

野外树木根系取样及根际土收集操作规程

Protocol for Sampling of Root and Rhizosphere Soils from Trees in Natural Fields

何兴华^{1,2}, 杨预展^{1,2}, 袁志林^{1,2,*}

¹ 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院, 北京; ² 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州

*通讯作者邮箱: yuanzli@caf.ac.cn

摘要: 微生物在林业生产力中发挥着越来越重要的作用, 而树木根系与土壤微生物交流非常密切, 并且树木根系可与多种类型微生物 (根际促生菌、外生菌根真菌和丛枝菌根真菌等) 建立共生关系 (图 1)。为了方便研究植物-微生物的互作机制, 本文描述了野外树木根系采集和根际土收集的具体方法, 即获得树木根系样品后, 在缓冲液中震荡, 去除根系, 最后离心获得根际土。从而方便开展后续菌群组成和结构分析, 以及分离纯化菌株等研究。

关键词: 树木, 根系取样, 根际土收集

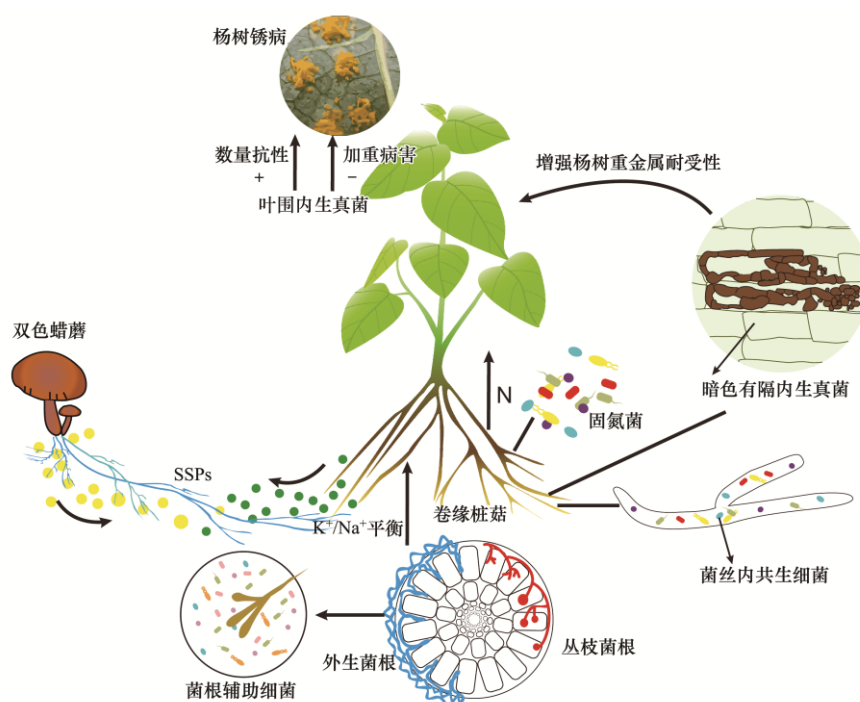


图 1. 杨树地上地下部分共生菌类型 (图片引自潘雪玉, 2018)

材料与试剂

1. 标签纸
2. 采样记录表
3. 冰袋或干冰
4. 无菌采样袋
5. 油性记号笔
6. 50 ml 离心管
7. 一次性无菌乳胶手套
8. NaCl (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 7647-14-5)
9. Na₂HPO₄ (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 20040618)
10. NaH₂PO₄ (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 20040818)
11. 10 mM PBS 溶液 (见溶液配方)

仪器设备

- 1、铁铲
- 2、取土钻
- 3、修枝剪
- 4、GPS 定位器 (南京君灿仪器设备有限公司, 彩途, model: K82B)
- 5、生物样品采样箱
- 6、小锄头 (中间半椭圆豁口)
- 7、全温振荡器 (苏州培英实验设备有限公司, 培英, model: THZ-C-1)
- 8、台式高速冷冻离心机 (Sigma 公司, Sigma, model: 3K15)

实验步骤

一、采样计划与前期准备

- 1、确定采样目的、区域、样点分布等。
- 2、准备器具：详见材料与试剂，仪器设备。
- 3、制定采样记录表，包括如下内容：采样点经纬度、采样日期、采样人、气候信息 (包括气温、降雨、湿度等)，以及所有影响后续研究的其他环境因素。

二、根系取样

- 1、 建议选择具有代表性的土壤，一般随机选择健康的树木作为根际土取样目标。采样时建议使用五点取样法采集样品，即先确定对角线的中点作为中心取样点，而后在对角线上选择与中心点距离相等的点进行取样。或者使用等距离取样法，由取样的比率决定距离或间隔 (图 2)。

