

农业微生物基因工程研究与展望

黄大昉

(中国农业科学院生物技术研究所,北京 100081)

摘要:介绍了我国农业微生物基因工程研究现状,特别是饲料、肥料和农药用重组微生物制剂的研究成果。为争取 5~10 年内使我国农业微生物成为新兴的高技术支柱产业,建议进一步加强基础研究,重视资源开发利用,适时开展功能基因组学研究,从高起点切入,以加快源头创新。另建议将微生物农药、饲料和食品加工用酶制剂列为近期研究开发重点。同时也要不断革新生产工艺,改进加工剂型,调整研发结构,促进产业发展。

关键词:农业微生物;基因工程;生物技术

Research and Prospects for Genetically Engineered Agricultural Microorganisms

Huang Dafang

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Since 1996, a remarkable progress in the area of genetically engineered agricultural microorganisms has been made in China. The recombinant phytase, diazotrophic *Alcaligenes faecalis* and modified *Bacillus thuringiensis* respectively used for feed additive, biofertilizer and biopesticide were approved to commercial production. For the development in next 5~10 years, enhancing basic research, especially on microbial resources and functional genomics would be extremely important. And the relevant strategy and measures were also suggested.

Key words: agricultural microorganism; genetic engineering; biotechnology

各类农业微生物的应用是实现农业可持续发展和保护生态环境的有力保证。在自然菌株选育的基础上开发微生物农药、肥料、饲料与食品用酶制剂已有长久的历史,对农业生产发挥了重要作用。但是,由于自然菌株和传统技术本身的一些缺陷与不足(诸如研究周期长、成本高、活性低等),实现农业微生物的产业化仍受到很大限制。然而,现代生物科学的发展和生物技术的广泛应用给农业微生物研究注入了新的活力,特别是近年来基因工程的研究为微生物遗传改良提供了有效手段,使农业微生物发展成为生命科学领域中最为活跃,最具创新性的前沿之一^[1~4]。

我国高技术发展计划(“863”计划)生物技术领域设有农业重组微生物研究专题,下设杀虫、防病、共生固氮、联合固氮、环境保护微生物和饲料用酶制剂等多个研究方向。“九五”期间,在“发展高科技,实现产业化”号召的鼓舞下,全体科技人员奋力

黄大昉:男,1942年生,研究员,博士生导师。

收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-12

开拓、不断创新,不仅在基础研究与前沿技术方面取得了突破性进展,而且在成果转化、实现产业化方面走出了新路^[5,6]。五年间共分离克隆各类新基因 89 个,构建高效工程菌株 51 株,其中 5 种菌剂经安全性评估获准进入田间试验,6 种菌剂进入环境释放,5 种菌剂完成产品登记或技术转让,部分产品已投产应用,初步实现了产业化。

1 饲料用植酸酶的产业化

添加植酸酶可以将饲料中畜禽无法吸收的植酸磷(6-磷酸肌醇)降解为可吸收的无机磷,从而提高饲料中养分的转化率和利用率,不仅可以替代磷酸氢钙的添加量,消除植酸磷的抗营养作用,而且能够大大减轻畜禽高磷粪便造成的环境污染。

由中国农业科学院饲料研究所和生物技术研究所联合承担的饲料用植酸酶课题在分离克隆和修饰改造植酸酶基因 *phAc* 的基础上,首创利用重组的基因工程毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 高效表达植酸酶,发酵液中植酸酶的含量可达 $6\sim 8\times 10^5$ U/mL,比

原始菌株 *Aspergillus niger* 963 提高了 3 000 倍,超过国外工程菌株 50 倍^[7]。由于发酵原料易得、工艺简便、成本低、周期短,适合大、中、小型企业进行生产,整套技术达到了国际领先水平。这项技术于 1998 年申请了发明专利,拥有我国自主知识产权,1999 年通过安全性评估,获准商业化应用,并获得了农业部颁发的新产品文号,同年列为国家计委首批高技术产业化推进项目在江西开始批量生产。投产后仅 10 个月,产量达 650 t,销售额超过 1 330 万元,纯利润约 475 万元。此外,添加植酸酶后减少磷酸氢钙用量 7 000 t,节约饲料成本 400 万元,畜禽粪便中磷的排出降低了 40%,取得了显著的社会、经济和生态效益。我国饲料市场对植酸酶需求量很大,预计 2010 年产量可达 15 万吨,利润可达 13.2 亿元。

