶]. آنزیم‌های خاک کاتالیزورهایی فعال به شمار می‌آیند که توسط ریزجانداران خاک تولید می‌شوند و عامل اصلی کنترل فرایندهای بیوشیمیایی مانند تجزیه کربن آلی و چرخه مواد مغذی خاک هستند [۳]. افزایش فعالیت آنزیمی در خاک‌های جنگلی اغلب نشان‌دهنده افزایش فراوانی و تنوع جوامع میکروبی از جمله قارچ‌هاست [۵]. قارچ‌ها با تولید آنزیم‌ها تجزیه مواد آلی و بازیافت مواد مغذی را به نفع خود و دیگر ریزجانداران تسهیل می‌کنند [۹]. می‌توان چنین استنباط کرد که آنزیم‌های برون‌سلولی مانند بتاگلوکوزیداز، آریل سولفاتاز، اسید فسفاتاز و لوسین آمینوپپتیداز از اصلی‌ترین عوامل تجزیه لیگنین و سلولز هستند و پلیمرهای لیگنوسولوزی و مواد آلی را به قطعات کوچک‌تر تبدیل می‌کنند [۷]. فعالیت آنزیم‌ها به تغییرات پوشش جنگلی، دما و رطوبت حساس است و با بهره‌وری اولیه بوم‌سازگان و سلامت خاک ارتباط دارد [۱۰].

مطالعه فعالیت قارچ‌ها و آنزیم‌های خاک پرهزینه و دشوار است، از این رو یافتن ارتباط آنها با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک به پژوهشگران در شناخت روابط بوم‌شناختی کمک می‌کند. استفاده از شاخصی مفید که بیانگر مجموعه‌ای از شاخص‌های خاک باشد لازم و کاربردی است [۱۱]. کیفیت خاک شاخصی مناسب و برابندی از مشخصه‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی است که در واکنش به شرایط مختلف محیطی تغییر می‌کند و از طریق آن می‌توان کیفیت خاک را محاسبه کرد [۱۲]. این شاخص ابزاری مؤثر برای تصمیم‌گیری چندمنظوره است و شاخصی مهم برای درک بهتر عملکرد خاک، با هدف مدیریت پایدار زیست‌بوم به شمار می‌رود [۱۳]. شاخص کیفیت خاک مجموعه‌ای از داده‌های خاکی است که در میان عوامل مختلف، روندی کلی را بیان می‌کند و

درختی به ترتیب زیر تغییر می‌کند. ۱. تیپ جنگلی آمیخته با غالب بودن گونه‌های انجیلی (*Parrotia persica* C. A.) Meyer، بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia* C. A.) (M. و مرمر (*Carpinus betulus* L.) در محدوده ارتفاعی کمتر از ۳۰ متر از سطح دریا؛ ۲. تیپ جنگلی آمیخته پایین‌بند با غالب بودن گونه‌های راش (*Fagus orientalis* Lipsky)، ون (*Fraxinus excelsior*) و انجیلی در محدوده ارتفاعی ۵۰۰ متر؛ ۳. تیپ آمیخته میان‌بند با غالبیت گونه‌های راش، مرمر و افراپلت (*Acer velutinum* Boiss) در محدوده ۱۰۰۰ متر؛ ۴. تیپ جنگلی راش خالص در محدوده ۱۵۰۰ متر؛ ۵. اکوتون بین مرتع و جنگل با غالبیت گونه‌های زالزالک (*Crataegus* sp.)، سیب (*Malus domestica*)، گلابی (*Pyrus communis* L.) در محدوده ۲۰۰۰ متر؛ ۶. منطقه مرتعی در محدوده ۲۵۰۰ متر از سطح دریا. همچنین نمونه‌های خاک در عمق ۱۰ سانتی‌متری برداشت [۲] و همراه با یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها برای آنالیزهای شیمیایی در هوای آزاد خشک و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. بخشی از نمونه‌های خاک در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای تجزیه و تحلیل مولکولی و همچنین بخشی دیگر در کیسه‌های پلی‌اتیلن برای سنجش تنفس میکروبی پایه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تجزیه آزمایشگاهی

مشخصه‌های خاک با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی سنجیده شد [۱۵]. دمای خاک با استفاده از دماسنج قابل حمل، جرم مخصوص ظاهری به روش کلوخه، واکنش خاک به روش پتانسیومتری، کربن آلی به روش والکلای بلاک، نیتروژن کل به روش کجلدال، پتاسیم و کلسیم قابل دسترس با دستگاه جذب اتمی و تنفس پایه میکروبی خاک نیز به روش بطری در بسته سنجیده شدند [۱۵].

نشان‌دهنده سلامت و حاصلخیزی خاک است [۱۲، ۱۳]. هدف این پژوهش، بررسی شرایط کیفی خاک با استفاده از شاخص کیفیت خاک و ارتباط آن با ترکیب و توزیع قارچ‌ها و فعالیت آنزیم‌های خاک در نیمرخ ارتفاعی جنگل‌های هیرکانی است.

مواد و روش‌ها

منطقه پژوهش

منطقه پژوهش با مساحت تقریبی ۱۴ هزار هکتار، متعلق به جنگل‌های حوزه آبخیز واز در استان مازندران است (عرض جغرافیایی ۳۶° ۱۲' ۳۰" تا ۳۶° ۳۰' ۰" و طول جغرافیایی ۵۲° ۱۲' ۱۵" تا ۵۱° ۱۵' ۵۵"). ارتفاع از سطح دریا در جلگه از حدود ۱۰- متر از پارک جنگلی نور شروع می‌شود و تا حدود ۲۸۰۰ متر ادامه دارد [۱۴]. منطقه پژوهش را می‌توان به شش سطح ارتفاعی جنگل‌های ساحلی، جنگل‌های پایین‌بند، میان‌بند، راشستان بالابند، اکوتون و مرتع تقسیم کرد [۱۴]. ترکیب و نوع گونه‌های درختی با افزایش ارتفاع تغییر می‌کند. میانگین سالیانه حداکثر و حداقل دمای هوا به ترتیب ۳ و ۵ درجه سانتی‌گراد کاهش به‌ازای هر ۱۰۰۰ متر افزایش ارتفاع است. بارندگی سالیانه در قسمت پایین‌دست حدود ۱۲۰۰ میلی‌متر است و با افزایش ارتفاع، به کمتر از ۷۰۰ میلی‌متر هم می‌رسد [۱۴]. بافت خاک سنگین با ساختمان توده‌ای و دانه‌های ریز است. این خاک‌ها روی سنگ بستر کنگلومرا با لایه‌های دولومیتی به وجود آمده است [۱۴].