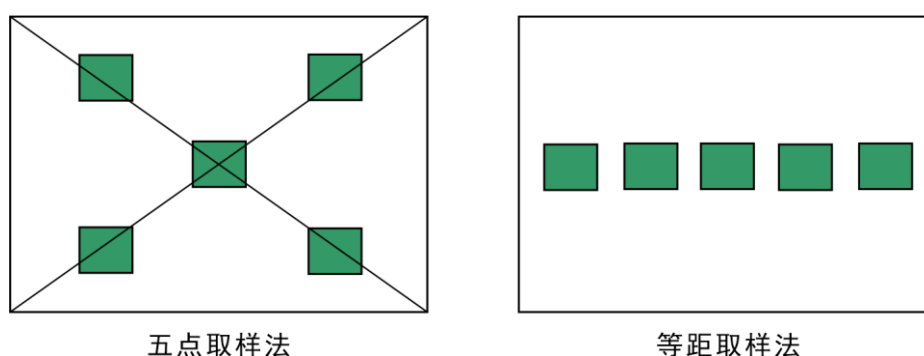


图 2. 五点取样法和等距取样法示意图

- 2、 采样使用的所有工具、采样袋或其他物品等，均需无菌。若野外缺乏合适的灭菌条件，可以使用采集位点临近区域的原始土壤对取样工具进行擦拭，尽量去除干扰。
- 3、 用铲子去除地表植被和其他杂质，使用小锄头轻轻刨开土壤，寻找树木的细根 (直径 ≤ 2 mm) (Berhongaray 等, 2013)，或使用土钻获取土壤和根系的混合样，再挑出细根。细根是树木吸收养分和水分的主要器官 (Guo 等, 2008)，同时也是与土壤接触最为密切的器官 (Norby and Jackson, 2000)，对树木的生长发育起着关键作用。因此，研究树木细根的根际微生物对提高林木生产具有重要意义。以杨树为例，距离树干 0-1 m 的范围为细根集中分布区，树木根系样品的收集范围在地下 5-20 cm 内，因为杨树细根主要集中分布在该范围内 (Mulia and Dupraz, 2006; Lacercat 等, 2016)，使用修枝剪剪取细根，每棵树木收集至少 10 g 根系样品。每个处理组至少 5 个生物学重复，一般推荐 10 个生物学重复。

- 4、将收集根系样本进行分装并做好标记，收集至无菌采样袋中，密封保存。无菌采样袋立即放入生物样品采样箱中低温保存（采样箱内提前放入冰袋或干冰）。低温运送至实验室进行根际土的收集。

三、实验室根际土收集

按以下步骤收集根际土：

- 1、在超净工作台内抖落根系的 **bulk soils** (即非根际土)，附着在根部约 1mm 厚的土壤被定义为根际土壤 (图 3) (Edwards 等, 2015)。
- 2、将根系样品转移至含 20 ml 无菌 10 mM PBS 溶液的无菌 50 ml 离心管中，放置于全温摇床 (苏州培英实验设备有限公司，培英，model: THZ-C-1) 120 rpm/min，室温下震荡 20 min (Beckers 等, 2016; Beckers 等, 2017)。
- 3、使用无菌镊子 (将镊子放在酒精灯火焰上进行高温消毒，用无菌水冷却至常温后使用) 挑除 50 ml 离心管中的根系，剩余悬浮液高速离心 ($6,000 \times g$, 4°C) 20 min (秦媛等, 2018) 收集根际土壤 (图 4)。
- 4、收集的根际土壤样品可直接进行后续实验，或液氮速冻后，置于 -80°C 超低温冰箱保存。

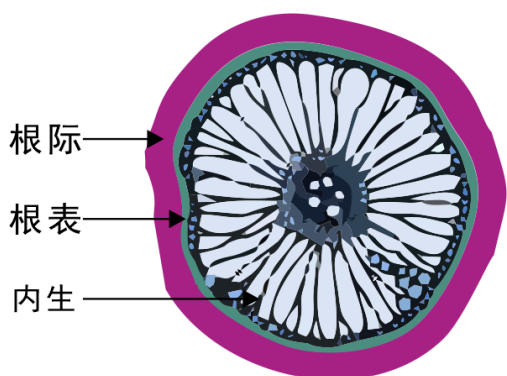


图 3. 根际、根表和内生示意图 (图片引自 Edwards 等, 2015)

