

## 46.6MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子对四种作物种子的生物学效应研究\*

卫增泉 刘玉岩 王桂玲 陈学兵 李惠玲  
(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)  
杨汉民 汪丽虹 高清祥 王崇英 王亚毅  
(兰州大学 兰州 730000)

**摘要** 在中科院近代物理研究所兰州重离子研究装置(HIRFL)上,采用46.6MeV/u  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子对四种不同作物种子进行了生物学效应研究.结果表明:重离子的轰击和贯穿,不仅会在种子表面外貌而且也对种子内部细胞造成严重损伤,重离子对种子萌发能力和生长发育均有明显的抑制作用,对生物功能也有影响;在种子的根尖细胞中出现的染色体畸变具有多种类型,而且畸变频率明显高于对照组.重离子对多种细胞器也产生了严重损伤,受损DNA具有一定的修复能力.测定了四种作物种子的半致死剂量及失活截面.找到了四种作物之间辐射敏感性的差异,讨论了细胞器损伤与生理过程异常的关系和受损DNA的修复过程.

**关键词** 重离子, 生物学效应, 辐射敏感性, 染色体畸变及频率, 细胞器, DNA, 损伤及修复.

### 1 引言

辐射生物学发展至今已有近百年的历史,但把重离子束作为诱变源用于各种生物效应的研究还是近二三十年的事.与X,  $\gamma$  或 n 等中性粒子相比,重离子在诱变生物学方面具有下列明显的独特优势:(1)传能线密度(LET)大,生理生化作用强,具有较高的诱发突变频率;(2)重离子在能量沉积过程中,其射程末端存在着一个尖锐的能量损失峰(Bragg peak),使能量沉积具有高度的空间分辨性,产生明显效应的区域是局部的和可选择的,不仅在存活率较高的情况下可得到较高的突变率,而且有可能定向诱变;(3)重离子诱变参数多样,有利于拓宽突变谱;(4)重离子损伤的生物分子和细胞,通常不易修复,使突变体较快稳定.

正因为重离子在剂量效应方面具有这种特性<sup>[1]</sup>,近年来,美、德、俄和日等拥有大型重离子加速器的国家相继开展研究,不仅在辐射诱变、辐射治疗,而且在模拟空间宇宙重离子对生物影响方面,取得了许多进展.1989年10月,中科院近物所兰州重离子加速器正式建成,次年,我们在该装置上采用大面积外束技

术,用46.6MeV/u  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束对四种不同作物种子进行照射,研究了其形态学、细胞学、生理化学和遗传学效应,为深入研究重离子作物育种和对空间重带电粒子的生物效应进行模拟研究奠定初步基础.

### 2 材料与方法

#### 2.1 供试材料

重离子辐照的四种作物种子是:粮食作物小麦、经济作物白兰瓜、饲料作物山豆和药用作物枸杞.

#### 2.2 辐射前处理方法

辐射前,挑选大小均匀、颗粒饱满和无损伤无霉菌污染的风干种子,用15%明胶液将其粘在直径40mm的聚四氟乙烯小盘中,种胚朝上,按同心圆排列,每盘50~250粒,每10个小盘固定于一个可旋转的大塑料盘上.

#### 2.3 辐射过程及重离子参数

将每个装载好的大塑料转盘安装在HIRFL辐照装置上<sup>[2]</sup>,置于常温常压大气环境中,由步进马达带动,依次接受照射,剂量数据获取与样品更换均由微机自动操作,另以未照种子作对照.

\* 国家自然科学基金委和甘肃省自然科学基金委资助课题

诱变源是电荷态为+6价的碳离子束,初始能量为 47.8MeV/u,因采用外束技术,在它们到达种子样品前扣除真空隔离 Ni 窗及一层空气间隙的能损后,最终能量为 46.6 MeV/u,大面积束流是通过靶子上游约 6m 处采用散焦的方法得到的. 离子流密度分别为  $1.43 \times 10^3$ 、 $4.19 \times 10^4$ 、 $2.6 \times 10^5$ 、 $1.8 \times 10^6$ 、 $1.08 \times 10^7$  和  $1.66 \times 10^7$  p/cm<sup>2</sup>. 在辐照装置样品环境中,次级辐射水平为:  $\gamma$  在 25.3 mSv/h 左右,  $n$  在  $6.3 \times 10^8$  n/s. cm<sup>2</sup> 左右.

