

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (6) :772 - 779; 4 June 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140509

## 基于非培养和培养的方法比较花生根瘤菌遗传多样性

陈静瑜<sup>1</sup>, 冯翊果<sup>1</sup>, 吴燕玲<sup>1</sup>, 孟祥飞<sup>2</sup>, 胡美娟<sup>1</sup>, 陈文峰<sup>2</sup>, 谷峻<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 516031

<sup>2</sup>中国农业大学生物学院, 北京 100094

**摘要:** 【目的】比较非培养和培养方法揭示的花生根瘤菌遗传多样性差异, 以期建立慢生根瘤菌快速检测占瘤率技术。【方法】采用经典分离培养技术获得花生根瘤菌和非培养方法直接从根瘤中收获类菌体分别提取 DNA 后, 比较分析 BOX-PCR 指纹图谱, 根据多样性指数评价基于非培养和培养方法的 BOX-PCR 指纹图谱技术揭示花生根瘤菌遗传多样性的差异。【结果】基于非培养方法检测的花生根瘤类菌体为 81.8%, 获得 85 种遗传群; 基于培养方法分离花生根瘤菌菌株为 72.7%, 获得 71 种遗传群; 两种方法共同检测到 17 种 BOX-PCR 遗传图谱相一致。根据多样性指数基于非培养方法反映不同地区花生根瘤菌遗传多样性结果较一致, 基于培养方法反映各地区的花生根瘤菌遗传多样性结果存在明显差异。【结论】基于非培养方法检测根瘤类菌体的遗传多样性, 能够更快速、真实反映不同土壤花生根瘤中的优势遗传群, 快速地统计根瘤菌菌株占瘤率; 与培养方法相结合有利于获得花生根瘤菌竞争结瘤能力强的土著菌株, 从而为筛选高效根瘤菌菌株奠定基础。

**关键词:** 花生慢生根瘤菌, 遗传多样性, 非培养和培养的方法, BOX-PCR

**中图分类号:** Q939      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 06-0772-08

花生 (*Arachis hypogaea*) 属于豆科落花生属, 是世界上种植面积最大的油料作物, 由于营养丰富而在食品、饲料等领域有着广泛的用途。目前, 中国花生的产量和种植面积分别居世界第一和第二。与其他作物相比, 花生抗旱耐瘠、适应性强, 相同生产条件下, 种植花生肥料用量少, 比较效益高, 还可以改良土壤、增加后茬。国内外学者对花生根瘤菌资源研究发现, 与花生共生的根瘤菌以慢生根瘤菌属的 8 个种群为主<sup>[1-8]</sup>。仅在阿根廷等少数地区分离到根瘤菌属的菌株<sup>[9-10]</sup>。最近, 阿根廷研究者发现在田间同一株花生植株上所有根瘤的分离物具有高度

的遗传多样性, 未发现遗传型明显占优势的根瘤菌菌株, 从而提出针对花生品种筛选高效菌株时, 既要考察其共生有效性即根瘤的固氮效率, 也一定要注意考察菌株的占瘤率即根际竞争结瘤能力<sup>[11]</sup>。

BOX-PCR 指纹图谱分析技术是根据 BOX 插入因子设计引物, 扩增微生物基因组 DNA 的重复性片段, 因其操作简单快捷, 容易获得较为丰富的扩增条带, 被广泛应用于田间高效根瘤菌菌株的筛选及根瘤菌接种剂田间跟踪实验<sup>[12-14]</sup>。由于慢生根瘤菌与其他属种的根瘤菌相比, 在纯培养中代时长, 生长缓慢, 16S rDNA 基因序列在不同种间变异很小等特

**基金项目:** 教育部留学回国人员科研启动基金 (310587); 国家自然科学基金青年基金 (31000002); 华南师范大学研究生科研创新基金

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-85210024; E-mail: gujun@snu.edu.cn