روش پژوهش

این پژوهش در شش طبقه ارتفاعی ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ متر از سطح دریا با محدوده ± 30 متر از هر طبقه در سه ترانسکت ارتفاعی بررسی شد که هر ترانسکت سه قطعه نمونه ۴۰۰ متر مربعی دارد. در هر قطعه نمونه ترکیب گونه‌های درختی و قطر برابرسینه درختان یادداشت شد. با افزایش ارتفاع از سطح دریا، ترکیب گونه‌های

آنزیم‌های خاک، در ابتدا نیم گرم خاک تازه در ۵۰ میلی‌لیتر سدیم استات ۵۰mM (pH = ۵) با استفاده از دستگاه (Ultra-Turrax; IKA Labortechnik, Germany) با دور ۸۰۰۰ در دقیقه به مدت ۳ دقیقه در حمام یخ همگن شدند. فعالیت آنزیم‌ها با سوبستراهای استاندارد 4-methylumbelliferol (MUF) یا 7-amido-4-AMC) methylcoumarin اندازه‌گیری شدند [۱۰]. ۴۰ میکرولیتر از سوبسترای اختصاصی هر آنزیم با غلظت نهایی ۵۰۰ میکرومولار که در حلال DMSO حل شده بود به ۲۰۰ میکرولیتر محلول خاک اضافه شد. سوبستراهای اختصاصی هر آنزیم و نحوه ساخت آنها به‌طور کامل در مقاله Baldrian (۲۰۰۹) گزارش شده است. برای تفریق فلورسانس، ۲۰۰ میکرولیتر سدیم استات ۵۰mM (pH = ۵) با ۴۰ میکرولیتر سوبسترای MUF استاندارد برای فرونشاندن فلورسانس ترکیب شد. در نهایت میکروپلیت به مدت ۱۲۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس فلورسانس ساطع شده در مدت زمان‌های ۵ و ۱۲۵ دقیقه با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان (Infinite, TECAN, Austria) در طول موج برانگیختگی ۳۵۵ نانومتر و طول موج انتشار ۴۶۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت‌های آنزیمی براساس منحنی‌های استاندارد MUF یا AMC محاسبه شد [۱۰].

به منظور شناسایی تاکسونومیک جمعیت قارچ‌های خاک، از روش متاژنومیکس استفاده شد. برای ارزیابی فراوانی قارچ‌ها، DNA از نمونه‌های خاک با استفاده از کیت تجاری اُمگا (OMEGA bio-tek, E.Z.N.A.® Soil DNA Kit, USA) و دستورالعمل آن استخراج شد. کیفیت DNA متاژنومی با استفاده از نانودراپ و ژل الکتروفورز آگارز بررسی شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ITS-3F و ITS-4R (GCATCGATGAAGAACGCAGC) و TCCTCCGCTTATTGATATGC) در آزمایشگاه

شاخص کیفیت خاک که شامل ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک است، با استفاده از سه گام اصلی زیر محاسبه شد: ۱. تعیین مجموعه‌ای از حداقل داده‌ها، ۲. امتیازدهی به هر یک از داده‌ها، ۳. ادغام امتیازها. در مرحله اول مشخصه‌های مربوط به حداقل داده‌ها در دو دسته جداگانه با نام‌های «الف» (بیشتر بهتر است) و «ب» (کمتر بهتر است) تقسیم و امتیازبندی شدند. دسته «الف» شامل پارامترهایی است که مقادیر زیاد آنها اثر مطلوبی بر خاک بر جای می‌گذارند (رطوبت، دما، کربن، نیتروژن، پتاسیم، کلسیم و تنفس میکروبی) و دسته «ب» شامل پارامترهایی است که مقادیر آنها اثر نامطلوب بر خاک به جا می‌گذارند (جرم مخصوص ظاهری). اسیدیته با توجه به دامنه تعریف شده برای آن (عدد ۷) گروه‌بندی می‌شود که اگر مساوی یا کمتر از ۷ باشد، در دسته «الف» و در صورت بیشتر بودن، در دسته «ب» جای می‌گیرد. در نهایت امتیاز مربوط به هر یک از متغیرهای قرارگرفته در این دو دسته با رابطه‌های زیر محاسبه می‌شود [۱۲، ۱۳].

$$(1) \text{ بیشترین ارزش / ارزش (مقدار عددی) هر تکرار} = \text{امتیازبندی مشخصه‌های دسته «الف»}$$

$$(2) \text{ ارزش هر تکرار / کمترین ارزش} = \text{امتیازبندی مشخصه‌های دسته «ب»}$$

ادغام امتیازهای محاسبه‌شده، درون شاخص کلی با نام شاخص کیفیت خاک در نظر گرفته می‌شود.

$$(3) \text{ شاخص کیفیت خاک} = \left(\sum S_i / n \right) \times 10$$

S_i امتیاز محاسبه‌شده برای هر مشخصه مورد مطالعه و n تعداد کل مشخصه‌های مورد مطالعه

فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز (EC ۳,۲,۱,۲۱)، سلویوهیدرولاز (EC ۳,۲,۱,۹۱)، آریل سولفاتاز (EC ۳,۱,۶,۱)، اسید فسفاتاز (EC ۳,۱,۳,۲)، لپاز (EC ۳,۴,۱۱,۱۲) و لوسین آمینوپپتیداز (EC ۳,۴,۱۱,۱) با روش انکوباسیون آزمایشگاهی سنجیده شدند. برای سنجش فعالیت

به‌منظور آنالیز چندمتغیره و تعیین ارتباط و همبستگی بین همه شاخص‌ها، از تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از پکیج‌های Facto Mine R، Factoextra و ggplot2 استفاده شد. همه تجزیه و تحلیل‌های آماری در بستر نرم‌افزار R Studio (version 3.3.2) انجام گرفت.

