Interreg Italia–Österreich

Co-funded by the European Union

CEDRIC

# BEST PRACTICE 1

# Probenahme des Wurzelsystems im Feld

Autorenschaft: ICGEB und ERSA

Im Rahmen des CEDRIC-Projekts wurden Wurzelproben von Gerste gesammelt, aus denen die für weitere molekulare Analysen verwendete Rhizosphäre isoliert wurde. Die Feldprobennahme bot eine Gelegenheit, die Sammelmethode anzuwenden und weiter zu verfeinern; diese wird nachfolgend ausführlich beschrieben, zum Nutzen aller Interessierten.

### 1) Vorbereitung des Materials

- **Werkzeuge:** sterilisierte Schaufel, Markierungsstäbe, Pinzetten, sterile Handschuhe, sterile Beutel oder Behälter (z. B. Röhrchen, Gefrierbeutel), Reinigungspapier, denaturierter Alkohol, Abfallbeutel, Kühlbehälter (mit Eis oder Kühlakkus) oder flüssiger Stickstoff (falls erforderlich).
- **Beschriftung:** robuste Etiketten vorbereiten, wasserfeste Marker, Notizblock für Aufzeichnungen.
- **Sterilität:** alle Werkzeuge müssen vor der Probenahme sterilisiert werden (autoklaviert oder mit 70 % Ethanol desinfiziert).

### 2) Vorbereitung der Entnahmestelle

- Vermeiden Sie es, Proben entlang der Feldränder oder in Bereichen zu entnehmen, die atypische Merkmale aufweisen und nicht repräsentativ für die gesamte Untersuchungsfläche sind.
- Wenn eine große Menge an Material gesammelt werden muss, markieren Sie das Probenahmegebiet mit Pflöcken oder anderen gut sichtbaren Markierungen.
- Wählen Sie mehrere Probenahmepunkte aus, die gleichmäßig über das gesamte Untersuchungsfeld verteilt sind, um eine umfassende Abdeckung zu gewährleisten.
- Legen Sie im Voraus die geeignete Tiefe für die Entnahme von Wurzeln und Boden fest und halten Sie diese für alle Proben konstant.

**Box 1. Das Wurzelmikrobiom: ein komplexes Ökosystem, das es zu erforschen gilt**

**Pflanzen** leben nicht isoliert im Boden, sondern stehen in ständigem Austausch mit komplexen **mikrobiellen Gemeinschaften**, zu denen **Bakterien, Pilze, Viren** sowie weitere **Mikro- und Makroorganismen** gehören. All diese Organismen können einen erheblichen Einfluss auf den Boden sowie auf die **Physiologie** und **Gesundheit** der Pflanzen ausüben. Einige sind pathogen und verursachen Krankheiten, während andere nützlich sind: Sie fördern das Pflanzenwachstum, verbessern die Nährstoffaufnahme und erhöhen die Toleranz gegenüber Umweltstress. Neben diesen Extremen gibt es auch „kommensale“ Bakterien, die keine unmittelbar positiven oder negativen Effekte auf die Pflanze ausüben, aber dennoch das Gleichgewicht und die Dynamik der **mikrobiellen Gemeinschaft** im **Boden** und an der **Wurzeloberfläche** beeinflussen können.

Aus diesen Gründen hat die wissenschaftliche Gemeinschaft ein wachsendes Interesse an der Untersuchung des mit den Wurzeln assoziierten Mikrobioms entwickelt – insbesondere in der **Rhizosphäre** (dem Bodenbereich, der direkt von den Wurzelexsudaten beeinflusst wird) und der **Rhizoplane** (der Oberfläche der Wurzeln selbst). Die Analyse dieser mikrobiellen Gemeinschaften ist jedoch dadurch erschwert, dass ein großer Teil der vorhandenen Mikroorganismen mit konventionellen Methoden im Labor nicht kultivierbar ist. Die Schwierigkeiten ergeben sich aus ihrem langsamen Wachstum, der Notwendigkeit spezifischer Umweltbedingungen oder ihrer Abhängigkeit von Wechselwirkungen mit anderen Mikroorganismen.

Um diese Einschränkungen zu überwinden, nutzen Forschende leistungsfähige DNA-Sequenzierungstechnologien, die eine direkte Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften *in situ* ermöglichen, ohne sie kultivieren zu müssen. Solche metagenomischen Ansätze bieten einen umfassenderen und präziseren Einblick in die

mikrobielle Vielfalt sowie in die potenziellen Funktionen dieser Organismen im Kontext des Wurzelökosystems.

### 3) Extraktion, erste Reinigung und Konservierung der Wurzelprobe

Während der Probenahme ist es entscheidend, strenge Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen einzuhalten: Tragen Sie stets mit denaturiertem Alkohol desinfizierte Handschuhe und wechseln Sie diese zwischen den einzelnen Proben. Sterilisieren Sie alle Werkzeuge mit denaturiertem Alkohol und reinigen Sie sie gründlich zwischen jeder Probe.

