

用 rep-PCR 技术研究中国花生根瘤菌的多样性*

李 俊 徐玲玫 樊 蕙 李 力 葛 诚

(中国农业科学院土壤肥料研究所农业部植物营养重点实验室 北京 100081)

杨苏声

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

摘 要 采用细菌基因组重复序列 PCR 技术(简称 rep-PCR)中常用的 REP-PCR 和 ERIC-PCR,对从中国 11 个省、市的 23 个点、24 个花生品种采集的根瘤中分离的 59 株花生根瘤菌 *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*)进行多样性研究,同时对来自国外的 6 株花生根瘤菌及 14 株参比慢生根瘤菌也进行了比较。得到的低相似性结果表明中国花生根瘤菌基因组存在显著的多样性。REP-PCR 揭示,在相似性 50% 上分为 11 个群,而 ERIC-PCR 却得到 24 个分群。这两种结果对菌株的分群有差异,暗示这两种短重复序列在慢生根瘤菌基因组中的分布的不同。没有发现菌株间基因组的多样性分布与花生品种、地理来源之间的必然联系。将两者电泳图谱结合并分析,得到介于上述两者间的结果。此结果进一步反映了菌株基因组间存在的多样性。同时还表明 rep-PCR 不仅是研究生物多样性的快速简便方法,还可应用于菌株的鉴别和生态学研究。

关键词 rep-PCR, 花生根瘤菌, 多样性

分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209 (1999) 04-0296-04

花生(*Arachis hypogaea* L)在我国已有五百多年的栽培历史并已成为主要的油料作物之一。花生在我国分布广泛,除宁夏外都有种植。对它的共生体——花生根瘤菌 *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*)虽有不少的研究^[1-4],但研究对象多是从某一区域中分离的花生根瘤菌,而对我国这一分布广泛的根瘤菌资源多样性研究尚未见文献报道。随着生物技术和生物多样性重要性的认识,近年来生物多样性研究已成为热点之一,且取得了许多进展。根瘤菌多样性的广泛研究已导致几个新种的发现和对根瘤菌及其共生体系有了更深的认识^[5-8]。

近几年基于 PCR 的多种新技术已广泛应用于根瘤菌遗传多样性的分析,尤其是 rep-PCR 技术的出现和使用,使得生物多样性研究快速、易做。它是利用细菌基因组中广泛分布的短重复序列(repetitive sequences)为引物的靶序列进行 PCR 扩增,通过电泳条带比较分析,揭示基因组间存在的差异。目前在细菌的基因组中已发现存在 10 种以上可用于基因指纹分析鉴定的短重复序列^[9],而用于根瘤菌多样性研究最多的是 REP(Repetitive Extragenic Palindromic, 基因外重复回文因子)和 ERIC(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, 肠杆菌基因间重复一致序列)二种重复序列。它们存在菌株、种、属水平

* 欧盟合作项目(ERBIC18CT960103)“中国根瘤菌多样性及其在持续农业中的意义”的部分工作
参加本工作的还有本组曹凤明同志

收稿日期:1998-04-27,修回日期:1999-02-01

的分布差异及进化过程中的相对保守性^[9]。本研究采用 REP-PCR 和 ERIC-PCR 对我国广泛分布的花生根瘤菌代表菌株进行分析研究,以探讨我国这一重要资源的基因组的多样性背景,为将来进一步研究、应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及其培养:从我国 11 个省、市的 23 个点、24 个花生品种的根瘤中分离的花生根瘤菌 59 株、选用的国外花生根瘤菌 6 株及其它慢生根瘤菌参比菌株 14 株详列于表 1。分离的花生根瘤菌都经过二次以上的纯化及原寄主品种回接确认。所有菌株均用常规 YEM 培养基培养。

1.1.2 DNA 的提取:按文献[11]中的方法提取细菌的总 DNA,并用已知浓度的 λ -DNA 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳估测所提取的 DNA 浓度,使用前调至 50 pmol 备用。

1.1.3 引物及 DNA 聚合酶:所用的 REP 和 ERIC 的双引物序列^[9,10]见表 2,由芬兰赫尔辛基大学合成并提供使用。用于 PCR 扩增反应的 DNA 聚合酶为芬兰生物制品公司生产的 Dynazyme。