**作者简介:** 陈静瑜 (1990 -), 女, 硕士研究生, 主要从事根瘤菌应用基础研究。

**收稿日期:** 2014-10-22; **修回日期:** 2014-12-11

点,因此分类研究一直滞后。最近,国外学者在研究大豆慢生根瘤菌菌株田间接种大豆后占瘤率分析时,率先采用了非培养的方法,直接提取类菌体制备模板后进行多位点基因扩增、测序及序列分析,避免了分离纯化培养慢生根瘤菌耗时长等不利因素<sup>[15]</sup>。为了建立起更快速、高效检测慢生根瘤菌占瘤率的技术平台,本研究选取花生根瘤为研究材料分别利用非培养的方法收获类菌体和常规培养的方法分离获得根瘤菌菌株,并与 BOX-PCR 技术结合比较分析花生根瘤菌遗传多样性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 花生根瘤及花生根瘤菌:**花生根瘤来自广东省花生主产区的花生种植土壤,采用土壤捕捉法收获根瘤后,分别采集根瘤收获类菌体和分离花生根瘤菌,具体方法参见文献 [16]。平均每种土壤分别采集 3-5 株花生植株上的根瘤 30-40 个用于根瘤类菌体提取,同时采集根瘤 30 个用于菌株分离。实验中的所有花生根瘤均用 70% 乙醇处理 30-50 s 后,浸于 15% 次氯酸钠溶液中表面消毒 7-10 min,灭菌水洗 5-7 次,再用于类菌体的制备和花生根瘤菌的分离。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**PCR 试剂购于大连宝生物公司广州分公司。PCR 扩增仪为美国 BioRad 产品。本研究使用的引物由北京六合华大基因科技股份有限公司广州分公司合成。用于 BOX-PCR 的引物 BOXAIR:5'-CTACGGCAAGCGCAGCTGACG-3'。

### 1.2 BOX-PCR 指纹图谱分析

花生根瘤中类菌体收获和 DNA 模板制备参见文献 [15]。花生根瘤菌菌株总 DNA 提取和 PCR 扩增,具体步骤见文献 [17],按照类菌体 DNA 模板制备的方法收集花生根瘤最后一次水洗的余液,并进行 BOX-PCR 扩增,作为阴性对照。电泳及图谱分析见文献 [18]。电泳结束后,在凝胶成像仪中扫描凝胶,将指纹图谱用 TIFF 文件保存。根据获得的 BOX-PCR 指纹图谱,选取代表性的遗传型再次电泳后,利用 GelcomparII (version 3.5) 分析软件,采用平均连锁法 (UPGMA) 聚类,最后得到花生根瘤菌类菌体和花生根瘤菌菌株的聚类树状图。

### 1.3 多样性指数计算

根据 BOX-PCR 指纹图谱分析结果,将不同的指纹图谱类型记为一种遗传型。按照文献 [19-20] 分别计算和评价不同地区花生根瘤及花生根瘤菌菌株的遗传多样性。计算的多样性指数主要包括:Simpson 指数 (D): $D = 1 - \sum P_i^2$ <sup>[21]</sup>, $P_i$  表示遗传型为 i 的类菌体或根瘤菌菌株所占的比例; Shannon-Wiener 指数 (H): $H = - \sum P_i \ln P_i$ <sup>[22]</sup>; 和 Pielou 均匀度指数 (E): $E = H/H_{max}$ ,  $H_{max} = \ln S$ <sup>[23]</sup>,S 表示不同土壤中的花生根瘤类菌体或根瘤菌菌株产生遗传型的总数,H 为丰富度指数。

