

具有拮抗作用的水稻内生固氮菌的分离与鉴定

高玲玲 陈小龙 蒋涛 姜伟娜 黄琼

云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201

摘要 从采自云南禄丰县水稻品种楚梗 27 的根、茎、叶中分离内生固氮菌, 并测定其抑菌作用。用 YMA 无氮培养基分离获得 125 株具有潜在固氮作用的内生细菌, 对 125 株内生细菌进行固氮酶基因 *nifH* PCR 检测, 共有 15 株内生细菌扩增出固氮酶基因 *nifH* 片段, 确定其为内生固氮菌。水稻各部位的内生细菌菌群密度不同, 依次为: 根 > 叶 > 茎。通过对水稻白叶枯病、条斑病、稻瘟病、纹枯病和恶苗病等 5 种主要病害的抑菌试验, 筛选出对 5 种病原菌都有抑制作用的内生细菌 11 株; 其中同时具有固氮和抑菌作用的有 3 个菌株, 分别为 NR-18、NR-64 和 NR-79。经 16S rDNA 序列测定表明, NR-18 和 NR-79 为多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*), NR-64 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 均来自水稻根部。

关键词 水稻; 内生固氮菌; 拮抗作用; 多粘类芽孢杆菌; 枯草芽孢杆菌

中图分类号 S 182; Q 93-331 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0553-05

水稻作为世界主要粮食作物之一, 其产量及病害的防治越来越受到人们的重视。伴随化肥、农药的大量使用, 在满足作物高产防病的同时, 带来的土壤恶化和环境污染等问题已不容忽视。由于生物防治具有对人畜安全、不污染环境等优点而越来越受到人们的重视。

研究表明, 科研工作者对于生物防治策略研究很多, 而利用细菌防治病害是关注的焦点, 如利用植物外部环境中的拮抗细菌防治植物病害, Knox 等^[1]利用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 防治由立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、腐霉菌 (*Pythium* spp.)、镰刀菌 (*Fusarium* spp.) 等引起的病害, 取得较好的效果; 陈志谊等^[2]应用枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 916 菌株防治水稻纹枯病效果显著。但由于这些生防菌易受外界环境条件的影响, 防病效果不理想。随着研究的进一步深入, 人们发现植物体内存在大量对植物病害具有较好防治作用的内生细菌, 许多研究者已从棉花、玉米、小麦、油菜、马铃薯、辣椒、葡萄、胡麻、芭蕉等多种植物分离获得内生拮抗细菌, 这些内生拮抗细菌对许多植物病害具有较好的防治效果^[3-10]; 而且 Andrews 等^[9]证明由于植物

内生细菌可以系统地分布于植物组织内, 并且有足够的碳源和氮源, 还可以受到植物组织的保护, 比暴露于恶劣环境(强烈的日光, 紫外线、暴风雨等)的附生细菌具有更稳定的生存环境, 也易于发挥作用, 再者许多内生细菌具有固氮、促生及抗旱等生物功能, 具有很好的开发利用前景。

20 世纪 80 年代以来, 内生固氮菌由于在禾本科作物上具有固氮活性, 又能促进植物生长, 成为国内外研究的热点^[11]。固氮菌可有效地抑制不同的病菌引起的植物病害, Braun 等^[12]研究发现成团肠杆菌对丁香假单胞菌丁香致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) 引起的小麦粒疫病防治效果达 45%~74%。因此, 具有固氮作用的内生细菌能成为良好的生防菌。

水稻主要病害有白叶枯病、条斑病、稻瘟病等, 但是对于具有拮抗作用的水稻内生固氮菌的研究则较少, 如杨海莲等^[13]的研究发现具有固氮作用的水稻内生阴沟肠杆菌对水稻稻瘟病、纹枯病和白叶枯病均有一定的防治效果, 本研究试图从水稻中获得具有对水稻病害有拮抗作用的内生固氮菌, 以期为提高水稻产量及病害防治提供理论依据。

收稿日期: 2011-11-22

基金项目: 农业部公益性(农业)行业科研专项 (nyhyzx07-056)