表 1 供试菌株和 rep-PCR 指纹图谱分群一览表

Table 1 Strains used and clusters of rep-PCR fingerprints

菌株 Strain	寄主及品种 Host plant	分离地或来源 ¹ Origin or source	rep-PCR 指纹图谱分群 ² Cluster of rep-PCR fingerprints with primers		
			REP	ERIC	REP+ERIC
花生根瘤菌 <i>B. sp. (Arachis)</i>					
2502	花生 87-77 品种	湖北,沙洋	A1	U1	N1
2524	花生中花 2 号品种	湖北,武昌	A2	B	N2
2547	花生中花 4 号品种	湖北,武昌	C1	T1	H1
2550	花生中花 4 号品种	湖北,武昌	C2	S1	H2
2553	花生鲁花 9 号品种	山西,临猗	D1	S2	O1
2562	花生鲁花 9 号品种	山西,临猗	D2	S3	O2
2567	花生鲁花 9 号品种	山西,临猗	D3	S2	O3
2571	花生海花 2 号品种	山西,临猗	I1	S4	T1
2576	花生海花 2 号品种	山西,太原	I2	S5	T2
2584	花生晋花 1 号品种	山西,汾阳	I3	S6	T3
2642	花生吕花 1 号品种	吉林,松原	A3	T2	L1
2644	花生吕花 1 号品种	吉林,松原	A4	T3	L2
2651	花生粤油 79 品种	广东,广州	E1	L1	P1
2652	花生粤油 79 品种	广东,广州	E2	L1	P2
2654	花生粤油 169 品种	广东,广州	G1	K1	J1
2655	花生粤油 169 品种	广东,广州	G2	A1	R1
2659	花生粤油 59 品种	广东,东莞	F	K2	E
2661	花生粤油 169 品种	广东,东莞	A5	S7	O4
2663	花生粤油 169 品种	广东,东莞	A6	P1	Q1
2664	花生粤油 59 品种	广东,东莞	A7	Q1	A1
2667	花生粤油 59 品种	广东,东莞	A8	Q2	A2
2669	花生粤油 59 品种	广东,东莞	A9	R1	L3

续表 1

菌株 Strain	寄主及品种 Host plant	分离地或来源 ¹ Origin or source	rep-PCR 指纹图谱分群 ² Cluster of rep-PCR fingerprints with primers		
			REP	ERIC	REP + ERIC
2672	花生企石 1 号品种	广东, 东莞	A10	Q3	R
2679	花生企石 2 号品种	广东, 东莞	A11	P2	Q2
2682	花生企石 2 号品种	广东, 东莞	A12	P3	Q3
2685	花生粤油 5 号品种	江西, 上饶	A13	I	C
2688	花生粤油 5 号品种	江西, 南昌	A14	S8	L4
2689	花生粤油 5 号品种	江西, 南昌	A14	S8	L4
2692	花生地方品种	江西, 南昌	A15	S9	L5
2695	花生地方品种	江西, 南昌	K1	R2	V1
2697	花生冀油 2 号品种	河北, 卢龙	K2	S10	U1
2698	花生 95-5029 品种	湖南, 长沙	H1	S11	O5
2706	花生湘花 4 号品种	湖南, 长沙	H2	Q4	K
2710	花生湘花 4 号品种	湖南, 长沙	K3	R3	V2
2714	花生长沙土子品种	湖南, 长沙	G3	D	R2
2717	花生海花 1 号品种	山东, 泰安	K4	S12	U2
2721	花生海花 1 号品种	山东, 泰安	B1	T4	F1
2724	花生大白沙品种	山东, 泰安	A16	G1	G1
2726	花生大白沙品种	山东, 泰安	A17	X	L6
2728	花生小白沙品种	山东, 泰安	A18	M1	D
2730	花生小白沙品种	山东, 泰安	B2	U2	F2
2735	花生小白沙品种	山东, 泰安	A19	G2	G2
2737	花生冀油 2 号品种	北京, 平谷	C3	S13	H3
2739	花生冀油 2 号品种	北京, 平谷	B3	U3	F3
2741	花生海花 1 号品种	陕西, 南郑	A20	H	L7
2742	花生海花 1 号品种	陕西, 南郑	A21	S14	L8
2746	花生海花 1 号品种	陕西, 南郑	A22	R4	L9
2749	花生海花 1 号品种	山东, 郓城	D4	S15	O6
2752	花生海花 1 号品种	山东, 郓城	A23	S16	L10
2753	花生 8130 品种	山东, 即墨	D5	S17	O7
2755	花生 8130 品种	山东, 即墨	A24	S18	O8
2764	花生 8130 品种	山东, 即墨	K5	S19	U3
2769	花生 8130 品种	山东, 即墨	A25	S20	O9
2774	花生冀油 3 号品种	河北, 旺县	A26	T5	L11
Spr1-2	花生天府 3 号品种	四川, 梅山	A27	U4	L12
Spr4-5	花生地方品种	四川, 雅安	K6	C	I
Spr7-10	花生天府 3 号	四川, 南充	A28	F1	M1
009	花生品种	IOC(CAAS)	A29	F2	M2
147-3	花生品种	IOC(CAAS)	A30	A2	L13
MAR253	原始山马蝗 <i>Desmodium barbatum</i>	Zimbabwe	A31	U5	L14
MAR411	花生品种	Zimbabwe	A32	K3	L15
MAR1510	非洲硬皮豆 <i>Macrotyloma africanum</i>	Zimbabwe	A33	V	L16
MAR1600	龙爪豆 <i>Vigna unguiculata</i>	Zimbabwe	A34	M2	L17
283A	花生品种	Israel	J1	N	L18
NC92	花生品种	Bolivia	A35	W	S