## 2 结果

### 2.1 花生根瘤类菌体及其根瘤菌菌株的 BOX-PCR 指纹图谱比较分析

本实验中采用非培养方法对获得的 10 个不同花生种植土壤中 380 个花生根瘤类菌体进行了 BOX-PCR 指纹图谱,共获得 311 个花生根瘤类菌体的 BOX-PCR 指纹图,检测成功率为 81.8%。在 15% 的相似水平上这些 BOX-PCR 指纹图谱有 85 种遗传型(见图 1-A)。采用分离培养方法从收集的 300 个花生根瘤中共分离获得花生根瘤菌 218 株,培养率为 72.7%,明显低于非培养的方法。在 62% 的相似水平上,培养菌株的 BOX-PCR 指纹图谱聚类为 71 种遗传型(见图 1-B)。两种方法获得的 BOX-PCR 指纹图谱中,采用非培养方法获得花生根瘤类菌体的 17 种遗传型包括 198 个指纹图谱与采用培养方法获得的花生根瘤菌菌株的指纹图谱相对应,约占检测类菌体遗传类型和指纹图谱总量的 20% 和 63.7%。花生根瘤菌菌株中这 17 种遗传型包括 163 个指纹图谱,约占 29.6% 的遗传型和 74.8% 的指纹图谱。由此可见,非培养的方法揭示的花生根瘤菌遗传多样性更大;两种方法获得的优势遗传型多数相同,即通常采用常规的分选方法能够获得花生根瘤中的优势遗传群。例如,分离自珠海土壤中的花生根瘤类菌体和花生根瘤菌菌株具有明显的优势遗传群,分离的菌株中有 25 株花生根瘤菌具有一致的 BOX-PCR 指纹图谱,相应花生根瘤类菌体有 28 个 BOX-PCR 指纹图谱一致,并且两种方法得到的优势遗传群的 BOX-PCR 指纹图谱一致。但是也有例外,在梅

