

拟南芥胚的不同区域对 MeV 离子辐照的响应^{*}

覃怀莉¹⁾ 薛建明¹⁾ 赖江南¹⁾ 王建勇¹⁾ 苗琦¹⁾ 张伟明¹⁾
马磊¹⁾ 颜莎¹⁾ 赵渭江¹⁾ 顾红雅²⁾ 王宇钢^{1)†}

1) 北京大学重离子物理教育部重点实验室, 北京 100871)

2) 北京大学生命科学学院, 北京 100871)

(2005 年 12 月 15 日收到, 2006 年 3 月 30 日收到修改稿)

利用不同能量的质子在大气环境中辐照拟南芥的含水种子, 能量从 1.1 MeV 到 6.5 MeV. 根据模拟计算结果, 相应能量的离子对种子的损伤区域分别为胚的浅层、胚的一半和整个胚. 本实验中, 具有较高能量的质子可以完全均匀地作用于拟南芥生长、发育及遗传密切相关的胚茎端分生组织, 而能量较低的质子则不能直接作用于茎端分生组织. 实验所用质子注量范围为 4×10^9 ions/cm²— 1×10^{14} ions/cm². 实验结果显示, 虽然拟南芥种子的发芽率和幼苗存活率随离子注量增加都呈现下降的趋势, 但对应于不同的胚损伤区域, 即在不同的入射质子能量条件下, 注量曲线具有各自的特征. 实验结果显示, 拟南芥种子中除了胚茎端分生组织作为对离子辐照敏感的辐射主靶外, 茎端分生组织之外的胚区域可能作为离子辐射次靶, 影响到最终的辐射生物学效应.

关键词: 离子辐照, 拟南芥, 胚区域, 生物效应

PACC: 6180J

1. 引 言

辐射育种或航天育种等生物改良, 是利用射线、粒子与植物种子中胚区域的生物分子相互作用, 造成 DNA 分子的断裂及重组, 从而改变种子的微结构和基因遗传等, 获得新的生物品种. 低能离子束作为生物改良中一个新的基因突变源, 已经取得了丰硕的成果^[1]. 针对低能离子生物效应进行的大量研究表明, 低能离子具有与其他辐照方式不同的特点, 如类似马鞍形的存活-注量曲线^[2-4]、离子的超长穿透深度^[5-8]等. 然而, 对于低能离子辐照植物种子诱变的机理, 究竟是由于极少数具有超常穿透能力的离子对分生组织内细胞的直接辐射损伤作用, 还是低能离子的辐照损伤通过后续的生化过程而产生的间接作用, 目前尚没有定论, 亟待从低能离子在植物样品中输运过程的物理角度, 以及植物胚局域化离子辐照所诱发的生物学效应等两个方面加以深入研究. 在辐射生物学中, 传统辐照方式如 X 射线、 γ 射线和高能离子, 由于具有较强的穿透能力, 能完全穿

透整个胚, 因此射线或粒子会直接损伤作为辐射生物靶的茎端分生组织内的遗传物质. 与此不同的是, 绝大部分几十 keV 的低能入射离子不能穿透整个样品, 而是停留在胚浅层, 其对植物种子造成的损伤是高度局域化的. 因此, 仅从辐照方式上讲, 低能离子辐射是有别于其他传统辐射的. 然而, 到目前为止, 国际上尚没有关于辐照损伤胚不同的区域是否会导致不同的生物学效应的报道.

由于低能离子辐照受限于真空环境, 这类实验所采用的植物样品绝大多数是干种子. 由于天然植物种子结构疏松多孔、质量分布不均匀, 离子在其中射程歧离很大, 很难用 TRIM 程序精确计算^[6-9]. 但是, 充分吸水后的种子由于内部含有大量水分, 可以以水为靶, 用 TRIM 程序^[8]精确模拟离子在含水种子的射程. 因此, 本实验选用含水的拟南芥种子作为离子辐照的样品, 从而在实验上准确地控制入射离子在种子中的作用区域.

为了考察胚不同深度区域的辐照效应, 我们的研究采用能量为 1.1 MeV、2.6 MeV 和 6.5 MeV 的质子在大气中分别辐照拟南芥的含水种子. 这样随着

^{*} 国家自然科学基金(批准号: 30435020)资助的课题.