نتایج و بحث

بیشترین سطح مقطع درختان در طبقه ارتفاعی ۱۰۰۰ متر مشاهده شد، درحالی که دما، جرم مخصوص ظاهری، نیتروژن، کلسیم قابل جذب و pH خاک در طبقه ارتفاعی صفر بیشتر بود. بیشترین کربن آلی، رطوبت وزنی، C/N و تنفس میکروبی خاک به طبقه ارتفاعی ۱۵۰۰ متر تعلق داشت (جدول ۱). در طول گرادیان ارتفاعی، نوع پوشش گیاهی و عوامل ریزاقليمی، اثر مهمی در تعیین تولید اولیه، تجزیه مواد آلی و چرخه‌های غذایی خاک دارد [۷]. همسو با نتایج پژوهش حاضر، حیدری و همکاران [۱۲] نشان دادند که مقدار نیتروژن، پتاسیم، کربن و تنفس میکروبی در خاک‌های جنگلی، بیشتر از مناطق دارای پوشش بوته‌ای و درختچه‌ای است که اغلب به دلیل تفاوت کمیت و کیفیت مواد تولیدی توسط پوشش گیاهی است [۱۲]. همچنین عواملی مانند دما و رطوبت خاک اثر مهمی در فعالیت جامعه تجزیه‌کننده خاک دارند و از عوامل تجزیه بستر و رهاسازی مواد مغذی مانند کربن، نیتروژن و پتاسیم هستند [۹]. در این زمینه بیرانوند و همکاران [۱۸] نشان دادند که با افزایش ارتفاع از سطح دریا و غالب شدن گونه‌های درختی راش، مقدار کربن آلی و نسبت C/N خاک افزایش و مقدار نیتروژن کاهش می‌یابد که ممکن است در نتیجه تجمع مواد آلی حاصل از لاشبرگ گونه‌های راش به دلیل کاهش دمای خاک باشد.

مولکولی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تکثیر شد [۱۶]. نمونه‌های حاصل برای توالی‌یابی (Illumina sequencing) به شرکت ماکروژن در کره جنوبی ارسال شدند. آنالیز داده‌های متاژنومی با استفاده از نرم‌افزار SEED2 انجام گرفت. واحدهای تاکسونومی براساس حداقل شباهت توالی ۹۷ درصد تعیین شدند. فراوانی تاکسایهای مختلف در طبقات ارتفاعی با استفاده از آزمون آماری ANOVA مقایسه شد. توالی‌های ITS به دست آمده در این تحقیق در پایگاه اطلاعاتی NCBI با کد PRJNA607056 ثبت شده و قابل دانلود است.

روش آماری

در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و همگن بودن واریانس داده‌ها با آزمون لون بررسی شد. سپس به منظور تعیین اختلاف یا نبود اختلاف مقادیر مشخصه‌های خاک، فعالیت آنزیم‌ها و قارچ‌ها بین طبقات مختلف ارتفاعی از آنالیز واریانس یکطرفه و برای مقایسه چندگانه میانگین‌ها از آزمون Tukey-HSD استفاده شد. برای تحلیل داده‌های مولکولی قارچ‌ها، اطلاعات تاکسونومی توالی‌های به دست آمده با توالی‌های متناظر موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه شد. سپس واحدهای تاکسونومی مربوط به هر گروه اکولوژیک قارچی با استفاده از نرم‌افزار SEED2 تعیین شد [۱۷]. در نتیجه درصد فراوانی نسبی گروه‌های اکولوژیکی قارچ‌های مختلف شامل اکتوماپکوریزها، ساپروتروف‌ها، پاتوژن‌های گیاهی، مخمرها، مخمرهای اختیاری، قارچ پوسیدگی سفید، قارچ‌های انگلی در جانوران و قارچ‌های ناشناخته^۸ شناسایی و طبقه‌بندی شد. همچنین

1. Ectomycorrhizal
2. Saprotroph
3. Plant pathogen
4. Yeast
5. Facultative yeast
6. White rot
7. Animal parasite
8. Unknown fungal

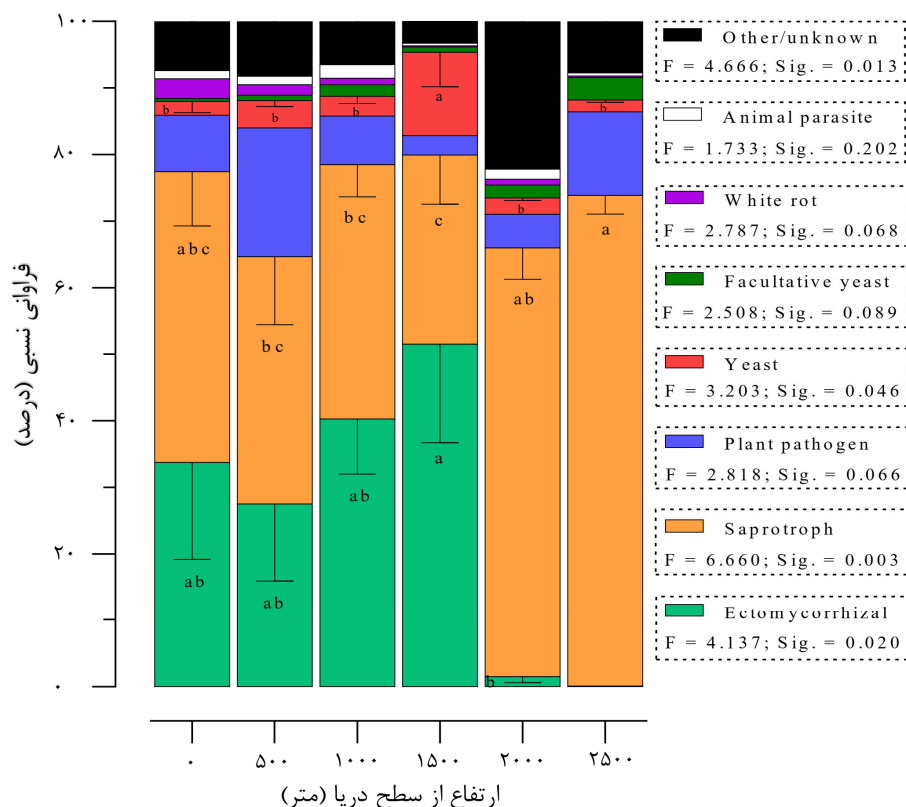
جدول ۱. میانگین (انحراف معیار) شاخص‌های پوشش جنگلی و ویژگی‌های خاک بین طبقات مختلف ارتفاعی

