

863

生物高技术丛书

农业微生物 基因工程

黄大昉 主 编
林 敏 副主编



科学出版社

“863”生物高技术丛书

农业微生物基因工程

黄大昉 主 编

林 敏 副主编

科 学 出 版 社

2001

内 容 简 介

本书作为“863”生物高技术丛书之一,重点介绍在国家高技术发展计划(863计划)的支持下,农业微生物分子遗传与基因工程研究所取得的进展。本书共设8章,分别就基因重组的根瘤菌、联合固氮菌、杀虫细菌、杆状病毒、防病微生物、饲料用酶制剂,以及农业微生物基因工程安全性有关的研究理论基础、实验方法和国内外研究现状与发展前景作了比较系统全面的论述。内容丰富,信息量大,学术思想活跃,强调应用目标却不忽视基础研究的深入;以介绍研究进展为主,但也包含重要理论与方法的论述。写作上力求做到深入浅出,图文并茂,通俗易懂,极具学习与参考价值。

可供综合性大学、农林院校、师范类院校有关专业教师、大学生与研究生阅读学习。也可供科技、生产和应用单位的有关科技和管理人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

农业微生物基因工程/黄大昉主编.-北京:科学出版社,2001.2

(“863”生物高技术丛书)

ISBN 7-03-008884-0

I. 农… II. 黄… III. 农业工程:遗传工程-研究 IV. S188

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 72044 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001 年 2 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16

2001 年 2 月第一次印刷 印张: 35 1/4

印数: 1—3 000 字数: 812 000

定价: 70.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈北燕〉)

“863”生物高技术丛书编辑委员会

丛书主编：

侯云德 强伯勤 沈倍奋

丛书编委会(按汉语拼音排序)：

陈永福	陈章良	陈 竺	丁 勇	顾健人	侯云德
黄大昉	贾士荣	李育阳	刘 谦	卢兴桂	马大龙
强伯勤	沈倍奋	唐纪良	许智宏	杨胜利	赵国屏

《农业微生物基因工程》编写人员名单

主 编:黄大昉

副主编:林 敏

主要编写人员(按姓氏笔画排序):

丁之铨	中国农业科学院植物保护研究所	北京	100094
王金生	南京农业大学	南京	200095
丘元盛	广东省微生物研究所	广州	510070
冯家勋	广西大学	南宁	530005
孙 明	华中农业大学	武汉	430070
李 林	华中农业大学	武汉	430070
李久蒂	中国科学院上海植物研究所	北京	100093
沈炳福	中国科学院上海植物生理研究所	上海	200032
吴永强	中国科学院上海植物生理研究所	上海	200032
张 杰	中国农业科学院植物保护研究所	北京	100094
陈三凤	中国农业大学	北京	100094
陈中义	中国农业科学院植物保护研究所	北京	100094
武 波	广西大学	南宁	530005
林 敏	中国农业科学院原子能利用研究所	北京	100094
庞 义	中山大学	广州	510275
周俊初	华中农业大学	武汉	430070
赵立平	山西大学	太原	030006
胡志红	中国科学院武汉病毒研究所	武汉	430071
俞冠翹	中国科学院上海植物生理研究所	上海	200032
姚 斌	中国农业科学院饲料研究所	北京	100081
黄大昉	中国农业科学院生物技术研究所	北京	100081
喻子牛	华中农业大学	武汉	430070

参加编写的其他人员(按姓氏笔画排序):

马立新	王亚茹	丘晓颖	平淑珍	史巧娟	印 红	刘子铎	刘墨青
杨 凯	李 强	李友国	李永兴	宋福平	余建秀	陆 伟	陈 明
陈大松	武 威	袁铁铮	董越梅	程红梅	操时树		

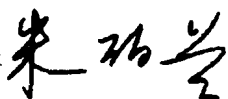
丛书序 I

生物技术是 20 世纪末期,在现代分子生物学等生命科学的基础上发展起来的一个新兴独立的技术领域,已被广泛应用于医疗保健、农业生产、食品生产、生物加工、资源开发利用、环境保护,对农牧业、制药业及其相关产业的发展有着深刻的影响,成为全球发展最快的高技术之一。在近 20 余年的时间里,各种生物新技术不断涌现。70 年代创建了重组 DNA 技术和杂交瘤技术之后,动植物转基因技术、细胞大规模培养技术,以及近几年的基因组学、蛋白组学、生物信息学、组合化学、生物芯片技术和自动化药物筛选技术等相继发展起来。可以说,生物技术的范围在不断地扩展,进入了蓬勃发展的新阶段。