[†] 通讯作者. E-mail: ygwang@pku.edu.cn

能量从小到大,入射离子在种子内的损伤区域逐渐加深,从而获得离子对拟南芥不同区域胚组织的辐照.根据辐照后种子发芽率和幼苗存活率的注量曲线与离子能量之间的关系,并观测拟南芥生长过程中的形态变化,本文研究并分析讨论了不同胚组织对于离子辐照的响应,由此提出了辐射次靶的概念并以此解释非主靶区域离子辐射生物学现象.

2. 实 验

实验采用拟南芥 *Columbia* 生态型种子作为辐照样品.拟南芥是一个重要的模式生物,具有种子小、耐辐射、植株小、生长周期短、遗传背景清楚等特点.图 1(a)为拟南芥干种子的环境扫描电镜 (environmental scanning electron microscope, ESEM) 照片.类似于干种子,拟南芥的含水种子也是呈椭球状,由于吸水膨胀,尺度比干种子稍大一些,图 1 中标出的尺度都是含水种子的大小.含水的拟南芥种子在纵向上尺度大约是 $450\mu\text{m}$,横向尺度大约是 $250\mu\text{m}$,种皮厚度大约是 $20\mu\text{m}$,种皮厚度歧离约为 $5\mu\text{m}$.图 1(b)是剥掉种皮后胚的 ESEM 照片,照片清楚显示,拟南芥胚由胚根和两片子叶组成.图 1(c)是种子剥掉一片子叶后的示意图,图中由一个小圆圈标出的区域是茎端分生组织 (shoot apical meristem, SAM),它处于两片子叶连接处的中部. SAM 由 8—10 个细胞组成,是胚最重要的组织,它决定植物后续的生长发育.在辐射生物学中,这一区域被称作辐射靶,这里我们把它叫做辐射主靶,以其与后面提出的辐射次靶相区别.质子沿 X 轴方向入射 (见图 1(c)),在入射方向上,从外表皮到 SAM 的距离约为 $100\mu\text{m}$,歧离约为 $20\mu\text{m}$.

质子辐照实验在北京大学 4.5 MV van der Graff 和 $2 \times 6\text{MV}$ tandem 加速器上进行.束流从 $6.5\mu\text{m}$ 厚的钛膜制成的真空窗引出.表 1 给出入射 H^+ 离子的物理参数.种子平铺在靶盘上,使束流入射种子的方向如图 1(c)所示.根据种子的尺度和入射离子的模拟计算可以得到 1.1MeV 质子的理论射程只有 $30\mu\text{m}$ 左右,入射离子只能刚穿透种皮,停留在胚的表层,不能到达 SAM,损伤区域是浅层胚; 2.6MeV 质子在种子内的理论射程是 $110\mu\text{m}$ 左右,在入射方向上种皮到 SAM 的距离大约是 $100\mu\text{m}$,这两者很接近,加上种子的个体差异性,尺度上有一定的歧离, 2.6MeV 入射离子不一定能肯定作用到 SAM,其损伤

区域是半个胚; 6.5MeV 质子的理论射程是 $560\mu\text{m}$,在离子入射方向上,拟南芥含水种子的尺度 (即横向尺度) 大约是 $250\mu\text{m}$,所以 6.5MeV 质子可以完全穿透整个种子,均匀作用到 SAM,离子损伤的是整个胚.实验中离子注量为从 $4 \times 10^9 \text{ ions/cm}^2$ 到 $1 \times 10^{14} \text{ ions/cm}^2$,每一种离子参数辐照大约 400 粒种子以满足实验的统计要求.

