

文章编号: 1007-4627(2003)03-0218-04

## 低能离子注入小麦种子胚内的射程分布\*

卫增泉, 袁世斌, 颀红梅, 赵力民, 毛淑红

(中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000)

**摘 要:** 采用 110 keV  $^{56}\text{Fe}^{1+}$  离子束垂直注入小麦种胚后, 将小麦沿腹面的纵沟掰开, 形成剖面, 将剖面水平朝上粘贴在金属铜托上, 用扫描电镜在剖面上从胚表面向纵深进行点分析, 测定不同深度上由 Fe 元素激发出的特征 X 射线强度, 由此得到了该种离子注入小麦胚内的最大射程约 5  $\mu\text{m}$ , 最可几射程为 0.935  $\mu\text{m}$ . 并对这种低能离子注入作物种子能诱发突变的机理进行了详细讨论.

**关键词:** 低能离子注入; 小麦; 胚; X 射线能谱分析; 射程分布

**中图分类号:** O571.33 **文献标识码:** A

### 1 引言

20 世纪 80 年代, 我国将低能重离子 ( $E < 200$  keV,  $Z \geq 6$ ) 注入技术应用于农学、医药学和生物学领域, 首先对水稻、小麦、棉花、大麦等农作物进行了诱变育种, 后又将其扩展到烟草、水果、花卉、树种、微生物和蚕卵等方面, 取得了明显效果. 但对这种效应的机理目前仍不十分清楚, 有着不同的解释. 为了深入探讨这个问题, 我们利用扫描电子显微镜中的电子束激发注入离子 (元素) 的特征 X 射线, 通过测其强度获得低能离子注入小麦种子胚内射程分布的实验结果.

### 2 材料与方 法

#### 2.1 试验材料

选用了甘肃省张掖市农科所提供的春小麦 14615 风干种子作试材.

#### 2.2 离子注入处理

离子注入是在中国科学院近代物理研究所 200 kV 离子注入机上进行的. 先用切片机将原凸凹不平的小麦种子胚部表面切成平面, 再用离子束垂直注入该平面, 离子种类为  $^{56}\text{Fe}^{1+}$ , 能量为 110 keV, 离子注量为  $5 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>, 束流强度在 3  $\mu\text{A}$  左右, 经扫描后的束流截面为  $\phi 55$  mm, 其均匀度好

于 95%.

#### 2.3 扫描电镜样品制备

取注入和未注入  $^{56}\text{Fe}^{1+}$  离子的种子各数粒, 将小麦沿腹面的纵沟用手掰开, 形成剖面, 将剖面水平朝上粘贴在金属铜托上, 供能谱分析. 为了不造成铁元素的污染, 剖面的形成不拿刀切, 制样粘接不用含铁的导电胶等.

#### 2.4 X 射线能谱分析

X 射线能谱分析是在 JSM-5600 LV 型电镜上进行的. 利用电镜中产生的电子束去轰击被测样品, 样品中的不同元素就会被电子束激发出相应的特征 X 射线, 采用软 X 射线探测器就能测到对应不同元素特征 X 射线的能谱图, 本实验只注重在不同深度上由 Fe 元素激发出的 X 射线强度. 实验中使用参数为: 加速电压 20 kV, 束流强度 0.15 nA, 放大倍数 1 000 $\times$ , 谱线收集时间 50 s, 测量时将电子束聚焦成 0.75  $\mu\text{m}$  左右的小方块亮点, 将其在剖面上从胚表面向纵深进行点分析, 移动步长为 1/4 小方块亮点的边长, 约 187 nm, 每个点重复测量 3 次, 求其平均值, 在每个步长深度上的 X 射线强度则采用相应测量点叠加再平均的方法算得.

### 3 实验结果

在不同深度上测得 Fe 元素的特征 X 射线强度

收稿日期: 2003 - 03 - 21; 修改日期: 2003 - 06 - 05

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(19135022, 19975060); 中国科学院重点基金资助项目(KJ952-S1-424); 甘肃省自然科学基金重点基金资助项目(C34)

作者简介: 卫增泉(1939-), 男(汉族), 江苏苏州人, 研究员, 博士生导师, 从事重离子核物理学与生命科学交叉学科的研究.

