

## 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<sup>1,2</sup>, 杨预展<sup>1,2</sup>, 袁志林<sup>1,2,\*</sup>

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

\*通讯作者邮箱: [yuanzl@caf.ac.cn](mailto:yuanzl@caf.ac.cn)

引用格式: 何兴华, 杨预展, 袁志林. (2021). 野外树木根系取样及根际土收集操作规程. *Bio-101* e2003655. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003655.

How to cite: He, X. H., Yang, Y. Z. and Yuang, Z. L. (2021). Protocol for Sampling of Root and Rhizosphere Soils from Trees in Natural Fields. *Bio-101* e2003655. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003655. (in Chinese)

**摘要:** 微生物在林业生产力中发挥着越来越重要的作用, 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

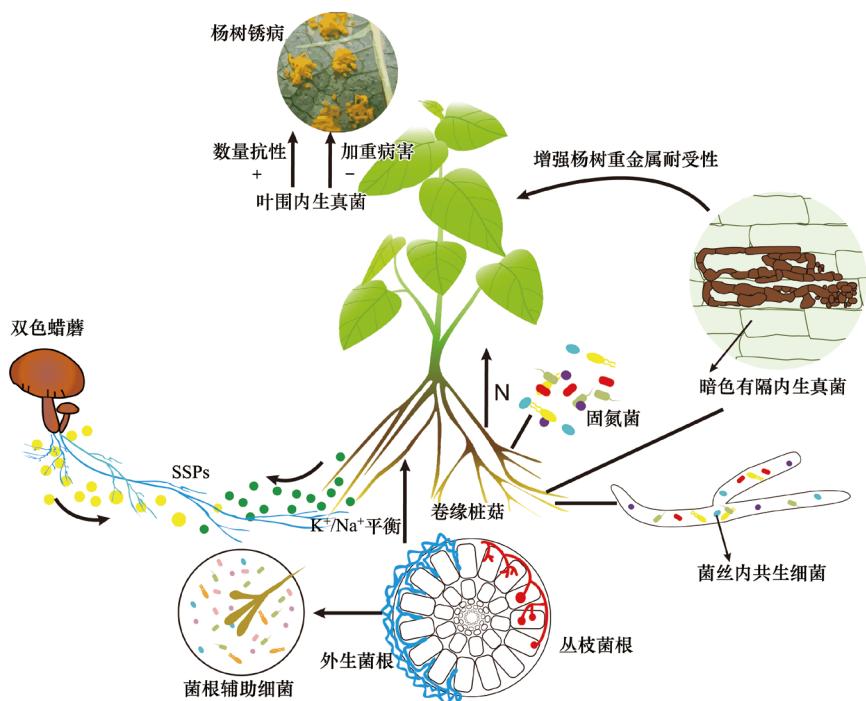


图 1. 杨树地上地下部分共生菌类型 (图片引自潘雪玉, 2018)

## 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. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 20040618)
10. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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）。

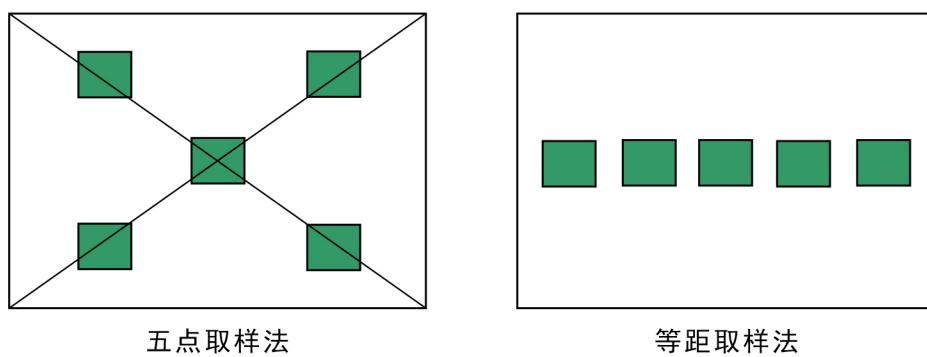


图 2. 五点取样法和等距取样法示意图

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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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. 将收集的根系样本分装至无菌采样袋中并做好标记，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 *et al.*, 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 120 rpm/min，室温下震荡 20 min (Beckers *et al.*, 2016; Beckers *et al.*, 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。

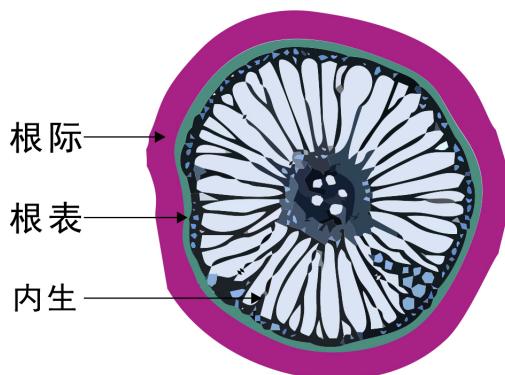


图 3. 根际、根表和内生示意图 (图片引自 Edwards 等, 2015)

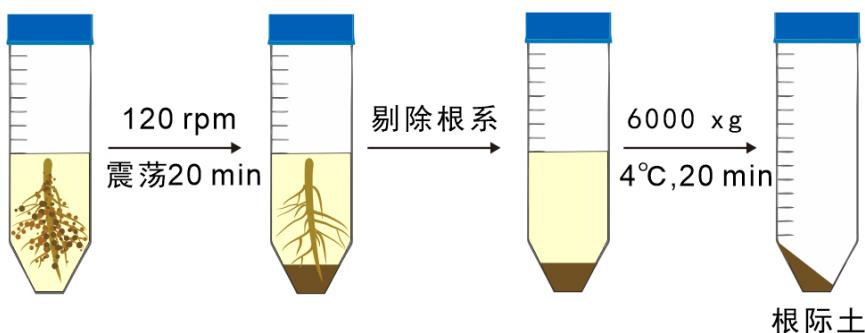


图 4. 根际土分离流程

#### 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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种提取方法比较](#). *林业科学* 54(9): 169-176.
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,中国林业科学研究院).
3. 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](#). *Plant Soil* 373(1-2): 269-283.
4. 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](#). *New Phytol* 180(3): 673-683.
5. Lacercat-Didier, L., Berthelot, C., Foulon, J., Errard, A., Martino, E., Chalot, M. and Blaudet, D. (2016). [New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance](#). *Mycorrhiza* 26(7): 657-671.
6. Mulia, R. and Dupraz, C. (2006). [Unusual fine root distributions of two deciduous tree species in southern France: What consequences for modelling of tree root dynamics?](#) *Plant and Soil* 281(1-2): 71-85.
7. Norby, R. J., and Jackson, R. B. (2000). [Root dynamics and global change: seeking an ecosystem perspective](#). *New Phytol* 147(1): 3-12.
8. 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](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(8): E911-E920.
9. 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.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(8): 2312-2317.
10. 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.](#) *Microbiome* 5(1): 25.