معنی‌داری	مقدار F	ارتفاع از سطح دریا (متر)						مشخصه‌های پوشش و خاک
		۲۵۰۰	۲۰۰۰	۱۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۰	
./...	۱۱/۴۶۹	-	۲/۸۹	۱۷/۴۹	۶۰/۵۵	۳۹/۳۳	۵۰/۳۱	سطح مقطع درختان (متر مربع بر هکتار)
./...	۸/۸۵۴	۲۰/۱۲	۳۷/۱۱	۳۱/۲۴	۲۶/۱۰	۳۷/۴۲	۲۵/۰۳	رطوبت خاک (درصد)
./...	۲۸۳/۸۰۶	۵/۶۱	۹/۰۹	۱۰/۵۹	۱۳/۸۱	۱۷/۸۲	۱۷/۵۹	دمای خاک (درصد)
./...	۸/۳۵۶	۱/۱۵	۱/۳۷	۱/۴۹	۱/۵۲	۱/۶۶	۱/۶۵	جرم مخصوص ظاهری خاک (گرم بر سانتی‌متر مکعب)
./...	۵۳/۴۴۷	۶/۸۵	۵/۵۷	۷/۵۶	۶/۰۹	۶/۴۵	۷/۸۴	واکنش خاک
./...	۳۰/۲۵۳	۲/۹۱	۲/۶۶	۵/۴۴	۴/۹۴	۳/۰۰	۲/۹۹	کربن آلی خاک (درصد)
./...	۵/۸۹۱	۰/۶۱	۰/۴۰	۰/۶۳	۰/۵۶	۰/۴۸	۰/۷۴	نیترژن خاک (درصد)
./...	۱۹/۷۲۲	۴/۹۳	۶/۹۲	۸/۸۹	۹/۱۸	۶/۳۷	۴/۱۴	نسبت کربن به نیترژن (C/N)
./۰۶۵	۲/۳۴۰	۳۱۸/۰۹	۲۹۸/۶۴	۳۴۱/۰۹	۲۶۰/۵۶	۳۷۲/۹۶	۲۴۶/۴۹	پتاسیم قابل جذب (میلی‌گرم بر کیلوگرم)
./...	۵۵/۸۳۶	۳۰۰/۸۸	۲۰۰/۷۲	۶۸۳/۷۸	۴۷۶۹/۴	۵۸۰۳/۴	۸۸۱/۰	کلسیم قابل جذب (میلی‌گرم بر کیلوگرم)
./...	۱۴/۸۳۷	۰/۳۴	۰/۵۳	۰/۸۲	۰/۵۸	۰/۵۶	۰/۷۴	تنفس میکروبی (میلی‌گرم CO ₂ بر گرم خاک در روز)

حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنادار ($P < 0.05$) در بین طبقات ارتفاعی است.

بیشتر لاشبرگ و انباشته شدن مواد کربنی در راشستان‌ها می‌تواند از دلایل افزایش فراوانی اکتومیکوریزها در طبقه ارتفاعی ۱۵۰۰ متر باشد [۲، ۷، ۹]. ژائو و همکاران [۵] نشان دادند که قارچ‌های ساپروتروف بیشتر در اطراف ریشه گیاهان مرتعی و علوفه‌ای فعالیت دارند. این یافته با نتایج پژوهش حاضر نیز مطابقت دارد. به‌طور کلی، ساپروتروف‌ها از عوامل اصلی معدنی شدن عناصر خاک هستند که این حالت بیشتر در خاک‌های با پوشش مرتعی (۲۵۰۰ متر) و گونه‌های درختی مانند ون، مرمر و افراپلت (ارتفاعات کمتر از ۵۰۰ متر) رخ می‌دهد [۷، ۸]. درختان ون و افراپلت از گونه‌های همزیست با قارچ‌های میکوریز آریسکولار هستند که به دلیل گردش زیاد مواد غذایی و pH زیاد، شرایط مناسبی را برای رشد قارچ‌های ساپروتروف فراهم می‌آورند [۷].

