

加速重离子辐射对水稻的 生物学效应研究

I. 加速重离子及 ^{60}Co γ 射线辐照水稻干 种子的当代生物学效应

刘振声 丘泉发 黄文忠

(中山大学, 广州)

梅曼彤

T.C.H. Yang

(华南农业大学, 广州)

(加州大学劳伦斯伯克莱研究所, 美国)

摘要 用高传能线密度(LET)的 ^{56}Fe (190 keV/ μ)、 ^{40}Ar (90 keV/ μ)离子束及低LET的 ^{60}Co γ 射线(0.27 keV/ μ)照射水稻干种子, 对当代幼苗生长、根尖微核细胞率和染色体畸变率的效应, 进行了实验分析。结果表明: 对比三种辐射源, 微核细胞率与染色体畸变率均随处理剂量增加而增加, 且呈线性关系。以幼苗的生长半抑制剂量(D_{50})为指标, 三种电离辐射(^{56}Fe 、 ^{40}Ar 离子束和 ^{60}Co γ 射线)的相对生物学效应(RBE)比值为6.3:1.9:1。以微核细胞率为指标, 三者的RBE比较值为11:4:1。可见高LET的 ^{56}Fe 和 ^{40}Ar 比低LET的 ^{60}Co 有较高的辐射生物学效应, 尤其是在诱发细胞核染色体畸变和微核出现方面, 高LET离子束有很高的效率。

关键词 重离子, ^{60}Co γ 射线, 相对生物学效应, 水稻种子

电离辐射对植物生理损伤及遗传性状变异的研究, 有大量的工作^[1-3]。但过去工作所用的外照射源多为低LET的X射线和 γ 射线, 使用低LET电离辐射诱发植物突变, 需要的剂量较高, 产生较严重的生理损伤, 且突变频率较低。

近二十年来, 随着加速器技术的发展, 已能从一些大型加速器获得各种具不同LET的高能量的重离子束, 并用于处理生物样品。有关研究指出, LET介于20—200 keV/ μ 的高能重离子束较之低LET的 γ 或X射线, 对酵母和哺乳动物细胞诱发突变的效率较高^[4,5]。在高等植物方面, Freeling等(1970)^[6]用高能的氦离子束及X射线处理玉米雄穗, Yang(1979)等^[7]用高能氧离子束及X射线处理玉米种子, 梅曼彤等(1987)^[8]用氦、氩、铁离子束及 ^{60}Co γ 射线处理玉米种子。他们的研究结果表明, 用相同的抑制生长的剂量处理, 上述各种高LET重离子束诱发玉米性状变异的效应均明显大于X射线及 γ 射线。

辐射处理植物种子的当代生理损伤和遗传突变频率有一定的关系; 在诱变育种研究中, 这类损伤的定量分析已作为考察新诱变源的常规内容(IAEA 1977)^[9]。为探讨加速器重离子辐射作为一种新诱变源在作物诱变育种中应用的可能性, 本文以水稻干种子为材料, 用各种剂量的 ^{56}Fe 、

* 本课题为国家自然科学基金资助项目

^{40}Ar 重离子束及 ^{60}Co γ 射线辐照处理, 以幼苗生长量及微核细胞率和染色体畸变率为辐射生物学效应指标, 比较不同 LET 辐射对水稻干种子诱变效应的大小以及剂量关系, 为重离子辐射对水稻诱变效应及其在育种上的应用研究提供资料及依据。

材 料 和 方 法

所用水稻品种为南方早籼“边皮占”和“银丹红”, 种子含水量为 14.3%, 系由华南农业大学提供的新鲜种子。

(1) 辐照处理 1988 年 12 月在美国加州大学劳伦斯伯克莱研究所 (Lawrence Berkeley Lab.) 的大型加速器组合 (Bevalac) 以高能氩 (^{40}Ar) 和铁 (^{56}Fe) 离子束对水稻干种子作照射处理; ^{60}Co γ 射线照射处理水稻种子于 1989 年 2 月在华南农业大学广东辐照中心进行。各种辐照处理的物理参数见表 1。

Tab 1. Physical parameters of various radiations

Radiation type	Energy	LET (keV/ μ)	Dose (Gy)	Dose rate (Gy/min)
^{60}Co γ -ray	1.17 MeV	0.27	151.2	2.62
			248.4	
			314.4	
			351.1	
			450.6	
^{40}Ar heavy ions	570 MeV/ μ	90	60	3.50
			90	
			120	
			150	
^{56}Fe heavy ions	600 MeV/ μ	190	40	0.50
			65	
			95	
			125	