### 2.4 辐照后的处理方法

辐照后将种子用 50℃ 温水浸泡数分钟,除去粘附在上面的明胶.

萌发实验的处理见文献[3]. 呼吸强度 ( $O_2 \mu l/h. g_{鲜重}$ ) 的测定是采用华氏微量呼吸计对萌发种子进行减压法测定,操作过程中恒温 25℃,种子浸泡后每隔 5~6 小时测量一次,细胞学观察处理见文献[4],在显微镜下每个剂量组至少观察 10 个根尖,共约 10000 个细胞,统计胚根细胞中染色体畸变类型和频率. 同时,将发芽 3~7 天的胚根和胚芽经固定和超薄切片制样,在透射电镜上观察其细胞器的结构变化. DNA 合成过程的处理是采用 <sup>3</sup>H-TdR 标记方法. 取培养不同时间的每组种子 20mg,分别加入 0.4ml <sup>3</sup>H-TdR,在 25℃ 标记 4 小时,然后用蒸馏水反复冲洗,将其转移至 5ml 离心管,在 80℃ 上干燥 8 小时,再加入四滴 HC10<sub>4</sub> 和四滴 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,在 80℃ 消化 6 小时,最终用 4ml 无水酒精和 6ml 闪烁液将消化液全部转入测量瓶进行测量.

## 3 实验结果与讨论

### 3.1 对作物种子外表与内部的损伤

由电镜观察到小麦种子遭 <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 轰击后外表形貌的变化,在胚部和顶部分别出现皱折和干缩现象;在种子内部,由于离子的贯穿胚乳受损,出现塌陷和空洞,细胞内含物流失,干枯收缩. 出现许多细胞丝状物(细胞质带)等.

### 3.2 对四种作物种子萌发和生长发育的影响

由不同剂量 <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子束照射小麦、白兰

瓜、山黧豆和枸杞四种干种子后,发芽率随剂量变化的趋势与 U. Bork 和 A. R. Kranz 的实验结果<sup>[5]</sup>非常相似. 图 1 是采用半对数坐标表达的发芽率曲线. 从图上可以得到,它们的半致死剂量 D<sub>50</sub>,分别是:小麦 <  $10^3$ p/cm<sup>2</sup> (占 85%) 和  $5.6 \times 10^5$ p/cm<sup>2</sup> (占 15%),白兰瓜为  $1.3 \times 10^7$ p/cm<sup>2</sup>,山黧豆约  $6.5 \times 10^6$ p/cm<sup>2</sup>,枸杞为  $5 \times 10^6$ p/cm<sup>2</sup>. 其中,小麦出现了一条典型的带抗尾巴的存活曲线,这可能是由于种子在选择、处理和排列过程中出现的不一致造成的. 通过对多靶一次击中数学模型  $S/S_0 = 1 - (1 - e^{-\sigma D})^n$  拟合,由回归分析求得它们的失活截面分别为  $307 \mu m^2$  (相应于 D<sub>50</sub> 为  $5.6 \times 10^5$ p/cm<sup>2</sup>)、 $5.2 \mu m^2$ 、 $1.64 \mu m^2$  和  $18.5 \mu m^2$  (见表 1). 由这些数据可以看到,四种作物种子对 <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子辐射敏感性的顺序是:小麦最敏感,白兰瓜最迟钝,山黧豆和枸杞居中.