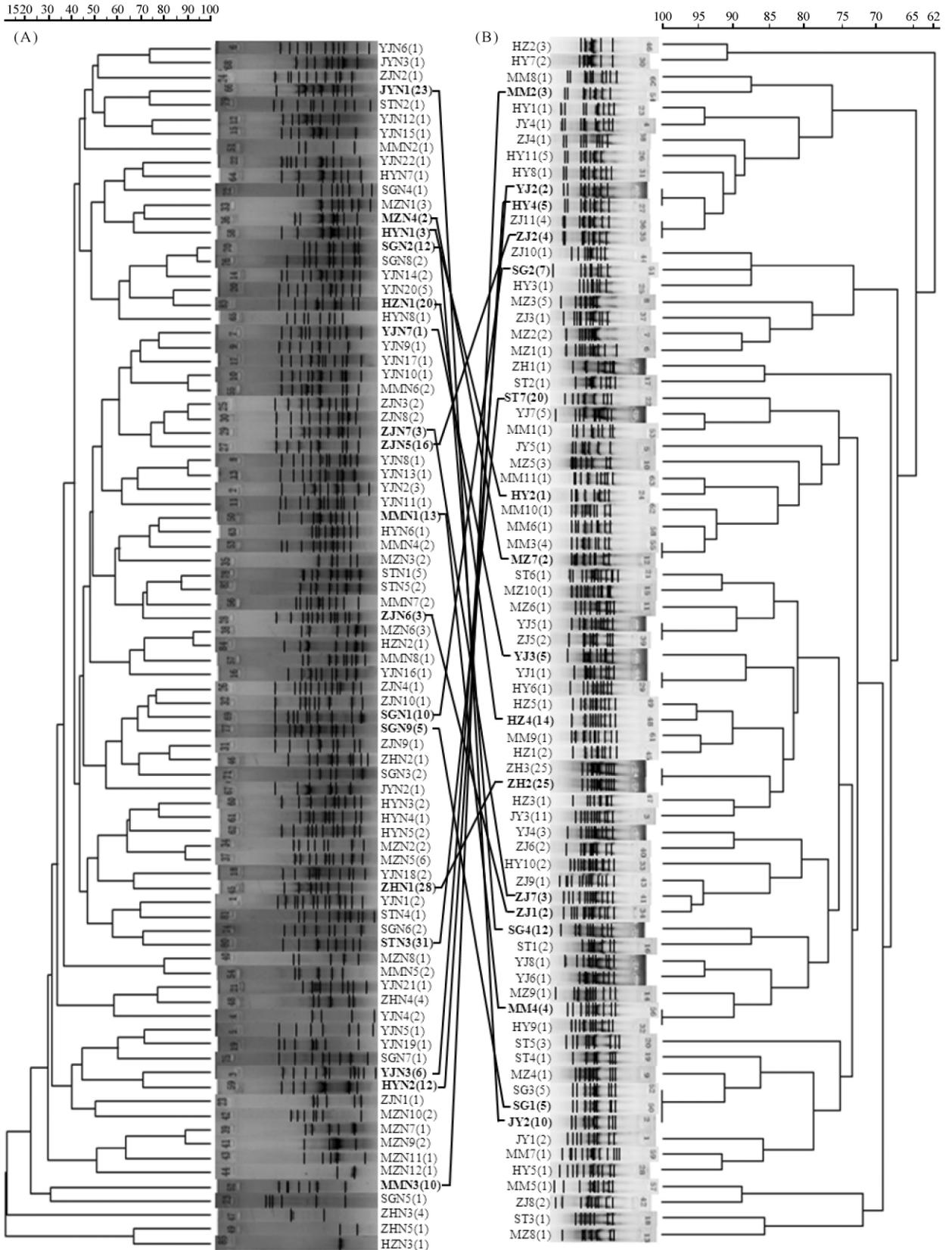


图 1. 花生根瘤类菌体 (A) 和根瘤菌菌株 (B) BOX-PCR 聚类分析图

Figure 1. The dendrogram of BOX-PCR for peanut bacterioids (A) and isolates (B).

州土壤中收获的花生根瘤类菌体得到 26 个 BOX-PCR 指纹图,分属于 12 个遗传型;而获得其花生根瘤菌菌株 18 株产生 10 种不同遗传型;均存在丰富的多样性,没有明显的优势遗传群,因此采用非培养和培养的方法进行比较分析时,仅有 1 种非优势的遗传类群相互对应;在阳江土壤中收获的花生根瘤类菌体得到 37 个 BOX-PCR 指纹图,分属于 22 个遗传型;相应的获得阳江花生根瘤菌 19 株分布于 8 个遗传群中;两种方法反映出阳江花生根瘤菌遗传多样性较大,没有十分明显的优势遗传群,仅有 2 个遗传群相互对应。

## 2.2 基于非培养和培养方法比较花生根瘤菌的遗传多样性

采用非培养的方法计算不同土壤中花生根瘤类菌体的遗传多样性指数(表 1),3 种不同多样性指数反映各土壤中花生根瘤菌类菌体的遗传多样性结果比较一致;其中阳江、梅州和韶关土壤中收获的花生根瘤类菌体遗传多样性更高,其均匀度指数(Pielou index)、优势度指数(Simpson index)和多样性指数(Shannon-wiener index)分列前 3 位;而来自揭阳和惠州的土壤中收获的花生根瘤类菌体遗传多样性较低,其均匀度指数(Pielou index)、优势度指数(Simpson index)和多样性指数(Shannon-wiener index)分列后 2 位。

表 1. 花生根瘤类菌体多样性指数计算结果(非培养方法)

Table 1. The diversity index of bacteroids in peanut nodules (Independent-cultured method)

Sample origin	No. of nodules	Genotypes of BOX-PCR	Pielou index	Simpson index	Shannon-wiener index
Zhuhai (珠海)	38	5	0.5533	0.4335	0.8904
Huizhou (惠州)	22	3	0.3347	0.1694	0.3677
Shaoguan (韶关)	36	9	0.8085	0.7809	1.777
Meizhou (梅州)	26	12	0.9354	0.8846	2.324
Jieyang (揭阳)	25	3	0.1870	0.1504	0.2055
Heyuan (河源)	23	8	0.7575	0.6881	1.575
Shantou (汕头)	40	5	0.4919	0.38	0.7917
Zhanjiang (湛江)	31	10	0.7387	0.7014	1.701
Yangjiang (阳江)	37	22	0.9265	0.9262	2.864
Maoming (茂名)	33	8	0.7792	0.7365	1.620

