

增多,在水稻、玉米、小麦三大作物中均已用基因枪法获得了转基因植株.由此可见,基因枪法具有十分广阔的应用前景.

迄今为止,现代生物工程中的物理学方法主要集中在上述两个领域中,细胞电融合法正日趋成熟,并已获得了广泛的应用.基因转移中的基因枪法还在发展之中,尚需进一步完善的地方主要在轰击的准确性、可控性;射弹大小均一性及其结构、物理参数与靶细胞之间的关系等方面.

参 考 文 献

[1] U. Zimmermann, *Biochim. Biophys. Acta*, **694**(1982), 227.
[2] R. Terada et al., *Mol. Gen. Genet.*, **210**-1(1987), 39.
[3] K. Toriyama et al., *Theor. Appl. Genet.*, **76**(1988), 665.

[4] I. Kramer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **772**(1984), 407.
[5] J. Vienken et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **820**(1985), 259.
[6] U. Zimmermann et al., *Adv. Biotechnol. Processes*, **4**(1985), 79.
[7] E. Schierenberg, *Dev. Biol.*, **101**(1984), 240.
[8] 张闻迪, *生物工程学报*, **4**(1988), 298.
[9] R. Wiegand, *J. Cell Sci.*, **88**(1987), 145.
[10] H. Hashimoto et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**(1985), 336.
[11] I. Negratin et al., *Plant Mol. Biol.*, **8**(1987), 363.
[12] M. Fromm et al., *Nature*, **319**(1986), 791.
[13] 许宁等, *生物物理学报*, **6**-2(1990), 281.
[14] M. Joersbo et al., *Plant Cell Reports*, **9**(1990), 207.
[15] J. C. Sanford et al., *J. Part Sci. Tech.*, **5**(1987), 27.
[16] J. H. Oard et al., *Plant Physiol.*, **92**(1990), 234.
[17] D. E. McCabe et al., *Bio. Tech.*, **6**(1988), 923.
[18] C. Sautter et al., *Bio. Tech.*, **9**(1991), 1080.
[19] P. Christou, *The Plant J.*, **2**-3(1992), 275.
[20] V. Vasil et al., *Bio. Tech.*, **10**(1992), 667.

激光在农业中的若干应用*

吴孔宝

(北京农业工程大学基础科学部, 北京 100083)

摘要 概述了激光的基本特性及其对生物体的作用过程,介绍了激光诱变、激光微束、激光荧光光谱、激光扫平等技术在现代农业中的一些应用.

关键词 激光诱变,激光微束,激光扫平

我国是一个农业大国,农业是国民经济的基础,在人口众多、农业自然资源相对不足、特别是人均占有耕地甚少的情况下,要从根本上解决好我国的农业问题,需要从各方面去努力,其中一个很重要的方面就是要依靠高科技,走生物技术和工程技术相结合的道路.激光是一种新型光源,由于其发射的光具有方向性好、单色性好、相干性好、亮度高等特点,在激光产生的短短 30 多年时间里,已经在工业、国防、医学

等领域获得愈来愈多的应用.近 10 年来,激光在农业和生物科学中的应用也发展很快,在激光育种、生物工程、激光扫平等许多方面都取得了可喜的成果.此外,由于激光的出现,使得光谱技术也获得了新的进展,并且也成为农业生物检测中的重要手段之一,本文仅对上述几个方面作一简要介绍.

* 1995 年 3 月 13 日收到初稿,1995 年 6 月 14 日收到修改稿.

1 激光诱变在遗传育种中的应用

激光诱变育种是通过激光辐射与生物分子的相互作用来改变其质量性状,并影响其数量性状的遗传的育种手段.与生物体相互作用的激光强度,多产生低功率刺激作用^[1].激光诱变是以激光为物理因子的一种人工突变,因此它遵循激光与生物体相互作用的一般规律.激光诱变大体经历三个阶段:一是光生物物理阶段,包含遗传物质对激光能量的直接吸收或经过一定的能量转移之后的间接吸收,包含遗传物质吸收激光能量之后自身被激发.二是光化学反应阶段,即激光对生物体的光合作用,引起生物分子的光解离、光致分离及生物分子的自由基反应等,导致 DNA 分子或染色体发生畸变.三是生物变化阶段,产生生物遗传性状已发生突变的突变体.