续表 1

菌株 Strain	寄主及品种 Host plant	分离地或来源 ¹ Origin or source	rep-PCR 指纹图谱分群 ² Cluster of rep-PCR fingerprints with primers		
			REP	ERIC	REP + ERIC
参比菌株 Reference strains					
HAMBI1132	扇富牧草 <i>Ornithopus compressus</i>	NZP	A36	S21	L19
HAMBI1133	树状羽扇豆 <i>Lupinus arboreus</i>	NZP	A37	M3	L20
HAMBI1136	狭叶羽扇豆 <i>Lupinus angustifolius</i>	ATCC	A38	S22	L21
HAMBI1157	富牧草 <i>Ornithopus sativa</i>	NZP	A39	M4	L22
HAMBI1662	锰香思树 <i>Acacia mangium</i>	Thailand	A40	L2	L23
HAMBI1732	锰香思树 <i>Acacia mangium</i>	Thailand	A41	K4	L24
HAMBI2121	硬百脉根 <i>Lotus pedunculatus</i>	Australia	A42	M5	L25
USDA4362	田皂角 <i>Aeschynomene</i>	USDA	J2	L3	J2
<i>B. japonicum</i>					
USDA110	大豆 <i>Glycine max</i>	USDA	A43	K5	L26
ATCC10324	大豆 <i>Glycine max</i>	USDA	A44	E	L27
USDA135	大豆 <i>Glycine max</i>	USDA	A45	O	L28
<i>B. elkanii</i>					
USDA76	大豆 <i>Glycine max</i>	USDA	A46	J	L29
<i>B. liaoningense</i>					
2060	大豆 <i>Glycine max</i>	SFI(CAAS)	J3	K6	J3
2281	大豆 <i>Glycine max</i>	SFI(CAAS)	J4	K7	J4

注:1. IOC(CAAS), 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉; SFI(CAAS), 中国农业科学院上肥研究所; Spr, 四川花生根瘤菌; ATCC, 美国模式菌株保中心; USDA, 美国农业部; NZP, 新西兰北吧尔梅生菌保中心; MAR, 津巴布韦马龙德拉土壤肥力研究室; HAMBI, 芬兰赫尔辛基大学应用化学和微生物系菌保中心。

2. 在 50% 相似性上的分群, 分别用英文字母 A 至 K 标识, 数字标明每一群中的包含的菌株数目。

Note: 1. IOC(CAAS), Institute of Oil Crop, Chinese Academy of Agricultural Science, Wuhan; SFI(CAAS), Soils and Fertilizers Institute, CAAS; Spr Sichuan peanut rhizobia; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md.; USDA, United States Department of Agriculture, Beltsville, Md.; NZP, Culture collection of the Department for Science and Industrial Research, Applied Biochemistry Division, Palmerston North, New Zealand; MAR, Soil Productivity Research Laboratory, Marondera, Zimbabwe; HAMBI, Culture Collection at the Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finland.

2. The cluster divided at the similarity of 50% and each cluster was designated one capital letter and the number of strain(s).

