

文章编号: 1007-4627(2007)02-0129-04

MeV 能量离子辐照拟南芥干种子和含水种子存活曲线对比^{*}

梅 韬, 覃怀莉, 薛建明, 王宇钢[#]

(北京大学重离子物理教育部重点实验室, 北京 100871)

摘 要: 离子束辐照植物种子所产生的水自由基对植物种子存活率会有影响, 实验中为了观察这种辐射效应, 采用 6.5 MeV 能量的质子分别辐照拟南芥干种子和含水种子。这个能量点的质子无论对于干种子还是含水种子都可以完全穿透, 减少了因损伤部位不同带来的差异。实验中采用的质子注量从 4×10^9 ions/cm² 到 1×10^{14} ions/cm²。实验结果显示干种子和含水种子存活曲线均成肩形下降趋势, 而且含水种子下降注量点明显低于干种子。这是自由基作用结果。同时在辐射生物学靶学说的基础上, 建立了模型, 通过参数的合理设置, 很好地拟合了实验数据。

关键词: 存活曲线; 含水种子; 靶学说; 自由基; 拟南芥

中图分类号: Q691

文献标识码: A

1 引言

20 世纪 80 年代后期, 中国科学家首先提出了低能离子的生物学效应, 并实现了低能离子的诱变育种。由此引出了低能离子在育种、细胞和微生物的改良以及离子束介导转基因等方向的研究以及应用。通过 20 年的发展, 低能离子的生物学效应已经产生了巨大的社会、经济效益^[1], 并且得到了更多科研工作者的重视。低能离子与传统的辐射方式, 如 X 射线、 γ 射线以及高能离子等相比有不同的特征, 具有较高的能量沉积密度和较浅的穿透深度等。同时低能离子对植物的辐照也显现出它特殊的规律。例如, 马鞍型存活-注量曲线^[2-4], 超长距离穿透^[5-8] 以及高突变率等。但对于低能离子与生物体的物理作用机制目前还不是很清楚。通常由于低能离子辐照实验受限于真空环境, 所以实验所采用的植物种子往往是干种子。但近来的研究表明, 低能离子辐照所产生的生物学效应可能与种胚中的自由基密切相关, 而干种子在离子辐照后所产生的自由基含量远低于含水种子。同时, 由于实验所采用的加速器可以引出外束而不受真空限制, 使含水种子的低能离子辐照成为可能。研究所采用的生物样品为拟南芥。拟南芥作为生物研究的模式材料, 具

有植株个体小、生活周期相对较短以及容易获得大量繁殖群体的特点^[9]。研究采用了 6.5 MeV 能量的质子, 在对拟南芥样品辐照后, 观察干种子和含水种子的存活-注量曲线之间的差异。本文讨论了干种子和含水种子之间存活率-注量曲线之间的差异, 并建立模型拟合了实验结果。

2 实验

实验采用拟南芥 Columbia 生态型种子作为辐照样品。质子辐照实验在北京大学 2×6 MV 串列静电加速器上进行。束流从 6.5 μ m 厚的钛膜制成的真空窗引出。6.5 MeV 质子通过 TRIM 程序^[10] 以水为靶计算出的理论射程是 560 μ m。拟南芥干种子的纵向尺寸约为 400 μ m, 横向尺寸约为 200 μ m; 而饱和和含水种子的纵向尺寸约为 450 μ m, 横向尺寸约为 250 μ m。无论干种子还是含水种子, 6.5 MeV 质子都可以完全穿透种胚。减少了因为损伤区域差异所带来的其它因素的影响。质子注量从 4×10^9 到 1×10^{14} ions/cm², 每个辐照点辐照大约 400 粒种子。

实验中, 干种子先进行辐照再在湿润滤纸上 4 $^{\circ}$ C 环境下春化 3 d 后种到土壤中。而含水种子先放

* 收稿日期: 2007-02-12; 修改日期: 2007-03-08

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10435020)

作者简介: 梅 韬(1984-), 男(汉族), 重庆人, 博士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: meitao97@163.com