生物学指出,细胞是生物体的结构单位和功能单位,生命过程首先表现在细胞里,细胞的最外面为细胞膜(植物细胞膜外还有细胞壁),膜内是细胞质,细胞质里有细胞核,还有线粒体、高尔基体(植物细胞还有叶绿体)等细胞器.细胞核是“司令部”,它控制各种细胞器协同作用以完成各种生理功能.它含有一种叫染色体的东西,染色体由 DNA(脱氧核糖核酸)和蛋白质一起构成.实验证明,激光照射生物体,可引起染色体产生缺失、重复、倒位和易位等结构的变异,可以产生断片、桥等形态的变异,也可产生染色体数量的变异.当激光使染色体一处断裂或多处断裂后,如果断裂的染色体仍按原来的样子接上去,就不会发生变化;如果在接合前发生了变化或断裂的染色体片断改变位置后以新的格局接合起来,就会出现染色体结构、形态或数量上的变异,这些变化有可能通过细胞分裂和减数分裂传到子代,产生遗传效应,这就是激光引起的染色体突变.

现代科学认为生物大分子脱氧核糖核酸(DNA)是生物体遗传信息的载体.遗传的信息

都贮存在 DNA 分子中,它直接决定生物体遗传,DNA 是由四种核苷酸组成,它们分别是脱氧腺苷酸(A)、脱氧鸟苷酸(G)、脱氧胞苷酸(C)和脱氧胸苷酸(T),而每一种核苷酸都是由磷酸基团、脱氧核糖和一个碱基(即 A, G, C 或 T)构成;成千上万个脱氧核苷酸通过磷酸二酯键连在一起就形成一条 DNA 链,两条 DNA 链反向互补排列并通过氢键合在一起,就形成一个 DNA 分子.生物体要维持种族的延续,就必须把 DNA 分子稳定地传给后代. A, C, G, T 四种核苷酸组成 DNA,这四种核苷酸的不同排列顺序就是遗传信息无穷无尽的根本原因. DNA 分子越长,这四种核苷酸就有越多的排列方式,贮存的遗传信息也就越多.

DNA 分子同一些蛋白质(组蛋白)结合在一起,通过螺旋、扭曲、折叠等方式压缩 8000 至 10000 倍而形成染色体,并存在于细胞核中,生物体细胞核中 DNA 的长度各不相同,它的长度并不能完全反映出遗传复杂性,因为并不是所有的 DNA 序列都能按照三联体密码来编码蛋白质,这里就需要提到基因的问题,基因是英文“gene”的音译,是一段 DNA 片段,这段 DNA 能按照中心法则合成蛋白质,而其他的 DNA 则不能.每一个生物种都有各自独特的 DNA 结构,每个基因也都有各自独特的 DNA 结构,编码出特定结构的蛋白质执行特定的生理功能,这些具有生理功能的蛋白质就是酶.在传统的育种技术中,有的优良作物的品种几代以后其优良的品质就要退化,很多情况都是因为这些优良品质没有在基因水平上固定下来.基因工程就是在基因(DNA)的水平上对生命体进行操作,而这种操作的结果可以传递给后代.植物基因工程是生物技术中一项快速发展的新技术,运用这种技术可定向创造出高产、优质、抗逆的植物新品种,植物基因工程以重组 DNA 技术,细胞和组织培养为基础,克服常规育种中有性杂交不亲和性的障碍,实现植物、动物和微生物之间的基因转移,是一项应用极为广泛的先进技术^[2].

研究证明激光可导致 DNA 分子氢键的断裂,引起单链或双链的断裂.1979 年 D. A. Angelov 等首次用激光对 DNA 和 RNA 的一种碱基进行双光子光解,实现了对 DNA 氢键的断裂.1984 年 Johnson, Thompson 等用紫外激光诱发 SV₄₀(猿猴病毒 40)DNA 分子一个键断裂,由 DNA I 变为 DNA II. DNA 氢键、单链或双链断裂后,当它们再结合时有可能发生差错, DNA 分子将按新的样板进行复制, DNA 分子链上核苷酸或碱基排列顺序将发生变化,造成基因突变,生物的遗传性状将发生变化,稳定后,便完成了激光诱发突变.