高玲玲, 博士研究生。研究方向: 植物细菌病害及其生物防治。E-mail: gaolingling1717@sina.com

通讯作者: 黄琼, 教授。研究方向: 植物细菌病害。E-mail: huangqiong88hs@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 水稻内生固氮菌的分离

本试验材料取自云南省禄丰县科甲村分蘖期水稻,品种为楚梗 27。

分别取健康水稻的根、茎和叶,用蒸馏水将材料表面清洗干净。分别称取 1 g 根、茎、叶置于已灭菌的培养皿中,用 70% 的乙醇消毒 10 s,转入 0.1% HgCl₂ 5 min,灭菌水冲洗 3 次,然后用灭菌后的滤纸吸去多余水分。将最后一次洗涤液涂布于固体培养基,以检测消毒是否彻底。将表面消毒完全的根、茎、叶用无菌剪刀剪碎,置于无菌研钵中充分研磨,按比例稀释各悬液,将不同稀释度取 100 μL 涂布于 YMA 培养基平板上,30 °C 恒温培养。3~4 d 后挑取不同形态的菌落,在 YMA 平板上划线分离单菌落并保存备用。

分离及抑菌试验用到的培养基有:

YMA 培养基:甘露醇 10 g,酵母粉 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.20 g, NaCl 0.10 g, K₂HPO₄ 0.5 g, CaCl₂ 0.05 g,琼脂 17 g, ddH₂O 1 000 mL, pH 7.0;

NA 培养基:蔗糖 10 g,蛋白胨 5 g,牛肉浸膏 3 g, 酵母浸膏 1 g,琼脂 17 g, ddH₂O 1 000 mL, pH 7.0;

PDA 培养基:马铃薯 200 g,蔗糖 17 g,琼脂 18 g, ddH₂O 1 000 mL。

1.2 拮抗内生细菌的筛选

以水稻白叶枯病 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)、条斑病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)、稻瘟病 (*Pyricularia oryzae* Cav.)、纹枯病 [*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]、恶苗病 (*Fusarium moniliforme* Sheld.) 等 5 种主要病害的病原菌作为供试病原菌,5 种供试病原菌均为笔者所在实验室提供。

1) 采用抑菌圈法筛选病原细菌的拮抗内生细菌。将培养稀释好的病原细菌在 NA 平板上涂布均匀,把相同孔径灭菌单层滤纸片均匀摆放在 NA 平板上。培养好的供试细菌菌液取 5 μL 滴在滤纸片上,3 次重复,以浸润无菌水的滤纸片为对照。28 °C 培养 2~3 d 后,检查是否有抑菌带形成,记录结果。

2) 采用平板对峙培养方法筛选病原真菌的拮抗内生细菌。用打孔器在菌落边缘制取直径为 5 mm 的菌块,将菌丝面朝下接种于 PDA 平板的中央,28 °C 培养 2 d 后,在距病原菌 30 mm 处对称摆放相同孔径灭菌单层滤纸片,将培养好的供试细菌菌液

吸取 5 μL 到滤纸片上,每平板 4 株,3 个重复,以浸润无菌水的滤纸片为对照,继续培养 7 d,检查是否有抑菌圈形成,记录结果。

将有拮抗作用的菌株进行 1 次重复试验,并在观察记录结果时测量其抑菌带大小,抑菌效果好的菌株备份保存。

1.3 固氮酶结构基因 *nifH* 的 PCR 扩增

1) 模板的制备。参照 Ausubel^[14] 的方法提取内生细菌 DNA,待菌株培养至饱和状态时收集菌体,溶菌酶破壁,蛋白酶 K 处理,用酚/氯仿/异戊醇抽提,乙醇沉淀,最后溶解在 20 μL ddH₂O 中,储存于 -20 °C 冰箱中备用。

2) 固氮酶 *nifH* 基因扩增。参照丁延芹^[15] 的方法,采用 1 对兼并引物 Primer 1 (5'-GGCT-GCGATCCVAAGGCCGAYTCVACCCG-3') 和 Primer 2 (5'-CTGVGCCTTGTTYTCGCGGATS-GGCATGGC-3') 扩增 *nifH* 基因片段。反应体系为:20 μL 体系中含 ExTaq 酶 (TaKaRa) 1.0~1.5 U, 10×buffer 2 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.8 μL, 引物各 10 pmol, DNA 模板 10~50 ng, 用 ddH₂O 补足 20 μL。反应程序为:95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 1 min, 58 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环。反应完成后,72 °C 延伸 10 min。扩增完毕后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 内生拮抗固氮菌的鉴定