**Box 2. Probentiefe: eine durch die Studienziele geleitete Wahl**

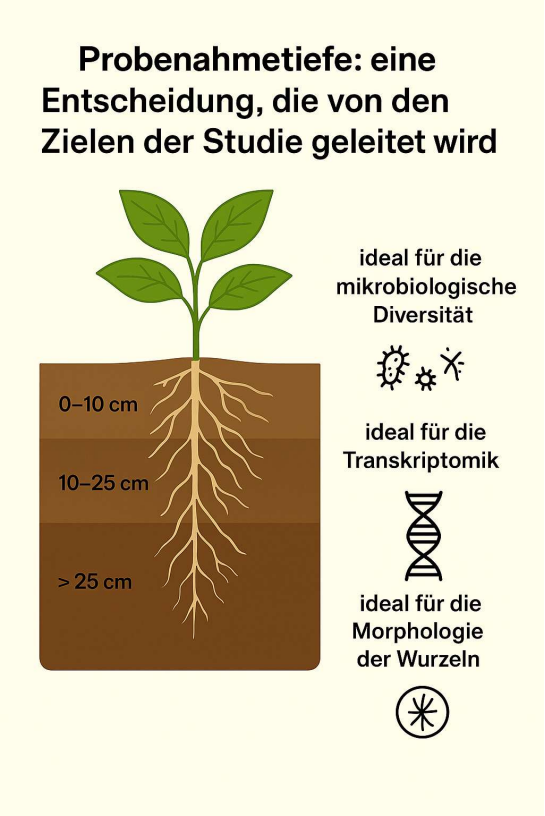
Die **Probentiefe** muss an die **spezifischen Ziele der Studie** angepasst werden, wie zum Beispiel die Untersuchung der **Wurzelmorphologie**, die **Metagenomik**, die **Transkriptomik**, die **Isolierung neuer Mikroorganismen** oder andere Forschungsansätze.

Im Fall morphologischer Studien hängt die Probentiefe von der jeweiligen Pflanzenart und der Struktur ihres Wurzelsystems ab.

Für Untersuchungen zur mikrobiellen Biodiversität empfiehlt es sich hingegen, sich auf eine Tiefe zwischen 0 und 25 cm zu konzentrieren, da dort in der Regel der Großteil der mit den Wurzeln assoziierten mikrobiellen Aktivität stattfindet.

Für **Studien zur Pflanzenphysiologie** und Transkriptomik ist es dagegen vorzuziehen, den Bereich zu beproben, in dem die größte Entwicklung **feiner Wurzeln** stattfindet, da diese eine hohe metabolische Aktivität aufweisen und den Hauptort der Interaktion mit dem Mikrobiom darstellen.

- Mit sauberen Handschuhen und einer sterilisierten Schaufel vorsichtig um die Pflanze herum graben und das zu beprobende Material entnehmen.
- Überschüssige Erde durch vorsichtiges Schütteln des Probenmaterials entfernen, wobei etwa 2 mm Boden an den Wurzeln haften bleiben sollen. Falls nötig, kann mit einem Gummihammer leicht an die Basis der Pflanze geklopft werden, um das Ablösen überschüssiger Erde zu erleichtern. Sollte die verbleibende Bodenschicht deutlich dicker oder dünner als die angegebenen 2 mm sein, ist deren Dicke zu dokumentieren.
- Die entnommene Probe muss in saubere Beutel (z. B. Lebensmittel- oder Gefrierbeutel) oder in Röhrchen mit geeignetem Volumen (2, 10, 15 oder 50 ml) gegeben werden. Jede Probe muss mit einem eindeutigen Code gekennzeichnet werden, der ihre Identifizierung gewährleistet.




**Box 3. Wie viel beproben? Strategien zur Gewinnung von repräsentativem Wurzelmaterial**

Wenn die **Probenentnahme konservativ erfolgen muss** und die Pflanze überleben soll, sollte **nur die minimale Menge an Wurzelmaterial** entnommen werden, die für die Analysen notwendig ist. Dabei ist darauf zu achten, das Material aus mehreren Bereichen rund um die Pflanze zu sammeln und auch

**Feinwurzeln** einzubeziehen, da diese metabolisch aktiver sind.

Für die **morphologische** oder **architektonische Untersuchung** der Wurzeln sollte der gesamte Wurzelballen mit einer Schaufel entnommen werden, wobei die Integrität des Wurzelsystems gewahrt bleiben muss. Das Graben sollte in einem ausreichenden Abstand vom Wurzelhals beginnen, um Schäden an den Hauptwurzeln zu vermeiden. Der Boden ist schichtweise vorsichtig zu entfernen, sodass das Wurzelsystem freigelegt wird, ohne Wurzeln zu brechen oder zu verformen. Die Entnahme sollte **langsam und äußerst sorgfältig** erfolgen, ohne ruckartige Bewegungen, die die Feinwurzeln beschädigen könnten. Wenn möglich, sollte das gesamte Wurzelsystem gesammelt und die **Reinigung ins Labor verlegt werden**, wo sie unter kontrollierteren Bedingungen durchgeführt werden kann.

