**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: [yuanzl@caf.ac.cn](mailto:yuanzl@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

**E:\Desktop\stxb-39-1-381-1\stxb-39-1-381-1.tif**

**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**

1. **采样计划与前期准备**
2. 确定采样目的、区域、样点分布等。
3. 准备器具：详见材料与试剂，仪器设备。
4. 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。
5. **根系取样**
6. 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)。

E:\Desktop\protocol\初稿1\树木根系及根际土取样\五点取样.tif

**图2. 五点取样法和等距取样法示意图**

1. 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。
2. 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。
3. 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。

1. **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 *× 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。

**E:\Desktop\protocol\初稿1\树木根系及根际土取样\Backup_of_根际示意图.tif**

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

**E:\Desktop\protocol\资料\根际土分离.tif**

**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

Na2HPO4 7 mM

NaH2PO4 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**

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种提取方法比较](http://www.linyekexue.net/CN/10.11707/j.1001-7488.20180919). 林业科学 54(9)：169-176.

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](https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CMFD&dbname=CMFD201901&filename=1018253266.nh&v=0Bu7TzIlO9mXpVlxFfr890m9vGkZEkQSt6j97%25mmd2FNG6eL5XyN%25mmd2BIyBiry3OkdixVRJp)(硕士学位论文,中国林业科学研究院).

Berhongaray, G., Janssens, I. A., King, J. S., and Ceulemans, R. (2013). [Fine root biomass and turnover of two fast-growing poplar genotypes in a short-rotation coppice culture.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834288) *Plant Soil* 373(1-2): 269-283.

Guo, D., Xia, M., Wei, X., Chang, W., Liu, Y., and Wang, Z. (2008). [Anatomical traits associated with absorption and mycorrhizal colonization are linked to root branch order in twenty-three Chinese temperate tree species.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657210) *New Phytol* 180(3): 673-683.

Lacercat-Didier, L., Berthelot, C., Foulon, J., Errard, A., Martino, E., Chalot, M., & Blaudez, D. (2016). [New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance.](https://link.springer.com/article/10.1007/s00572-016-0699-y) *Mycorrhiza* 26(7): 657-671.

Mulia, R., & Dupraz, C. (2006). [Unusual fine root distributions of two deciduous tree species in southern France: What consequences for modelling of tree root dynamics?](https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-005-3770-6) *Plant and Soil* 281(1-2): 71-85.

Norby, R. J., and Jackson, R. B. (2000). [Root dynamics and global change: seeking an ecosystem perspective.](https://jacksonlab.stanford.edu/publication/root-dynamics-and-global-change-seeking-ecosystem-perspective) *New Phytol* 147(1): 3-12.

Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A. and Sundaresan, V. (2015). [Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605935) *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(8): E911-E920.

Beckers, B., De Beeck, M. O., Weyens, N., Van Acker, R., Van Montagu, M., Boerjan, W., and Vangronsveld, J. (2016). [Lignin engineering in field-grown poplar trees affects the endosphere bacterial microbiome.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26755604) *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(8): 2312-2317.

Beckersz, B., De Beeck, M. O., Weyens, N., Boerjan, W., and Vangronsveld, J. (2017). [Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28231859) *Microbiome* 5(1): 25.