

激光技术在林木和园艺植物育种及基因工程中的应用

马凤翔¹ † 陈晓阳²

(1 北京林业大学理学院 北京 100083)

(2 北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083)

摘要 激光具有极高的功率密度,因而可被应用于种子催芽和诱变育种,可作为林木和园艺植物育种和基因改良的新技术手段。文章从四个方面进行了探讨(1)激光辐照的生物效应机理(2)激光在林木和园艺植物种子催芽中的应用(3)激光在林木和园艺植物诱变育种中的应用(4)激光在林木和园艺植物基因工程中的应用。

关键词 激光 林木 园艺植物 催芽 诱变育种 基因工程

Laser applications in seed germination , mutation breeding and gene engineering for forestry and horticulture

MA Feng-Xiang¹ † CHEN Xiao-Yang²

(1 College of Science , Beijing Forestry University , Beijing 100083 , China)

(2 College of Biological Science and Biotechnology , Beijing Forestry University , Beijing 100083 , China)

Abstract Laser radiation has a very high power density so it has been used in accelerating seed germination and mutation breeding , and can be applied in new technical methods to improve the genes of trees and plants. We discuss the mechanism of the biological effects of laser radiation , then review the applications of lasers in accelerating seed germination , mutation breeding and gene engineering of forest trees and horticultural plants.

Keywords laser forest tree horticulture plants accelerating germination mutation breeding gene engineering

1 引言

自第一台激光器问世以来,激光便进入了生物学研究领域,由此产生了一门新兴的交叉学科——激光生物学。发展到今天,激光在生物学中的应用已广泛和深入,内容涉及医学、农林科学、动植物以及微生物等各个方面。

激光育种是激光生物学研究的一个分支,它是利用激光辐照生物体诱导其发生遗传性变异,再根据育种目标进行选择 and 培育新品种的诱变育种技术。通过广大育种工作者的不懈努力,我国激光辐照育种已取得了令人可喜的进展。据 1997 年的不

完全统计,我国通过激光诱变育成的植物新品种达 43 个,其中粮食作物 28 个、经济作物 5 个、蔬菜 4 个、水果林木 4 个。最近几年,激光诱变育种研究又有了新的进展,尤其是在基因工程方面发展迅速。然而在林木、园艺植物育种领域,激光的应用进展相对迟缓。为此,有必要对激光诱变技术在林木、园艺植物遗传育种中的应用作一探讨,为今后深入开展研究提供参考。

2006-05-15 收到初稿 2007-06-26 收到修改稿

† 通讯联系人. Email: mfx001@126.com

2 激光辐照生物效应的机理

激光是一种高亮度的定向能束,是由原子或分子受激发射而产生并被放大的一种相干光辐射。激光具有单色性、相干性、方向性和高亮度的特性即激光的四性。激光四性的本质是激光具有很高的光子简并度,也就是说,激光可以在很大的相干体积内具有很高的相干光强。充分利用激光所具有的这些特性,可获得极高的功率密度。这正是激光被应用于诱变育种研究的物理学基础。

目前应用于激光辐照诱变育种的激光器种类有多种,波长从远红外至紫外几乎所有频率。根据已有的研究试验统计,常使用的激光器有 CO_2 和 N_2 分子激光器、He-Ne 激光器、 Ar^+ 和 Kr^+ 离子激光器、红宝石激光器、钕玻璃激光器、钇铝石榴石(YAG)固体激光器等,其中又以 CO_2 激光器和 He-Ne 激光器最为常用^[1]。

激光辐照的生物效应机理是多类型的,具体的生物效应由特定生物组织的性质以及激光参数决定。生物组织的性质主要指光学特性(如反射、吸收及散射系数)和热力学性质(如热传导和热容量)。激光参数则主要有波长、辐照时间、能量剂量、辐照面积、能量密度和功率密度等^[2]。目前,学术上比较一致的观点认为,激光辐照生物效应的机理大致有五种,即激光加热作用、光化学作用、机械压力作用、激光电磁场作用以及激光生物刺激作用^[3]。激光与生物组织相互作用的关系如图 1 所示^[2]。