见表1.

由上述测量结果可以看到, 与对照样品相比

较,  $110 \text{ keV}^{56} \text{Fe}^{1+}$  离子注入小麦种子胚内的最大射程约为  $5 \mu\text{m}$ , 最可几射程为  $0.935 \mu\text{m}$ .

表1 对照和处理样品在不同深度上(从胚表面起)Fe元素的特征X射线强度

深度/ $\mu\text{m}$	X射线强度/(counts $\cdot \text{s}^{-1}$ )				
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X \pm \text{SD}^*$	对照**
0.187	12.57	10.02	12.22	$11.60 \pm 1.38$	4.15
0.374	13.96	14.13	12.24	$13.44 \pm 1.05$	4.10
0.561	14.96	13.36	14.47	$14.26 \pm 0.82$	3.83
0.748	15.23	15.58	14.01	$14.94 \pm 0.82$	2.98
0.935	16.19	18.07	16.49	$16.92 \pm 1.01$	3.03
1.122	16.46	15.26	17.08	$16.27 \pm 0.93$	4.08
1.309	15.56	17.21	13.68	$15.48 \pm 1.77$	3.94
1.496	14.69	13.32	16.01	$14.67 \pm 1.35$	3.90
1.683	13.62	13.46	12.58	$13.22 \pm 0.56$	3.68
1.870	12.4	14.96	12.46	$13.27 \pm 1.46$	2.96
2.057	11.98	10.23	13.11	$11.77 \pm 1.45$	3.38
2.244	11.91	9.98	12.06	$11.32 \pm 1.16$	3.50
2.431	11.92	10.46	12.55	$10.64 \pm 1.07$	3.78
2.618	11.59	11.96	9.87	$10.14 \pm 1.12$	4.03
2.805	11.00	12.04	10.14	$10.06 \pm 0.95$	4.12
2.992	9.86	10.63	9.42	$8.97 \pm 0.61$	3.87
3.179	9.00	9.57	9.03	$8.20 \pm 0.32$	3.27
3.366	8.33	9.76	7.98	$7.69 \pm 0.94$	3.36
3.553	8.07	8.68	9.05	$7.60 \pm 0.50$	2.96
3.74	8.25	7.88	7.95	$7.03 \pm 0.20$	3.47
3.927	8.12	8.01	7.14	$6.76 \pm 0.54$	3.88
4.114	7.95	8.11	7.65	$5.90 \pm 0.23$	3.34
4.301	7.16	7.87	6.92	$5.32 \pm 0.49$	4.05
4.488	6.75	5.89	6.48	$4.37 \pm 0.44$	3.97
4.675	6.02	6.57	4.99	$3.86 \pm 0.80$	3.49
4.862	5.13	5.03	4.69	$2.95 \pm 0.23$	3.86

\* 点分析3个测量值的平均值及其标准偏差, \*\* 对照为未被Fe离子注入的小麦种子样品.

## 4 讨论

(1) 低能离子(这里所说的低能离子是指总能量几十到100、200 keV的重离子)注入植物干种子内射程分布的研究一直令生物学界、农学界和物理学界科研工作者的关注,因为它对阐明低能离子注入植物种子能诱发突变的机理关系密切.

(2) 在先前的一些实验结果和讨论中,人们常

常采用(种子)“表层”这个词<sup>[1]</sup>,但它的含义不甚明确,可以包含种(果)皮的表层,也可以是剥去了种(果)皮后露裸种胚(果肉)的表层,所以在用“表层”时应该加上限定词,如连同种(果)皮的,还是剥去种(果)皮的.因为不同植物种子的种皮或果皮厚度一般是不同的,例如玉米为  $140 \mu\text{m}$ ,葡萄  $100 \mu\text{m}$ ,番茄  $60 \mu\text{m}$ ,绿豆为  $50-70 \mu\text{m}$ 等<sup>[2,3]</sup>.然而,它们的组织结构常常类似,疏松多孔,有的明显地呈网

状结构<sup>[2]</sup>.