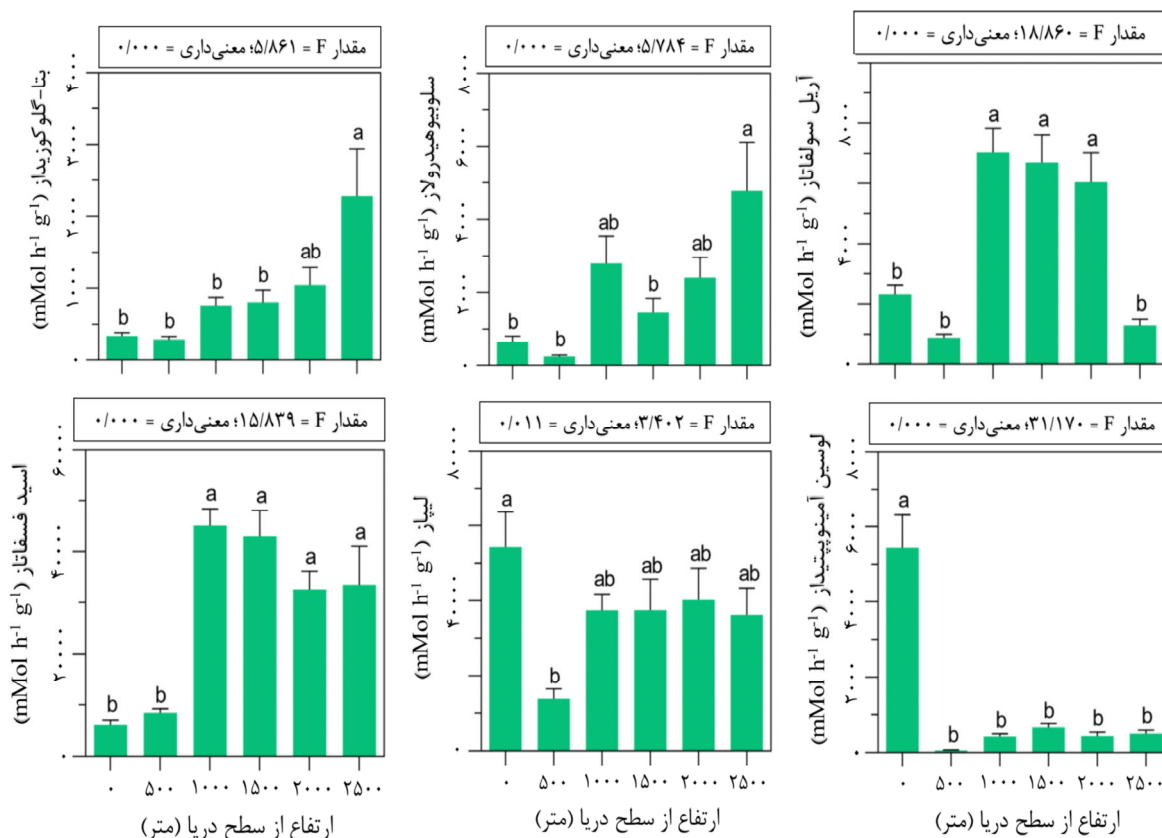
درصد فراوانی نسبی گروه‌های اکولوژیکی قارچ‌ها در شش طبقه ارتفاعی با هم مقایسه شد که بیشترین درصد فراوانی نسبی اکتومیکوریزها و مخمرها به طبقه ارتفاعی ۱۵۰۰ متر تعلق داشت، درحالی که بیشترین درصد فراوانی قارچ‌های ساپروتروف در ارتفاعات بالاتر از ۲۰۰۰ متر مشاهده شد (شکل ۱). قارچ‌های اکتومیکوریزای ارتباط نزدیکی با فعالیت زیاد ریشه‌ای و مواد آلی دارند [۸]، درحالی که از نور مستقیم خورشید و دمای کم‌گريزان‌اند [۷، ۹]. با افزایش ارتفاع و کاهش دما، فعالیت ریشه‌ای برای جذب مواد مغذی کاهش می‌یابد [۵]. عوامل مذکور و همچنین نبود ریشه گونه‌های درختی همزیست با قارچ‌های اکتومیکوریزای از دلایل اصلی کاهش فعالیت آنها در ارتفاعات بالای ۲۰۰۰ متر هستند [۲، ۸]. از طرفی تولید



شکل ۱. درصد فراوانی نسبی گروه‌های اکولوژیکی قارچ‌ها در طبقات ارتفاعی مختلف.

با نتایج پژوهش حاضر، بالدریان و همکاران [۱۹] نشان دادند که آنزیم‌های آریل سولفاتاز و اسید فسفاتاز از عوامل مؤثر در چرخه و تجزیه کربن آلی خاک به حساب می‌آیند. این شرایط در ارتفاعات میانی با غالبیت گونه راش و غلظت زیاد کربن و رطوبت خاک مشاهده می‌شود [۲۰]. همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های وابسته به کربن در زیر توده‌های راش ممکن است به دلیل افزایش زی توده روزمینی [۲]، فعالیت اکتوماپکوریزها [۳] و تنفس میکروبی خاک باشد [۶]. در مقابل، زیاد بودن فعالیت آنزیم لوسین آمینوپپتیداز در طبقات ارتفاعی کمتر را می‌توان به زیاد بودن نیتروژن، دما، pH و تنوع زیاد گونه‌های درختی نسبت داد [۱۹]. افزایش فعالیت لوسین آمینوپپتیداز همسو با افزایش نیتروژن و کاهش C/N ممکن است به دلیل وجود لاشبرگ باکیفیت و شرایط مناسب برای تجزیه مواد آلی باشد [۳].

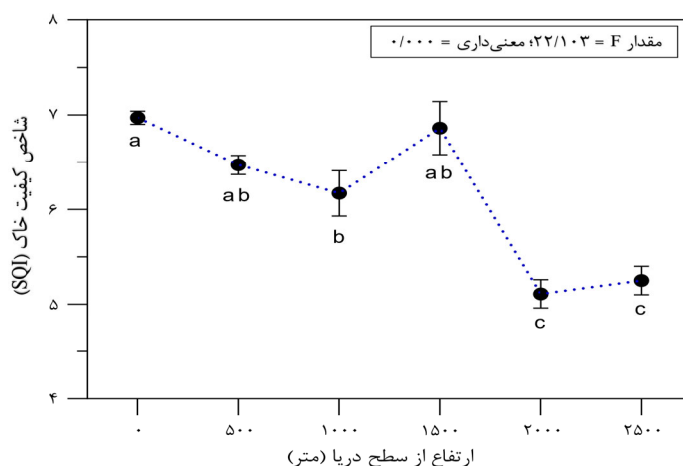
براساس بررسی فعالیت‌های آنزیمی خاک، بیشترین فعالیت آنزیم‌های لپاز و لوسین آمینوپپتیداز در پایین‌ترین طبقه ارتفاعی (صفر متر)، بیشترین فعالیت آنزیم‌های آریل سولفاتاز و اسید فسفاتاز در طبقات میانی (۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ متر) و بیشترین فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز و سلوبیوهیدرولاز در بالاترین طبقه ارتفاعی (۲۵۰۰ متر) دیده می‌شود (شکل ۲). آنزیم‌های سنجش شده در پژوهش حاضر روندهای متفاوتی با افزایش ارتفاع از سطح دریا نشان می‌دهند که می‌توان دلیل اصلی آن را وجود پوشش درختی منحصربه‌فرد [۳]، دمای خاک و فعالیت قارچ‌ها [۱] در هر طبقه ارتفاعی برشمرد. مدینه و همکاران [۹] نشان دادند که آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز و سلوبیوهیدرولاز همبستگی مثبت و معنی‌داری با فعالیت قارچ‌های ساپروتروفی دارند که در تجزیه مواد آلی در بالاترین طبقات ارتفاعی و دمای کم، اثر اساسی دارند [۶]. همسو