1) 生理生化试验。参照文献^[16] 对具有拮抗作用的水稻内生固氮菌进行生理生化特征试验。

2) 16S rDNA 基因片段序列测定。参照 Weisburg 等^[17] 的方法扩增细菌的 16S rDNA 片段。采用细菌通用引物 P0 (5'-GAGAGT TYG ATC CTG GCT CAG-3') 和 P6 (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'), 预期扩增片段大小为 1 513 bp。PCR 反应体系包括:模板 DNA 20 ng, ExTaq 酶 (TaKaRa) 1.5 U, dNTPs 0.25 mmol/L, 10×Buffer 5 μL, 引物 P0 和 P6 各 5 mmol/L, 无菌水补足至 50 μL。PCR 反应程序为:94 °C 4 min, 94 °C 40 s, 60 °C 40 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环,最后 72 °C 下延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,回收纯化测序。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离

将表面消毒后的水稻材料研磨,悬液涂布在

YMA 固氮培养基上,共分离得到 125 株内生细菌,其中茎分离到 10 株,叶分离到 14 株,根分离到 101 株。可见,水稻内生细菌的种群密度为根>叶>茎,这种差异可能与它们所处环境和功能有关。

2.2 拮抗内生细菌的筛选结果

为确定分离得到的 125 株内生细菌的抑菌效果,利用 5 种水稻病原菌——白叶枯病菌、条斑病菌、稻瘟病菌、纹枯病菌、恶苗病菌进行抑菌测定,结果表明,59 株内生细菌对水稻白叶枯病有抑菌作用,50 株内生细菌对水稻条斑病菌有抑制作用,16 株对水稻稻瘟病菌有抑制作用,24 株对水稻纹枯病菌有抑制作用,29 株对水稻恶苗病菌有抑制作用。其中 11 株对 5 种病原菌均有抑制作用,分别为 NR-11、NR-18、NL-33、NL-38、NR-48、NR-64、NR-79、NR-80、NR-90、NR-96、NR-100。抑菌效果表明,125 株内生细菌中不同分离部位抑菌效果有差异,根部内生菌的抑菌效果最好,其次为叶部的,最差的为茎部的分离物,这也可能与器官所处环境有关,根

所处微生物环境较为复杂,因此具有拮抗作用的内生细菌最多。

2.3 固氮酶结构基因 *nifH* PCR 扩增检测

为进一步筛选水稻内生固氮菌,对分离的 125 株内生细菌进行固氮酶 *nifH* 基因的 PCR 检测,结果表明有 15 个菌株能扩增出约 360 bp 的固氮酶 *nifH* 基因片段(图 1)。而 15 株固氮菌除 NL-33、NL-34 来源于叶以外,其余 13 株均来源于根部,由此可知,固氮内生细菌多存在于根部。

2.4 具有拮抗作用的内生固氮菌筛选

综合内生细菌抑菌试验和固氮酶 *nifH* 基因检测结果,共得到具有拮抗作用的内生固氮菌 3 株,分别为:NR-18、NR-64、NR-79。将 3 个菌株进行白叶枯病菌、条斑病菌、稻瘟病菌、纹枯病菌、恶苗病菌等 5 种水稻病原菌的抑菌试验(表 1),结果表明,NR-18 和 NR-79 对 5 种水稻病害的抑制效果最好(抑菌带宽度 ≥ 4 mm),均十分明显,NR-64 效果次之(抑菌带为 2~5 mm)。