激光加热作用是生物组织吸收了激光束的能量,再转化为热量,使局部温度升高所致,其在表现为生物组织的凝结、汽化、炭化和熔融等不同的效应,如图 2 所示^[2]。在激光加热作用中,温度是一个决定性参数。当温度为 60°C 、持续时间不少于 6s 时,可以导致组织细胞发生不可逆损伤。炭化、汽化和凝结作用是不可逆过程,它们引起了不可恢复的损伤。DNA 的耐热能力比蛋白质强。实验表明,若在 1 小时内把 DNA 维持在 80°C 的高温,它们的活性不会受多大的影响。因此,在激光辐照育种研究中,确定激光的剂量和辐照时间达到导致 DNA 不可逆变性的阈值温度至关重要。

激光光化作用是生物组织在光的作用下产生的生化反应。生物组织吸收激光后的光化反应明显强于普通光。激光辐照和生物分子间的相互作用,强

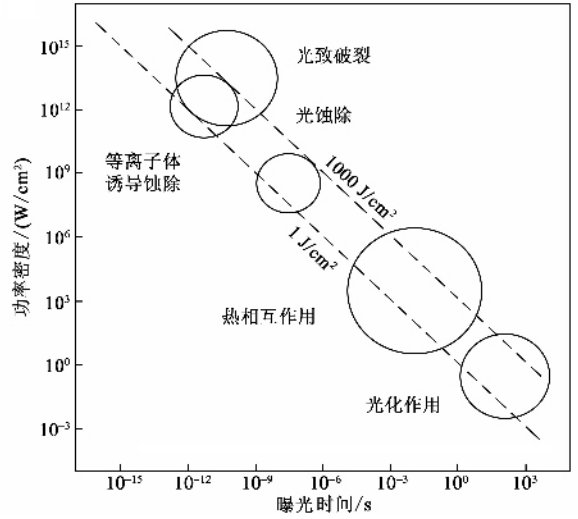


图1 激光与生物组织相互作用关系图,圆圈仅大致给出了有关的激光参数(光致破裂被认为是光学击穿引起的多重机械作用,其基本原理是冲击波的产生以及空化的形成。等离子体诱导蚀除在空间上只限于焦点处,形成组织的击穿区域,导致物质的电离)

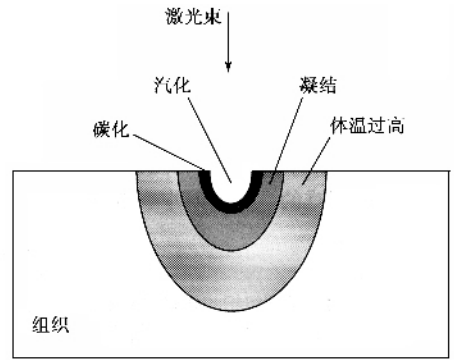


图2 生物组织中热效应的位置

烈地依赖于激光的波长和时间特性。激光辐照对生物大分子的作用,一般靠振动激发而不是靠电子吸收来实现。DNA 是重复排列的生物大分子,激光束能在许多位置引起破坏,能选择性地破坏 DNA 结构中某些化学键或天然构象^[3]。

光致压力作用是激光照射生物组织直接或间接压力作用的结果。压力作用包括由激光加热引起组织气化而导致的气流反冲压、内部气化压、热膨胀超声压、等离子体压力以及因激光电场引起的电致伸缩压等。直接由光子碰撞引起的光压称为一次压力,其余由激光间接引起的压力称为二次压力。激光作用于生物组织的压力主要是二次压力。当激光束能量很高时,冲击波和其他多重压力作用就会变得很强烈,组织或细胞被光致压力撕裂,发生电学击穿,引起光致破裂,为细胞间遗传物质交换提供通