根据近代紫外光诱变的研究及光生物物理学对核酸及其碱基的吸收光谱测定, DNA 的吸收谱在 200—300nm 时,吸收峰为 254—266nm,在波长为 260nm 处吸收很强^[3](图 1).

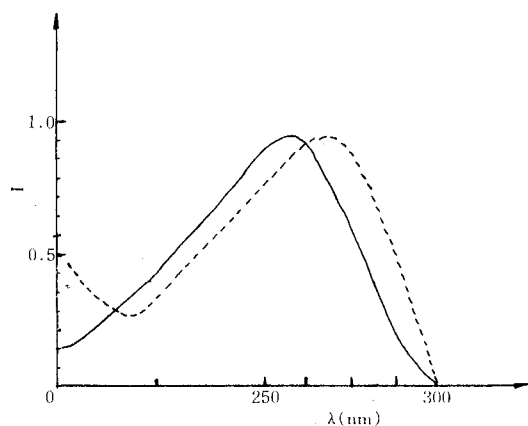


图 1 两种碱基的吸收光谱^[3]

激光诱变育种在国外从 1960 年开始,原苏联曾育出早熟、果实含糖、抗坏血酸、胡萝卜素多的番茄新品种,育出高产的玉米等,成果显著.我国的激光诱变育种从 1972 年开始,据有关部门统计,采用激光技术已培育出了 3 个水稻新品种和 3 个小麦新品种,推广种植面积 5000 多万亩,增加粮食 10 多亿公斤.用激光技术也培育出了大豆、油菜、豆角、蕃茄、棉花、家蚕等 20 多个新品种,育成的大豆新品种,产量比现在的良种还高 25% (亩产 150 多 kg),而且它们的脂肪含量也提高 2.5% 至 2.7%;蛋白质

含量提高 4.8%.用激光诱发家蚕变异,育出了性能优良的家蚕,其茧层量提高 16%,茧成率提高 15.7%,茧丝长度平均加长 80m^[4].

利用激光诱变已育成品质优良的水果新品种.云南农业大学园艺系梁绍信利用 CO₂ 激光诱变早熟水蜜桃天花粉品“砂子早生”,获得两个有花粉的突变系,经过 10 年,连续四个无性代,育成了“沙激 1 号”和“沙激 2 号”两个经济竞争力较强的水蜜桃早熟新品种.这两个品种的育成为我国提供了主栽早熟水蜜桃品种,并为长波红外激光具有基因断键修复机制的假说提供了可重复的实例^[5].

激光诱变效应的研究已涉及到水生动物如海胆、蛙、鱼、蟾蜍等,家禽有鸡,甚至哺乳动物鼠、兔、羊、猪、狗等.

激光育种和电离辐射育种相比,具有很多特点:如激光作用温和,成活率高;诱变类型广,有益突变多;能使远缘杂交成功;当代可能产生遗传突变,育种周期短;对电离辐射损伤有修复作用;安全、易防护,无污染等.

2 激光微束在生物工程中的应用

将激光通过光学系统加以聚焦,可以形成非常细的光束,其光斑直径可以小到 μm 级甚至十分之几 μm ,其高斯峰点附近的功率密度高达 10^{12} W/cm^2 ,此光场内电场强度可达 10^8 V/cm .这种微束激光好像一把锋利的微形手术刀,可以用它对活胚、活细胞、细胞器、染色体等进行特定的切割和损伤等显微技术.激光微束技术作为一种现代的先进工具,在人工改造动植物品种方面获得成功,无疑会揭开人工合成生命物质以及工厂制造生物产品这样一个“工程生物”时代的序幕.