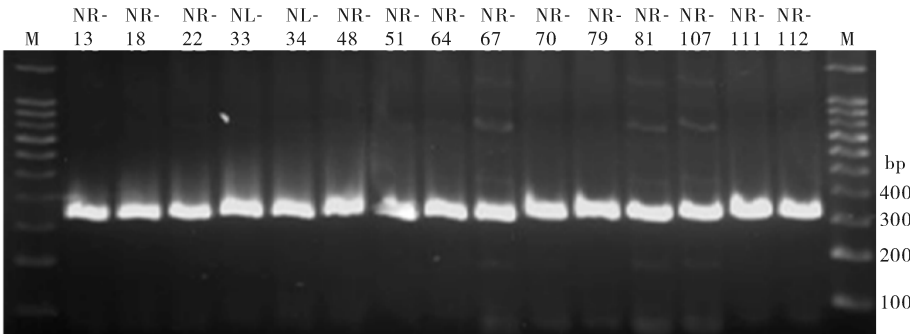


图 1 15 株内生固氮菌的固氮酶 *nifH* 基因片段 PCR 扩增产物电泳图(1.5% 琼脂糖电泳)

Fig. 1 PCR products of *nifH* gene fragments of 15 endophytic diazotrophs on 1.5% agarose electrophoresis

表 1 NR-18、NR-64、NR-79 对 5 种水稻病原菌的抑菌效果
Table 1 Control effectiveness of NR-18, NR-64 and NR-79 on five pathogens of rice

指示菌 Test microorganisms	抑菌带宽度/mm Inhibition zone width		
	NR-18	NR-79	NR-64
白叶枯病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	12	10	5
条斑病菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	11	10	2
稻瘟病菌 <i>Pyricularia oryzae</i> Cav.	9	7	3
纹枯病菌 <i>Thanatephorus cucumeris</i> (Frank) Donk	7	8	2
恶苗病菌 <i>Fusarium moniliforme</i> Sheld.	4	4	3

2.5 内生拮抗固氮菌的鉴定结果

1)生理生化鉴定结果。对 3 株内生拮抗固氮菌

株进行生理生化测定,结果表明菌株 NR-64 的各项指标均呈阳性,而菌株 NR-18 和 NR-79 的 H₂S、明胶液化、酪蛋白水解、氧化酶实验及耐盐性在 5% 以上时呈阴性(表 2)。

2)16S rDNA 基因片段序列测定结果。为进一步确认所分离的水稻内生固氮菌的种属类型,对 NR-18、NR-64 和 NR-79 进行 16S rDNA 序列测定,测定结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 比较,并构建系统发育树(图 2)。结果表明,菌株 NR-18 和 NR-79 的 16S rDNA 序列几乎一致,与多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)(EF656457. 1)有 98% 的相似性,而菌株 NR-64 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)(GQ861470. 1)有 99% 的相似性。结合生理生化鉴定和 16S rDNA 结果可知,从根部分

离的内生固氮细菌 NR-18、NR-79 属于多粘类芽孢杆菌, NR-64 属于枯草芽孢杆菌。

表 2 生理生化鉴定结果

Table 2 The results of physiological and biochemical identification

测定指标 Identification items	NR-18	NR-79	NR-64
耐盐性 Growth with NaCl			
1%	+	+	+
2%	+	+	+
5%	-	-	+
7%	-	-	+
10%	-	-	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+
D-果糖 D-Fructose	+	+	+
乳糖 Lactose	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+
D-木糖 D-Xylose	+	+	+
H ₂ S H ₂ S production	-	-	+
淀粉水解 Hydrolyzing starch	+	+	+
明胶液化 Isinglass liquification	-	-	+
酪蛋白水解 Hydrolysis casein	-	-	+
接触酶 Catalase	+	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	+
V-P 反应 Voges-Proskauer reaction	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+

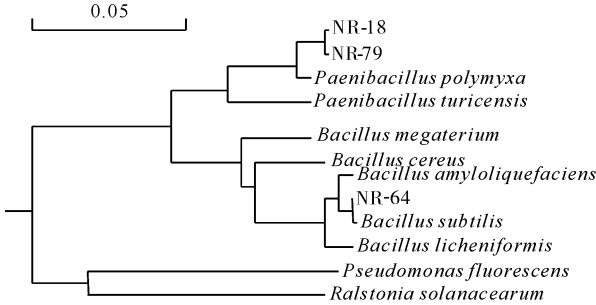


图 2 菌株 NR-18、NR-64、NR-79 的 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 The PHYLPILP tree based on strains NR-18, NR-64, and NR-79 16S rDNA sequence