我国的生物技术在“国家高技术研究与发展(863)计划”的支持下,经过 15 年全国生物技术科技人员的努力拼搏,在农业生物技术和医药生物技术的研究和开发方面都取得了很大的进展。一方面,我们在研究上取得了一批国际影响的创新成果,并获得一批拥有了自己知识产权的专利;另一方面,在开发上已有一批生物技术产品进入市场,还有相当一批产品正在研究开发中;海洋生物技术和环境生物技术也已起步。目前,生物技术研究产业化已引起了全社会的关注,并将成为我国 21 世纪的一个新兴支柱产业。

在辞别 20 世纪,迈入 21 世纪之际,“863”计划生物领域专家委员会回顾我国生物技术的发展历程,展望生物技术发展前景,编写了“‘863’生物高技术丛书”。借此机会,我希望所有从事生物技术研究 and 开发的科技人员,要进一步团结拼搏,增强创新意识,注重成果转化,为我国生物技术不断发展壮大做出新的贡献!

科学技术部 部长



2000 年 7 月 15 日

丛书序 II

生物技术是 20 世纪末人类科技史中最令人瞩目的高新技术,为人类解决疾病防治、人口膨胀、食物短缺、能源匮乏、环境污染等一系列问题带来了希望。国际上科学家和企业家公认,信息技术和生物技术是 21 世纪关系到国家命运的关键技术和作为创新产业的经济增长增长点。

生物技术是指有机体的操作技术。它从史前时代起就一直为人类所开发利用,造福于人类。在我国的悠久历史中,传统的生物技术在经济的发展中一直起重要作用,特别是农业。据传,在石器时代的早期,神农氏曾传授人民如何种植谷物,并实行轮作制度;在石器时代的后期,我国早就善于酒精发酵;在公元前 221 年的周代后期,我国就能做豆腐并酿制酱油和醋,其所用的基本技术沿用至今。公元前 200 年,在我国最早的诗集——《诗经》中就提到过采用厌氧菌进行亚麻浸渍处理。早在 16 世纪,我国的医生就知道,被疯狗咬可以传播狂犬病。公元 10 世纪,就有了预防天花的活疫苗,到了明朝(1368~1644),这种疫苗就广泛用于大量人群接种,此后,这种疫苗接种技术通过有名的丝绸之路传入欧洲国家。

1953 年 Watson 和 Crick 提出了脱氧核糖核酸(DNA)的双螺旋结构模型,阐明了它是遗传信息的携带者,从而开辟了现代分子生物学的新纪元。DNA 分子是所有生命机体发育和繁殖的蓝本。众所周知,一切生命活动主要是蛋白质的功能,而蛋白质是由基因编码的。60 年代初就破译了“遗传密码”。生命现象千姿百态,但生命体的本质却有高度的一致性。它们的蛋白质都是由 20 种氨基酸以肽链连接而成,核酸都由 4 种核苷酸以磷酸链构成,其遗传密码在整个生物界也基本一致。于 70 年代,科学家们发展了一种新技术,也就是众所周知的 DNA 重组技术。它向人们提供了一种手段,人们可以在试管内,根据人们的意愿来操作基因、改造基因,新的基因信息可以转入一种简单的生命体中,如大肠杆菌,或转入另一种机体,借以提供一种手段来改造谷物和家畜品种,或生产有效药物,制作疫苗和一系列自然蛋白质,或进行基因治疗。显然,新生物技术是一场革命,是生产力的一次解放,被认为是 20 世纪人类的一项最伟大贡献,它必将深刻地促进世界经济的发展。

广义的新生物技术包括基因工程、细胞工程、发酵工程和酶工程,但新技术的核心是基因工程技术,它能带动其他生物技术的发展,最具有革命性。

近 20 年来,国际上生物技术飞跃发展,特别是基因操作技术、生物治疗技术、转基因动植物技术、人类和其他生命体基因组工程、基因治疗技术、蛋白质工程技术、生物信息技术、生物芯片技术等。生物技术的创新正在带动着生物技术巨大产业的发展,它包括基因药物、重组疫苗、生物芯片、生物反应器、基因工程抗体、基因治疗与细胞治疗、组织工程、转基因农作物、兽用生物制品、生物技术饲料、胚胎移植工程、基因工程微生物农药、环保、海洋生物技术,以及现代生物技术对发酵、制药、轻工食品等传统产业的改造等领域。