继适用于猪、鸡等单胃动物的酸性植酸酶之后,该课题组根据我国发展淡水养殖的需要,又创制了国际尚属空白的耐高温、鱼类用中性植酸酶。中试结果显示这种新型植酸酶产量可达 5.2×10^5 U/mL,比原始菌株 *Aspergillus* sp. 98 提高了 4 000 多倍。占我国水产养殖产量 90% 的鲤科鱼类都可应用中性植酸酶。按我国人均水产量 22.5 kg 计,鱼饲料需求为 500 万吨,中性植酸酶的用量将达到 5 000 t,仅因替代无机磷而降低饲料成本一项,经济效益就可超过 1 亿元。

饲料用植酸酶从开始研究到生产应用仅仅用了 4 年时间,在利用高新技术改造传统饲料工业的进程中起到了示范作用,不仅结束了我国植酸酶产品完全依赖进口的历史,而且由于技术先进、生产成本低,可望进入国际市场。它的成功充分体现了我国农业生物技术的高起点、高速度和跨越式发展。

2 固氮微生物肥料的产业化

植物根际存在着种类繁多的联合固氮微生物,它的发掘利用有可能为非豆科植物打开一条“体内固氮”的途经,并开发成为新型的无污染的微生物肥料。近年来,中国农业科学院原子能研究所、北京大学等单位对固氮斯氏假单胞菌(原名粪产碱菌 *Alcaligenes faecalis*)固氮作用的分子遗传进行了深入的研究^[8],分离克隆了一系列固氮酶结构基因和调控基因,初步揭示了这种固氮细菌基因表达与调控机制^[9]。在此基础上,构建了携带固氮酶正调控基因 *nifA* 和一般氮代谢调节基因 *ntrC* 的耐铵工程菌

株 AC1541。室内外实验结果证实重组的工程菌固氮作用较自然菌株有明显提高,田间应用能够有效促进植物生长和减少化肥用量。这一成果在国际尚属首创,有关菌株保护和工程菌发酵已申请了两项发明专利,并于 2000 年通过安全性评估,成为我国第一个获准商品化生产的基因工程产品,并列为国家计委高技术产业化推进项目,在辽宁省首先投产应用。菌肥产品田间示范显示:用于盐碱地水稻可节约纯氮肥 12%~20%,用于大棚蔬菜效果尤其突出,不仅可减少氮肥用量 15%~50%,而且可增产 11%~33%,蔬菜品质也有明显提高。

3 杀虫微生物农药的研究与开发

非化学合成的、具有杀虫、防病作用的各种有益微生物的应用因对人畜和生态环境十分安全,已成为植物保护发展的重要方向。但若要扩大微生物农药的应用,仍需要对筛选出的自然菌株进行遗传改良,以进一步增强毒力,延长残效或扩大防治对象。近年来,中国农业科学院植物保护研究所、华中农业大学、中山大学等单位对苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)等杀虫防病细菌的分子遗传和基因工程进行了广泛研究,取得了很大进展。如 1997 年前国际 Bt 杀虫基因名录中没有中国的记载,但近 5 年我国科学家独立鉴定发现的新型 Bt 基因已超过 35 个,占同期国际新命名 Bt 基因总数的三分之一。由于杀虫基因鉴定、克隆等关键技术的突破,大大推动了目标产品的研究开发。迄今国内已构建了 10 余种含有不同 Bt 杀虫基因、适用于防治棉花、蔬菜等作物多种鳞翅目和鞘翅目害虫的工程菌,部分菌剂已获准进入田间试验或环境释放^[10-13]。Bt 菌剂 WG-001 作为我国第一个获准商品化生产的基因工程微生物农药产品,即将进入市场应用。

4 前景展望

在已经实施的“十五”“863”计划中,农业基因工程微生物的研究范围有了进一步扩展。尤其在微生物农药方面,除了杀虫与防病细菌制剂以外,新增了杀虫病毒、真菌和农用抗生素课题,环境与特殊微生物的研究由于与我国社会经济发展关系重大而单列一专题,研究内容除农业环境污染以外还涉及工业、城市、水域等重要污染物降解的微生物技术,以及成为近年国际研究热点的难培养和极端环境微生物资源的开发利用。目前,这些课题正在取得进展,