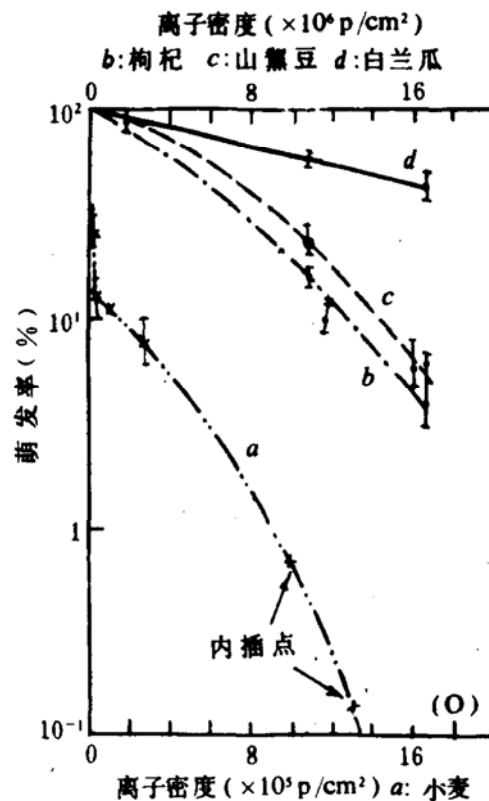


图 1

表 1 46.6MeV/u <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子辐照四种不同种子后萌发率的回归分析

作物品种	$\sigma(\mu\text{m}^2)$	$n$	$r$
山豆	5.2	102	0.999**
白兰瓜	16.4	118	0.995**
枸杞	18.5	118	0.958**
小麦	307(对 $D_{50}=5.6 \times 10^5 \text{p/cm}^2$ )	18.1	0.992**

注释: 回归公式:  $S/S_0 = ne^{-\sigma F}$  ( $\ln y = \ln n - \sigma F$ )  
 $\sigma$ : 失活截面(回归系数)  $n$ : 外推数  
 $r$ : 相关系数 \*\* : 在  $\alpha \leq 0.01$  情况下,  $r$  的显著性.

表 2 <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子对四种不同作物种子的半致死剂量、失活截面和染色体畸变频率

	小麦	山豆	枸杞	白兰瓜
半致死剂量 $D_{50}(\text{p/cm}^2)$	$5.6 \times 10^5$	$6.5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$
失活截面 $\sigma(\mu\text{m}^2)$	307	16.4	18.5	5.2
染色体畸变频率 $f(\%)$ (对照组 $f$ )	2.60~17.98 (0.04)	2.58~7.15 (0.53)	1.34~4.87 (0.15)	0.09~0.26 (0.01)

实验中观察到了, 种子萌发结束后, 小麦胚芽鞘高度, 山豆幼苗高度, 白兰瓜和枸杞主根长度等生长势随 <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子不同剂量的抑制情况, 在小麦生长过程中, 出现过双苗植株.

### 3.3 对呼吸代谢的影响

图 2 展示了枸杞种子在接受了不同剂量后, 对萌发后期(以 212 小时为例)呼吸强度的影响. 由图可见, 各不同剂量受照组呼吸强度均受抑制, 其抑制程度与剂量呈正相关性.

### 3.4 对根尖细胞染色体畸变的影响

<sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子辐照小麦和枸杞后根尖细胞中出现的染色体畸变类型有: 微核、小核、双核、多核、畸形核、核碎裂、桥、断片、染色体粘连、游离染色体与环状染色体等. 文献[4]给出了四种不同作物胚根细胞中染色体畸变频率随

辐照剂量变化的趋势. 四种作物的总畸变率变动于(0.09~17.98)%之间, 超出对照组几倍, 几十倍乃至几百倍. 对 <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 最敏感的是小麦, 最迟钝的是白兰瓜, 枸杞和山豆居中. 在剂量为  $1.08 \times 10^7 \text{p/cm}^2$  时, 微核率分别是: 小麦为 11.88%, 枸杞为 4.66%, 山豆为 1.08%, 白兰瓜为 0. 这个辐射敏感性次序与上面萌发中的顺序是一致的. 畸变频率与剂量呈正相关性, 较为特殊的是, 在剂量  $1.08 \times 10^7 \text{p/cm}^2$  下照射小麦与山豆种子后, 这种畸变频率反而有所下降, 这可能是由于剂量过大, 严重抑制了细胞分裂过程, 降低了细胞分裂指数, 从而减少了细胞分裂过程中再次出现结构变化所致. 见文献[4]中表 2.