道。

激光光致电磁场作用机理主要有四种 (1)用高电场强度的激光照射生物组织,可使生物组织产生二次紫外光谐波,蛋白质和核酸因强烈吸收谐波紫外光而受损 (2)激光与生物分子相互作用时,部分光子因发生碰撞而发生受激拉曼散射和受激布里渊散射,这些散射可导致细胞损伤和破裂 (3)激光强电场可使生物分子的外层电子突破静电势垒而逸出,形成自由电子和离子,即发生电击穿。电击穿形成致密的等离子体,产生的等离子体使生物组织发生剥裂效应,如产生自由基等 (4)在激光强电场作用下,生物分子可能发生电离,原来无极性的生物分子可能发生极化,原来已极化的生物分子沿电场方向旋转,从而引起微观结构的变化,尤其是膜结构发生了改变^[2,3]。

激光的生物刺激作用是由大于刺激阈值的小剂量激光引起的,大于损伤阈值的激光剂量则引起生物抑制作用甚至死亡。弱激光的生物刺激作用机理,目前尚不成熟,比较典型的三种假说是 (1)受体蛋白的中介作用,调整细胞功能假说 (2)生物组织的共振效应,调整生物场假说 (3)偏振光的定向电场力改变细胞膜的构型假说^[3]。

综上所述,激光加热作用引起酶失活、蛋白质变性,导致生物的生理遗传变异;光致压力作用使组织变形、破裂,引起生理及遗传变异;光化作用是通过一定波长的光子被吸收,跃迁到一定能级,引起生物分子的变异;电磁场作用产生自由基导致 DNA 损伤,改变微观结构,引起遗传突变。到目前为止,人们普遍认为,低功率激光影响生物体并使生物产生遗传变异的主要机制在于激光的光化学作用和光致电场作用。激光辐照的综合生物效应,既直接导致染色体发生畸形诱变,引起染色体缺失、重复、倒位和异位等,使得染色体产生形态和数量上的变异,这些变异通过有丝分裂或减数分裂实现遗传效应;也间接通过激光的特有性质,使其能量在染色体及 DNA 分子周围聚集,导致 DNA 产生分子水平上的突变。激光辐照的直接和间接效应,导致了植物基因突变和染色体变异等,形成多种多样的遗传突变体供作物、林木及园艺花卉育种研究者选择。

3 激光技术在林木和园艺植物育种及基因工程中的应用

3.1 激光技术在林木和园艺植物种子催芽中的应用

小剂量激光辐照对生物有刺激效应。由于激光辐照种子简单易行,效果明显,激光用于林木和园艺植物种子催芽研究的报道也比较多。研究已表明,激光辐照可以打破种子休眠状态,提高种子活力,改善形态结构,激活生理代谢过程,促进植株生长发育。吴俊林等用 He-Ne 激光(输出功率为 3.8mW)辐照油松种子后再进行萌发试验,经低剂量 He-Ne 激光处理后,比对照种子提前 2—3 天发芽,发芽率提高 39%,活力指数提高 67%,生物量提高 20%^[4]。吴俊林等还在聚乙二醇(PEG6000)模拟干旱胁迫条件下用 He-Ne 激光(输出功率 10.2mW)以不同时间辐照油松种子,萌发试验表明,在模拟干旱条件下,激光辐照后油松种子的发芽率、活力指数、生物量分别提高 32.23%、81.19% 和 46.58%,萌发期油松种子幼苗保护酶系统的超氧化物酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性显著提高,比对照提高 28.7% 和 46.52%^[5]。

崔延棠等用不同剂量的 He-Ne 激光(功率为 15mW)辐照多年生黑麦草(品种为守门员),试验结果表明,低剂量的 He-Ne 激光辐照可显著提高黑麦草种子的活力,并提高其越夏能力和抗旱能力(即抗逆性)^[6]。陈怡平等用 He-Ne 激光(功率密度为 5.23mW/mm²)预处理苕蓝种子,对苕蓝种子萌发和苗期均有促进作用,尤以 5min 处理效果最好,且经激光处理后,其幼苗的 α -淀粉酶、谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)等酶活性高于对照,说明激光处理增强了苕蓝的代谢水平,有利于苕蓝生长和发育^[7]。用低剂量激光辐照大叶龙胆种子、苏丹草种子、柱花草种子均获得了类似的试验结果。