目前,生物技术产业与信息产业相比较还处于发展初期,至 1998 年全世界共有生物技术公司 3600 余家,主要集中在美国和欧洲,其中年产值超过 10 亿美元的有约 20 家。

生物技术产业在 20 年中市场总值增加了 50 多倍;涨幅最快是在近 10 年,例如美国在 1980 年生物技术产品的销售额还处于零增长,1991 年达到 59 亿美元,1996 年为 101 亿美元,1998 年增至 147 亿美元;目前,生物技术仍保持 25% 左右的增长速度,20% 左右的融资率和 12.5% 就业增长率以及 8.76% 平均股市涨幅。另一方面,也要看到,美国的 1300 余家生物技术公司中上市公司为 300 家,而赢利的公司约为 20 家,这是由于生物技术产品的研究和开发周期较长,因此从整体看生物技术产业还处在投入阶段。从另一方面来看,尽管美国公司的赢利公司不多,但赢利公司的数量却在稳步上升。

1999 年全球生物技术产品的总销售额约为 500 亿美元,而产生的间接经济效益超过 3000 亿美元,全球有一半以上的人直接享用过生物技术产品。其主要产品为医药产品、农产品和食品。

我国自 1986 年实施“863”计划以来的 15 年中,现代生物技术的开发研究与产业化进入飞速发展阶段:二系法杂交稻的开发与推广对我国的粮食增产起了重要作用,2000 年已推广 5000 万亩以上。1993 年我国第一例转基因作物抗病毒烟草进入了大田试验。1997 年第一例转基因耐贮存番茄获准进行商品化生产,至 1999 年 5 月共有 6 种转基因作物其产品投放市场。2000 年我国转基因抗虫棉花种植面积超过 550 万亩。1990 年我国研制了第一例转基因家畜,1991 年山羊克隆获得成功,生物技术饲料添加剂已经实现了规模化生产。我国自 1989 年第一种基因药物——重组 $\alpha 1b$ 干扰素获准投放市场以来,至 1999 年我国已有 18 种基因药物和疫苗获准进行商业化生产,另有 26 种基因药物处于临床前或临床 I、II 期试验,我国生物技术医药产业已初具规模。我国已列为人类基因组计划国际大协作的成员国,承担完成 1% 的任务,美、英、日、法、德、中科学家于 2000 年 6 月 26 日宣布人类基因组全部 DNA 序列的工作框架图已经完成。我国在国际上首先发现神经性耳聋的基因,基因治疗已有 4 个项目进入临床试验阶段;生物芯片技术的开发研究与产业化正在与国际上同步发展。15 年来我国在生物技术领域中取得的成就是举世瞩目的,同时还培养了一大批中青年科技人才,为下世纪初 S-863 计划的实施和生物高技术产业化奠定了扎实的基础,也将为下世纪初我国的经济建设做出应有的贡献。

本丛书是在科学技术部中国生物工程开发中心、“863”计划生物技术领域专家委员会的领导下,由在第一线从事“863”生物高技术研究与开发的科技人员撰写的系列丛书。本丛书包括了农、医生物技术的各个方面,不仅基本上概括了近 10 年来国际上的研究进展和发展趋势,而且还全面反映了我国“863”计划实施 15 年来在生物技术领域取得的进展和成果。本丛书的出版无疑将进一步推动我国生物技术开发研究和产业化的进程,促进我国经济的持续发展。同时,本丛书也是培养新一代青年生物技术科学家的重要教科书。