研究表明,原核细胞直径约为 5—10 μm ,一般动植物细胞为 10—100 μm ,变形虫之类的大细胞直径为 1000 μm ,人胎儿细胞的中期染色体直径为 0.4 μm ,长 2—10 μm .因此,可以将激光微束投射到活细胞上的某一点,甚至细胞

内的某条染色体,或在某一段染色体上进行遗传操作,由于它可以远距离、非接触操作,不仅方便,还可以做到“绝对无菌”。此外,还可以利用不同组织的光学特性,实现极高的选择性“损伤”。激光微束技术在生物工程中已经开拓了多方面的应用,下面仅举二例。

2.1 细胞融合技术

细胞融合技术是细胞工程的重要内容之一,以往用化学的、病毒的及高压电脉冲等方法在微生物、植物、动物体细胞的融合中取得了成功,但对动物生殖细胞的融合,由于会“中毒”,致使融合后的细胞无法成活。山东海洋大学张闻迪教授于1990年用激光微束诱导动物的卵细胞融合取得成功。以泥鳅受精卵为材料,采用波长为 $0.59\mu\text{m}$ 的染料激光器,经一台荧光显微镜聚焦于样品,光点瞄准两个卵的质膜接触处,控制光束能量密度在 $10\mu\text{J}/\mu\text{m}^2$,使细胞膜产生不明显的微孔,约在1s内愈合。激光照射后,2个卵细胞沟通形成哑铃状,细胞内含物相互混合,约5h后形成一个比普通卵大1倍的球形卵细胞,最后发育成体积比对照仔鱼大的小泥鳅,在国际上首次成功地实现了动物细胞的激光融合^[6]。

2.2 外源基因注入技术

利用人工方法从一种生物中提取某种基因,注入到另一种生物细胞内,经培育生长成为具有预期特定变异性状的一种新的生物,这种技术称为外源基因注入技术,这是遗传工程中非常诱人的前沿性生物技术。1984年,日本理化研究所M. Tsukakoshi等的实验,成功地用紫外脉冲激光替代细针给细胞穿孔,把外源DNA物质引入细胞。采用Nd:YAG激光的三次谐波,波长355nm,脉宽5ns,最小光斑直径 $0.3\mu\text{m}$,照射在正常的体外培养的大鼠肾细胞膜上,形成亚 μm 级的小孔。肾细胞在含有大肠杆菌Eco-gpt基因的溶液中,外源DNA能自动流入大鼠肾细胞中,被穿孔的细胞膜可以在1s内自动愈合。

中国科学技术大学李振刚等采用激光微束

与显微注射结合起来的新方法进行基因导入,不像从前那样把卵浸入基因溶液中,而是把激光微束与显微注射针分别地瞄准蚕卵。在激光微束穿孔之后,迅即滴注一定量的基因溶液。他们所用的激光器为合肥工业大学激光研究所的Jy-1型钕玻璃激光微束仪,其波长 $1.06\mu\text{m}$,脉冲宽度10ns,脉冲能量数十mJ,聚焦后光斑直径15— $20\mu\text{m}$,所用蚕种是中国蚕桑研究所提供的3011B₄新2(红卵)及云纹皮斑(白卵)。提取3011B₄受精卵中的活性染色质,取产卵后3h之内的受精卵,先以激光微束穿孔,迅即滴注10mL的模板活性染色质溶液。处理后卵置温室中,使其胚胎发育。这种方法,除了避免激光穿孔时损伤DNA外,还能定量地控制基因溶液,可使用量大大减少,而用基因液浸泡蚕卵或细胞时,每次要耗费大量溶液,并在使用中其温度不断上升,容易造成基因失活^[7]。

采用脉冲微束激光在蚕卵上植入异源活性染色质的技术比传统的机械方法具有速度快、成活率高、操作灵活方便等优点,而且适用于任何大小的细胞。另外,在光照的瞬间,细胞膜的通透度会突然提高,吸收异源染色质溶液,这也是传统的基因转移技术无法达到的。

3 激光扫平在土地平整中的应用

激光扫平技术利用了激光单色性好、方向性好,亮度高等特点,它可以应用于建筑行业中的大型场地的平整,也可以应用于农业中的土地平整和水利基本建设,在当前我国的能源和水资源都普遍紧缺的情况下,土地平整质量的好坏直接影响到灌溉和施肥的效果。为了把激光技术用于土地平整,我们于1991年开始研制用于土地平整的激光扫平仪。