3.2 激光技术在林木诱变育种中的应用

林木遗传育种是林业建设的先导,是生态建设和林业发展的基础和保障,在林业和生态建设中具有举足轻重的地位和作用。但由于林木生长周期长,并且有高度的杂合性和高度的遗传负荷,限制了像农作物自交那样基本遗传材料的产生,加之林木遗传改良方法和研究手段的相对滞后,使得林木遗传改良落后于其他物种,极大地影响了林木遗传育种研究的进展。单纯的常规林木育种技术手段已经不能满足我国经济社会对林业可持续发展的需要,新的育种技术和方法的运用显得十分的迫切。激光

辐照诱变育种技术具有操作简单、安全,而且正变率高(通常指获得高产、优质、抗逆等变异为正变异),辐射损伤轻,诱变当代即可出现遗传性突变等特点,为林木遗传育种研究增添了一种十分有效的技术手段。事实上,已经有许多研究人员利用激光辐照育种技术开展了相关的研究工作,并取得了一些进展。

陈震古等^[8]用 He-Ne 激光(剂量 $20\text{J}/\text{cm}^2$)诱导杨树花药培养单倍体植株及其无性系获得成功。陈震古选用 25 种杨树试验材料,结合水培杂交和组织培养技术,用 He-Ne 和 CO_2 激光不同剂量照射离体花药、子房、花粉等,结果表明,与对照比较,用 $20\text{J}/\text{cm}^2$ 剂量的 He-Ne 激光诱导花药愈伤组织能促使花粉的芽分化,在对供试的 7 个杨树品种雌株的 42 种处理中,出愈率高过对照的近 $2/3$,其中 He-Ne 激光诱导出愈率最高达 37% 以上,而对照最高只有 16% 左右;试验还获得了用 He-Ne 激光($30\text{J}/\text{cm}^2$ 剂量)诱导美洲黑杨“ I_{69} ”子房愈伤组织的无性繁殖系“Clone14”,经细胞学分析,证实其起源于雌配子体的母性单倍体,再经过两年继代培养的次生愈伤组织的芽分化率由原来的 20% 提高到 55%,且愈伤组织更趋纯化;试验也获得了用 He-Ne 激光($20\text{J}/\text{cm}^2$ 剂量)诱导的欧洲黑杨“52-2”单倍体花粉植株“20-8”,经细胞学分析,证实其起源于雄性配子体的亲本单倍体,用同功酶分析,酯酶同功酶(EST)、过氧化物同功酶(POD)的酶活性和酶带数与对照有明显差异,说明用激光诱导杨树单性生殖是有效的。

梁绍信等选用日本引进品种桃“砂子早生”经用 CO_2 激光辐照处理,获得两个突变系并用嫁接法繁殖,经过 10 年连续 4 个无性代培育,选育成功两个不同于原来亲本的“早成熟、早投产、早丰产”的三早水蜜桃新品种“沙激一号”和“沙激二号”,其产量分别比亲本高 3.7 倍和 4.6 倍,且遗传性状稳定^[9]。李庄等用 CO_2 激光辐照沙田柚枝条生长点后,采用低位高接法繁殖,获得了一个完全没有种子的优质沙田柚新品种。并以此无核母株枝为材料,再采用 CO_2 激光辐照处理(剂量为 $98\text{mJ}/\text{cm}^2$),低位高接繁殖子代,又获得果实成熟期提前一个月的无核加早熟的沙田柚新品种^[10]。钱吉等运用 RAPD 分子标记技术对该新品种进行分析,结果显示,经激光处理的无核沙田柚新品种(处理组)与对照之间存在着 DNA 分子水平上的差异,也就是说,已经引起了沙田柚后代基因组的显著变异,且这种诱变所引起的性状改变是可以遗传的^[11]。

3.3 激光技术在园艺植物诱变育种中的应用

由于长期存在的“重引轻育”现象,品种问题已经成为限制我国园艺花卉业进一步发展的“瓶颈”。培育具有中国特色和自主知识产权、品质稳定的“奇、特、优”新品种是园艺花卉业的当务之急。然而,常规育种方法需创造分离群体,经表型性状筛选,实现育种目标需要时间周期长,育种成本高,已无法满足人们对园艺花卉品种的新要求,而物理诱变育种优势明显。当前,在物理诱变育种中,核辐射是最常用的育种方法。新的诱变方法如激光辐照在园艺花卉育种中的应用虽然可见到一些相关报道,但总体而言,仍十分有限,应用潜力很大。

