

纳秒级强脉冲电子束与 Ar^+ 离子束辐照作物种子后自由基产额的变化

高清祥 王 勇 杨汉民

(兰州大学生物系, 兰州 730000)

江兴流 宋志敏

(兰州大学现代物理系, 兰州 730000)

摘要 应用多极板放电室产生的纳秒级强脉冲电子束与 Ar^+ 离子束辐照蕃茄、黄瓜、辣椒和小麦的种子, 分别测定辐照种子中的自由基产额, 统计胚根根尖细胞中的染色体畸变频率和种子的萌发能力, 藉以比较两种不同脉冲处理的辐照效果。实验发现: 辐照处理时间的长短与自由基产额、染色体畸变率以及种子的萌发能力密切相关。辐照处理时间长, 自由基产额高, 染色体畸变率高, 萌发生长能力低。四种作物种子的重复实验证明, 电子脉冲的辐射效应明显强于 Ar^+ 离子脉冲。

关键词 自由基, 电子束, Ar^+ 离子束, 辐照效应, 蕃茄, 辣椒, 黄瓜, 小麦

近年来, 作物低能重离子注入诱变的实验研究正受到国内学者的广泛关注^[1,2], 在理论研究和实际应用方面已经取得了良好的进展^[1], 但是由于低能重离子的穿透能力极为有限, 难以直接进入种胚深层^[3], 因此诱变机理仍不十分清楚。为了弥补低能重离子穿透能力的不足, 本研究应用多极板火花放电室产生的纳秒级强脉冲电子束与 Ar^+ 离子束^[4,5], 辐照四种不同作物的种子, 测定辐照种子中的自由基产额, 统计胚根根尖细胞中的染色体畸变频率和种子的萌发能力, 比较两种不同脉冲处理的辐照效果。

1 材 料 与 方 法

1.1 材料

蕃茄、辣椒、黄瓜及小麦四种作物的种子。

1.2 脉冲辐照处理

脉冲辐照处理作物种子在兰州大学现代物理系加速器实验室进行。供试种子用双面胶片贴于 $\phi 2.5 \text{ cm}$ 的圆形靶托上, 然后放入多极板放电室内, 靶托以 3 r/min 的速度旋转, 以改善辐照的均匀度。放电室通入 10 Pa/m^2 左右的氩(Ar)气, 在直流负高压作用下, 产生的纳秒级强脉冲电子束与氩离子束用于辐照处理^[4,5]。辐照条件为: 粒子能量 $46 \sim 49 \text{ keV}$, 电流密度 10^4 A/cm^2 , 脉冲宽度 50 ns , 脉冲频率 $120/\text{min}$, 辐照剂量的大小以处理时间的长短来控制, 脉冲辐照时间分为 20 、 30 、 40 、 45 、 60 和 90 min 6 个组。

1.3 自由基产额的测定

辐照后的种子取相同数目并称重后装入测试管内。蕃茄、辣椒种子每管装 15 粒; 黄瓜种子每管 10 粒切碎装入; 小麦种子 15 粒, 切取种子 $1/3$ 处的种胚部分装入。装入的样品保持密度相

近,然后在电子顺磁共振(EPR)波谱仪(BRUKER ER 200 D—SRC)上测试自由基信号幅度,重复5~6次,每次测试条件保持相同,测试条件为:微波频率9.7 GHz,微波功率32.7 mW, $g=2.0049$,自由基产额用信号振幅高度(cm)表示。

1.4 种子萌发生长实验

取蕃茄种子60粒,分两批在培养皿中25℃下萌发,按常规方法测定发芽率和发芽势,用株高平均高度(cm)代表生长势。

1.5 细胞学观察

从10个萌发的小麦种子上切取主根根尖,经卡诺氏(Carnoy's)固定液固定和改良苯酚品红染色液染色,压碎法制片后进行显微观察,对每一处理组各观察10个根尖的 1×10^4 个细胞,计数有染色体畸变的细胞,计算染色体畸变频率。

2 实验结果

2.1 电子束与 Ar^+ 离子束辐照蕃茄种子的自由基产额

为比较不同剂量和两种脉冲辐照处理的效果,测定了电子脉冲与离子脉冲辐照后蕃茄种子中的自由基产额,结果如表1所示。

经电子脉冲与 Ar^+ 离子脉冲辐照后,蕃茄种子中EPR信号普遍增高。其中 Ar^+ 离子处理组EPR信号幅度增加了10.5%~33.3%,而电子脉冲组增加了90.3%~106.7%。电子脉冲的辐照效果明显强于离子脉冲。同时自由基产额与辐照时间(剂量)有关,时间增长(剂量增加)产额增加率也相应提高。

Tab 1. Amplitude of EPR signal in tomato seeds irradiated by pulsed electron beam and ion beam