受照射处理后的水稻种子于塑料袋内常温下保存, 于 1989 年 3 月同时浸种发芽。

(2) 幼苗生长量观察 每处理组及对照组分别用 20 粒萌动种子 (经浸种 2 d), 放入培养皿湿滤纸上, 于自然光照和室温 25℃ 下生长, 于苗龄 7 d 测量各组幼苗的平均高度和总干重, 以对照组为 100%, 各处理组分别与对照组的百分数作为相对生长量指标。

(3) 细胞学观察 实验各组分别取根长约 1 cm 的水稻幼苗。取根尖, 用 Carnoy 氏液固定 2h, 清洗, 转入 75% 酒精于 4℃ 冰箱内过夜, 用 1 mol/dm³ HCl 溶液在 60℃ 水解 10 min, 用 Shieff 氏试剂染色 1 h, 压碎法制片^[10], 在显微镜下至少观察 10 个根尖, 20 个视野, 共约 2000 个细胞, 统计微核细胞数和染色体畸变细胞数, 计算微核细胞率和染色体畸变率 (均以 % 表示)。并以最小二乘法对结果进行回归分析。

试 验 结 果

1. 三种电离辐射对水稻苗期生长抑制效应

试验结果表明, 不同辐射处理后, “边皮占” 种子发芽率均略有降低 (为对照的 80%—92%), 而

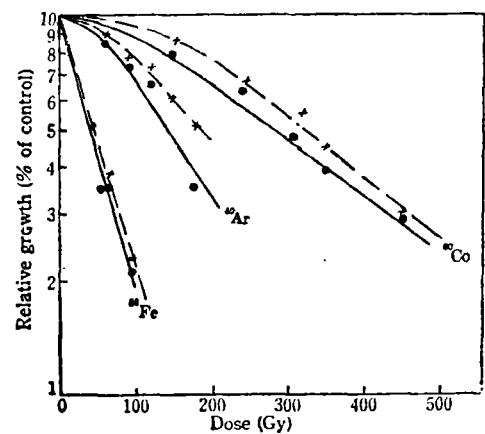


Fig 1. Growth curves of dried rice seeds for two varieties, “bian pi zhan” and “yin dan hong” irradiated with ^{60}Co γ -ray and ^{56}Fe , ^{40}Ar heavy ions
● bian pi zhan × yin dan hong

Tab 2. RBE for relative growth percentage, micronuclear cell rate and chromosome aberration rate or rice irradiated with various types of radiation at the first generation

Radiation type	LET (keV/ μ)	Rice variety	Relative growth	Micronuclear cell rate	Chromosome aberration rate
^{60}Co γ ray	0.27	Bian pi zhan	1	1	1
		Yin dan hong	1	1	1
^{40}Ar heavy ions	90	Bian pi zhan	2.0	4.3	3.3
		Yin dan hong	1.8	3.7	2.9
^{56}Fe heavy ions	190	Bian pi zhan	6.5	11.3	4.2
		Yin dan hong	6.1	10.8	4.0

RBE for relative growth was determined at the D_{50} level

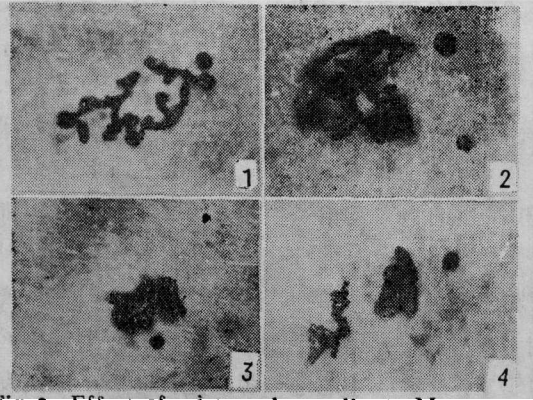


Fig 2. Effect of micronuclear cell; (1) Mono-micronucleus in metaphase (2) Twin micronucleus cell (3,4) Monomicronucleus