激光扫平仪包括一台激光发射机和一套接收装置,发射机发出的激光束,经准直、转向和旋转装置后,可以在一个平面内作 360° 扫描,作为施工现场的恒定水平基准。接收装置安装在推土机或平地机上,接收激光信号,经光电转

换,可随时向操作人员提供反映地面高低的“适中”、“略高”、“过高”、“略低”、“过低”等五种可分辨的信息,操作人员可根据这些信息手动调整刀铲量,也可将这五种信息通过控制箱,控制推土机的液压系统,达到自动调整刀铲量的目的。

激光发射机由激光器、准直光管、基准平台、光束转向和旋转装置等四部分组成。激光器(由市电供电,也可通过逆变器由电瓶供电)采用 TEM_{00} 输出的 He-Ne 激光器,其功率约 1—2mw,波长 6328Å,激光器的发热以及周围环境温度的变化都可以使得激光器毛细管弯曲或谐振腔变形,从而引起光束方向的漂移,为了尽可能减少这种漂移给测量带来误差,我们采用了热稳定措施。由于衍射现象的存在,激光光束不可能构成发散度为零的理想平行光。为了提高光束的方向性,需要在激光器的前面加一定的准直系统,具体做法是加一个倒置的开普勒形式的望远镜,本仪器的竖轴采用标准圆柱轴系,轴的上端与基准平台联为一体。基准平台

的侧面分别装有两个相互垂直的带有符合棱镜的长水准器,从而确保由基准平台出射的光束严格控制在二维的水平面内。光束转向与旋转装置由一台小型直流电动机带动一小平台,小平台上装有直角棱镜的机构。当小电机以 1—2 转/s 的转速旋转时,经直角棱镜反射的准直光束在半径 $R' = 120m$ 的作业范围内以 $v = 2\pi nR'$ 的线速度对接收靶进行扫描,式中 n 为电机的转速,可通过改变电压进行调速。

激光扫平仪在发达国家(日本、德国、美国)已是商品化的仪器,但价格都比较昂贵。该项技术在农业和建筑行业中有较高的实用价值。据光明日报 1988 年 1 月 8 日报道,埃及从美国引进 21 台装有同类仪器的拖拉机,并在 1000 多亩土地上进行了平整试验,结果表明,利用激光技术平整土地,可以使单位面积生产成本降低 60%,劳动时间减少 50%,灌水时间减少 75%。可见该项技术推广应用后具有明显的经济效益。