正因为植物种子种皮或果皮在微观上一般呈网状结构,所以,注入离子如果不与其网“线”相碰,就可以“毫不费力”地穿入种(果)皮下的组织,这时离子能量即使很低,它也能在种(果)皮的另一面观测到,所以,这样的实验结果也许可以测到透过 200  $\mu\text{m}$  以上种(果)皮的离子能谱,但这对讨论低能离子注入植物种子能诱发突变的机理是无法起到佐证的.双方的争论不在于能否穿过种(果)皮,关键的是:即使穿过种(果)皮后,离子还能走多深?也就是说,应该研究低能离子在剥去种(果)皮的裸露种胚(果肉)中的射程.

(3)人们最先是对低能离子注入水稻、小麦等作物种子果然能诱发遗传突变感兴趣,特别是物理学界的研究者,由于作物胚内主要含蛋白质一类物质,而蛋白质是一种准晶结构材料,可以按照 LSS 理论计算,60 keV  $^{14}\text{N}^{1+}$  在蛋白质内的射程和 100 keV  $^{14}\text{N}^{1+}$  在小麦内的射程稍大于 0.2  $\mu\text{m}$ ,110 keV  $^{56}\text{Fe}^{1+}$  在麦胚内的射程还不足 0.2  $\mu\text{m}$ <sup>[4]</sup>,对级联原子的假设也进行了模拟计算,200 keV  $^{14}\text{N}^{1+}$  在细胞中级联原子前冲的影响小于 1.5  $\mu\text{m}$ <sup>[5]</sup>,因此,进入麦胚这么浅的离子不可能去伤及胚细胞核.

(4)根据计算分析,我们和有些研究者对这种低能离子注入诱发突变的机理提出了假设,认为这是注入离子与植物种子中靶物质相互作用产生的次级过程,例如特征 X 射线、次级电子和热穗效应等<sup>[4,6]</sup>.我们还利用同步辐射激发的碳光研究了超软特征 X 射线是否能诱发小麦种子根尖细胞中的染色体发生畸变,答案是肯定的<sup>[7]</sup>.

我们持不同意见的是,认为低能离子注入水稻、小麦等作物种子诱发突变的机理不是注入离子的直接作用,而是一系列次级过程的复合作用.我们并没有否定低能离子可以穿过疏松多孔、具有网状结构的种(果)皮,即使它有 1 mm 厚,也没有否

定低能离子可能穿越露裸细胞的细胞膜,更没有否定低能离子可能直接轰断 DNA 生物大分子这样的直接作用,但要这种低能离子在作物种子胚内穿越一段距离(通常高等植物细胞大小介于 10—100  $\mu\text{m}$  之间)去直接接触及细胞核确是一件不太可能的事.

(5)后来,在采用大剂量低能离子注入外基因介导研究中,有的研究者认为这是离子束穿孔细胞膜导致外源基因的渗入,但我们认为这是大剂量离子轰击,“剥”去了细胞膜,造成细胞质与外源基因的融合.因为在上述研究中,研究者采用了  $10^{16}$  ions/ $\text{cm}^2$  量级的离子剂量,即 1 ions/ $\text{\AA}^2$  (1  $\text{\AA}=0.1$  nm),如果离子束在其截面上分布是均匀的,那么每平方  $\text{\AA}$  上就有 1 个离子通过,而以  $^{14}\text{N}^{1+}$  为例,它的直径是 1.5  $\text{\AA}$ ,也就是说,细胞被离子轰击的那个面的膜全被离子轰碎了,相当于用溶解酶溶解了半个细胞膜,因此,外源基因不是穿过离子打的孔渗入的,而是像细胞融合现象那样的作用.