董丽娟等用低剂量 CO_2 激光辐照茉莉短穗,试验结果表明,低剂量激光有促进茉莉分枝和开花的作用效果,有可能被用作茉莉花育种的诱变源。李红等用 N_2 分子激光辐照沙打旺驯化种的种子,筛选出高产、早熟、适应性广的沙打旺新品种“黑辐 4 号”^[9]。高智才等用 He-Ne 激光辐照伊豆锦、先锋、黑奥林的腋芽,经过五年五代筛选,选育出极早熟芽变葡萄新品种“激早丰”,后经过氧化氢酶(CAT)酶谱检测,证明了其变异是稳定可靠的^[12]。李成佐采用 He-Ne 和 CO_2 激光辐照云南元谋本地葱,从变异后代中选育出高产、优质、多抗及适应性强的红皮葱新品种“昌激 99-3”,经专家组实地验收, 667m^2 产量达 9186.7kg,为全国最高产量^[13]。

3.4 激光技术在林木和园艺植物基因工程研究中的应用

随着激光与生物组织相互作用机理研究的深入,一种利用激光的力学原理所产生的光的势阱效应,对微米以下的微小物体,用激光微束的光梯度力和散射力(即光压)进行操控的激光光镊操纵微粒技术,已经发展成为植物遗传基因操作和植物外源基因转化研究十分得力的工具和手段,它为林木和园艺花卉品种的遗传基因改良和远缘分子杂交开辟了一条新途径。

激光技术在林木和园艺花卉遗传基因操作中,主要用来进行微切割和微分离小块组织、单细胞甚至单个染色体、基因片段,以及用来去除细胞壁诱导原生质体融合。微束激光经多次折射进入显微镜物镜,并将之聚焦到染色体标本上,对待研究的染色体或基因片段进行准确切割和分离。用该项技术可以获得任意一条染色体或基因片段,进而将 DNA 制备

成探针及分子标记,用于基因定位,或对有用基因进行克隆,构建基因文库。王兰岚等曾用氩离子激光器成功地切割了蚕豆、小冰麦等植物的染色体。Schermelleh 等用紫外激光与激光压力弹射技术结合,可快速分离单条染色体,并用 DOP-PCR 对染色体进行扩增,可应用于 FISH 杂交的探针^[14]。Kamisuji 等用激光微束切割分离了还阳参染色体的一个 C 区带^[15]。Scutt 等用激光微束分离了蝇子草性染色体,并进行了成功的扩增和克隆^[16]。Meimberg 等用紫外激光微束在细胞壁上钻孔,然后利用激光压力弹射的非接触方法分离单个叶绿体,并进行单个叶绿体 DNA 分子的聚合酶链式反应(PCR)扩增^[17]。由于微束激光的光斑直径很小(最小可达 $0.5\mu\text{m}$),而且可通过计算机对切割过程进行控制,所以利用激光微束切割染色体或基因片段不仅精确细致,而且方便快捷。可见,利用激光光刀及光镊进行染色体和基因片段的微切割和微分离有极大的优越性。光刀的使用令染色体和基因片段切割的准确性大大提高,而利用光镊又使染色体和基因片段的分离与收集变得十分容易,染色体及基因的微切割、克隆为遗传基因图谱的构建及新的基因的克隆提供了新的研究思路。正是激光技术具有捕获组织或细胞的特异性突出的特点,使微束激光显微操纵技术在林木和园艺植物功能基因组学的研究中发挥出十分积极的作用,并可望成为功能基因组学研究的一项不可或缺的技术。