表 2 采用的 PCR 扩增引物

Table 2 Oligonucleotides used as PCR primers

引物 Primer	5'~3' 核苷酸序列 ¹ 5'~3' nucleotide sequence	参考文献 Reference
REP 1R-1	IIIICGICGICATCIGGC	9, 10
REP 2-1	ICGICTTATCIGGCCTAC	
ERIC 1R-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA	9, 10
ERIC 2-1	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCC	

¹序列符号缩写: A, 腺嘌呤; G, 鸟嘌呤; C, 胞嘧啶; T, 胸腺嘧啶; I, 次黄苷。

Abbreviations: A = Adenine; G = Guanine; C = cytosine; T = Thymine; I = Inosine.

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增:所有的 PCR 扩增反应都在 PTC-200 型(基因公司生产)扩增仪上进行。按文献[11]加入 PCR 各组份,总反应体积为 $25\mu\text{L}$,进行 30 个 PCR 循环。对 REP-PCR 扩增,除初始循环中的变性温度 95°C 、6 min 和最后循环中的延伸温度 65°C 、16 min 外,每一循环的程序为 94°C 变性 1 min, 40°C 复性 1 min, 65°C 延伸 8 min。对 ERIC-PCR 扩增,除初始循环中的变性温度 95°C 、7 min 和循环中复性温度为 50°C 外,其余过程同 REP-PCR 扩增程序。扩增循环结束后,取 $8\mu\text{L}$ PCR 产物进行予电泳检查以检查扩增效果。

1.2.2 rep-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳:配制 1.5% 琼脂糖凝胶,置中型水平电泳槽中,以 $1\times\text{TAE}$ (Tris-乙酸)为电泳缓冲液,加样后用 60V 低压电泳 4 h 左右。用限制性内切酶 Sin I 充分酶切的 λ -DNA 的消化产物作 DNA 分子大小迁移的标记。由于本研究选用的菌株多,需分析比较多块胶上的电泳结果,因而尽可能使每块胶上的分子标记电泳距离(位置)一致,操作中以加样缓冲液中的二种染料的迁移距离为控制标准。电泳结束后,将胶浸泡溴化乙锭溶液中染色 30 min。

1.2.3 rep-PCR 电泳结果分析:将电泳结果在紫外光线下用专用软件扫描存入计算机。用 Gel Compar 软件(4.0 版,比利时应用数学研究所设计)分析电泳结果,采用平均连锁法(UPGMA)绘出聚类树状图,并进行菌株的分群。

2 结果

用 REP 和 ERIC 分别作为引物的 PCR 产物电泳出现多条带谱,其分子大小范围在 0.3~7.0 kb 之间(图 1)。所比较的菌株在 50% 相似性的分群结果列于表 1,根据 REP-

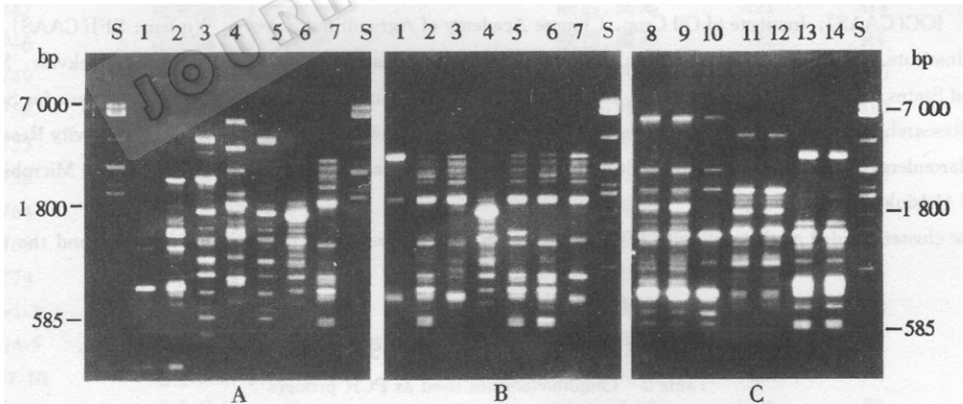


图 1 花生根瘤菌基因组的 ERIC-PCR(A、C)和 REP-PCR(B)电泳图谱(其中部分菌株选作分析比较)

S: 标准参照 DNA(Sin I 酶切 λ -DNA); A 和 B. 1:2656;2:2657;3:2658;4:2659;5:2660;6:2661;7:2662; C. 8:2685;9:2685;10:2686; 11:2688;12:2688;13:2692;14:2692.