通讯联系人: 王宇刚, E-mail: ygwang@pku.edu.cn

在湿润滤纸上在 4 °C 环境下春化 3 d 同时饱和吸水, 再经辐照后种到土壤中。生长环境为 23 °C 恒温, 16 h 光照, 8 h 黑暗。约一个月后, 长出 4—5 片叶的时候开始统计存活率。同时设置对照组。实验数据为两次实验的平均结果。

3 实验结果和讨论

图 1 给出了 6.5 MeV 条件下辐照的两组样品的存活注量曲线。可以看出, 两组样品存活率随注量下降较快。干种子存活曲线在注量达到 6×10^{10} ions/cm² 之后开始迅速下降, 到 5×10^{11} ions/cm² 时存活率已经降为 0。含水种子存活率下降所需注量比干种子低, 在注量为 8×10^9 ions/cm² 之后开始迅速下降, 下降到 3×10^{11} ions/cm² 时, 存活率降为 0。

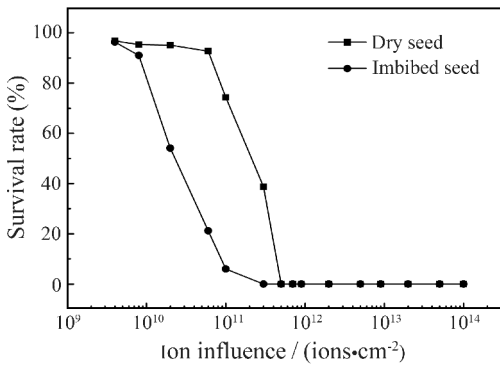


图 1 6.5 MeV 质子辐照结果

干种子和含水种子的横向尺度分别为 200 和 250 μm, 其中茎段端分生组织在离子入射方向距离表皮大约为 100 μm。6.5 MeV 的质子能够穿透整个种胚, 直接损伤到茎端分生组织 (Shoot Apical Meristem, 简称 SAM)。此时的存活曲线呈现肩型下降趋势。根据生物学和辐射生物学的基础理论, SAM 直接关系到植物的生长和遗传, 是胚内最重要的组织区域^[11], 也是对辐射最敏感的生物靶^[12]。SAM 由 10—12 个细胞组成, 当入射离子注量较小时, 离子只是损伤部分 SAM 细胞, 没有被损伤的细胞仍然可以分生出新的细胞, 保证胚生长点的正常功能。因此, 需要一定注量的入射离子才能损伤 SAM 全部或足够多的细胞, 从而使 SAM 完全失去生长点功能^[13]。所以, 当质子注量达到一定值以后, 存活曲线会呈现肩型下降趋势。

在 6.5 MeV 条件下含水种子的存活率在不为

0 处普遍低于干种子。6.5 MeV 质子的理论射程为 560 μm, 无论干种子还是含水种子, 损伤区域均为整个种胚。在这样的条件下种子的体积差异和离子的射程差异都不明显, 所以离子的损伤截面差异是引起存活率差异的主要原因。我们认为, 含水种子除了离子直接与生物分子作用以外, 还会产生大量的自由基, 通过自由基与生物分子发生相互作用^[14]。干种子中也会产生自由基, 但含水种子中所产生的自由基数量远多于干种子。而自由基的产生加大了离子的损伤截面, 所以含水种子产生大量细胞损伤所需的质子注量相对干种子而言要更低。

4 模型

在辐射生物学常用的靶学说的基础上, 我们对实验结果做了相应的理论推导来拟合实验数据。

根据辐射生物学的观点^[14], 细胞被粒子击中的概率符合泊松分布, 设细胞靶体积为 V_1 , 粒子注量为 D , 则根据泊松分布细胞被击中 n 次的概率为

$$P[n] = \frac{(V_1 D)^n}{n!} e^{-V_1 D}. \quad (1)$$

细胞要经受 n 次击中以上才会造成细胞死亡, 所以细胞的存活率为

$$S = P[0] + P[1] + P[2] + P[3] + \dots, \quad (2)$$

即
$$S = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(V_1 D)^k}{k!} e^{-V_1 D}, \quad (3)$$