شکل ۲. مقایسه فعالیت آنزیم‌های مختلف خاک در طبقات مختلف ارتفاعی

میکروبی بیشتر در پایین‌ترین طبقه ارتفاعی موجب افزایش شاخص کیفیت خاک شده است [۱۱]. این افزایش همچنین ممکن است به دلیل افزایش سرعت تجزیه لاشبرگ و پویایی فعالیت میکروارگانیسم‌ها باشد، زیرا لاشبرگ گونه‌های مانند ممرز به سرعت تجزیه می‌شود و سرعت برگشت عناصر غذایی به خاک را افزایش می‌دهد [۱۳]. در طبقه ۱۵۰۰ متر نیز زیاد بودن شاخص کیفیت خاک به دلیل مقدار زیاد کربن و تنفس میکروبی خاک است که ممکن است به واسطه فعالیت قارچ‌های اکتومایکوریزی و آنزیم‌های وابسته به کربن در زیرگونه راش باشد [۷].

بیشترین شاخص کیفیت خاک متعلق به پایین‌ترین طبقه ارتفاعی و کمترین آن مربوط به طبقات ارتفاعی بالاتر از ۲۰۰۰ متر از سطح دریا بوده است و طبقه‌های میانی حالتی بینابینی را نشان می‌دهند (شکل ۳). تاج پوشش گسترده و زی‌توده زیاد درختان، مقدار زیادی از مواد آلی را به خاک اضافه می‌کند که سبب ایجاد شرایط مطلوب برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها و شاخص کیفیت خاک نسبت به مراتع می‌شود [۱۲]. در این بین، کربن، نیتروژن و تنفس میکروبی خاک اثر مهمی در افزایش کیفیت خاک دارند. تنوع زیاد گونه‌های درختی، نیتروژن، کلسیم، pH و همچنین تنفس

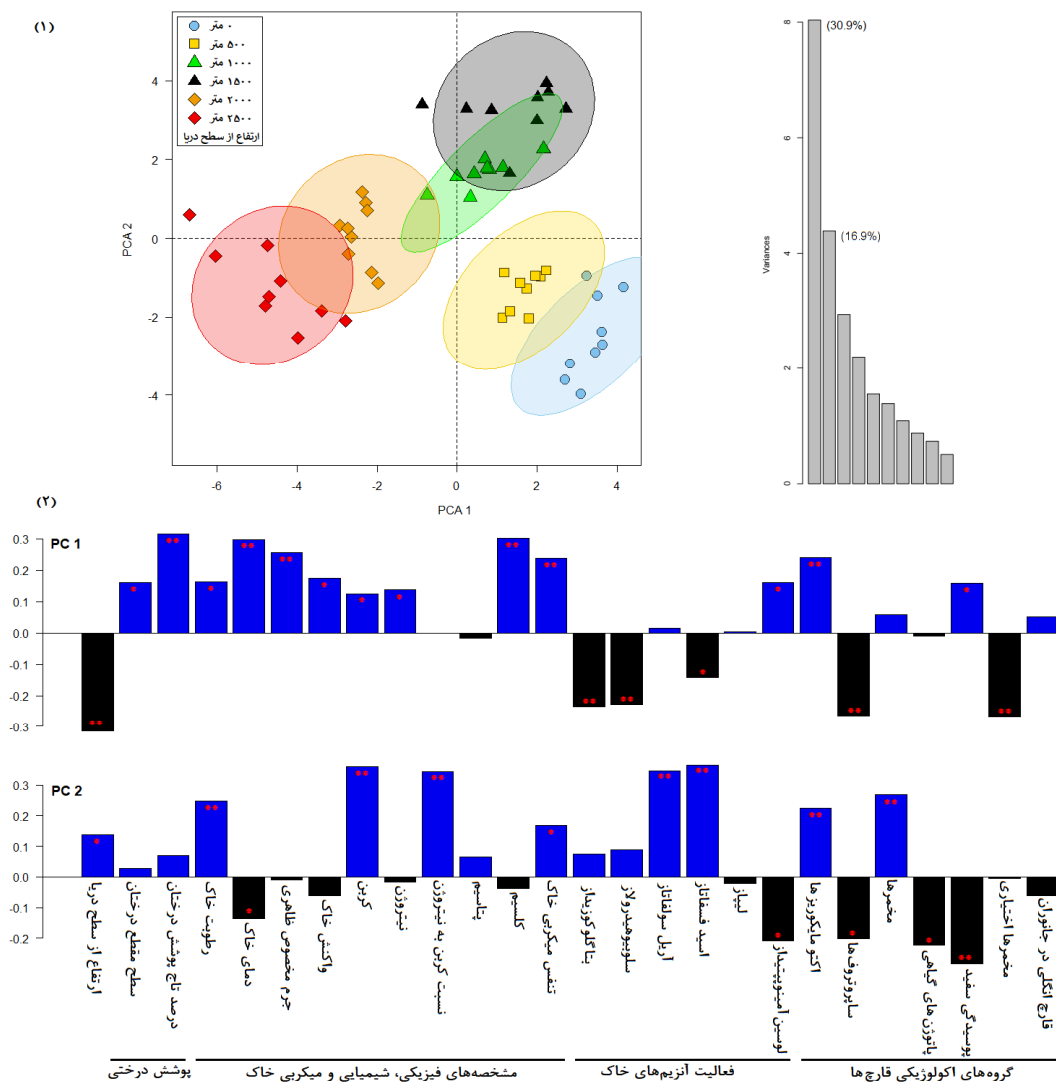


شکل ۳. میانگین شاخص کیفیت خاک در طبقات مختلف ارتفاعی

نسبت به گونه‌های دیگر کیفیت کمتری دارند و منبع خوبی برای تجمع کربن در سطح لاشبرگی و خاک هستند، رابطه نزدیکی با اکتومایکوریزها برقرار کرده‌اند [۲]. کربن و نسبت C/N زیاد، غلظت کم مواد مغذی و مقادیر زیاد ترکیبات برگشت‌ناپذیر (ترکیبات آللوپاتی، تانن‌ها و لیگنین) از طریق تجزیه قارچی با گردش آهسته مواد مغذی مانند اکتومایکوریزها پشتیبانی می‌شود [۷]. در این زمینه براساس برخی شواهد کربن خاک از طریق میسلیوم قارچ‌های مایکوریزی به گیاهان عرضه می‌شود [۹].