Fig.1 ERIC(A,C) and REP (B) fingerprint patterns of genomic DNA from *B. sp.* (*Arachis*) strains

Lanes: S: lambda DNA digested with Sin I; 1:2656;2:2657;3:2658;4:2659;5:2660;6:2661;7:2662; 8:2685;9:2685;10:2686; 11:2688;12:2688;13:2692;14:2692.

PCR 电泳指纹图谱绘制的树状图(图 2)。得到的结果都表明中国花生根瘤菌基因组间存

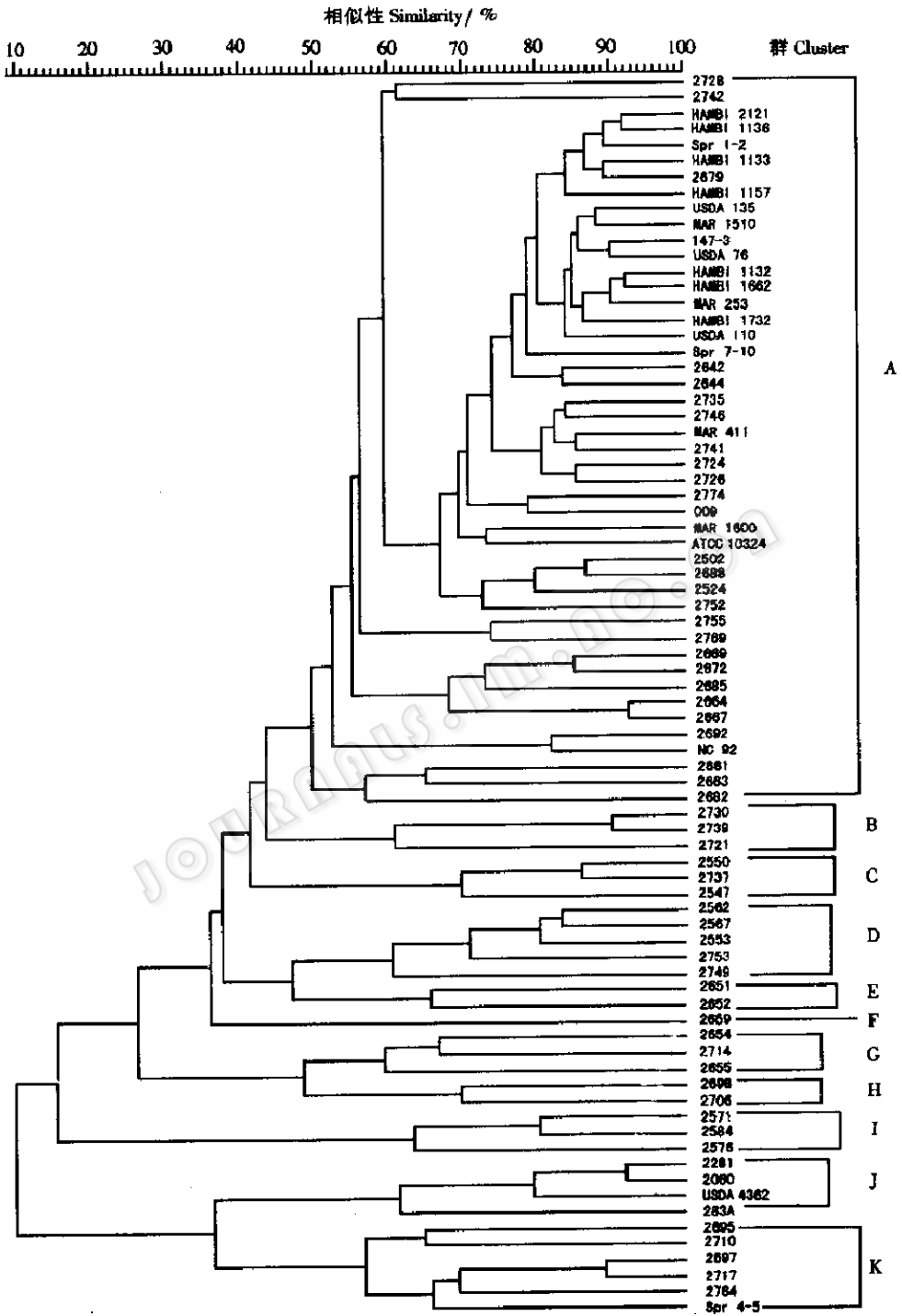


图 2 采用平均连锁法构建的 REP-PCR 结果树状图(在 50% 相似性上进行分群)