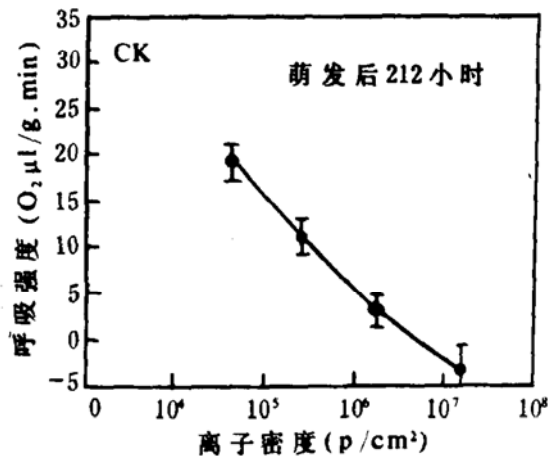


图 2

染色体是遗传物质的载体, 基因直线排列在其上, 染色体结构变异将会导致基因缺失, 重复或重组(倒位或易位), 在表型上就会出现各种突变体, 小麦 M<sub>2</sub> 花粉出现双萌发孔就是突变体的一个代表性例子. 这类突变体一经稳定下来就具有遗传效应, 这说明有可能把重离子束作为一种新的诱变源用于作物辐射育种.

### 3.5 对细胞器结构的影响

<sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子对小麦萌发 3~7 天后胚根和胚芽中细胞器亚显微结构可产生明显的变异, 其中有染色体畸变的微核类型; 线粒体形态异

常、嵴数减少和排列紊乱；叶绿体(质体之一)内基粒发育不良、类囊体数目少及排列稀疏；高尔基体发达、潴泡多、排列紧密、长度增大、小泡体积变大及数量增多；出现特有的指纹状次级溶酶体；淀粉粒变大而明显。

由实验看到的线粒体结构变异，正好说明为什么呼吸强度减小，这反映了测到的生理功能变化与有关细胞器结构的异常相一致。高尔基体发达，正适应细胞内对次级溶酶体的需求，而特有指纹状次级溶酶体的大量产生，正反映细胞内存有大量破损细胞器，并有利于这些残骸的消除和细胞器的更新。这些废弃物的大量产生也说明了重离子轰击细胞的结果。

### 3.6 对 DNA 合成过程的影响

图 3 表示了<sup>12</sup>C<sup>6+</sup>离子照射山豆种子，在萌发中 DNA 合成的动态过程，它表明在种子萌发早期，种胚细胞中存在着 DNA 损伤的修复过程，即非按时 DNA 合成。在低剂量下，非按时合成峰很明显，而在高剂量下，非按时合成峰已消失，甚至按时合成峰也明显低于对照组，这说明细胞已经致死或已接近致死。

尽管重离子作用后，细胞仍有一定的修复能力，但比 X、γ 射线作用后的修复能力要小得多。以  $1.43 \times 10^3 \text{ p/cm}^2$  <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子为例，它虽只能使小麦胚根细胞中染色体畸变频率为 2.6%，但确实严重抑制了种子萌发能力(已达 D<sub>50</sub>)；而相同染色体畸变频率的 X、γ 射线，却