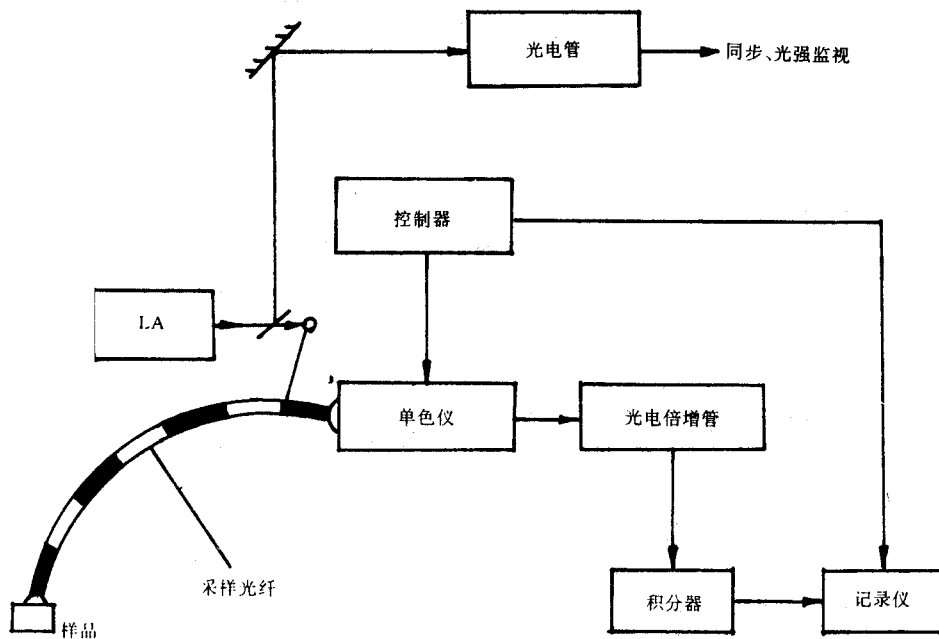


图2 激光荧光仪的组成

4 激光荧光光谱分析在生物检测中的应用

利用元素的特征荧光光谱进行化合物中痕量物质的分析,在激光产生之前就是一种行之有效的经典方法.激光出现后,使得这一分析方法的灵敏度和分辨率大为提高.生物分子的电子吸收带相互重叠,具有宽阔的吸收带,因此它对激励光的波长要求并不严.利用高功率密度的(超)短脉冲激光即可在不“损伤”样品的情况下实现高密度激发,从而产生较强的荧光信号,可以检测到 0.1mL 样品中 10^{-10} g 物质的含量;利用其高空间分辨率,不但可对不同亚细胞组织的微量元素进行高精度测定,而且还可以在不损伤活体的情况下,检测不同时期的成分变化;利用其高时间分辨率,测量荧光分子的荧光衰减规律,即可分析与该分子有关的某些超快生化过程.

激光荧光光谱分析装置主要由激光器、样品室、荧光检测系统、放大及记录显示系统组成(图2).

激光荧光光谱分析技术在农业生物检测中有着广泛的应用,下面仅举二例.

4.1 农作物生长情况的监测

原苏联乌克兰科学院植物研究所根据激光能使植物绿叶发出荧光,以及植物的营养状况能通过绿叶的荧光信号灵敏反映出来的现象,采用激光荧光分析方法,监测农作物生长情况.他们的具体做法是在飞机上安装激光系统,用激光束激发植物发射荧光,遥测接收荧光信号,用计算机进行数据处理即可获得农业播种情况和作物生长情况,并根据荧光光谱判断作物缺少何种养料,以便及时采取措施改善田间管理.

美国皮尔斯威尔农业研究中心也发现,激光照射植物叶子所产生的荧光光谱与作物的营养状况有关.他们用氮分子激光器作光源,“诊断

粮食、豆类作物的氮、磷、钾、铁、硼、钙等元素的含量.

4.2 家畜 X 精子和 Y 精子的分离

现代生物学指出, Y 精子与卵子结合可产生雄性仔畜, X 精子与卵子结合则产生雌性仔畜.为控制仔畜的性别需人工分离 X 精子和 Y 精子.美国 L. A. Johnson 研究出分离 X 精子和 Y 精子的激光荧光电泳法.该方法就是由一定的染料给精子染色,再用激光激发使其发射荧光,根据 X 精子的 DNA 含量比 Y 精子高,则 X 精子发出的荧光强度比 Y 精子强的原理,判别两种精子.然后给一种精子加以微弱的正电荷,给另一种精子加以微弱的负电荷,将精子置于电场中,在电场力的作用下,两种精子将分开,分别被收集在不同的容器中,据 Johnson 介绍,用该方法已能分离牛、猪、绵羊的 X 精子和 Y 精子,为人工受精提供了良好的条件^[9].

现代农业的发展需要高新技术的支撑,激光作为一种新技术已经在农业中得到极为广泛的应用,不少领域也取得了相当可观的经济效益,十分引人注目.然而由于生物体的复杂性,激光对生物体的作用机理至今还不十分清楚,还有待于进一步探索.

参 考 文 献

- [1] G. H. Sydaway, *Nature*, **203**(1966), 303.
- [2] 贾士荣, 高技术通讯, No. 2(1995), 1.
- [3] 敖秀珠, 激光在农牧业中的应用, 内蒙古大学出版社, (1990), 136.
- [4] 宋健, 现代科学技术基础知识, 科学出版社, (1994), 233.
- [5] 梁绍信, 激光杂志, **9**-6(1988), 360.
- [6] 张闻迪, 中国激光, **17**-3(1990), 171.
- [7] 李振刚等, 激光杂志, **9**-6(1988), 361.
- [8] Wu Kongbao et al., Proceedings of International conference on Agricultural Engineering, International academic publishers, (1992), V-26.
- [9] 同[3], 221.