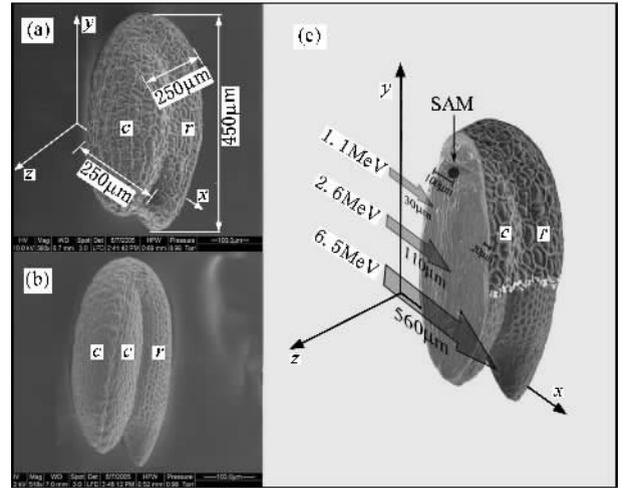


图 1 (a) 拟南芥干种子的 ESEM 照片 (b) 剥掉种皮后的拟南芥胚的 ESEM 照片 (c) 剥掉一片子叶后的拟南芥种子的示意图 (箭头表示质子入射方向和大致入射范围, $30\mu\text{m}$, $110\mu\text{m}$, $560\mu\text{m}$ 分别为 1.1MeV , 2.6MeV , 6.5MeV 质子的射程, r 为胚根, c 为子叶, SAM 为茎端分生组织, 图中所标尺度均为含水种子的尺度)

表 1 入射 H^+ 离子的能量、理论射程及射程歧离

质子引出真空前的能量/MeV	质子到达样品表面的能量/MeV	质子的射程*/ μm	射程歧离/ μm	损伤范围
2	1.1	30	6	浅层胚
3.2	2.6	110	7	半个胚
7	6.5	560	14	整个胚

* 以水为靶模型, TRIM 程序^[10]计算.

辐照前,含水种子放置在湿润滤纸上在 4°C 下春化三天.辐照后,发芽率在培养皿里湿润滤纸上测定,存活率在土壤里测定,培养环境均为恒温 23°C ,每日 16h 照明, 8h 黑暗.约 5 天后,滤纸上的种子种皮破裂、子叶长出,待生长状态稳定后,统计发芽率.约一个月后,细土中存活的拟南芥植株已长出 2—3 片子叶,统计存活率.对照组的发芽率和存活率分别为 95% 和 90%.每一种条件的实验重复了两次,由于严格控制了离子辐照及拟南芥培养条件,两次实

实验的结果重复性很好,误差基本在 10% 以内.最后的实验结果是两次的平均并由此得到实验的统计误差.

3. 实验结果

图 2,图 3 和图 4 分别是 1.1MeV,2.6MeV 和 6.5MeV 的质子辐照拟南芥含水种子后发芽率和幼苗存活率的结果.1.1MeV 质子辐照后,种子的发芽率几乎不受影响,即使在最大注量时发芽率仍保持在 85% 以上,然而幼苗的存活率却随质子注量增加缓慢地下降,在 1×10^{14} ions/cm² 处存活率只有 40%,并且有一个小峰出现在 2×10^{13} ions/cm² 注量点的附近.2.6MeV 质子辐照后,在低注量区间种子的发芽率和幼苗存活率曲线都下降相对缓慢,发芽率曲线在 3×10^{12} ions/cm² 出现一个小峰值,存活率曲线在 1×10^{11} ions/cm² 附近出现类似肩形的特征.6.5MeV 质子辐照对种子的生长活力影响最明显,并且发芽率和存活率在中间注量骤然下降,两条注量曲线都表现出肩形骤然下降的特征,其中致使存活率下降所需的注量小于发芽率下降所需的注量.纵观图 2,图 3 和图 4,可以明显看出,随入射能量增大,离子对种子发芽和存活的抑制逐渐增强.