نتایج تحلیل مؤلفه‌های اصلی همچنین نشان می‌دهد که در طبقات ارتفاعی بالا، آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز، سلوبیوهیدرولاز و اسیدفسفاتاز و قارچ‌های ساپروتروف همبستگی مثبت و معنی‌داری با هم دارند. قارچ‌های ساپروتروف در بین گونه‌های گیاهی غیرچوبی فراگیرند، اما در برخی از درختان برگ‌ریز جنگل‌های معتدله مانند ون و افراپلت نیز یافت می‌شوند و در چرخه معدنی عناصر غذایی نقش دارند. در این پژوهش طبقات ارتفاعی بالاتر از ۲۰۰۰ متر با پوشش علفی گواه این است که این قارچ‌ها رابطه خوبی با پوشش علفی دارند [۷]. علاوه بر اثر درختان خاص، میکروب‌های خاص ممکن است در تجزیه و آزادسازی ترکیبات خاک اثر داشته باشند [۹].

تحلیل مؤلفه‌های اصلی نیز بیانگر موقعیت مکانی متفاوت طبقات ارتفاعی، شاخص‌های خاک، آنزیم‌ها و قارچ‌هاست (شکل ۴). این تحلیل نشان می‌دهد که پایین‌ترین طبقه ارتفاعی همبستگی مثبت و معنی‌داری با تاج‌پوشش درختان، رطوبت، دما، pH کربن، نیتروژن و کلیسم خاک، آنزیم لوسین‌آمینوپپتیداز و قارچ‌های اکتومایکوریزی دارد. محور دو نشان‌دهنده همبستگی مثبت و زیاد رطوبت، کربن، C/N و تنفس میکروبی خاک، آنزیم‌های آریل‌سولفاتاز و اسیدفسفاتاز و قارچ‌های اکتومایکوریز و مخمرها در طبقات ارتفاعی ۱۵۰۰ متر است (شکل ۴). قارچ‌های اکتومایکوریزی، سنبل میکروبی خاک جنگل‌های معتدله با گونه‌های درختی مانند راش و بلوط هستند و مقدار زیادی از زی‌توده میکروبی خاک را تشکیل می‌دهند [۲، ۸]. این قارچ‌ها به منابع آلی کربن‌دار، نسبت C/N زیاد و pH خاک کمتر از محل رویش دیگر گونه‌های درختی پهن‌برگ وابسته‌اند و به آنزیم‌های خارج‌سلولی مانند اسیدفسفاتاز و آریل‌سولفاتاز برای تجزیه مواد آلی احتیاج دارند [۵]. پژوهش حاضر نیز نشان داد که ویژگی‌های پوشش درختی همبستگی مثبتی با اکتومایکوریزها در طبقات ارتفاعی متوسط دارند. از آنجا که درختان راش از نظر شاخص‌های کیفی لاشبرگ و خاک



شکل ۴. بررسی روابط بین شاخص‌های رویشگاهی، فیزیکوشیمیایی خاک، آنزیم‌ها و گروه‌های قارچی با استفاده از تحلیل مؤلفه‌های اصلی

نتیجه‌گیری

زیاد، فعالیت آنزیم لوسین آمینوپپتیداز، بستر قلیایی و ترکیب مناسب قارچ‌ها، بهترین کیفیت خاک را به وجود آورده‌اند. میکروارگانیسم‌های خاک از جمله قارچ‌ها اثر مهمی در تولید آنزیم‌های خاک و تجزیه مواد آلی دارند. از این رو شناسایی آنها با روش‌های نوین و دقیق مولکولی مانند روش‌های مبتنی بر متاژنومیکس، درک ما را از مطالعه اکولوژیکی و بوم‌شناسی جنگل افزایش می‌دهد. در نهایت با استفاده از روش‌های جدید مولکولی می‌توان به ترکیب مناسب میکروارگانیسم‌های خاک‌زی پی برد و

کاهش فعالیت اکتومایکوریازها، آنزیم‌های لوسین آمینوپپتیداز، آریل سولفاتاز و اسیدفسفاتاز، دما و پوشش روزمینی موجب کاهش شاخص کیفیت خاک در بالاترین طبقه ارتفاعی شد. در طبقات میانی با غالب بودن گونه راش، بیشترین فعالیت اکتومایکوریازها و مخمرها به دلیل دسترسی فراوان به کربن و رطوبت خاک، مشاهده می‌شود. جنگل‌های آمیخته ساحلی در شرایطی از جمله دمای مناسب برای تجزیه مواد مغذی، تنفس میکروبی

گرفت. نویسندگان از گروه آزمایشگاهی پروفیسور پیتیر بالدریان بابت فراهم کردن آزمایشگاه سنجش آنزیم و کمک در تحلیل داده‌های متاژنوم قارچی در پژوهشگاه میکروبیولوژی محیطی شهر پراگ جمهوری چک قدردانی می‌کنند.