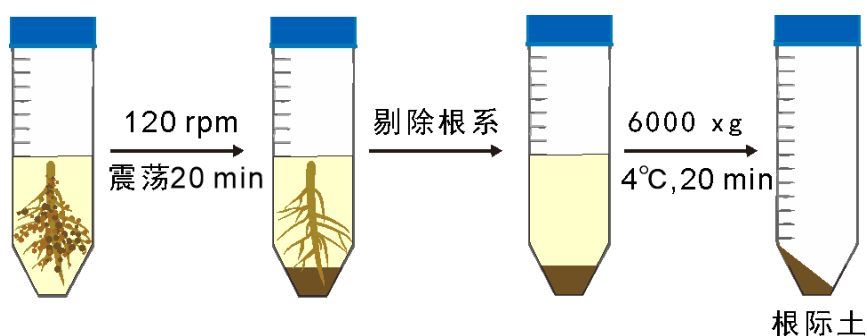


图 4. 根际土分离流程

注意事项:

- 1、根系取样，时常会碰到杂质含量较高，取样时需要对杂质进行过滤，避免石块等杂质戳破采样袋等情况的发生，也会给后续提取造成干扰。
- 2、采样时每个采样点的取样深度及采样量应均匀一致。
- 3、根际土收集过程中，摇床震荡时间和强度可根据洗涤难易程度而调整。
- 4、样品保存时避免反复冻融，以免破坏根际土壤菌群结构。

溶液配方

1、10 mM PBS 溶液(w/v):

NaCl	130 mM
Na ₂ HPO ₄	7 mM
NaH ₂ PO ₄	3 mM

超纯水定容至 1 L，调 pH 7.4，121 °C 高压灭菌 15 min，待温度恢复到室温后 4 °C 保存备用。

致谢

本工作的顺利开展得益于国家自然科学基金项目(资助号：31722014)和中央非营利性研究基础研究基金(资助号：CAFYBB2020ZY002-1 和 CAFYBB2019ZA001-3)的经费支持。

参考文献

1. 秦媛, 潘雪玉, 靳微, 陈连庆 和 袁志林. (2018). [杨树人工林土壤微生物群落4种](#)

- 117 [提取方法比较](#). 林业科学 54(9): 169-176.
- 118 2. 潘雪玉. (2018). [沿海防护林树种促生、耐盐根系真菌筛选及机制初探](#)(硕士学位论文论
119 文,中国林业科学研究院).
- 120 3. Berhongaray, G., Janssens, I. A., King, J. S., and Ceulemans, R. (2013). [Fine](#)
121 [root biomass and turnover of two fast-growing poplar genotypes in a short-](#)
122 [rotation coppice culture](#). *Plant Soil* 373(1-2): 269-283.
- 123 4. Guo, D., Xia, M., Wei, X., Chang, W., Liu, Y., and Wang, Z. (2008). [Anatomical](#)
124 [traits associated with absorption and mycorrhizal colonization are linked to root](#)
125 [branch order in twenty-three Chinese temperate tree species](#). *New*
126 *Phytol* 180(3): 673-683.
- 127 5. Lacercat-Didier, L., Berthelot, C., Foulon, J., Errard, A., Martino, E., Chalot, M., &
128 Blaudez, D. (2016). [New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots](#)
129 [display high metal tolerance](#). *Mycorrhiza* 26(7): 657-671.
- 130 6. Mulia, R., & Dupraz, C. (2006). [Unusual fine root distributions of two deciduous](#)
131 [tree species in southern France: What consequences for modelling of tree root](#)
132 [dynamics?](#) *Plant and Soil* 281(1-2): 71-85.
- 133 7. Norby, R. J., and Jackson, R. B. (2000). [Root dynamics and global change:](#)
134 [seeking an ecosystem perspective](#). *New Phytol* 147(1): 3-12.
- 135 8. Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K.,
136 Bhatnagar, S., Eisen, J. A. and Sundaresan, V. (2015). [Structure, variation, and](#)
137 [assembly of the root-associated microbiomes of rice](#). *Proc Natl Acad Sci U S*
138 *A* 112(8): E911-E920.
- 139 9. Beckers, B., De Beeck, M. O., Weyens, N., Van Acker, R., Van Montagu, M.,
140 Boerjan, W., and Vangronsveld, J. (2016). [Lignin engineering in field-grown](#)
141 [poplar trees affects the endosphere bacterial microbiome](#). *Proc Natl Acad Sci U*
142 *S A* 113(8): 2312-2317.
- 143 10. Beckersz, B., De Beeck, M. O., Weyens, N., Boerjan, W., and Vangronsveld, J.
144 (2017). [Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and](#)
145 [endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees](#). *Microbiome* 5(1):
146 25.