“银丹红”种子发芽率降低不明显，且三种辐射处理对两种水稻发芽率的剂量作用无相关性。

以 7 d 苗龄的水稻幼苗 20 株平均株高为指标，各处理组占对照组的百分数(对照为 100%)为相对生长量(Y)，对剂量(D)的半对数图，为剂量生长效应曲线(见图 1)。

从图 1 可见，低 LET 的 ^{60}Co γ 射线处理的剂量效应曲线为典型带“肩”区的曲线，且其直线部分斜率较小，与有关文献报道相近^[11]。而高 LET 的 ^{56}Fe 离子束处理，随着剂量增加，相对生长量直线下降，无“肩”区存在。 ^{40}Ar 离子束的 LET 介于上述两者之间，其剂量效应曲线存有小的“肩”区，直线部分的斜率介于上述两者之间。两个水稻品种间表现同一规律，但“边皮占”品种对三种辐射均较“银丹红”品种略为敏感些。

^{56}Fe 、 ^{40}Ar 离子束和 ^{60}Co γ 射线对“边皮占”种子生长的半抑制剂量 (D_{50}) 分别是 40 Gy、140 Gy 和 280 Gy；而对“银丹红”种子生长的 D_{50} 分别为 45 Gy、180 Gy 和 325 Gy。由此计算出 ^{56}Fe 、 ^{40}Ar 离子束和 ^{60}Co γ 射线三者的相对生物学效应(RBE)值见表 2。

2. 三种电离辐射对水稻当代细胞生物学效应比较

(1) 诱发微核形成 观察受不同辐射处理的水稻幼苗根尖细胞，发现微核形成较对照组(未受照射)明显增多。带微核的细胞中，有单

Tab 3. Analysis of regression and correlation of various irradiation on micronucleated cell rate in root tip of rice seeds

Radiation type	Rice variety	Regression coefficient	Regression equation ($Y = \text{micronuclear cell rate}, X = \text{Dose}$)	Correlation coefficient	P value
^{60}Co γ rays	Yin dan hong	0.0163	$Y = -0.0641 + 0.0163 x$	0.9865	<0.01
	Bian pi zhan	0.0171	$Y = 0.0216 + 0.0171 x$	0.9842	<0.01
^{40}Ar heavy ions	Yin dan hong	0.0617	$Y = -0.0729 + 0.0617 x$	0.9836	<0.05
	Bian pi zhan	0.0617	$Y = 0.1147 + 0.0617 x$	0.9836	<0.05
^{56}Fe heavy ions	Yin dan hong	0.1456	$Y = 0.1123 + 0.1456 x$	0.9998	<0.05
	Bian pi zhan	0.1485	$Y = 0.1763 + 0.1585 x$	0.9999	<0.05

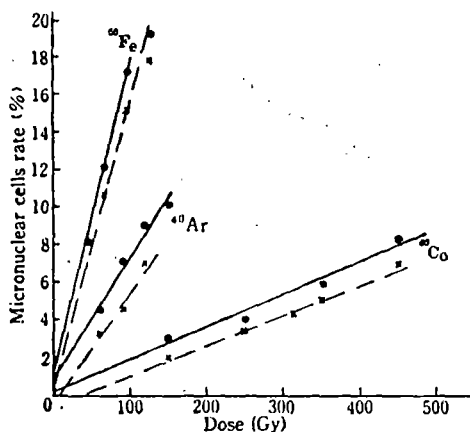


Fig 3. Dose response curves for ^{60}Co γ -rays and ^{56}Fe , ^{40}Ar heavy ions in inducing micronuclear cells in root tips of rice seeds of two varieties, "bian pi zhan" and "yin dan hong"
● bian pi zhan × yin dan hong

微核、双微核，乃至多微核，而以单微核出现较多(见图2中1—4)。微核多见于间期细胞，但也有出现于分裂前后各时期，且其大小差别较悬殊。

统计各种类型辐射不同剂量处理组的微核细胞率，并以最小二乘法对其与剂量关系进行回归分析，得线性回归方程(见表3)，检验表明回归相关性显著。

据表3回归方程及实测值作出微核细胞率和剂量的关系曲线(见图3)。从图3可见， ^{56}Fe 离子束较之 ^{60}Co 射线更有效地诱发微核形成， ^{40}Ar 离子束的诱发微核形成的能力介于两者之间；且“边皮占”种子较“银丹红”种子微核发生率高，这些规律类似于生长抑制效应。这说明在产生同样的生长作用剂量下， ^{56}Fe 及 ^{40}Ar 离子束比 ^{60}Co 射线诱发更多微核细胞。