计算培养方法获得的不同土壤中花生根瘤菌菌株的遗传多样性指数(表 2),3 种不同多样性指数反映各土壤中花生根瘤菌菌株的遗传多样性结果不同;湛江、茂名和梅州土壤根瘤分离到花生根瘤菌菌株的遗传多样性更高,其均匀度指数(Pielou index)、

优势度指数(Simpson index)和多样性指数(Shannon-wiener index)均列前 3 位;珠海土壤花生根瘤分离得到花生根瘤菌菌株遗传多样性最低,具有明显的优势遗传群。

表 2 花生根瘤菌菌株多样性指数计算结果(培养方法)

Table 2. The diversity index of strains from peanut nodules (Dependent-cultured method)

Sample origin	No. of isolates	Genotypes of BOX-PCR	Pielou index	Simpson index	Shannon-wiener index
Zhuhai (珠海)	26	2	0.2352	0.07396	0.163
Huizhou (惠州)	21	5	0.6599	0.5215	1.062
Shaoguan (韶关)	25	3	0.9403	0.6215	1.033
Meizhou (梅州)	18	10	0.9146	0.8519	2.106
Jieyang (揭阳)	26	5	0.7326	0.6642	1.179
Heyuan (河源)	16	10	0.9103	0.8438	2.096
Shantou (汕头)	29	7	0.5858	0.5042	1.140
Zhanjiang (湛江)	19	10	0.9498	0.8754	2.187
Yangjiang (阳江)	19	8	0.8901	0.8144	1.851
Maoming (茂名)	19	11	0.9121	0.8643	2.187

根据多样性指数计算结果(表 1 和 2),比较非培养和培养的方法反映出的花生根瘤菌的遗传多样性,结果表明,两种方法揭示的花生根瘤菌遗传多样性存在明显差异。来自韶关土壤中的花生根瘤菌类菌体的遗传多样性较大,收获的 36 个类菌体 BOX-PCR 指纹图谱中产生 9 种不同的遗传型;而采用培养方法得到花生根瘤菌菌株的结果看,虽然其均匀度指数较高,但是其 Simpson 指数和 Shannon-wiener 指数均偏低,得到的 25 株花生根瘤菌中产生 3 种遗传型。此外,来自珠海土壤中的花生根瘤菌类菌体的遗传多样性也与花生根瘤菌菌株的遗传多样性存在明显不同。

### 3 讨论

非培养技术是一项不依赖于传统微生物培养的生物技术,它伴随着分子生态学技术广泛深入地应用于不同环境中的微生物群落研究而迅速发展起来。自 1888 年荷兰学者 Beijerinck 首次获得根瘤菌的纯培养物以来,全世界各国学者采用培养的方法对与不同豆科植物共生的根瘤菌资源进行了深入研究,并期望使用根瘤菌剂代替化学氮肥接种大豆、菜豆、花生等豆科经济作物。近年来,随着不同地区根瘤菌资源及共生机理的深入研究,发现根瘤菌与豆科植物的共生关系因其所处的区域地理环境不同而具有多样性,并且豆科植物根瘤菌接种剂的筛选和应用必须考虑菌株对当地环境的适应能力<sup>[24]</sup>。与此同时,在筛选根瘤菌高效菌株时发现不同根瘤菌菌株与不同品种的豆科植物匹配性存在差异<sup>[12,14]</sup>。采用传统微生物培养技术分离根瘤菌菌株后,结合运用各种分子生物学分析技术,如:基于基因组水平指纹图谱分析(BOX-PCR、AFLP 等)、基于特殊基因扩增片段酶切图谱和序列的多态性分析及多位点基因序列分析等可以揭示根瘤菌不同种属或菌株之间的遗传多样性。然而在分离纯化根瘤菌过程中存在人为的选择,并且对于生长速度缓慢的慢生根瘤菌其根瘤的分离物通常需要培养 7-10d,再经过 1-2 轮的纯化后至少需要 14d。如果采用非培养方法直接从表面消毒的根瘤中提取类菌体后制备 DNA 模板并与 BOX-PCR 等技术结合,大大缩短了研究周期,节省了分离纯化的时间,有利于在短时间内大量、快速检测根瘤菌的占瘤率。因此,在筛选高效根