2000 年 1 月 16 日

目 录

丛书序 I

丛书序 II

第一章 概论	(1)
一、微生物在现代生物科学与农业发展中的地位与作用	(1)
(一)微生物的基本特征与主要类群	(1)
(二)位于生命科学前沿的微生物学科	(2)
(三)微生物与农业可持续发展	(2)
(四)农业微生物的遗传改良	(3)
二、农业微生物基因工程主要研究领域与研究现状	(3)
(一)微生物肥料	(3)
(二)微生物农药	(4)
(三)饲料用酶制剂	(6)
(四)环境净化用微生物制剂	(6)
(五)基因工程微生物安全管理	(7)
三、农业微生物基因工程的发展前景	(8)
(一)新基因的克隆与功能研究	(8)
(二)新型高效微生物制剂的研究	(8)
第二章 重组根瘤菌	(11)
一、根瘤菌与豆科植物的相互关系与分类	(11)
(一)根瘤菌的形态与生理特性	(11)
(二)根瘤形成的早期过程与阶段	(12)
(三)根瘤的结构与功能	(14)
(四)根瘤菌与豆科植物的互接种族关系	(17)
(五)根瘤菌的分类	(17)
二、研究根瘤菌共生固氮基因结构与功能的主要方法	(19)
(一)突变缺失法	(19)
(二)基因探针杂交法	(20)
(三)功能互补法	(20)
(四)专一性基因活化或抑制法	(21)
三、根瘤菌共生固氮基因的结构、功能与调节	(21)
(一)根瘤菌结瘤基因的结构、功能与调节	(22)
(二)根瘤菌固氮基因的结构、功能与调节	(34)
(三)与共生固氮作用有关的其他基因	(44)
四、影响根瘤菌结瘤与固氮效率的主要因素	(50)

(一)接种根瘤菌的占瘤率与提高接种菌竞争结瘤能力的途径	(51)
(二)接种根瘤菌的共生固氮效率与提高接种菌共生固氮效率的途径	(55)
五、重组根瘤菌构建的技术路线与研究结果	(61)
(一)重组根瘤菌的发光酶基因 <i>luxAB</i> 标记与占瘤率检测	(61)
(二)用 <i>luxAB</i> 标记技术测定重组质粒的稳定性	(63)
(三)以绿色荧光蛋白基因 <i>gfp</i> 为报告基因的启动子探针载体的构建与应用	(66)
(四)导入三叶草素基因(<i>tx</i>)的费氏中华根瘤菌竞争结瘤能力的研究	(69)
(五)导入增效基因对大豆根瘤菌共生固氮作用的影响	(71)
(六)导入四碳二羧酸转移酶基因(<i>dct</i>)对大豆根瘤菌共生固氮作用的影响	(74)
(七)导入竞争结瘤基因 <i>nfe</i> 的重组大豆根瘤菌的构建与应用	(80)
(八)带 Kp <i>nifA</i> 的重组质粒 pXD1 的构建	(82)
第三章 重组联合固氮菌	(102)
一、联合固氮相关基因的结构功能与表达调控	(102)
(一)联合固氮正调节和负调节基因	(103)
(二)一般氮代谢调节基因	(112)
(三)铵载体基因(<i>amtB</i>)	(117)
(四)固氮酶翻译后共修饰蛋白 <i>dra</i> 基因	(120)
二、固氮菌的氢酶基因	(124)
(一)引言	(124)
(二)氢代谢与固氮和生长的关系	(125)
(三)细菌的氢酶	(128)
(四)氢酶的基因	(131)
(五)结论与展望	(135)
三、重组联合固氮菌的构建	(136)
(一)转 <i>ntrC-nifA</i> 耐铵工程菌 AC1541 的构建	(137)
(二)阴沟肠杆菌 E26 和催眠克氏杆菌 NG13 耐铵工程菌的构建	(139)
(三)重组吸氢工程菌的构建	(141)
(四)耐铵或泌铵工程日勾维肠杆菌的构建	(143)
(五)转 <i>nifA</i> 基因巴西固氮螺菌 <i>draT</i> 突变株的构建	(148)
四、联合固氮菌的田间应用	(149)
(一)水稻联合固氮工程菌的田间应用	(149)
(二)玉米联合固氮工程菌的田间应用	(156)
(三)菌剂剂型及接种方式的研究	(160)
第四章 重组杀虫细菌	(175)
一、重组杀虫细菌的研究进展	(175)
(一)杀虫细菌的主要类群及其生物学特性	(175)
(二)杀虫毒素及编码的基因	(186)
(三)重组杀虫细菌	(188)
二、苏云金芽孢杆菌分子生物学	(193)