(2) 诱发染色体畸变 三种辐射的各种剂量处理，均看到诱发水稻根尖染色体畸变的现象，包括出现染色体桥(单桥或双桥)、染色体断片和落后染色体等，如图4中的5—8所示。

三种辐射对两个品种水稻根尖细胞染色体畸变率的剂量关系，通过回归相关分析所得的结果见图5，相应的三种辐射的RBE值列于表2。

从表2和图5可见，在诱发染色体畸变方面，和微核细胞率及相对生长量有类似的规律，即 ^{56}Fe 离子束诱发的效应大于 ^{40}Ar 离子束，后者又大于 ^{60}Co 射线，且“边皮占”种子较“银丹红”种子敏感些。 ^{40}Ar 离子束诱发染色体畸变和诱发微核发生这两种指标的RBE比较接近，但 ^{56}Fe 离子束诱发染色体畸变的RBE值低于诱发微核细胞的RBE值。鉴于水稻染色体畸变的观察难度较大，而且畸变率和细胞所处时期有关，需要作更多的观察分析，才能进一步确定 ^{56}Fe 离子束诱发染色体畸变的能力。

三种辐射诱发染色体畸变和诱发微核细胞出现，这两种指标，通过回归相关分析也表明它们

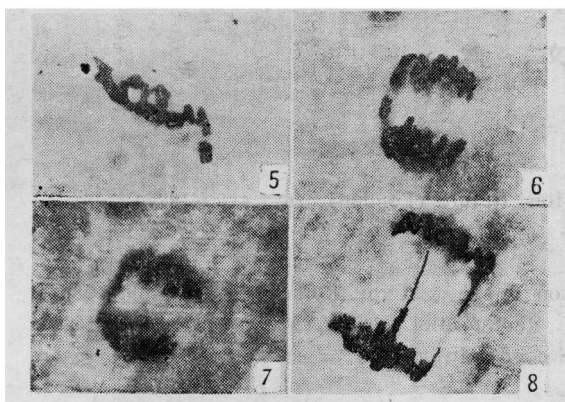


Fig 4. Effect of chromosome aberration:
(5)Chromosomal fragment (6)Backward chromosome (7)Single bridge (8)Twin bridge

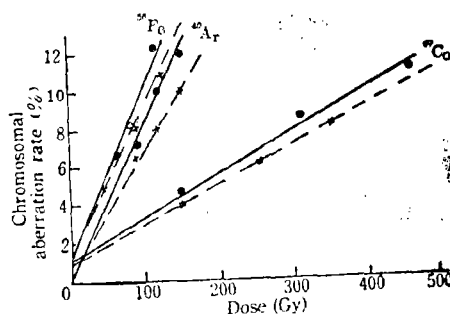


Fig 5. Dose response curves for ^{60}Co γ ray and ^{56}Fe , ^{40}Ar heavy ions in inducing chromosomal aberration in root tips of rice seeds of two varieties "bian pi zhan" and "yin dan hong"
● bian pi zhan × yin dan hong

呈显著的线性正相关,这与其他作者用低 LET 电离辐射研究的结果基本相符^[8-8]。

讨 论

植物种子受辐照后,降低苗期生长的效应,已成为检定辐射源对植物的生理损伤的指标之一。本工作除了在试验结果中用幼苗平均株高作为相对生长量指标以外,也用幼苗总干重作为生长量指标,两个指标的剂量效应关系的规律性完全相似,即高 LET 电离辐射有较高的抑制苗期生长的效应。

不同电离辐射对水稻生长的剂量效应曲线,表现为随着 LET 的增高而生长曲线的“肩”区缩小,乃至消失,类似于这些重离子对哺乳动物细胞的存活曲线^[12]。这似乎提示高 LET 的重离子束对植物的损伤机理也有可能类似于其对动物细胞的损伤作用;如引起较多的 DNA 分子双链断裂,从而与低 LET 的光子辐射主要使细胞 DNA 单链断裂有所区别。