瘤菌菌株作为接种剂、或对高效根瘤菌菌株、根瘤菌剂进行田间接种实验时,直接采用非培养的方法与 BOX-PCR 技术结合显然可以快速、真实地反映根瘤菌菌株的占瘤率,从而更客观地评价其竞争结瘤能力。

细菌基因组中广泛存在着许多短的重复序列,分布于染色体基因间隔区,含有多个拷贝,长度小于 200 bp 如 REP (Repetitive Extragenic Palindromic, 基因外重复回文序列<sup>[25]</sup>、ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, 肠杆菌基因间重复共有序列<sup>[26]</sup>、BOX<sup>[27]</sup>等。rep-PCR 指纹图型具有菌株专一性,Svenning 等利用 ERIC-PCR 指纹图谱研究了田间接种后 3 株 *R. leguminosarum* biovar *trifolii* 与白三叶草的竞争结瘤能力,ERIC-PCR 指纹图谱能够区分接种的 3 株菌<sup>[28]</sup>。因此,rep-PCR 指纹图谱是研究根瘤菌遗传多样性、菌株鉴定等十分重要的技术。其中 BOX-PCR 技术用于根瘤菌的菌株遗传分型研究中,与 ERIC-PCR、REP-PCR 相比具有重复性更强的优点,因此被更广泛地应用于田间高效根瘤菌菌株的筛选及根瘤菌接种剂田间跟踪实验。RAPD 技术因其对菌株具有更高的区分度也被推荐用于根瘤菌菌株的遗传分型<sup>[29]</sup>,其中经筛选发现 M13 引物可很好的区分慢生根瘤菌菌株<sup>[30,31]</sup>。本研究中,以花生根瘤经表面消毒后的最后一次水洗物为阴性对照,分别采用 BOX-PCR 和以 M13 为引物的 RAPD 技术,结果前者并未扩增出相应条带,而以 M13 为引物、最后一次水洗物为阴性对照的模板则扩增出明亮的条带。由此可见,运用 BOX-PCR 技术直接以根瘤中的类菌体 DNA 为模板统计占瘤率是可信的,可以更有效地排除根瘤外其他杂菌干扰。但是当根瘤中存在内生细菌或者根瘤被 2 个不同根瘤菌菌株侵染时,则采用非培养的方法统计占瘤率会出现偏差,因此将非培养的方法和培养的方法有机结合可以降低这种误差。此外,在收获根瘤菌类菌体制备 DNA 模板时要注意及时除去植物组织碎片,因植物组织中的多酚类物质会影响 PCR 扩增,导致 BOX-PCR 的扩增结果受到抑制。

生物多样性指数是应用数理统计方法求得表示生物群落的种类和数量的数值,用以评价环境质量,一直以来被广泛用于各种生态环境中植物、动物等生物多样性的评价。近年来,生物多样性指数被引入到基于培养的方法揭示根瘤菌种群内和种属间多

样性研究中, 用来评价分离自不同自然环境中同一种宿主豆科植物或同一生境中不同宿主豆科植物的根瘤菌菌株的丰富度和优势度<sup>[19,32]</sup>。本研究率先采用非培养方法和培养方法与 BOX-PCR 技术结合, 揭示花生根瘤菌的遗传多样性, 结果发现不同自然环境中的花生根瘤菌遗传多样性差异明显, 在种植花生多年的土壤中多数区域已形成优势的遗传群, 仅少数地区没有发现优势的遗传群。将非培养和培养的方法结合能够更全面的反映花生根瘤菌的遗传多样性, 既快速的统计了自然条件下不同地理区域花生根瘤菌菌株的占瘤率, 又明确了不同地理区域中土著花生根瘤菌优势遗传群, 为进一步筛选高效花生根瘤菌菌株提供了强有力的指导。