(一)苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因的定位	(193)
(二)苏云金杆菌质粒生物学	(195)
(三)苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因的类群	(197)
(四)苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因的结构	(206)
(五)苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因的表达与调控	(210)
(六)伴胞晶体的杀虫机制	(215)
(七)昆虫对苏云金芽孢杆菌毒素的抗性	(218)
三、苏云金芽孢杆菌工程菌	(224)
(一)苏云金芽孢杆菌工程菌的构建策略	(226)
(二)高效广谱苏云金芽孢杆菌工程菌	(232)
(三)多功能苏云金芽孢杆菌工程菌	(235)
(四)延缓抗性工程菌	(236)
四、重组荧光假单胞菌	(237)
(一)荧光假单胞菌及其分子生物学	(237)
(二)重组荧光假单胞菌的构建	(240)
(三)重组荧光假单胞菌的开发与应用	(246)
第五章 重组昆虫杆状病毒	(271)
一、杆状病毒杀虫剂	(271)
(一)杆状病毒的形态及病理学特性	(271)
(二)杆状病毒杀虫剂的生产和应用	(274)
(三)杆状病毒杀虫剂的优缺点	(276)
二、杆状病毒分子生物学	(277)
(一)基因组结构	(277)
(二)杆状病毒的结构蛋白	(280)
(三)杆状病毒基因组的复制	(282)
(四)杆状病毒分子病理学	(285)
三、杆状病毒表达载体系统及基因操作	(287)
(一)杆状病毒作为外源基因的表达载体	(288)
(二)转移载体的构建	(289)
(三)细胞内同源重组及重组病毒的筛选	(291)
(四)外源基因的表达与分析	(293)
(五)构建杆状病毒表达载体系统的新路线	(295)
四、应用基因工程技术改良杆状病毒杀虫剂	(297)
(一)表达激素和酶的重组杆状病毒	(298)
(二)表达昆虫专性毒素的重组杆状病毒	(298)
(三)缺失 <i>egt</i> 基因的重组杆状病毒	(301)
(四)异源病毒重组扩大杀虫谱	(302)
(五)修饰病毒本身的基因	(302)
(六)安全性	(303)

第六章 重组植物病害防治微生物	(316)
一、重组植物病害防治微生物的构建原理	(316)
(一)植病生防机制	(316)
(二)寄主-病原物互作机制	(326)
(三)植物环境微生物	(342)
二、构建重组植物病害防治微生物的策略	(350)
(一)应用策略	(351)
(二)靶标设计	(352)
(三)路线设计	(357)
三、研究进展及展望	(364)
(一)细菌素及其产生菌的应用	(364)
(二)PGPR 的应用	(370)
(三)基于 harpin 的生防工程菌的研究与应用	(374)
(四)水稻白叶枯病菌(Xoo) <i>hrp</i> 基因缺失突变体 Du728 的构建及其对水稻白叶 枯病的防治效果	(380)
(五)水稻黄单胞菌水稻致病变种致病因子调控基因的克隆和鉴定	(397)
(六)水稻黄单胞菌水稻致病变种致病因子调控基因 <i>ryfC</i> 缺失突变体对水稻白叶 枯病的防治效果	(400)
第七章 重组饲料用酶制剂	(409)
一、饲料用酶的种类和作用	(409)
二、饲料用酶基因工程研究的主要方向	(411)
(一)利用重组微生物反应器高效表达、生产饲料用酶制剂	(412)
(二)利用基因工程手段改良饲料用酶制剂	(412)
三、重要饲料用酶的分子生物学与基因工程研究进展	(414)
(一)蛋白酶	(414)
(二)饲料用淀粉酶类	(421)
(三)植酸酶	(429)
(四)饲料用非淀粉多糖酶	(434)
四、展望	(445)
第八章 农业微生物基因工程的安全性	(457)
一、农业微生物基因工程安全性评价与管理的意义和内容	(458)
(一)农业微生物基因工程安全评价与管理的重要性	(458)
(二)安全性评价的主要内容	(459)
二、我国农业微生物基因工程安全性评价与管理	(459)
(一)我国基因工程安全管理部门及有关法规	(459)
(二)我国《基因工程安全管理办法》简介	(460)
(三)我国农业微生物基因工程安全性评价与管理	(461)
三、美国农业微生物基因工程安全性评价与管理	(467)
(一)实验研究——控制条件下的基因工程安全管理	(467)