利用激光微束技术甚至可以在保持细胞活性的条件下去除细胞壁,获取符合电生理实验要求的材料,诱导原生质体融合。Kurkdjian 等用激光微束制备了紫花苜蓿的原生质体^[18]。De Boer 等用激光微束去除了百合的花粉管壁获得了原生质体^[19]。Hahne 利用激光诱导细胞融合技术,在 5% 的 PEG 溶液中,将来自朱槿和烟草愈伤组织的原生质体混和,以使原生质体之间相互靠近,选择两个异源细胞接触的区域进行单脉冲照射(四倍频 Nd:YAG 激光,波长 266nm),接触部分的细胞便开始融合,一分钟之内形成一个圆的细胞杂合体,并可观察到细胞质流动^[20]。激光微束不但可以诱导活体组织内细胞的融合,也可以诱导细胞内膜系统及细胞器的融合。随着光镊技术的发展,人们可以更有目的地选择融合对象及融合位点。用激光微束与光镊系统可把任意两个细胞融合为一个杂交细胞,即使这两个细胞之间体积差异极大,膜性质不同,都可诱导其融合。这是其他传统方法(如 PEG 法、电融合法)所

无法比拟的。

微束激光技术还被应用于林木和园艺花卉外源基因的导入。由于激光微束的直径很小,且能量很高,可引起细胞壁和细胞膜可自我愈合的可逆性穿孔。利用激光的这种效应,将聚焦到微米级的激光微束对组织或细胞进行穿刺,导入外源 DNA。王兰岚等建立了成熟的激光微束转化植物细胞的程序,并率先获得了有分子证据的稳定转化植株。王兰岚等采用波长为 530nm 的二倍频 Nd:YAG 激光微束,将 Gus 基因分别导入兰科(石斛兰)、锦葵科(棉花)、大戟科(橡胶树)、松科(云杉)等植物,并获得了瞬时表达^[21]。赵慧等用 Nd:YAG 激光微束将菜豆几丁质酶基因导入苹果砧木。刘桂珍等将 $\beta-1,3$ -葡聚糖基因和几丁质酶基因双阶植物表达载体用 Nd:YAG 激光微束系统导入棉花幼胚,最终得到了双阶转基因棉花植株,其 T_1 代已在病圃中得到抗枯萎病及抗黄萎病检验,并且选育到第七代已达到稳定表达的植株,这表明激光微束转化法已进入到实用阶段^[22]。激光微束还可以穿透花粉粒的管壁对花粉进行基因转化,再通过花粉培养产生转基因单倍体及双倍体。Yamaguchi 等用 N_2 分子激光微束转化了多种观赏植物的花粉,他先用 FETC 荧光染料确定渗透值,然后将 PBI21 的质粒 DNA(Gus, NPT II 基因)导入凤仙花和沃克凤仙花,花粉用 N_2 分子激光微束在 0.3mol/L 高渗溶液中进行激光穿刺,有 18.5% 的 Gus 基因获得表达^[23]。

激光微束基因转化法获得成功的关键环节是控制试验材料的渗透压,即在激光辐照之前,受体细胞必须进行高渗液处理。一般预处理高渗液多在 $0.5\text{—}0.1\text{mol/L}$ 之间,使细胞内外压差超过 0.05mol/L 为宜。激光微束转化法是一种行之有效的转基因方法,预计今后将会有更多的研究者运用此项技术培育成人们期望的转基因林木和园艺花卉新品种。

4 结束语

激光可被应用于诱变育种。激光辐照育种的生物学诱变效应是由激光加热作用、光致压力作用、光化作用和光致电磁场作用等综合作用的结果。从生物个体、细胞、亚细胞及分子等多个层面的基础研究,证实了激光辐照能引起生物遗传性变异,可以作为林木和园艺花卉育种的新诱变源。同时,通过激光辐照诱变所选育的多个新品种,从实践层面证实

了激光诱变技术应用于林木和园艺花卉育种的有效性。激光辐照技术为林木和园艺花卉育种提供了一种有效的新技术手段。

随着激光技术研究的深入,激光微束被越来越多地应用于遗传基因操作,用来微切割和微分离染色体或基因片段,以及用来去除细胞壁诱导原生质体融合。试验结果表明,微束激光技术应用于林木和园艺花卉遗传基因操作具有明显的优越性。另一方面,试验也证实,微束激光技术是介导外源基因转化的一种操作简便、转化效率高的技术方法。植物基因激光微束转化法的最大优点是穿透力强,可以将外源基因定点导入靶细胞,对细胞的损伤小,单、双子叶植物均可应用,受体材料可以是花粉、单细胞,也可以是组织小块、微器官甚至细胞器。微束激光技术在林木和园艺花卉转基因育种研究中有着广阔的应用前景。