Für Studien zur Analyse der mit den **Wurzeln assoziierten mikrobiellen Biodiversität** oder für transkriptomische Untersuchungen wird empfohlen, **mindestens 500 mg frische Wurzeln** zu sammeln, vorzugsweise solche, die die aktivsten und am stärksten kolonisierten Abschnitte (z. B. Feinwurzeln) enthalten.

Für die Isolierung von Mikroorganismen gelten in der Regel 3–10 Gramm Boden/Rhizosphäre pro Probe als ausreichend. Nach einer gründlichen Homogenisierung kann die Probe seriellen Verdünnungen und anschließender Ausplattierung unterzogen werden. Es wird außerdem empfohlen, Proben aus mehreren Entnahmestellen zu sammeln, da dies im Fall ähnlicher Mikrobenarten die Wahrscheinlichkeit verringert, mehrere Klone desselben Stammes zu isolieren.

- Es ist entscheidend, die Probe feucht zu halten: Zu diesem Zweck können beim Verstauen einige Milliliter physiologische Lösung, PBS (NaCl 0,137 M, KCl 0,0027 M, $Na_2HPO_4$ 0,01 M, $KH_2PO_4$ 0,0018 M) oder eine andere geeignete Lösung hinzugefügt werden.

- Für Proben, die für molekulare Analysen bestimmt sind, wird empfohlen, das Material sofort in Trockeneis oder flüssigem Stickstoff einzufrieren, wobei ausschließlich dafür geeignete Röhrchen zu verwenden sind, die diesen Bedingungen standhalten. Falls dieses Verfahren im Feld nicht möglich ist, kann eine vorübergehende Lagerung in einem gekühlten Behälter oder einer Styroporbox mit Eis oder Kühlelementen erfolgen, was eine wirksame Alternative darstellt, um die Qualität der Probe zu erhalten. In diesem Fall kann auch der Einsatz einer Soil Preservation Solution hilfreich sein, um die Zersetzung zu verhindern und den biologischen sowie molekularen Zustand der Probe in situ zu bewahren.

- Für Proben, die zur Isolation von Mikroorganismen oder für morphologische bzw. architektonische Untersuchungen der Wurzeln bestimmt sind, reicht ein gekühlter Behälter oder eine Styroporbox mit Eis oder Kühlelementen aus. Dabei ist wichtig, dass das Kühlmaterial nicht in direkten Kontakt mit der Probe kommt, sondern ausreichend isoliert ist, um Schäden durch Einfrieren oder übermäßige direkte Abkühlung zu vermeiden.

- Die Anzahl der zu entnehmenden Proben variiert je nach den Zielen der Probenahme:
    - Für molekulare Studien wie Metagenomik und Transkriptomik sind mindestens 3–5 biologische Replikate von unterschiedlichen Pflanzen pro Behandlung oder Bedingung unerlässlich. Ein Umfang von 5–10 biologischen Replikaten gewährleistet jedoch eine solidere statistische Aussagekraft.
    - Für Studien zur Morphologie und Architektur der Wurzeln gewährleistet eine Anzahl von 5–10 biologischen Replikaten eine gute Repräsentativität der untersuchten Population oder Behandlung. Eine Probenahme von mehr als 20 Wurzeln verleiht den erhobenen Daten zusätzliche Robustheit.

- Die im Feld gesammelten und bis zur Ankunft im Labor gekühlt aufbewahrten Proben können unmittelbar nach der Reinigungsphase verarbeitet werden.
  Der erforderliche Reinigungsgrad hängt von den spezifischen Zielen der Studie ab:

- Für Studien zur Wurzelarchitektur und -morphologie können die Proben sorgfältig mit sterilem Wasser gereinigt werden, um Erdreste zu entfernen, ohne die Strukturen zu beschädigen,
- Für Studien zur Endosphäre ist eine gründliche Reinigung gefolgt von einer Oberflächensterilisation erforderlich, um äußere Kontaminationen zu beseitigen.
- Dieselbe Vorgehensweise gilt für Proben, die für physiologische oder transkriptomische Analysen vorgesehen sind, bei denen es entscheidend ist, das Vorhandensein exogener Kontaminanten auf ein Minimum zu reduzieren.
- Für Untersuchungen der Rhizosphäre müssen die Proben so behandelt werden, dass das rhizosphärische Kompartiment erhalten bleibt und nicht während der Reinigung entfernt wird.