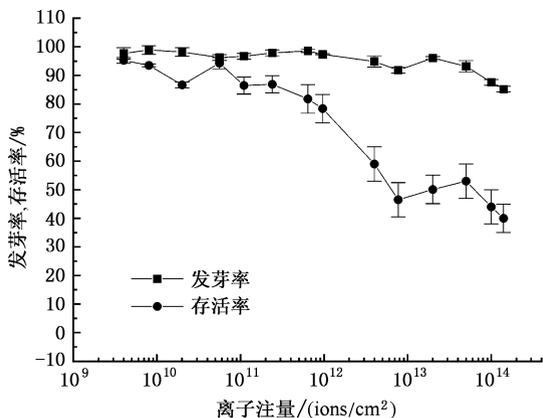


图 2 1.1MeV 质子辐照含水种子后种子发芽率和幼苗存活率的注量曲线

4. 讨 论

从图 4 显示的实验结果看到,6.5MeV 能量质子辐照后,种子发芽率和幼苗存活率在中间注量处骤然下降,这与高能离子和电子束辐照拟南芥干种子

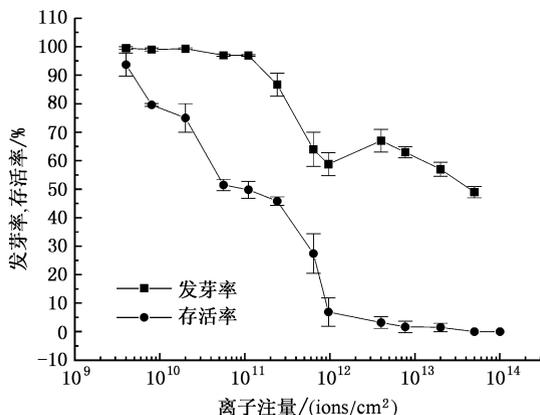


图 3 2.6MeV 质子辐照含水种子后种子发芽率和幼苗存活率的注量曲线

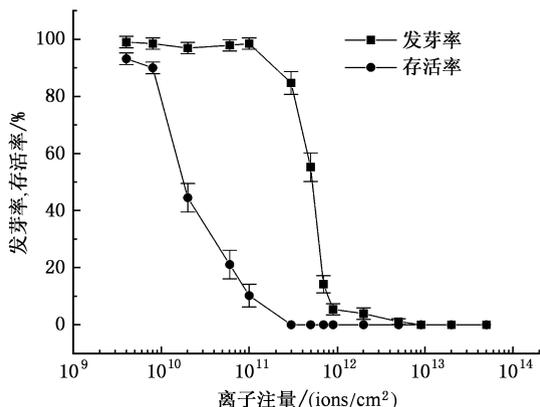


图 4 6.5MeV 质子辐照含水种子后种子发芽率和幼苗存活率的注量曲线

的结果很相似^[11].高能离子和电子束都可以均匀地穿透整个种子,6.5 MeV 质子损伤的范围也是整个种子,入射离子肯定能够作用到茎端分生组织.根据生物学和辐射生物学的基础理论,茎端分生组织直接关系到植物的生长和遗传,是胚内最重要的组织区域^[12],也是对辐射最敏感的生物靶^[13].茎端分生组织由 8—10 个细胞组成,当入射离子注量较小时,离子只是损伤部分茎端分生组织细胞,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茎端分生组织全部或足够多细胞,从而使茎端分生组织完全失去生长点功能^[14].所以,图 4 中 6.5MeV 对应的发芽率曲线,在 4×10^9 ions/cm² 到 1×10^{11} ions/cm² 注量区间都是保持着很高的发芽率,在 2×10^{11} ions/cm² 注量附近发芽率突然很快下降.存活率曲线与之类似,由于幼苗的生长涉及到比种子萌发

更多、更复杂的代谢过程,存活率在 2×10^{10} ions/cm² 注量就开始下降.

1.1MeV 能量质子损伤的区域是浅层胚,不可能作用到茎端分生组织.然而 1.1MeV 质子辐照对种子的生命活动仍有一定的影响,虽然种子发芽率受影响很小,只在很大注量处略微有点下降,但是幼苗存活率受到明显的影响,存活率曲线随注量增加逐渐下降(见图 2).虽然在此能量下,入射离子没有作用到辐射生物靶——茎端分生组织,但对种子发芽率和幼苗存活率造成不同程度的影响,那么这应该这是由于茎端分生组织之外的其他胚组织受到离子辐照损伤而造成的结果.因此我们认为,茎端分生组织是辐射生物靶的主靶,其外围组织可认为是辐射生物靶的次靶.从实验结果看,次靶虽然没有主靶那么敏感,但是也对最后的辐射生物学效应有一定的影响和贡献.

对于损伤整个胚的较高能量离子辐照,辐射生物主靶起着主导作用,由于茎端分生组织的特点,辐射效应存在域值,因此 6.5MeV 质子辐照后注量曲线呈现骤然下降的肩形特征.1.1MeV 质子损伤的只是浅层胚,只与辐射生物次靶作用,辐照效应随离子注量增大逐渐增强,所以注量曲线随注量缓慢下降.