则细胞死亡率为

$$W = 1 - S. \quad (4)$$

在这里设组织死亡的细胞数阈值为 m , 即当死亡细胞数小于 m 时, 组织可以自我修复; 一旦死亡细胞数大于 m , 则组织无法修复, 而造成组织死亡。设组织细胞总数为 M , 则单细胞按照 W 的死亡率, 造成组织死亡, 乃至种子死亡的几率有以下关系:

$$p = 1 - \sum_{i=1}^m C_{15}^i W^i (1 - W)^{1-i}. \quad (5)$$

同时, 根据实验观察, 我们认为在 SAM 周围存在次靶概念^[15]。即当粒子没有击中 SAM 时, 也会有一定的损伤信号传导, 造成种子死亡, 并且影响随注量增大而增强。设这一项满足:

$$s' = e^{-\gamma V_2 D}, \quad (6)$$

这项可能与种子内的次靶概念有关。设 V_2 是次靶体积。γ 是一关于信号传导的系数, 这一系数因种

子干湿不同。同时对含水种子, 因为水自由基的作用, 其损伤效果比干种子严重, 以及含水种子靶体积比干种子大。综合这些因素, 我们设定一损伤系数 l_1 , 对于主靶和次靶, 损伤系数应该一致。

$$s' = e^{-\gamma l_1 V_2 D}, \quad (7)$$

则综合总存活率以上关系, 有

$$S = s'(1 - p)。$$

含水种子的主靶体积本身要大于干种子, 所以其主靶体积为 $V_1 l_1$ 。公式整理为

$$S = e^{-\gamma V_2 l_1 D} \sum_{i=1}^m C_{15}^i \left(1 - \sum_{k=0}^N \frac{(V_1 l D)^k}{k!} e^{-V_1 l D} \right)^i \cdot \left(\sum_{k=0}^N \frac{(V_1 l D)^k}{k!} e^{-V_1 l D} \right)^{1-i}。 \quad (8)$$

在计算中, 所用参数解释及具体数值设置如下: D 为入射粒子剂量; V_1 为拟南芥 SAM 中单细胞的靶体积, 约为 $2.64 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$; γV_2 为与次靶的靶体积成正比的数值, 其中 γ 为系数, 与作用方式有关。拟合中, 干种子取 $\gamma V_2 = 1.045 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$, 含水种子取 $\gamma V_2 = 3.13 \times 10^{-10} \text{ l}_1 \text{ cm}^2$, 其中 l_1 为自由基损伤作用系数, 同时对于系数 γ 也有关系(拟合中取 $l_1 = 3$); N 为造成细胞死亡所接受的粒子数(拟合中取 $N = 80\,000$); m 为 SAM 中能造成组织无法修复的死亡细胞数上限(拟合中取 $m = 8$)。

我们发现拟合中的含水种子的靶体积参数比干种子靶体积参数大, 而含水种子的自由基作用效果大于干种子。综合起来, 离子在含水种子中的损伤效果大约比在干种子中的大 3 倍。这个结果我们认为比较合理。拟合出的图象如图 2 所示。

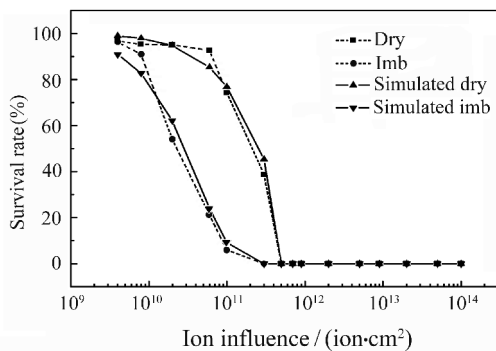


图 2 理论模型拟合曲线和实验曲线的比较

● 和 ■ 两条曲线为图 1 中的实验曲线。

5 结论

通过实验, 我们认为虽然含水种子的体积大于干种子, 但在完全穿透的条件下, 含水种子中生成的自由基对生物体的间接作用造成的损伤大于干种子中的损伤。同时, 通过建立模型, 拟合实验曲线, 我们也证实了这种观点。

致谢 作者感谢北京大学重离子物理研究所提供辐照条件的老师。同时也感谢北京大学生命科学学院的顾红雅教授等老师, 他们为实验中生物样品的培养提供了方便。

参考文献 (References):

[1] Yu Z L. Physics, 1999, **26**: 333(in Chinese). (余增亮. 物理, 1999, **26**: 333.)