3 讨论

本研究表明,水稻中内生细菌密度分布为根>叶>茎,并且分离的内生细菌中固氮菌有 13 株,其中有 3 株能对水稻白叶枯菌等 5 种病原菌起到抑制作用,2 株是多粘类芽孢杆菌,1 株为枯草芽孢杆菌。由于土壤中具有丰富的微生物种类,因此也直接导致从水稻分离的内生细菌以根部内生细菌为主。本试验没有使用对仪器和耗费都高的乙炔还原法、¹⁵N 同位素稀释法等,而是直接使用 PCR 技术扩增细菌中的固氮酶基因 *nifH*,从而节省大量的时间,可以快速地分离的内生细菌中鉴定出固氮菌。而且

16S rDNA 通用引物扩增测序获得菌种信息也免去细菌生理生化鉴定的复杂操作,可以有效避免实验中人为因素的影响并提高了菌种鉴定的可靠性。

在玉米、甘蔗、小麦等植物中分离到巴西固氮螺菌、成团肠杆菌、多粘类芽孢杆菌、肺炎克雷伯氏菌、固氮弧菌属等,具有固氮活性^[18]。史应武等^[19]在甜菜块根中分离到对甜菜光合作用及产量、品质有正效应的内生多粘类芽孢杆菌 S-7。李峰等^[20]在小麦根系组织中分离到对小麦赤霉病有抑制作用的多粘类芽孢杆菌;张淑梅等^[21]在番茄叶中分离到 1 株对水稻恶苗病有抑制作用的多粘类芽孢杆菌。由此可见,多粘类芽孢杆菌是存在于不同作物、对多种病害具有拮抗作用的固氮促生菌。

姚乌兰等^[22]从水稻根际中分离到 1 株多粘类芽孢杆菌 WY110,并克隆到抗真菌蛋白与已报道的多粘类芽孢杆菌 *gluB* 的核苷酸和氨基酸序列同源性分别达到 84% 和 88.7%,可见水稻中多粘类芽孢杆菌具有类似的生防菌特征。本研究从分蘖期水稻的根、茎、叶中分离到 125 株内生细菌,其中 15 株为内生固氮菌,经抑菌试验获得 3 株同时具有拮抗作用和内生固氮作用的菌株,分别为 NR-18(多粘类芽孢杆菌)、NR-79(多粘类芽孢杆菌)和 NR-64(枯草芽孢杆菌)。本研究分离到的多粘类芽孢杆菌也来源于水稻根内,属于内生固氮菌。同时抑菌试验表明 NR-18、NR-79 还具有对至少 5 种水稻病原菌的拮抗作用,因此 NR-18、NR-79 具有促生和生防作用。

从水稻中分离的枯草芽孢杆菌也是一种重要的内生细菌,蔡学清等^[23]从水稻中分离的枯草芽孢杆菌对水稻有促生作用,文凯等^[24]从水稻中分离的内生枯草芽孢杆菌能抑制水稻纹枯病菌,但目前为止还未见分离到具有固氮活性的枯草芽孢杆菌的报道。本研究首次从水稻根中分离到同时具有拮抗和内生固氮作用的枯草芽孢杆菌,具有很好的开发应用前景,值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] KNOX O G G, KILLHAM K, LEIFERT C, et al. Effects of increased nitrate availability on the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis* [J]. Applied Soil Ecology, 2000, 15(2): 227-231.
- [2] 陈志谊. 枯草芽孢杆菌 B-916 防治水稻纹枯病的田间试验 [J]. 中国生物防治, 1997, 13(2): 75-78.
- [3] 兰海燕, 王长波, 宋未. 棉花内生细菌及其研究进展 [J]. 棉花学报, 2000, 12(2): 105-108.
- [4] 袁平, 孙福右, 田宏先, 等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的