Fig. 2 UPGMA dendrogram generated from the REP fingerprints (the cluster divided at the similarity of 50%)

在的显著多样性。未发现菌根据 REP-PCR 电泳指纹图谱绘制株间基因组的多样性分布与花生品种、地理来源之间的必然联系。

2.1 花生根瘤菌的 REP-PCR 结果分析

从图 2 树状图中看出,所用的 79 株慢生根瘤菌在相似性 11% 相聚。除 2688 和 2689 的电泳指纹图谱完全一致外,其余菌株都有各自的特征谱带。低的相似性暗示这些菌的基因组之间存在显著异质性。由于所得到的树状图相似性低,为便于分析及分群,用相似性 50% 作为界定线。在此相似性上可划分为 11 个群,其中群 A 为最大的一群,包括 47 个菌株(表 1),所比较的参比菌株除 *B. liaoningense* 2281 和 2060 及 *B. sp.* BTAi USDA 4362 外的 11 株也都在这一大群中,来自国外的花生根瘤菌除 283A 外也都分布于这一群中,而从中国分离的花生根瘤菌除 28 株属于群 A 外,还分布于另 10 群中。这表明中国花生根瘤菌基因组中的 REP 分布具有更多的复杂性。

2.2 花生根瘤菌的 ERIC-PCR 结果分析

与 REP-PCR 结果比较,所有菌株在 50% 相似性上的 ERIC-PCR 指纹图谱分为 24 群(表 1),且仅在 2% 的相似性上相聚(限于篇幅未给出其树状图);花生根瘤菌和参比菌株分别分布于 21 个、7 个群中。表明 ERIC 在这些慢生根瘤菌基因组中的分布比 REP 更为多样;且两者的结果对菌株的分群有差异,暗示这两种短重复序列在基因中的分布也不同。然而发现分别来自同一地点的三对菌株:2651 和 2652,2553 和 2567,2688 和 2689,两两之间的 ERIC 图谱一致。

为验证 rep-PCR 扩增的重复性,选择三个菌株(2685、2688、2692)进行二次 ERIC-PCR 扩增,结果(图 1-C)表明在反应体系组份、PCR 仪及扩增反应程序稳定的条件下,得到相同的电泳图谱,具有良好的重复性。

2.3 REP-PCR 和 ERIC-PCR 两种结果综合的分析

通过计算机将 REP-PCR 和 ERIC-PCR 电泳指纹图谱综合并进行分析,更能准确反映菌株间基因组中存在的差异^[11],所有菌株在相似性 50% 上得到 22 个分群(表 1),且在相似性 18% 上相聚(限于篇幅未给出其树状图),菌株的分群归属处于上述两种结果之间。

3 讨论

采用 rep-PCR 得出的中国花生根瘤菌基因组存在多样性的结论,与 Van Rossum 等^[12]用多相分析对来自津巴布韦能与花生有效结瘤的慢生根瘤菌及 E. Urtz 等^[13]用 *nif* 基因的 RFLP 分析及 DNA 杂交得出的结论一致。用 rep-PCR 分析 *Rhizobium meliloti*、*R. galegae* 和 *B. japonicum* 血清型 123 菌株的结果与其它方法的分析相吻合^[11,14,15]。本实验选择部分菌株进行二次 REP 和 ERIC 重复扩增,电泳结果表明它们具良好的重复性。由于这一技术具快速、简单、经济的优点,如不需要专一性的探针和 Southern 杂交,可用细胞悬浮液甚至无需用细菌纯培养进行 PCR 扩增^[10]。所以,用 rep-PCR 研究根瘤菌的多样性是一种科学有效可行的技术。此外,rep-PCR 具有菌株水平的特征电泳图谱使之可用于菌株的鉴定和生态学中的菌株原位及追踪研究。至于来自同一地点、同一品种的花生根瘤菌 2688 和 2689 具有相同 REP-PCR 和 ERIC-PCR 图谱,推测它们本来就