[2] Chen R L, Song D J, Li Y F, *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 2002, **11**: 75(in Chinese). (陈若雷, 宋道军, 李玉峰等. 激光生物学报, 2002, **11**: 75.)

[3] Song D J, Yao J M, Shao C L, *et al.* Nuclear Techniques, 1999, **22**: 129(in Chinese). (宋道军, 姚建铭, 劭春林等. 核技术, 1999, **22**: 129.)

[4] Yu Z L, Shao Cunlin. Radiation Phys Chem, 1994, **43**: 349.

[5] Vilaithong T, Yu L D, Alisi C. Surface and Coatings Technology, 2000, **128**: 133-459.

[6] Xue J M, Wang Y G, Yan S, *et al.* Radiation Effects & Defects in Solids, 2002, **157**: 459.

[7] Xie J W, Zhou H Y, Wang P, *et al.* Acta Physical Sinica, 2003, **52**: 2 530(in Chinese). (谢竞祚, 周宏余, 王平等. 物理学报, 2003, **52**: 2 530.)

[8] Lu T, Zhou H Y, Ding X J, *et al.* Acta Physical Sinica, 2005, **54**: 4 822(in Chinese). (陆挺, 周宏余, 丁晓纪等. 物理学报, 2005, **54**: 4 822.)

[9] Ottoline Leyser, Stephen Day. Mechanisms in Plant Development. Malden: Blackwell Publishing, 2003, 180—182.

[10] Ziegler J F, Biesack J P, Littmark U. Stopping and Range of Ions in Solids. New York: Pergamon Press, 1985, 22—35.

[11] Berg Van den, Willemsen C, Hage V, *et al.* Nature, 1995, **378**: 62.

[12] Kranz A R, Bork U, Bucker H, *et al.* Nuclear Tracks and Radiation Measurement, 1990, **17**: 155.

[13] Shikazono N, Tanaka A, Kitayama S, *et al.* Radiat Environ Biophys, 2002, **41**: 159.

[14] Qiu Guanyin, Peng Yinxiang. Biophysics. Wuhan: Wuhan University Press, 2000, 173—186(in Chinese). (丘冠英, 彭银祥. 生物物理学. 武汉: 武汉大学出版社, 2000, 173—186.)

- [15] Qin Huaili, Xue Jianming, Lai Jiangnan, *et al.* Acta Physica Sinica, 2006, **55**: 5 991(in Chinese). (覃怀莉, 薛建明, 赖江南等. 物理学报, 2006, **55**: 5 991.)

Contrast of Dry and Water-saturated Arabidopsis Seeds Irradiated by MeV Energy Ions^{*}

MEI Tao, QIN Huai-li, XUE Jian-ming, WANG Yu-gang[#]

(Key Laboratory of Heavy Ion Physics, Ministry of Education, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: The dry and water-saturated seeds of *Arabidopsis thaliana* were irradiated by H^+ ions with 6.5 MeV in atmosphere. The ion fluence used in this experiment was in the range of $4 \times 10^9 - 1 \times 10^{14}$ ions/cm². According to the structure of the seed and TRIM simulation, the ions with the energy of 6.5 MeV can penetrate the whole seed. The experiment shows that the fluence-response curves for the dry seeds and water-saturated seeds had distinct shoulders and reduced rapidly. The experimental results show that the water-imbibed seeds were more sensitive than the dry seeds and the reason is from free radicals reaction. A model has been constructed, and primely simulates the experiment data.

Key words: survival-curve; water-saturated seed; target theory; radical; arabidopsis

* Received date: 12 Feb. 2007; Revised date: 8 Mar. 2007

* Foundation item: National Natural Science Foundation of China(10435020)

Corresponding author: Wang Yu-gang, E-mail: ygwang@pku.edu.cn