- 分离和筛选[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 270-274.
- [5] 何红, 蔡学清, 洪永聪, 等. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. 中国生物防治, 2002, 18(4): 171-175.
- [6] 王靖, 黄云, 张艳, 等. 油菜根肿病菌拮抗微生物的筛选及其防治效果测定[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(2): 169-174.
- [7] FISHER P J, PERTIN O, SCOTT H M L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize[J]. New Phytologist, 1992, 12(2): 299-305.
- [8] 郭景旭, 张辉, 李子钦, 等. 胡麻枯萎病生防芽孢杆菌筛选及抑菌效果研究[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(6): 598-602.
- [9] ANDREW J H. Biological control in the phyllosphere[J]. Phytopathology, 1992, 30: 603-635.
- [10] 骆焱平, 王兰英, 谢颖, 等. 内生细菌 BYG2-5 的鉴定及其对芭蕉炭疽病的防效[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 470-473.
- [11] 覃丽萍, 黄思良, 李杨瑞. 植物内生固氮菌的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 150-152.
- [12] BRAUN K A, JACOBSEN B J, SANDS D C. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley by an antagonistic *Pantoea agglomerans*[J]. Phytopathology, 2000, 90(4): 368-375.
- [13] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未, 等. 水稻内生阴沟肠杆菌 MR12 的鉴定及其固氮和防病作用[J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 92-93.
- [14] AUSUBEL F M. 精编分子生物学指南[M]. 颜子颖, 译. 北京: 科学出版社, 1995.
- [15] 丁延芹. 固氮芽孢杆菌的分离、鉴定及其 *glnB* 基因的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学图书馆, 2004.
- [16] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [17] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173: 697-703.
- [18] 许提森. 内生固氮菌研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 4828-4830.
- [19] 史应武, 娄恺, 李春, 等. 内生多粘类芽孢杆菌 S-7 对甜菜光合作用及产量和品质的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 2(3): 597-602.
- [20] 李峰, 徐大勇, 王光利, 等. 一株拮抗赤霉病的小麦内生细菌的筛选和抑菌活性[J]. 生态学杂志, 2011, 30(8): 1738-1743.
- [21] 张淑梅, 沙长青, 赵晓宇, 等. 一株抗真菌内生多粘芽孢杆菌的分离鉴定及对水稻恶苗病菌的抑制作用[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2): 84-88.
- [22] 姚乌兰, 王云山, 韩继刚, 等. 水稻生防菌株多粘类芽孢杆菌 WY110 抗菌蛋白的纯化及其基因克隆[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 878-887.
- [23] 蔡学清, 林彩萍, 何红, 等. 内生枯草芽孢杆菌 BS-2 对水稻苗生长的效应[J]. 福建农林大学学报, 2005, 34(2): 189-194.
- [24] 文凯, 赵秀云. 水稻内生细菌的分离鉴定及其拮抗性研究[C]. 中国农业科技服务协会. 植物内生菌开发与应用学术研讨会论文集. 北京: [出版者不详], 2009: 115-119.

Isolation and identification of endophytic nitrogen-fixing bacteria in rice with antipathogenic functions

GAO Ling-ling CHEN Xiao-long JIANG Tao JIANG Wei-na HUANG Qiong

College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract Endophytic nitrogen-fixing bacteria were isolated from roots, stems and leaves of rice Chujing27 collected in Lufeng County of Yunnan Province and its inhibition was identified. 125 isolates were obtained by nitrogen-free medium and 15 strains were identified as nitrogen-fixers with PCR amplification of *nifH* gene fragments. Endophytic bacteria in different parts had different density, with peak value in roots and the lowest density in stems. Among the 125 isolates, 11 endogenous strains had suppressive effect on five main bacteria diseases, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Pyricularia oryzae* Cav., *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, *Fusarium moniliforme* Sheld. of rice. Three strains (NR-18, NR-64 and NR-79) isolated from roots had both functions. 16S rDNA sequence analysis showed that NR-18 and NR-79 were identified as *Paenibacillus polymyxa* and NR-64 was identified as *B. subtilis*. The experiment above showed that the 3 nitrogen-fixing bacteria isolated and identified had potential value on agriculture. It was the first time that *Paenibacillus polymyxa* isolated as nitrogen-fixing bacteria had antipathogenic functions in the root of rice.

Key words rice; endophytic nitrogen-fixing bacteria; antipathogenic functions; *Paenibacillus polymyxa*; *Bacillus subtilis*

(责任编辑: 张志钰)