是由同一菌株侵染形成的两个根瘤中分离的。也正如 Judd 等^[15]所得出的 REP-PCR 和 ERIC-PCR 两者分析结果有差异一样,我们得到的结果也如此;De Bruijin 等^[14]分析 *Rhizobium meliloti* 时发现 ERIC-PCR 比 REP-PCR 具更高的分辨率,我们的分析结果也与之一致。虽然 rep-PCR 指纹分析已被证明可以反映出亲缘关系较近的菌株间基因组中存在差异,但却不一定能反映存在于质粒 DNA 上的差异^[16]。该技术的不足还在于 rep-PCR 的重复性相对稳定,它受多种因素的影响。不同来源的或不同批次的引物、扩增所用的 DNA 聚合酶及不同型号的 PCR 仪对复杂多带谱的 rep-PCR 结果都有一定影响,难以在不同实验室进行比较分析^[16],这也在一定程度上限制该技术的应用。尽管如此,在稳定的或标准化的实验条件下,仍然不失为一种对大量菌株进行快速有效分群及初步鉴定的手段。本文采用 rep-PCR 揭示出中国花生根瘤菌基因组存在显著多样性,对其多样性的根源进一步的研究,如进行 16S rRNA 和 23S rRNA 或这两个基因间隔区域(IGS)的测序或 RFLP 分析,将有助于揭开中国花生根瘤菌的起源、进化和系统发育关系,为更好利用这一资源提供科学依据。

致谢 本试验是在芬兰赫尔辛基大学 Lindstrom 教授实验室完成的,感谢她和 T. Zewdu 对本工作的指导和帮助;同时感谢四川农业大学的张小平教授和陈强老师提供了四川花生根瘤菌(Spr 系列)。

参 考 文 献

- [1] 张小平,陈 强,李登煜. 微生物学报,1996,36(3):227~233.
- [2] 周平贞,胡济生. 土壤学报,1990,27(4):353~359.
- [3] 朱光富,周俊初,陈华葵. 遗传学报,1996,23(2):131~141.
- [4] 艾云灿,曹燕珍. 华中农大学报,1991,10(2):169~176.
- [5] Martinez-Romero E, Segovia E L, Mercante F M *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1991,4(4):417~426.
- [6] Segovia L, Young J P W, Martinez-Romero E. *Int J Syst Bacteriol*, 1993,43(4):374~377.
- [7] Philippe D L, Willems A, Bruno P *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1994,44(4):715~733.
- [8] Jarvis B D W, van Berkum P, Chen W X *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1997,47(3):895~898.
- [9] Stone B B, Wietupski R M, Breton G L *et al.* *Cell*, 1984,37:1015~1026.
- [10] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. *Acids Res*, 1991,19:6823~6831.
- [11] Nick G, Lindstrom K. *System Appl Microbiol*, 1994,17:265~273.
- [12] Van Rossum D, Schuurmans F P, Gills M *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995,61:1559~1609.
- [13] Urtz E B, Elkan G H. *Can J Microbiol*, 1996,42:1121~1130.
- [14] De Bruijin F. *Appl Environ Microbiol*, 1992,58:2180~2187.
- [15] Judd A K, Schneider M, Sadowsky M J *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1993,59:1702~1708.
- [16] Laguerre G, Patrick M, Marie-Reine A *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1996,62(6):2029~2036.

GENETIC DIVERSITY AMONG CHINESE PEANUT RHIZOBIA BY rep-PCR ANALYSIS*

Li Jun Xu Lingmei Fan Hui Li Li Ge Cheng

(Key Laboratory of Plant Nutrition, Soil and Fertilizers Institute, CAAS, Beijing 100081)

Yang Susheng

(Department of Microbiology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Repetitive sequences (repetitive extragenic palindromic [REP], and enterobacterial repetitive intergenic consensus [ERIC]) with the polymerase chain reaction (PCR) were used to fingerprint pure DNA extracted from 79 bradyrhizobial strains. These strains included 59 peanut rhizobia [*Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*)] isolated from root nodules of 24 peanut (*Arachis hypogaea* L) cultivars from 23 sites in 11 provinces in China, 6 peanut rhizobial strains from other nations, and 14 reference strains of other bradyrhizobia. All the strains were clustered at the level of 11%, 2%, and 11, 24 clusters were obtained at the similarity of 50% with REP-PCR and ERIC-PCR fingerprints, respectively. The results showed that significant genomic diversity exists within the peanut rhizobia from China. Also they suggested that there are different distributions of REP and ERIC in genomic DNA of the peanut rhizobia. The combined results, REP plus ERIC data, were found between the both above. The genomic diversity seems not to correlate with their host and geographic origins. Our results supported this technique is a useful tool for genotypic characterization and identification of rhizobia as well as ecological studies.

Key words rep-PCR, *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*), Diversity

* The research was funded by the EC project, INCOFC contract n^o ERBIC 18CT960103.