Irradiation type	Time of irradiation/min	Amplitude of EPR signal $\bar{x} \pm s/cm$	$S\bar{x}/cm$	Relative increasing rate of amplitude of EPR signal/%
Control	0	7.90 ± 0.20	0.12	0.0
	20	8.73 ± 0.70	0.41	10.5
Ion beam	40	8.13 ± 0.40	0.23	2.9
	60	10.53 ± 0.40	0.23	33.3
Electron beam	20	15.03 ± 0.45	0.26	90.3
	40	15.70 ± 0.62	0.36	98.7
	60	16.33 ± 0.50	0.29	106.7

2.2 电子束与 Ar^+ 离子束脉冲辐照效应在其它三种作物种子上的验证

蕃茄、黄瓜、辣椒及小麦种子的实验结果见表2。

从自由基信号幅度增加率看,四种不同作物种子对于两种不同脉冲辐照的反应虽有较大差异,但可明显看出和辐照蕃茄种子一样,电子脉冲的辐照效应大于离子脉冲。电子脉冲辐照60 min后,黄瓜、辣椒、蕃茄和小麦种子中自由基信号强度的增加率分别为249.8%、201.4%、106.7%和86.0%;而离子脉冲辐照60 min后,它们的自由基信号增长率分别只有21.1%、31.4%、33.3%和2.3%。

2.3 辐照种子中的自由基产额与萌发能力间的相关性

生物体受到辐照后可产生自由基,它是生物组织中的重要产物,在辐射损伤的间接作用中起

Tab 2. Amplitude of EPR signal in cucumber, hop pepper, tomato and wheat seeds irradiated

Plant species	Irradiation type	Time of irradiation /min	Amplitude of EPR signal $\bar{x} \pm s$ /cm	S $\bar{x}$ /cm	Relative increasing rate of amplitude of EPR signal/%
Cucumber seeds	Control	0	9.50±0.26	0.15	0.0
	Ion beam	60	11.50±0.50	0.32	21.1
	Electron beam	60	33.23±0.65	0.38	249.8
Hot pepper seeds	Control	0	5.63±0.32	0.19	0.0
	Ion beam	60	7.40±0.36	0.21	31.4
	Electron beam	60	16.97±0.57	0.33	201.4
Tomato seeds	Control	0	7.90±0.20	0.12	0.0
	Ion beam	60	10.53±0.40	0.23	33.3
	Electron beam	60	16.33±0.50	0.29	106.7
Wheat seeds	Control	0	6.13±0.21	0.12	0.0
	Ion beam	60	6.27±0.35	0.20	2.3
	Electron beam	60	11.40±0.53	0.31	86.0

Tab 3. Amplitude of EPR signal and germinating ability of tomato seeds irradiated

Irradiation type	Time of irradiation/min	Reletive amplitude of EPR signal/%	Reletive germinating rate/%	Reletive growing power/%
Control	0	100.0	100.0	100.0
Ion beam	45	98.3	93.8	103.4
	90	158.4	88.3	82.4
Electron beam	45	252.4	64.6	33.1
	90	449.2	48.9	16.0

重要作用。为此，进一步研究了两种脉冲辐照后蕃茄种子中的自由基产额与种子萌发能力之间的相关性，结果由表 3 看出，蕃茄种子的萌发能力随自由基产额的增高而降低，自由基产额越高，萌发能力越低，两者呈负相关性。

2.4 小麦种子脉冲辐照后的染色体畸变率

因小麦与其他三种作物相比，具有细胞大，染色效果好，染色体畸变易于鉴别的特点，所以选择其为观察染色体畸变的材料，结果由表 4 可见，纳秒级强脉冲辐照小麦种子后的染色体畸变率，随着剂量的增大而显著增大。其中离子束脉冲辐照后，染色体畸变率由 0.7‰增加大 0.9‰~8.3%，1.29~11.9 倍；电子脉冲辐照后，染色体畸变率由 0.7‰增加到 2.1‰~52.0‰，为 3.0~74.3 倍。在相同辐照时间下，电子脉冲导致的染色体畸变率远大于离子束脉冲的作用，染色体畸变率较客观地反映了脉冲辐照的效应。

Tab 4. Chromosomal aberrant frequency in root cell of wheat seeds irradiated

Treatment of irradiation	Time of irradiation/min	Chromosomal aberrant frequency/%	Relative chromosomal aberrant frequency/%
Control	0	0.7	100.00
Ion beam	30	0.9	128.6
	60	1.6	228.6
	90	8.3	1185.7
Electron beam	30	2.1	300.0
	60	10.2	1457.1
	90	52.0	7428.6

3 讨 论

3.1 脉冲电子束与离子束的辐照效应

脉冲电子束与离子束辐照作物种子后,给种子中物质的分子提供了使化学键裂解的能量^[6],致使种子中的自由基浓度明显上升,高浓度的自由基能够导致 DNA 分子的损伤^[7-9],并产生遗传效应,这是脉冲电子束与离子束辐照处理后所发生的化学过程和生物过程。由于种子中物质成分复杂,因而产生的自由基在种类和活泼性上是不同的。在 EPR 上测定时,种子在受辐照后至少有一天以上的存放期,因此,测出的 EPR 信号只是化学性质上较为稳定的长寿命自由基,信号幅度的高低仅仅反映多种自由基的总浓度,不代表某一物质的自由基所产生的单一信号。