## 参考文献

- [1] El-Akhal MR, Rincón A, Arenal F, Lucas MM, Mourabit NE, Barrijal S, Pueyo JJ. Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial isolates obtained from nodules of *Arachis hypogaea* in northwestern Morocco. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40 (11) : 2911-2914.
- [2] Muñoz V, Ibañez F, Tonelli ML, Valetti L, Anzuay MS. Phenotypic and phylogenetic characterization of native peanut *Bradyrhizobium* isolates obtained from Córdoba, Argentina. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34 (6) : 446-452.
- [3] Nkot LN, Krasova-Wade T, Etoa FX, Sylla SN, Nwaga D. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in diverse land use systems of humid forest zone in Cameroon. *Applied Soil Ecology*, 2008, 40 (3) : 411-416.
- [4] Taurian T, Fernando I, Fabra A, Aguilar OM. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in Central Argentinean Soils. *Plant and Soil*, 2006, 282 (1) : 41-52.
- [5] Wang R, ChangYL, Zheng WT, Zhang D, Zhang XX, Sui XH, Wang ET, Hu JQ, Zhang LY, Chen WX. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36 (2) : 101-105.
- [6] Yang J, Zhou J. Diversity, phylogeny and host specificity of soybean and peanut bradyrhizobia. *Biology and Fertility of Soils*, 2008, 44 (6) : 843-851.
- [7] Yang JK, Xie FL, Zou J, Zhou Q, Zhou J. Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37 (1) : 141-153.
- [8] Chen Q, Zhang X, Terefevork Z, Kaijalainen S, Li D, Lindström K. Diversity and compatibility of peanut (*Arachis hypogaea* L.) bradyrhizobia and their host plants. *Plant and Soil*, 2003, 255 (2) : 605-617.
- [9] Ibáñez F, Tania T, Jorge A, Maria LT, Adriana F. Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts *Rhizobium giardinii* and *Rhizobium tropici* isolated from peanut nodules in Central Argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40 (2) : 537-539.
- [10] Taurian T, Aguilar M, Fabra A. Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from native soil population in Córdoba, Argentina. *Symbiosis*, 2002, 33 (1) : 59-72.
- [11] Angelini J, Ibáñez F, Taurian T, Tonelli ML, Valetti L, Fabra A. A study on the prevalence of bacteria that occupy nodules within single peanut plants. *Current Microbiology*, 2011, 62 (6) : 1752-1759.
- [12] Jia RZ, Gu J, Tian CF, Man CX, Wang ET, Chen WX. Screening of high effective alfalfa rhizobial strains with a comprehensive protocol. *Annals of Microbiology*, 2008, 58 (4) : 731-739.
- [13] Xiao M, Liu X, Liu G, Dai Y, Guo Z, Guo X, Wei S. Study on competitive nodulation ability of *Rhizobia* in symbiosis with reseeded *Medicago sativa* in field test by using BOX-PCR molecular marker method. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2011, 26 (1) : 187-191. (in Chinese)
- 肖猛, 刘晓云, 刘桂霞, 戴燕燕, 郭振国, 郭晓叶, 魏爽. BOX-PCR 分子标记对补播紫花苜蓿共生根瘤菌田间竞争结瘤能力的研究. 华北农学报, 2011, 26 (1) : 187-191.
- [14] Jia RZ, Wang ET, Liu JH, Li Y, Gu J, Yuan HL, Chen WX. Effectiveness of different *Ensifer meliloti* strain-alfalfa cultivar combinations and their influence on nodulation of native rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 57 (6) : 960-963.
- [15] van Berkum P, Elia P, Song Q, Eardly BD. Development and application of a multilocus sequence analysis method for the identification of genotypes within genus *Bradyrhizobium* and for establishing nodule occupancy of soybean (*Glycine max* L. Merr). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25 (3) : 321-330.
- [16] Vincent JM. A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria. London: Blackwell Scientific Publications, Oxford, Edinburgh. 1970: 23-30.