(二)田间试验和环境释放(包括商品化)——开放条件下的基因工程安全性评价 与管理	(468)
四、欧洲联盟微生物基因工程安全性评价与管理	(479)
五、农业微生物基因工程安全性评价研究	(480)
(一)研究动态	(480)
(二)环境释放的监控方法	(484)
(三)案例分析	(487)
附录 遗传重组微生物环境释放的安全性评价案例 *	(493)
案例 1:水稻黄单胞菌水稻变种缺失致病性基因的不致病工程菌 SL3751 的 中间试验	(493)
案例 2:转 Bt 杀虫蛋白基因荧光假单胞菌 IPP202 的中间试验	(504)
案例 3:双重重组棉铃虫核型多角体病毒杀虫剂在河南省的中间试验	(513)
案例 4:Tn5 介导转 <i>ntnC-nifA</i> 基因粪产碱菌 AC1541 的环境释放	(522)
案例 5:日勾微肠杆菌转重组质粒工程菌 E7 的环境释放	(531)
案例 6:同源重组双交换法转 <i>nifA-dctABD</i> 基因中华苜蓿根瘤菌 RMBPC-2 的有限商品化	(537)
案例 7:利用生物反应器——基因工程酵母生产植酸酶的商品化	(539)

第一章

概 论

一、微生物在现代生物科学与农业发展中的地位与作用

(一) 微生物的基本特征与主要类群

微生物主要包括病毒、细菌、真菌、原生动物和某些单细胞藻类，是自然界中个体微小，数量巨大并具有广泛多样性的低等生物类群。除了非细胞状态的病毒之外，微生物可归入原核生物和真核生物两大类型，两者在遗传和细胞构成上的区别可见下表：

原核生物	真核生物
DNA 游离于细胞质中	DNA 为细胞核的核膜所包围，核内有核仁
仅有一条染色体	多于一条染色体，每个染色体可能存在 2 个拷贝（二倍体）
DNA 与组蛋白类似物结合	DNA 与组蛋白构成复合体
染色体外可能有质粒存在	除酵母菌外未发现质粒
mRNA 中未发现内含子	所有基因中都含有内含子
二分体式进行细胞分裂，即仅通过无性过程进行细胞复制	细胞分裂通过有丝分裂
通过接合、转导和转化等方式进行遗传信息的转移	遗传信息的交换可通过有性繁殖进行。减数分裂导致单倍体细胞的生成，细胞之间可以融合
质膜含有 hopanoids，另有脂多糖和磷脂	质膜中含甾醇
质膜参与能量代谢	多数情况下存在线粒体
膜系统和细胞质中的液泡参与光合作用	藻类和植物细胞中存在叶绿体、存在与蛋白质合成与定位有关的内膜、内质网膜和高尔基体，细胞骨架由微管组成
鞭毛中仅有一种鞭毛蛋白	鞭毛结构复杂，由 9+2 微管排列而成
核糖体为 70S	核糖体为 80S（线粒体和叶绿体核糖体为 70S）
真细菌细胞壁由肽聚糖组成，占细菌有不同的多聚体存在	细胞壁成分为多糖、纤维素或几丁质

（以上根据 J. Nicklin et al., Instant Notes in Microbiology, BIOS Scientific Publishers Limited, 1999）。

(二) 位于生命科学前沿的微生物学科

微生物与动物、植物等高等生物在生理活动、遗传机制等方面有许多相似之处，但由于它们形态微小、结构简单、易于培养、繁殖与操作，因而成为研究基本生命过程的理想材料，无论在基础理论上还是在应用方面不断取得突破性进展。例如，分子遗传学便植根于微生物遗传学，其早期研究的大多数发现均取材于微生物。许多引人注目的成就可以追溯到 20 世纪 40 年代有关细胞转化的第一批实验、真菌代谢突变株的首次分离，以及 20 世纪 70 年代第一次利用细菌质粒人工构建杂合 DNA。正是通过肺炎链球菌的基础研究发现遗传物质的化学本质是 DNA，从而明确了生物遗传的物质基础。之后，基因密码和基因活性的调控、基因与蛋白质的相互作用，以及重组 DNA 与基因工程技术的开发等也无不源于微生物遗传的深入研究。如果说生命科学是当今及 21 世纪发展最为迅速、最具影响力的自然科学领域的话，那么，微生物学科则是其中最为活跃，最具创新性的发展前沿之一。