林木和园艺花卉育种由于其自身的特殊性而存在育种研究工作的困难。在今后的研究中,我们应充分利用激光辐照育种技术以及微束激光遗传基因操作技术,并与其他高新技术,尤其是现代生物技术(如离体细胞培养、分子标记辅助选择)相结合,组成复合育种技术,将林木和园艺花卉育种的研究水平推向崭新高度。

参 考 文 献

[1] 唐玄之,封国林等.激光生物学报,1999(2):157 [Tang X Z, Feng G L *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 1999(2):157 (in Chinese)]

[2] Markolf H N. Laser-Tissue Interactions Fundamentals and Applications. Berlin Heidelberg Springer-Verlag, 2004

[3] 孙承纬.激光辐照效应.北京:国防工业出版社,2002 [Sun C W. Laser Irradiation Effects. Beijing: The Press of National Defense Industry, 2002 (in Chinese)]

[4] 吴俊林,张宗权等.西北农林科技大学学报(自然科学版),2002(2):136 [Wu J L, Zhang Z Q *et al.* Journal of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2002(2):136 (in Chinese)]

[5] 吴俊林,张社奇等.激光生物学报,2006(1):36 [Wu J L, Zhang S Q *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 2006(1):36 (in Chinese)]

[6] 崔延棠,尉亚辉等.西北大学学报(自然科学版),2002(5):573 [Cui Y T, Wei Y H *et al.* Journal of Northwest University (Natural Science Edition), 2002(5):573 (in Chinese)]

[7] 陈怡平,王勋陵.激光技术,2004(1):42 [Chen Y P, Wang X L. Laser Technology, 2004(1):42 (in Chinese)]

[8] 陈震古.光电子·激光,1999(5):447 [Chen Z G. Journal of Optoelectronics·Laser, 1999(5):447 (in Chinese)]

[9] 万贤国.激光生物学报,1996(3):865 [Wan X G. Acta Laser Biology Sinica, 1996(3):865 (in Chinese)]

[10] 李庄,陈茂鑫等.激光生物学报,1999(1):52 [Li Z, Chen M X *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 1999(1):52 (in Chinese)]

[11] 钱吉,谯敦华等.复旦大学学报(自然科学版),2000(3):327 [Qian J, Kan D H *et al.* Journal of Fudan University (Natural Science Edition), 2000(3):327 (in Chinese)]

[12] 高智才,王海洋等.激光生物学报,1997(1):1009 [Gao Z C, Wang H X *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 1997(1):1009 (in Chinese)]

[13] 李成佐.激光生物学报,2004(4):258 [Li C Z. Acta Laser Biology Sinica, 2004(4):258 (in English)]

[14] Schermelleh L, Thalhammer S, Heckl W *et al.* Biotechniques, 1999(2):362

[15] Kamisugi Y, Sakai F, Minezawa M *et al.* Theor. Appl. Genet., 1993, 85:825

[16] Scutt C P, Kanisugi Y, Sadai F *et al.* Genome., 1997, 40:705

[17] Meimberg H, Thalhammer S, Brachmann A *et al.* Plant J., 1999, 20(3):371

[18] Kurkdjian A, Leitz G, Manigault P *et al.* J. Cell Sci., 1993, 105:263

[19] De Boer A H, Van Duijn B, Giesberg P *et al.* Protoplasma, 1994, 178:1710

[20] Hahne G H. Eur. J. Cell Biol., 1984, 33:175

[21] 王兰岚,宋桂英.激光生物学报,1996(1):811 [Wang L L, Song G Y. Acta Laser Biology Sinica, 1996(1):811 (in Chinese)]

[22] 刘桂珍,蓝海燕等.中国激光,2000(3):279 [Liu G Z, Lan H Y *et al.* Chinese Journal of Lasers, 2000(3):279 (in Chinese)]

[23] Yamaguchi T. Abstract VIIIth international congress of plant tissue and cell culture. Firenze, 1994, 139