- Nach der Reinigung können die Proben sofort verarbeitet werden oder:

  - **feucht bei 4 °C gelagert** werden für morphologische und architektonische Untersuchungen der Wurzeln,
  - **in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C aufbewahrt werden** für molekulare Analysen,
  - **mit Glycerin kombiniert (Endkonzentration 21 %)** und bei **–80 °C gelagert werden**, wenn sie zur Isolation von Mikroorganismen (Bakterien) verwendet werden sollen, oder bei 4 °C, wenn Pilze isoliert werden sollen, was in jedem Fall innerhalb von 48–72 Stunden erfolgen muss.

**Box 4. Wie viele Replikate werden benötigt? Biologische vs. technische**

Um statistisch aussagekräftige Daten zu erhalten, ist es entscheidend, eine **ausreichende Anzahl von Replikaten** durchzuführen. Die benötigte Anzahl hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der natürlichen Variabilität des untersuchten Systems, den Forschungszielen, der Art der anzuwendenden statistischen Analyse und den verfügbaren Ressourcen. Die Replikate, die den Ergebnissen Signifikanz verleihen, sind in erster Linie die biologischen Replikate.

Biologische Replikate sind unabhängige Proben, die von unterschiedlichen biologischen Einheiten stammen, wie Pflanzen, Tieren oder verschiedenen Individuen. Ihr Zweck ist es, die natürliche biologische Variabilität zwischen verschiedenen Probanden oder unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zu erfassen. Zum Beispiel entsprechen in einer Studie zum Wurzelmikrobiom die biologischen Replikate Wurzeln, die von unterschiedlichen Pflanzen gesammelt wurden, die unter ähnlichen oder verschiedenen Bedingungen wachsen, abhängig vom Versuchsdesign. Diese Replikate sind entscheidend, da sie es ermöglichen, die Ergebnisse auf die gesamte Population zu übertragen und zuverlässige statistische Analysen durchzuführen, um die Auswirkungen von Behandlungen oder realen biologischen Bedingungen zu bewerten.

**Technische Replikate** hingegen bestehen aus Wiederholungen desselben biologischen Samples. Sie dienen dazu, die durch experimentelle oder laborbedingte Prozesse eingeführte Variabilität zu messen, wie z. B. DNA- oder RNA-Extraktion, PCR, Bibliotheksvorbereitung für Sequenzierungen oder instrumentelle Messungen. In Mikrobiomstudien kann man beispielsweise die DNA-Extraktion von einer einzelnen Wurzel mehrfach durchführen oder mehrere PCR-Reaktionen mit demselben Extrakt ausführen. Technische Replikate sind wichtig, um die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der technischen Daten sicherzustellen, erhöhen jedoch nicht die biologische Repräsentativität der Untersuchung.

**Metadaten und Bohrproben**

Bei Feldproben ist die sorgfältige Erfassung von Metadaten entscheidend, um Rückverfolgbarkeit, Zuverlässigkeit und wissenschaftliche Gültigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Der erste Schritt besteht darin, eine ausreichende Menge Boden zu entnehmen, die im Labor oder bei

einer spezialisierten Einrichtung für eine chemisch-physikalische Analyse der Probe verwendet werden kann.
Der Boden kann entweder durch Bohren oder mit einer Schaufel entnommen werden, wobei die beim Wurzelprobenahme verwendete Grabtiefe eingehalten werden sollte.

Anschließend müssen die Metadaten gesammelt werden, also alle Informationen, die beschreiben, wer, was, wo, wann, wie und mit welchen Besonderheiten die Probenahme durchgeführt wurde.

Es ist daher wichtig, Folgendes zu dokumentieren:

- Name der durchführenden Person
- Die beprobte Pflanzenart
- Geografische Koordinaten des Feldes
- Bodenbedingungen (trocken, feucht, überschwemmt, etc.)
- Saison und aktuelle sowie kürzliche Wetterbedingungen
- Angewandte landwirtschaftliche Praktiken (z. B. Bodenbearbeitung, Bewässerung)
- Zuletzt durchgeführte Behandlungen (z. B. Dünger, Pflanzenschutzmittel) mit Angabe des Datums
- Alle weiteren relevanten Beobachtungen, die für die Ziele des Projekts nützlich sein könnten

Weitere Informationen:

Simmons, T., Caddell, D.F., Deng, S., Coleman-Derr, D. Exploring the Root Microbiome: Extracting Bacterial Community Data from the
Soil, Rhizosphere, and Root Endosphere. J. Vis. Exp. (135), e57561, doi:10.3791/57561 (2018).

Roey Angel 2020. Field sampling of root-associated microbes for DNA/RNA extraction. protocols.io; https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.vd5e286