

小麦相关微生物的野外采样与样品保存

Field sampling and sample storage of wheat-associated microbiomes

马玉颖¹, 褚海燕^{1,2,*}

¹中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 江苏 南京 210008; ²中国科学院大学 北京 100049;

*通讯作者邮箱: hychu@issas.ac.cn

摘要: 植物的根、茎、叶、花、果实等各组织器官表面和内部都定殖着复杂且多样的微生物。由于对环境和植物状态具有极度的敏感性, 这些植物相关的微生物群落在野外环境条件下时刻维持着相对动态的平衡。因此, 对于处于复杂环境中的田间/野外植物相关微生物的研究, 需要注意在植物样本获取中的及时处理, 尽可能地减少植物组织及其相关微生物显著的变化。本文以田间小麦相关微生物的研究为例, 利用液氮速冻、干冰运输以及低温保存等方式, 详述了对田间小麦植株样本的采集、运输、处理及保存过程及注意事项, 为更好地保持野外小麦植株样品 (根、茎、叶等) 采集时的原状态, 维持其中相关微生物群落的稳定, 以供后续进行小麦植株相关性状指标的测定, 及其小麦相关微生物 DNA 的提取和研究提供基础方法指导。

关键词: 小麦, 植物微生物, 野外采样, 样品保存

材料与试剂

1. 小麦植株
2. 铁锹
3. 剪刀
4. 密封袋
5. 标签
6. 铅笔
7. 记号笔
8. 液氮
9. 干冰

10. 空泡沫盒
11. 干冰箱 (装有干冰的泡沫箱)
12. 液氮罐 (南京天玮地络仪器设备有限公司, catalog number: LD25)
13. 氧化锆珠 (南京东晟美生物科技有限公司, Zirconia beads, 5MM)
14. 10 ml 离心管 (biosharp, micro-centrifuge tube, catalog number: S-100-M)
15. 毛刷 (VICO, catalog number: WK82215)
16. 一次性无菌手套 (AMMEX, catalog number: TLFCMDSi42100)
17. 无菌水
18. 无菌滤纸

仪器设备

1. -40 °C 冰箱 (Haier, catalog number: DW-40L508)
2. -80 °C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, model number: 907)
3. 高通量快速研磨机 (上海净信, JXFSTPRP 系列全自动样品快速研磨仪)

实验步骤

1. 根据试验设计, 用铁锹挖取整株小麦植株, 尽可能地去掉根系部分的大土块、杂草等; 手拿剧烈抖动根系至几乎没有明显的土壤掉落即可。
2. 用干净的剪刀分离根、茎、叶各个植株组织部分后, 分别置于密封袋中, 在密封袋的外部用记号笔标明样品名称、采样时间、试验处理等信息; 同时用铅笔写好标签, 将标签贴于样品袋内部偏上部分, 以防止外部记号笔标识在贮存时的模糊和损坏。
3. 将样品密封袋中的空气尽可能的排出, 封口, 再置于泡沫盒中, 倒液氮速冻样品 3~5 min。
4. 将速冻好的样品放置在 -80 °C 的干冰箱中, 运回实验室。
5. 实验室中利用小毛刷 (提前灭菌) 将紧密附着在根系表面的土壤刷下来, 尽量刷到根系表面无明显的土壤颗粒 (土壤和根系颜色一般有明显差异, 可以通过颜色来辨别是否刷得较为干净了), 收集到 10 ml 无菌离心管中, 保存为小麦根际土样品。

6. 将剩余小麦根系用无菌水冲洗干净，利用无菌滤纸吸取洗净的根表多余水分，置于新的样品密封袋中，再用液氮速冻，保存为小麦根系样品。
7. 上述小麦根际土、根、茎、叶等样品袋封好口后，置于-40°C 冰箱保存即可，若需长期保存，请置于-80 °C 冰箱保存。
8. 后续取用测定小麦相关微生物时，将冷冻的小麦根、茎、叶等组织剪碎后，置于10 ml 无菌离心管中，同时放入 3~4 粒 5 MM 氧化锆珠，在离心管表面写好样品标识。
9. 提前将研磨机适配器放入液氮中预冷，再将准备好的离心管置于适配器中研磨，将其中的小麦组织样品粉碎成粉末状，用以提取样品 DNA；参数组设定：研磨次数 1 次，频率 40 Hz，运行时间 60 s。

注意事项

1. 所有野外和实验室对样品的操作，都需戴上一次性无菌手套进行处理，处理不同实验处理的样品时，请更换新的无菌手套。
2. 野外样品分离好后放入密封袋时，密封袋要尽量排出空气后在封口，以防速冻时密封袋爆裂。
3. 如果需要测定小麦内生微生物，则需要在剪碎样品前，对小麦的根、茎、叶等组织进行表面消毒处理，以去除表面微生物。
4. 研磨时，注意每个离心管中放置的样品不要超过管的一半，不要按压的太紧，以防无法将样品充分研磨成粉末状；因此，建议每个样品研磨 2~4 管，再将这些管中的样品粉末混合到一个管中，以保持研磨后充足的样品分量。
5. 研磨前液氮冷冻样品即可，不要将离心管放入液氮中冷冻，否则研磨时，离心管底部容易破裂。

溶液配方

1. 无菌水

去离子水进行高压灭菌

致谢

本实验得到国家自然科学基金项目 (31870480) 的资助。

参考文献

1. Zimmerman, N. B. and Vitousek, P. M. (2012). Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. *P Natl Acad Sci USA* 109: 13022-13027.
2. Fan K., Delgado-Baquerizo M., Zhu Y. and Chu H. (2020). Crop production correlates with soil multitrophic communities at the large spatial scale. *Soil Biol Biochem* 151: 108047.