越来越显示出微生物生物技术的巨大潜力和广阔前景。但应当看到,我国农业与环境微生物研究开发的整体水平与应用规模同一些发达国家相比还有较大差距。进入 21 世纪以来,全球经济一体化速度迅速加快,我国社会与经济的发展正在出现新的飞跃,保护生态环境、实现农业可持续发展的呼声不断高涨。加入 WTO 以后,国内外市场对高质量、无污染的绿色农业产品的需求大大增加。面对如此严峻的挑战和发展的良好机遇,如果我们能准确把握微生物生物技术的发展方向,从高起点切入,就有可能取得跨越式发展,在 5~10 年内使我国农业与环境微生物技术成为新兴的、对国民经济发展有较大贡献的高技术支柱产业。

5 措施建议

为了加快农业微生物生物技术的研究与产业化,建议采取以下措施:

5.1 加强基础研究,促进源头创新

我国具有丰富的微生物资源,但只有从中鉴定分离到具有杀虫、防病、除草、固氮、促生、抗逆、降解污染物、促进养分转化等各种功能的新基因才能拥有自主知识产权,也只有将生物技术与传统方法紧密地结合在一起才能不断提升我国农业微生物研究开发的整体水平和国际竞争力。因此,要十分重视微生物资源的发掘利用,更要继续加强微生物基础生物学和分子遗传学研究。近 10 年来,基因组学及相关新兴学科的兴起,为深入揭示各类生物基因结构与功能提供了大规模、高通量和自动化的研究手段和全新的思路。目前国际上已完成了 80 余种微生物基因测序,还有 140 余种微生物的测序正在进行,其中与农业有关的微生物约有 20 种。以此为推动,农业微生物的基础与应用研究领域将会大大拓展并迅速取得新的突破^[12,13]。因此,要针对我国实际情况,选准切入点,适时开展重要农业微生物的结构基因组和功能基因组学研究。为了促进源头创新,建议继固氮微生物之后,将杀虫与防病微生物功能基因发掘和利用的基础研究列入国家重点基础研究发展计划。

5.2 确定研究重点,加快应用进程

经过多年努力,我国农业微生物基因工程研究水平有了明显提高,有的工作已初步形成了自己的优势与特色,“十五”期间完全有可能取得较快的发展。建议将某些经济发展迫切需要、又可能在研究开发中取得较快突破的项目,如:杀虫与防病微

生物农药、饲料与食品用微生物酶制剂等列为“十五”“863”计划生物与现代农业技术领域的重点项目并加大支持力度。此外,在积极促进技术发展的同时也要高度重视预防转基因生物对健康和环境可能存在的风险,为此,要严格按照国务院新近颁布的“农业转基因生物安全管理条例”要求,认真开展重组微生物的生物安全性评价研究^[14]。根据微生物的特点,尤要注意研究建立准确、灵敏的检测方法,加强转基因微生物在环境中定殖、存活、扩散能力以及与非靶标生物种群相互关系的监测;为了尽可能保证安全,应设法去除抗性标记基因和非目的基因的 DNA 序列^[15]。

5.3 革新生产工艺,改进加工剂型

目前我国农业微生物产品多为含活体微生物的液体制剂或加工粗放的固体制剂,应用效果易受外界环境因素影响而不够稳定,且难以长期贮存运输。因此,必须采用先进的生产工艺,发展适用的加工剂型,尽快提高“下游”技术的水平。否则,即使运用高技术手段开发出高效菌株,最终还是无法获得最大的应用效益。

5.4 调整研发结构,促进产业发展

我国农业微生物研究开发、生产销售和推广应用分属不同部门和系统,导致科研成果转化渠道不畅。全国现有微生物农药、肥料等生产企业数百家,大多规模小、资金少、研发力量弱、技术含量低、产品效能不稳定,严重制约了农业微生物高技术产业化的进程。唯有深化经济体制改革和科研体制改革,加快企业重组,实现“产、学、研”结合,建立具有我国特色的“产业链”,才能适应今后发展的需要。

参 考 文 献

- 1 Charles J F. Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000.
- 2 Frey P M. Biocontrol agents in the age of molecular biology. TRENDS Biotechnol, 2001, 19: 432~433
- 3 Lacey L A, Frutos R, Kaya H K, et al. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? Biologi Control, 2001, 21: 230~248
- 4 Mathre D E, Cook R J, Callan N W. From discovery to use, tranversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. Plant Disease, 1999, 83: 972~983