رابطه آنها را با چرخه‌های عناصر غذایی و فعالیت‌های آنزیمی بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور انجام

References

- [1]. Ren, C., Zhang, W., Zhong, Z., Han, X., Yang, G., Feng, Y., and Ren, G. (2018). Differential responses of soil microbial biomass, diversity, and compositions to altitudinal gradients depend on plant and soil characteristics. *Science of the Total Environment*, 610: 750-758.
- [2]. Bahram, M., Pölme, S., Kõljalg, U., Zärre, S., and Tedersoo, L. (2012). Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytologist*, 193: 465-473.
- [3]. Šnajdr, J., Dobiášová, P., Urbanová, M., Petránková, M., Cajthaml, T., Frouz, J., and Baldrian, P. (2013). Dominant trees affect microbial community composition and activity in post-mining afforested soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 56: 105-115.
- [4]. Saitta, A., Anslan, S., Bahram, M., Brocca, L., and Tedersoo, L. (2017). Tree species identity and diversity drive fungal richness and community composition along an elevational gradient in a Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza*, 28: 39-47.
- [5]. Zhao, F., Feng, X., Guo, Y., Ren, C., Wang, J., and Doughty, R. (2020). Elevation gradients affect the differences of arbuscular mycorrhizal fungi diversity between root and rhizosphere soil. *Agricultural and Forest Meteorology*, 284:107894.
- [6]. Mathieu, Y., Gelhaye, E., Dumarçay, S., Gérardin, P., Harvengt, L., and Buée, M. (2013). Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology and fungal ecology. *Journal of Microbiological Methods*, 92(2): 157-163.
- [7]. Heděnc, P., Nilsson, L.O., Zheng, H., Gundersen, P., Schmidt, I.K., Rousk, J., and Vesterdal, L. (2020). Mycorrhizal association of common European tree species shapes biomass and metabolic activity of bacterial and fungal communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 149:107933.
- [8]. Tedersoo, L., Bahram, M., Pölme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., and Smith, M.E. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346: 1052-1053.
- [9]. Medina, J., Monreal, C.M., Orellana, L., Calabi-Floody, M., González, M.E., Meier, S., Borie, F., and Cornejo, P. (2020). Influence of saprophytic fungi and inorganic additives on enzyme activities and chemical properties of the biodegradation process of wheat straw for the production of organo-mineral amendments. *Journal of Environmental Management*, 255: 109922.
- [10]. Baldrian, P. (2009). Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant, Soil and Environment*, 55: 370-378.
- [11]. Asadiyan, M., Hojjati, S.M., Pourmajidian, M.R., and Asghar, F. (2013). Impact of Different Land-use / Land Cover Types on Soil Quality in Alandan Forest, Sari. *Physical Geography Research Quarterly*, 45(3): 65-76.
- [12]. Heydari, M., Eslaminejad, P., Kakhki, F.V., Mirab-balou, M., Omidipour, R., Prévosto, B., Kooch, Y., and Lucas-Borja, M.E. (2020). Soil quality and mesofauna diversity relationship are modulated by woody species and seasonality in semiarid oak forest. *Forest Ecology and Management*, 473: 118332.
- [13]. Andrews, S.S., Flora, C.B., Mitchell, J.P., and Karlen, D.L. (2003). Growers' perceptions and acceptance of soil quality indices. *Geoderma*, 114(3-4):187-213.

- [14]. Khaleghi, P., Abasi, H., Hosani, S., Frohar, M., and Ghelichnian, H. (1997). *Caspian forests profile, Waz Research Forest*. Ministry of Jihad-e-Production Department of Education and Research, Research Institute for Forests and Rangelands Publication, Tehran, Iran, 380 p.
- [15]. Ghazan Shahy, C. 2006. *Analysis of soil and plants*. Homa Publication, 272 p.
- [16]. Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research* 41(1): e1-e1.
- [17]. Větrovský, T., Baldrian, P. and Morais, D. (2018). SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*, 34(13): 2292-2294.
- [18]. Bayranvand, M., Kooch, Y., Hosseini, S.M. and Alberti, G., 2017. Humus forms in relation to altitude and forest type in the Northern mountainous regions of Iran. *Forest Ecology and Management*, 385: 78-86.
- [19]. Baldrian, P., Šnajdr, J., Merhautová, V., Dobiášová, P., Cajthaml, T., and Valášková, V. (2013). Responses of the extracellular enzyme activities in hardwood forest to soil temperature and seasonality and the potential effects of climate change. *Soil Biology and Biochemistry*, 56: 60-68.
- [20]. Kooch, Y. and Bayranvand, M. (2017). Composition of tree species can mediate spatial variability of C and N cycles in mixed beech forests. *Forest Ecology and Management*, 401: 55-64.

**Evaluation of fungal and enzymatic activities in relation to soil quality
along altitudinal gradient in Hyrcanian forests
(Case study: Vaz watershed - Mazandaran province)**

M. Bayranvand*; Ph.D. Student, Faculty of Natural Resources & Marine Sciences, University of Tarbiat Modares, Noor, I.R. Iran

M. Akbarinia; Assoc., Prof., Faculty of Natural Resources & Marine Sciences, University of Tarbiat Modares, Noor, I.R. Iran

Gh. Salehi Jouzani; Prof., Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, I.R. Iran

J. Gharechahi; Assist., Prof., Molecular Genetics, Human Genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, I.R. Iran

(Received: 10 September 2020, Accepted: 15 December 2020)

ABSTRACT

The activity of fungal and enzymes are important for soil quality in forest ecosystems. Altitudes above sea level (a.s.l.) are important for their impacts on biological and non-biological characteristics of soil by effecting distribution of fungal communities and their enzymatic activities. The aim of this study was to investigate fungi diversity and soil enzyme activities in relation to soil quality index (SQI) along an altitudinal gradient (0, 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 m a.s.l.) in Vaz watershed-Mazandaran province. In each elevation level, nine 400 m² plots were investigated for tree cover and soil characteristics. The soil physical, chemical, and enzymatic properties were measured by conventional laboratory technique. To profile fungal community, ITS region was PCR amplified using barcoded primers and sequenced using next-generation sequencing technologies. Our results showed that the highest SQI and leucine aminopeptidase activities were observed at the lowest elevation level with the highest soil microbial respiration, nitrogen and temperature. The highest percentage of ectomycorrhizal and yeasts fungi, as well as the highest activities of arylsulfatase and acid phosphatase enzymes were associated with middle SQI in 1500 m altitude level with a high correlation with soil carbon concentration. The lowest SQI, along with the activity of saprotrophic fungus and β -glucosidase and cellobiohydrolase enzymes was noted in higher elevations. It can be concluded that with increasing elevation, SQI is decreased due to a reduced ectomycorrhizal fungi population and decreased activities of carbon/nitrogen-dependent enzymes in the absence of coexisting tree species.

Keywords: ectomycorrhizal, soil microbial respiration, ITS sequencing, forest soil, enzymatic activity, metagenomics.

* Corresponding Author: Email: m.bayranvand@gmail.com, Tel: +98 91910068094