(6)上面对机理的讨论,只是根据理论计算推测的,然而,不少研究者希望进而获得实验上的证据,因此就有采用卢瑟福背散射法<sup>[7,8]</sup>、电镜 X 射线能谱法<sup>[9]</sup>、二次离子质谱法、电镜形貌观测和微区分析法<sup>[3]</sup>、质子或  $\alpha$  粒子透射能谱法<sup>[2,10]</sup> 和正电子湮没技术<sup>[1]</sup> 等来测量或推算低能离子注入小麦种胚内的射程或穿过种(果)皮的厚度,他们得到的结果存在较大差别,但从上面讨论的主题来看,贯穿麦胚的最大深度应该认为不足 1  $\mu\text{m}$ .

## 5 结束语

我们这次实验获得了 110 keV  $^{56}\text{Fe}^{1+}$  离子注入小麦种子胚内的最大射程约为 5  $\mu\text{m}$ ,最可几射程为 0.935  $\mu\text{m}$ .由此数据仍然可认为低能离子注入水稻、小麦等作物种子诱发突变的机理不是注入离子的直接作用,而是一系列次级过程的复合作用.

## 参 考 文 献

- [1] 陆 挺. 低能离子注入引起的植物种子微结构的变化[J]. 物理, 2002, 31(9): 555.
- [2] Tan Chunyu, Xia Yueyuan, Zhang Jianhua, *et al.* Proton Transmitting Energy Spectra and Transmission Electron Microscope Examinations of Biological Samples[J]. Chin Phys Lett, 1999, 16(2): 123.
- [3] 苏 一, 李 毅, 辛 华等. 绿豆种胚中离子注入深度的研究[J]. 核技术, 1997, 20(12): 718.
- [4] Wei Zengquan, Xie Hongmei, Han Guangwu, *et al.* Physical Mechanisms of Mutation Induced by Low Energy Ion Implantation[J]. Nucl Instr and Meth, 1995, B95: 371.
- [5] 韩光武, 马受武, 卫增泉等. 低能重离子及其碰撞产生的级

- 联原子在生物材料中的直接作用范围[J]. 核技术, 1995, 18(12): 759.
- [6] 王震遐. 低能离子注入诱变原初作用物理模型[J]. 安徽农学院学报, 1991, 18(4): 298.
- [7] Wei Zengquan, Han Guangwu, Zhou Guangming, *et al.* An Important Mechanism of Crop Breeding with Ultralow Energy Ion Implantation[J]. Nucl Instr and Meth, 1998, B134: 191.
- [8] 卫增泉, 刘玉岩, 王桂玲等. 低能重离子注入小麦胚内的作用范围[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1993, 11(2): 90.
- [9] 杨汉民, 韩榕, 高清祥等. 扫描电镜 X 射线能谱分析法测定重离子束注入小麦种子的深度[J]. 核农学报, 1993, 7(4): 198.
- [10] 韩建伟, 余增亮. 低能离子对番茄果皮蚀刻与穿透作用的研究[J]. 生物物理学报, 1998, 14(4): 757.

## Range Distribution of Low Energy Ions Implanted into Embryo of Wheat Seed\*

WEI Zeng-quan, YUAN Shi-bin, XIE Hong-mei, ZHAO Li-min, MAO Shu-hong  
(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** After embryo of wheat seed was right implanted by 110 keV  $^{56}\text{Fe}^{1+}$  ions, the seed was broken into two parts by hand along its abdomen trench to form two cross-sections. A half-seed was pasted on a metal holder in keeping the cross-section upwards horizontal. Spot analyses were carried out from embryo surface towards depth on the cross-section under SEM and the intensity of characteristic X rays induced by electrons in Fe elements of the embryo was measured. From this, the maximum range of the ions in the embryo of wheat seed was obtained about 5  $\mu\text{m}$  and the range with maximum probability was 0.935  $\mu\text{m}$ . Mechanism of mutation induced by the low energy ions implanted into the crop seed is in greater detail discussed.

**Key words:** implantation of low energy ion; wheat; embryo; energy analysis of X ray; range distribution

\* **Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (19135022, 19975060); Major Subject of Chinese Academy of Sciences (KJ952-S1-424); Natural Science Foundation of Province (C34)