- 5 黄大昉,林敏.农业微生物基因工程.北京,科学出版社,2001.
- 6 黄大昉.微生物遗传工程.范云六.农业生物工程技术.郑州:河南科技出版社,2000.216~230
- 7 姚斌,张春义,范云六,等.产植酸酶的黑曲霉菌株筛选及其植酸酶基因克隆.农业生物技术学报,1998,6:1~6
- 8 Lin M,Smalla K,Heuer H, et al. Effect of an *Alcaligenes faecalis* inoculant strain on bacterial communities in flooded soil microcosms planted with rice seedlings.Applied Soil Ecol,2000,15:211~225
- 9 林敏,尤崇杓,Elmerich C.固氮粪产碱菌中 *nif*、*ntr* 和 *gln* 基因鉴定及 *nifA* 克隆.农业生物技术学报,1995,3:47~51
- 10 宋福平,张杰,黄大慰,等.苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立.中国农业科学,1998,31:13~18
- 11 孙明,刘子铎,喻子牛.苏云金芽孢杆菌 YBT-1520 杀虫晶体蛋白基因的属性.微生物学报,2000,40:365~371
- 12 张杰,宋福平,李长友,等.对鞘翅目害虫高毒力 *Bt* 基因 *Cry3Aa7* 的分离克隆及表达研究.中国农业科学,2002,35:650~653
- 13 Perego M, Hoch J A. Functional genomics of gram positive microorganisms review of the meeting San Diego, California, 24 to 28 June 2001. J. Bacteriol, 2001, 183:6973~6978
- 14 彭于发,黄大慰.重组农业微生物的安全性评价.朱守一.生物安全与防止污染.北京:化学工业出版社,1999.54~65
- 15 Sanchis V, Agaisse H, Lereclus D, et al. A recombinase-mediated system for elimination of antibiotic resistance gene markers for genetically engineered *Bacillus thuringiensis* strain. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:779~784

·农业生物技术研究成果·

优质玉米杂交种农大 108

A Quality Hybrid Corn Nongda 108

多年来的种植表明,农大 108 表现高产、稳产、适应性广、抗逆性强、质优、日照不敏感等优点,种植范围迅速扩大,从黑龙江南部到云贵川,从山东半岛到新疆西部都可种植。北京以北可作春播或套播,保定以南可作套播和夏播,广西则春、夏、秋都可种植。经初步统计,1997 年全国示范 6 hm²,1998 年 1.3×10⁴ hm²。1999 年经北京、天津、河北、山西、山东、河南、四川、重庆、吉林、辽宁、云南等 11 个省市统计种植 6.1×10⁴ hm²,2000 年种植 18.7×10⁴ hm²,2001 年种植 25.4×10⁴ hm²。目前在全国已推广除西藏、福建、广东、台湾等以外的 25 个省市自治区,预计 2002 年的种植面积将超过 26.6×10⁴ hm²,自 2000 年连续两年推广面积排名第一,成为全国种植面积最大的玉米品种,并在我国农作物种植面积最大的品种中排名第一。

农大 108 品质好,营养成分高,蛋白质含量 9.43%(一级饲料标准 9.2%)、赖氨酸含量 0.36%(比掖单 13 含量 0.21%高 0.15%),脂肪含量 4.21%(比掖单 13 含量 3.5%高 0.71%)。按平均产量 8131 kg/hm² 计算,1997~1999 三年比掖单 13 增产赖氨酸 1491×10⁴ kg,玉米油 7045×10⁴ kg。2000 年种植 13.3×10⁴ hm²,将增产赖氨酸 1626×10⁴ kg,玉米油 7680×10⁴ 万 kg。相当于 2 个赖氨酸工厂和十几个玉米油加工厂的产量。作为饲料可以增产更多的猪肉和鸡蛋,经济效益相当可观。

农大 108 株型比较紧凑,株高穗位适中,叶色浓绿,叶绿素含量高(3.66 mg/g 叶片)。光合同化率高,抽雄吐丝期达 71.88 mg(CO₂)/dm²·h⁻¹,灌浆后期仍高达 52.3 mg(CO₂)/dm²·h⁻¹(掖单 13 则为 38 mg(CO₂)/dm²·h⁻¹)。因此成熟时,仍青枝绿叶。根系发达,根量大,比一般杂交种多 5~10 条根。茎秆坚硬,抗倒性强。抗旱、抗涝、抗大小斑病、黑粉病、病毒病、轻古微纹枯病和青枯病。抗虫性也好。该品种的综合抗性好,稳产性好等明显优点,因而深受农民欢迎。

(下转第 139 页)