植物种子受照射后,幼苗根尖细胞及成龄植株的花粉母细胞中出现微核及染色体畸变,并且微核细胞率和染色体畸变率有一定的相关性^[3,5,13]。由于对微核的观察较简易可行,所以有作者推荐用微核细胞率作为测定辐射敏感性的指标。重离子辐射处理水稻种子诱发微核出现的工作,国内外报道很少。本工作系基于 1988 年和 1989 年的试验,两年所获的结果相似,即高 LET 重离子束诱发微核细胞率高于低 LET 的 γ 射线。因此进一步说明,微核细胞率可作为判断不同类型电离辐射的损伤效应的有用指标。

按本文结果,高 LET 辐射诱发微核细胞率的效应远大于诱发生长受抑制的效应,前一种指标的 RBE 值可为后一种指标的 RBE 值的近 2 倍(见表 2),这就说明,高 LET 辐射对细胞核损伤的高效率。前已指出,微核细胞率与染色体畸变率有一定的相关,但是否与后代突变率相关?华南农业大学自 1987 年以来进行了 ^{40}Ar 重离子束对水稻诱变效应的研究,初步结果说明该离子束诱发突变率较高(结果待发表)。几种不同 LET 辐射诱发水稻突变的研究正在该校进行,试验结果将有助于了解微核细胞率、染色体畸变率与后代突变频率的关系。

参 考 文 献

- [1] 王琳清, 原子能农业译丛, (3), 1 (1984)。
[2] 顾瑞琦, 植物生理学通讯, (5), 1 (1981)。
[3] 郭宝江, 李淑娴, 植物学报, 26 (2), 134 (1984)。
[4] R. Cox, J. Thaker, D. Goodhead and R. J. Munfon, *Nature (London)*, 267, 425 (1977)。
[5] T. H. Ma, *Envlr. and Expt. Botany*, 20(2), 169 (1980)。
[6] T. H. Ma, *Mutat. Res.*, 64, 307 (1978)。
[7] T. H. Ma, Jr. G. J. Kontos and Van A. Anderson, *Envlr. & Expt. Botany*, 20(2), 169 (1980)。
[8] M. T. Mei, L. M. Craise and T. C. Yang, *Int. J. Radiat. Biol.*, 50(2), 213 (1986)。
[9] FAO & IAEA, *Manual of Mutation Breeding (Second Edition)*, 1977, 87-95。
[10] 刘振声, 李淑娴, 植物生理学通讯, (3), 42 (1987)。
[11] 丘冠英, 冯胜彦, 朱天才, 柳益明, 原子能农业应用, (3), 10 (1983)。
[12] T. C. Yang and C. A. Tobias, *Proc. of Gamma Field Symposia No. 18 "Crop Improvement by Induced Mutation"*, Japan, 1979, 141-153。
[13] 陶舜华, 张伯林, 原子能农业应用, (4), 1 (1984)。

(稿件收到日期: 1990年3月1日)

STUDY OF BIOLOGICAL EFFECTS OF ACCELERATED HEAVY IONS IRRADIATION ON RICES I. BIOLOGICAL EFFECTS OF HEAVY IONS IRRADIATION ON RICE SEEDS AT THE FIRST GENERATION

Liu Zhensheng, Qiu Quanfa, Huang Wenzhong

(Zhongshan University, Guangzhou)

Mei Mantong

(South China Agricultural University, Guangzhou)

T. C. H. Yang

(Lawrence Berkeley Laboratory, University of California, Berkeley, USA)

ABSTRACT The dried rice seeds were irradiated with accelerated ^{56}Fe , ^{40}Ar ions beams, or ^{60}Co γ -rays at various doses and the effects on seeding growth, as well as micronuclei and chromosome aberration induction were observed. The results indicated that the seeding height reduction, frequency of micronucleated cells and frequency of chromosome aberrations all appeared to dose dependent for these three types of radiation. The RBE value for seeding height reduction, determined at fifty percent of height inhibition level, was found to be about 6.3, 1.9 and 1 for ^{56}Fe , ^{40}Ar and ^{60}Co γ -ray respectively. However, the RBE values for the frequency of micronucleated cells were about 11, 4 and 1 for ^{56}Fe , ^{40}Ar particles, and ^{60}Co γ -ray. It appeared that the effectiveness of high LET radiation in inducing biological effects at the first generation was higher than that of low LET radiation, especially in inducing the micronuclei formation.

KEYWORDS Heavy ions, ^{60}Co γ -ray, RBE, Rice seeds