(三) 微生物与农业可持续发展

微生物不仅是研究生物学基本规律的理想材料，由于它们代谢能力强、功能各具特色、产物多种多样，在农业、医学、食品及许多工业中的应用也历来受到人们的关注。广义的农业微生物应包括各类对农业有益的微生物和对动植物有害的病原微生物，本书仅就前者进行论述，但已足以清楚地看到微生物与农业发展的密切关系。众所周知，化学肥料、化学农药等工业的发展对本世纪农业生产水平的提高作出了巨大的贡献，但是它们不加节制的使用以及各类工农业废弃物的大量堆积与排放，也造成了农业生态环境的恶化，不仅严重影响了农业生产力的提高，也对人类的健康与安全构成了威胁。反过来，让我们看一下微生物在农业可持续发展中的作用。例如，素有“微生物大本营”之称，并在自然界元素循环中扮演主要角色的土壤微生物，其主要作用之一是分解动植物的残体或排泄物而将它们转化成为腐殖质，促进土壤良好结构的形成。许多土壤微生物可固定空气中的氮素和转化各类有机物，不断为植物提供有效利用的碳、氮、磷、钾、硫等各类营养元素。每年全球通过微生物固定的氮素总量可达 1.35 亿吨，相当于工业生产氮肥的三倍。许多土壤微生物还具有分解污染物的能力而起到净化环境的作用。自然界还广泛存在昆虫的病原微生物和植物病菌的拮抗微生物，它们可用于植物病虫害的防治而部分替代化学农药。通过微生物繁殖和发酵能生产有机酸、氨基酸、生长激素、抗生素、各类酶制剂等多种产品，分别用作饲料添加剂、食品添加剂和农药等。而对人口剧增、耕地锐减、资源枯竭、环境恶化等重大社会、经济问题的严峻挑战，农业微生物技术的进一步研究和开发将成为实现农业可持续发展的有效手段。

(四) 农业微生物的遗传改良

我国拥有极为丰富的农业微生物基因资源。应用常规技术手段筛选各类天然微生物菌株并加以利用也有久远的历史和良好的基础。但是,应当看到传统的微生物技术效率低、周期长、成本高,选出的菌株通常还存在种种缺陷和不足。例如,一些具有杀虫和防病作用的菌株或毒力效价不高,或效力不够迅速和持久,或防治对象单一,若要扩大应用就需要对野生型菌株进行遗传改良,使其提高某些功能基因的表达量、延长表达时间或扩大基因的作用范围。又如,有的土壤微生物具有降解某种污染物的能力,但当环境中污染物成分比较复杂时往往难以发挥作用,为了有效治理污染,也需要通过基因的复合而改变原始菌株的单一作用特性。以基因工程为核心的生物技术能够迅速实现遗传物质在不同生物种属甚至物种之间的转移,因而已经成为农业微生物遗传改良的主要手段。农业微生物基因工程已发展成为现代生物技术的重要领域之一。

二、农业微生物基因工程主要研究领域与研究现状

(一) 微生物肥料

微生物肥料是具有改善植物氮、磷、钾及微量元素营养,能够促进植物生长的生物制剂的总称,主要包括可自生或与植物共生,能增加氮素供应的根瘤菌与联合固氮菌、用于增加磷、钾营养的解磷、解钾细菌,以及促进植物生长作用的根际促生微生物(PGPR)等。

1. 重组根瘤菌

根瘤菌和豆科植物共生固氮自19世纪末以来一直是生物固氮研究的重点,20世纪70年代以后已深入到分子遗传学的研究范畴。目前在根瘤菌中已发现三类固氮基因:结瘤基因(*nod*)、固氮基因(*nif*)和共生固氮基因(*fix*),它们分别以*nodD*、*nifAL*和*fixLJ*作为主要的调节基因。近年的研究开始揭示根瘤菌与豆科植物在分子水平上的相互作用以及有关基因的调控机理,从而为进一步改造利用根瘤菌、提高共生固氮效率提供了新的线索和条件。例如,美国Scupham(1996)等将固氮正调节基因*nifA*与增强碳素代谢的四碳二羧酸转移酶基因*dct*共同整合于苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)的染色体,新构建的菌株比出发菌增产达12.9%。该工程菌已于1997年获准进入有限商品化生产应用。我国近年来开展了重组大豆根瘤菌[大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)和费氏中华根瘤菌(*Rhizobium fredii*)]研究。研究工作主要集中于华中农业大学(周俊初等)、中国科学院上海植物生理研究所(俞冠翹等)、广西大学(武波等)。除了*nifA*与*dctABD*等基因外,还构建了含有吸氢酶基因*hup*、三叶草素基因*tfx*、竞争结瘤基因*nfeC*、脯氨酸脱氢酶基因*putA*和结瘤基因*nod*的多株工程菌。部分菌株室内条件下固氮效率和竞争结瘤能力有明显提高,但若要进一步走向田间应用还须加强生物固氮与竞争结瘤分子机理、基因的表达调控,以及应用技术等方面的研究。