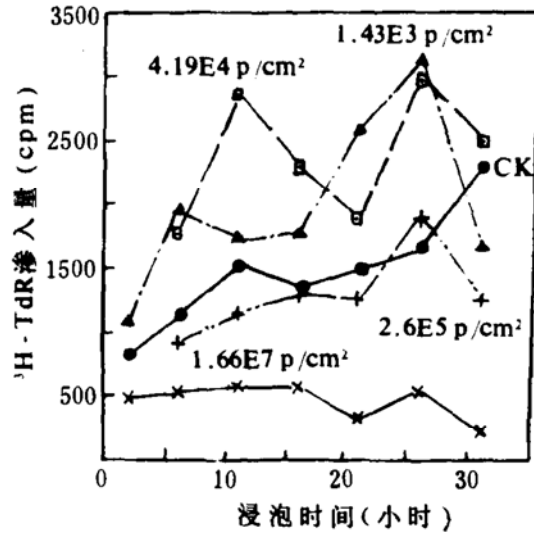


图 3

并不明显抑制小麦种子的发芽率和正常生长发育<sup>[6]</sup>，这可能是因重离子与 X、γ 辐射诱发染色体结构损伤的修复程度不一致的结果。

### 参 考 文 献

- 1 卫增泉. 核物理动态, 1987, 4(3): 22
- 2 卫增泉等. 核技术, 1991, 14(6): 341
- 3 卫增泉等. 核技术, 1991, 14(6): 380
- 4 卫增泉等. 安徽农学院学报, 1991, 18(4): 318
- 5 Bork U, et al. ARABIDOPSIS Information Service, 1985, 22: 57
- 6 王琳清主编. 原子能农业应用(植物突变育种专辑), 1985

## Research into Biological Effects of <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> Ions with 46.6MeV/u on Four Kinds of Plant Seeds

Wei Zengquan   Liu Yuyan   Wang Guiling   Chen Xuebing   Li Huiling

(Institute of Modern Physics, Academia Sinica, Lanzhou 730000)

Yang Hanmin   Wang Lihong   Gao Qingxiang   Wang Chongying   Wang Yafu

(Lanzhou University, Lanzhou 730000)

**Abstract** The biological effects of 46.6MeV/u <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> ions on four kinds of plant seeds were studied at HIRFL of Institute of Modern Physics (IMP), Academia Sinica. The results indicate that serious injuries were presented on not only external features of the seeds but also internal cells (下转 47 页)

段.

采用具有加速能力的重离子冷却储存环和一般的后加速器相比,主要有下列特点:

(1) 储存、加速不稳定奇异核,可使单一的奇异核次级束的强度达  $10^9 \sim 10^{10}$  pps;

(2) 束流在环内可保持  $>10$  小时,即没有产生反应的束流可在环内重复轰击内靶进行实验;

(3) 储存环对原有加速器注入要求较宽,注入时间端存储运行时间,这就减少对原有设备运行状况的依赖.

在这样的装置上可进行各种不阻止束流的内靶实验和瞬间的外靶实验,这无疑是奇异核研究开创核物理研究新纪元的实现.

### 参 考 文 献

- 1 Tanihata I. *Treatise on Heavy Ion Science*, 1989, 8
- 2 Detraz C. *Inter. Nucl. Phys. Conf.*, Brasil 1989, 2: 337 and *Nucl. Astrophys. Problems*, Tokyo 1988, 151
- 3 Mittig W, et al. *Phys. Rev. Lett.*, 1987, 59: 1889
- 4 Shen Wenqing, et al. *Nucl. Phys.*, 1989, A491: 440

## Studies and Progress of Exotic Nuclei with Radioactive Beam at HIRFL

Zhan Wenlong

(*Institute of Modern Physics, Academia Sinica, Lanzhou 730000*)

**Abstract** The researches with Radioactive Nucleon Beam (RNB) at HIRFL is proposed as three stages. 1) Modification of post beam transport line as Projectile Fragmentation (PF) type RNB under construction. 2) High quality (PF) RNB being designed. 3) Storage ring (with accelerating ability) is perspective. Meantime, the progress of 1st stage RNB at HIRFL is described.

**Key Words** radioactive nucleon beam(RNB), projectile fragmentation, storage ring.

(上接 64 页)

due to the bombardment and penetration of the ions. The heavy ions can significantly inhibit germination and growth of the seeds and can affect physiological functions. In root tip cells of irradiated seeds, a great variety of chromosomal aberrations were observed and the aberration frequencies were greatly higher than that of the corresponding controls. Serious damages of some organelles were induced by the ions. Damaged DNA can be repaired to some extent. Median lethal doses and inactivation cross — sections of the four kinds of plant seeds are determined and the differences of radiation sensitivity between different seeds are found. The correlations of organelle damages with abnormal physiological processes and the repairing process of damaged DNA are discussed.

**Key Words** heavy ion, biological effect, radiation sensitivity, chromosomal aberration and frequency, organelle, DNA, damage and repair.