- [17] Gao JL, Terefework Z, Chen WX, Lindstrom K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91 (2-3) :155-168.
- [18] Gu J, Chen W. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia associated with *Glycyrrhiza* spp. Grown in northern regions of China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39 (7) :1321-1327. (in Chinese)  
谷峻, 陈文新. 中国北方地区甘草根瘤菌表型及遗传多样性研究. 中国农业科学, 2006, 39 (7) :1321-1327.
- [19] Sotelo M, Irisarri P, Lorite MJ, Casaretto E, Rebuffo M, Sanjuán J, Monza J. Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 2011, 49 (1) : 197-207.
- [20] Palmer KM, Young JP. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, 66 (6) : 2445-2450.
- [21] Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature*, 1949, 163 (4148) : 688.
- [22] Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 1948, 27 (3) : 379-423.
- [23] Pielou EC. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 1966, 13: 131-144.
- [24] Chen W, Wang E, Chen W. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37 (1) : 81-86. (in Chinese)  
陈文新, 汪恩涛, 陈文峰. 根瘤菌-豆科植物共生多样性与地理环境的关系. 中国农业科学, 2004, 37 (1) : 81-86.
- [25] Gilson E, Climent JM, Brutlag D, Hofnung M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequence in *E. coli*. *The EMBO Journal*, 1984, 3 (6) : 1417-1421.
- [26] Hulton CSJ, Higgins DF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 1991, 5 (4) : 825-834.
- [27] Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20 (13) : 3479-3483.
- [28] Svenning MM, Gudmundsson J, Fagerli IL, Leinonen P. Competition for Nodule Occupancy Between Introduced Strains of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *trifolii* and its Influence on Plant Production. *Annals of Botany*, 2001, 88 (4) : 781-787.
- [29] McInnes A, Thies JE, Abbott LK, Howieson JG. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36 (8) : 1295-1308.
- [30] Rivas R, Peix A, Mateos PF, Trujillo ME, Martínez-Molina E, Velázquez E. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant and Soil*, 2006, 287 (1) : 23-33.
- [31] Duran D, Rey L, Navarro CSA, Imperial J, Ruiz-Argüeso T. Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36 (2) : 128-136.
- [32] Yang W, Kong Z, Chen W, Wei G. Genetic diversity and symbiotic evolution of rhizobia from root nodules of *Coronilla varia*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36 (1) : 49-55.

# Genetic diversity of peanut bradyrhizobia estimated by culture-independent vs. culture-dependent approaches

Jingyu Chen<sup>1</sup>, Yiguo Feng<sup>1</sup>, Yanling Wu<sup>1</sup>, Xiangfei Meng<sup>2</sup>, Meijuan Hu<sup>1</sup>,  
Wenfeng Chen<sup>2</sup>, Jun Gu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 516031, Guangdong Province, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory for Agro-Biotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China

**Abstract:** [Objective] To develop a rapid technique for estimating the percentage of bradyrhizobial nodule occupancy, we compared the differences of genetic diversity of peanut bradyrhizobia with culture-independent and culture-dependent methods. [Methods] We used the traditional media plate technique for isolation of peanut bradyrhizobia and directly collected the bacteroids from peanut nodules. The BOX-PCR fingerprintings were compared after amplification with the DNAs of peanut bradyrhizobial isolates by culture-dependent approach and bacteroids by culture-independent approach. [Results] The percentage of testing for peanut bacteroids was 81.8% with culture-independent method, and 85 genotypes of BOX-PCR were obtained. The percentage of isolation for peanut bradyrhizobia strains was 72.7% and 71 genotypes of BOX-PCR were produced. There were totally 17 corresponding BOX-PCR genotypes obtained by both methods. [Conclusion] The culture independent method for direct analysis of genetic diversity from bacteroids in nodules can much more rapidly and clearly find the dominant genetic groups in different soil samples and fast figure out the percent of the rhizobia nodule occupancy.

**Keywords:** peanut bradyrhizobia, genetic diversity, culture-independent vs. culture-dependent approaches, BOX-PCR

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the SRF for ROCS, SEM (310587) and by the National Natural Science Foundation for Young Researchers of China (31000002)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-85210024; E-mail: gujun@senu.edu.cn

Received: 22 October 2014/ Revised: 11 December 2014