2. 重组联合固氮菌

以豆科植物结瘤作用为先导的生物固氮研究迄今已有 100 多年的历史。作为它的一个新的分支,植物根际微生物联合固氮研究的开展不过才 20 年左右。然而,由于种类繁多的联合固氮菌在改善禾本科植物氮素营养方面的潜在价值,特别是具有植物内生作用的联合固氮菌的利用有可能为非豆科植物打开一条“体内固氮”的新途径,这类固氮菌的分子遗传和基因工程已成为新的研究热点。在众多的联合固氮菌中,目前国内外以肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 和固氮粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) 研究得较为深入。现已分别克隆了这些细菌的 *nifHDK*、*nifLA*、*ntrBC* 等固氮酶结构基因和调控基因,初步揭示了不同联合固氮菌之间在基因表达与调控上的多样性,从而为耐铵和泌铵工程菌株的构建提供了多种选择。我国重组联合固氮菌的研究工作集中于中国农业大学(李季伦等)、中国农科院原子能所(林敏等)、北京大学(王忆平等)、广东微生物所(丘元盛等)、中国科学院植物所(李久蒂等)、中国科学院上海植物生理研究所(吴永强等)。试验应用的主要作物是水稻和玉米,近年还扩大到黄瓜、番茄等多种蔬菜。供试的受体菌除了上述三种以外还包括阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、催娩克氏杆菌 (*Klebsiella oxytoca*)、类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*)、日勾维肠杆菌 (*Enterobacter gergoviae*) 等。涉及到的基因有固氮酶正调控基因 *nifA*、一般氮代谢调节基因 *ntrC*、*ntrA*、*glnB*、四碳二羧酸转移酶基因 *dctA*、吸氢酶基因 *hup*、固氮酶负调控基因 *nifL*、固氮酶活性抑制基因的突变基因 *draT* 以及铵运输蛋白基因 *amT*、*nrgA*、*mebI* 等。多年的试验研究结果表明,经过重组修饰的耐铵工程菌能显著提高固氮效率、有效减轻铵对固氮的阻遏作用,但田间效果常因受到诸多生态因子的影响而不太稳定。在特定的土质下(如沙壤土、白浆土、盐渍化土)并采用科学的施用方法(如菌液浸根与叶面喷施结合),田间应用可节约化肥 15% 以上。“八五”与“九五”期间,我国水稻联合固氮菌累计试验示范应用面积累积达 200 万亩以上。

(二) 微生物农药

微生物农药是指非化学合成、具有杀虫防病作用的微生物制剂,如微生物杀虫剂、杀菌剂、农用抗生素等。这一类微生物包括杀虫防病的细菌、真菌和病毒。

1. 杀虫微生物

杀虫微生物中研究最多,用量最大的是苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)。Bt 在生成芽孢时菌体中可形成一个或多个具有强烈杀虫作用的称为 δ -内毒素的蛋白晶体,因而能广泛用于粮食、经济作物与蔬菜、林业以及一些卫生害虫的防治(喻子牛等, 1990)。Bt 的另一突出优点是选择性强,对人畜、天敌、植物都非常安全,堪称“无公害农药”。但是, Bt 也存在一些缺点与不足,如毒素蛋白晶体易受环境因素作用而分解;杀虫作用不持久,田间防治效果仅能维持 3、4 天;杀虫谱偏窄,仅对部分鳞翅目害虫有效;常年使用害虫可能产生抗药性等。20 世纪 80 年代以来,对 Bt 杀虫作用的分子机理已有大量研究(Whiteley and Schnepf, 1986),国际上迄今已命名的 *cry* 和