辐照剂量与效应的关系,在本研究中个别数据出现了与预期不一致的结果,如 Ar^+ 离子束处理 20 min 的信号幅度高于 40 min 的信号幅度,但统计结果表明,两者不存在本质的差异。辐照处理 45 min 的信号幅度低于对照,相对生长势的增加都在误差范围之内。尽管这样,也能看到随着辐照时间的延长,自由基浓度增高的总趋势。EPR 信号幅度高,染色体畸变率高,种子萌发率和生长势低。自由基产额随剂量的增大(即辐照时间的增长)而增高,这与文献[10, 11]结果相一致。

3.2 脉冲电子束与离子束辐照效应差异的原因

电子束和离子束辐照生物材料后所产生的生物学效应有着明显的差异,从自由基产额、染色体畸变频率及种子萌发能力来看,电子束的辐照效果明显强于离子束。一般认为重离子的 LET(传能线密度)值比电子束大, RBE(相对生物学效应)也大,但在能量较低时,电子束和离子束的注入深度应作为优先考虑的因素,根据理论计算,电子束的注入深度要比离子束大得多,这可能是本研究中电子束的作用强于离子束的主要原因。

脉冲辐照处理时间相同时,电子束引起的自由基浓度高于离子束。除了以上原因外,通常认为重离子带正电荷,为需电子物质,会吸引自由基所带的不成对电子,由于这种区域性的电性中和,可能降低了自由基产额,也有人认为重离子的注入破坏了一部分自由基^[10, 12]。

低能电子束与离子束的注入深度都极为有限,胚根细胞中所出现的染色体畸变,由电子束或离子束通过直接作用而引起的可能性极小,脉冲辐照后所产生的高额自由基通过化学途径发挥作用,可能是造成染色体畸变的原因之一。

3.3 多极板火花放电室的应用前景

多极板火花放电室产生的纳秒级强脉冲离子束有高的 LET 值,有粒子能量、质量、电荷

数、粒子种类、脉冲宽度和功率密度等多种参数组合可供选择。产生的电子束具有很强的磁自收缩作用, 能量和电子的沉积具有射程终点效应, 因而能作为生物诱变的辐射源。同时因其结构简单, 造价低廉, 操作简便, 而在作物诱变育种研究中有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 余增亮, 邱励俭, 霍裕平. 安徽农学院学报, 1991, 18(4): 251
- 2 Yu Zengliang et al. Nucl. Instru. Methods, 1991, B 59/60: 705
- 3 卫增泉, 杨汉民等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1993, 11(2): 90
- 4 Bloess D et al. Nucl. Instru. Methods, 1983, 205: 173
- 5 Jiang X L. Han L J. Rev. Sci. Instrum, 1992, 63(4): 2420
- 6 郑荣梁. 自由基生物学, 北京: 高等教育出版社, 1992, 7
- 7 朱壬葆等. 辐射生物学, 北京: 科学出版社, 1987, 73
- 8 Clemens Von Sonntang. Int. J. Radiat. Biol., 1980, 46(5): 507
- 9 harwanl Singh et al. Int. J. Radiat. Biol., 1984, 46(2): 193
- 10 刘振声, 邱泉发, 施骏等. 辐射与环境生物物理研究, 第1集, 北京: 中国科学技术出版社, 1992, 133
- 11 邓建国, 余增亮. 安徽农学院学报, 1991, 18(4): 263
- 12 Muttermann J et al. Appl. Radiat. Isot., 1989, 40(10—12): 915

YIELD OF FREE RADICAL IN PLANT SEEDS IRRADIATED BY INTENSE NANOSECOND PULSED ELECTRON BEAM AND ION BEAM

Gao Qingxiang Wang Yong Yang Hanmin

(Biology Department of Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Jiang Xinliu Shong Zhimin

(Modern Physics Department of Lanzhou University, Lanzhou 730000)

ABSTRACT In this report, free radical yields in plant seeds (tomato, wheat, hot pepper and cucumber) irradiated by intense pulsed electron beam and ion beam were proved to be in positive proportion with doses. But the ability of seed germination is approximately in negative proportion with the free radical yield. Chromosomal aberrant frequency is approximately in positive proportion with the free radical yield in seeds. The results showed that the effectiveness of pulsed electron beam is stronger than that of pulsed ion beam. This method proved to be simple and effective for using intense nanosecond pulsed electron beam and ion beam radiation to induce mutant in plant.

KEYWORDS Free radical, Electron beam, Ion beam, Irradiation effect, Tomato, Wheat, Hot pepper, Cucumber