2.6MeV 质子大约损伤胚的一半,由于种子尺寸的个体差异,入射离子不一定能作用到茎端分生组织.对于尺度较小的种子,入射离子可以作用到辐射主靶,对于尺度较大的种子,入射离子只能作用到辐射次靶.由图 3 所示,2.6MeV 对应的发芽率曲线基本上都处于另外两条发芽曲线的中部,在最大注量 1×10^{14} ions/cm² 处,仍有近 50% 种子可以发芽.这说明这部分种子的主靶没有受到致死的损伤,仍具有一定的分生能力,使种子萌发,不过种子的次靶受到了严重的损伤,即使可以发芽却不能正常生长,所以高注量区存活率几乎为零(见图 3).由上述分析,2.6MeV 质子辐照拟南芥含水种子,主靶损伤效应和次靶损伤效应都对种子的生长能力造成抑制,发芽率和存活率曲线介于另外两个能量对应的曲线之间,并兼具两者的曲线特征,在中间注量有明显下降,但总体下降趋势比较缓慢.

从图 2 和图 3 还可以看到,1.1MeV 对应的存活率曲线在 2×10^{13} ions/cm² 处有一个小峰,2.6MeV 对应的存活率在 3×10^{12} ions/cm² 处有一个小峰,这种类似马鞍形的注量曲线在低能离子辐照植物^[2]、微

生物^[3]和生物分子^[4]的研究中都有发现,与 X、 γ 射线和高能离子辐照后直线下降或肩形下降的曲线特征都不同,其产生的原因和机理尚未十分清楚.X、 γ 射线和高能离子都是可以穿透整个生物样品,我们的实验里,可以完全穿透种子的 6.5MeV 质子辐照后并没有出现马鞍曲线效应,而能量较低、不能作用到辐射主靶的离子辐照却导致类似马鞍形的注量-存活曲线.那么,我们可以设想,马鞍曲线可能与辐射次靶的离子辐照损伤相关.次靶是茎端分生组织外围的胚组织,虽然不是茎的生长点,但关系到营养吸收和运输、激素和各种酶的调节等生理功能.曲线下降过程中马鞍峰的回涨,可能是源于一定注量离子引起的种子生理功能的刺激效应.目前,国际上辐射生物学的热点——旁观者效应的研究^[15,16],不同组织之间、细胞之间和细胞内部存在着辐射损伤信号的传导过程,从而引发非辐照细胞的变异.在我们的实验中,发现辐射次靶的损伤能够影响植株的生物性状的变化.然而,次靶如何导致最终的辐射效应、次靶与主靶之间的关系,是否也存在类似旁观者效应的辐照损伤信号传导以及能否导致植物遗传变异等等,这样一些非常重要的辐射生物物理的基础问题还有待于对离子辐照诱发的生物效应做进一步深入地研究,包括精细离子束对胚进行局域化辐照、胚不同区域之间辐照损伤信号传导等方面的研究.

5. 结 论

通过不同能量的质子辐照含水拟南芥种子的实验,我们发现,1.1MeV 的质子辐照拟南芥含水种子,损伤浅层胚,入射离子只能作用到辐射生物次靶,注量曲线随注量增大缓慢下降,并出现类似马鞍形的曲线.6.5MeV 的质子损伤整个种子(包括整个胚),辐射生物主靶占主导作用,注量曲线呈现肩值骤然下降特征,与高能辐照结果类似.对于损伤半个胚的 2.6MeV 质子,在部分种子内离子作用到主靶,在部分种子内离子只作用到次靶,其生物学响应介于 1.1MeV 和 6.5MeV 的结果之间,兼具二者曲线的特征.根据实验结果,我们提出了在植物种子中存在辐射生物次靶,它的损伤至少能够影响幼苗的生长,产生类似低能离子辐照植物干种子所引发的生物学效应.

- [1] Yu Z L 1999 *Physics* **26** 333 (in Chinese) [余增亮 1997 物理 **26** 333]
- [2] Chen R L , Song D J , Li Y F , Wu L J , Yu Z L 2002 *Acta Laser Biology Sinica* **11** 75 (in Chinese) [陈若雷、宋道军、李玉峰、吴李君、余增亮 2002 激光生物学报 **11** 75]
- [3] Song D J , Yao J M , Shao C L , Yu Z L 1999 *Nuclear Techniques* **22** 129 (in Chinese) [宋道军、姚建铭、劭春林、余增亮 1999 核技术 **22** 129]
- [4] Yu Z L , Shao C L 1994 *Radiation Phys. Chem.* **43** 349
- [5] Vilathong T , Yu L D , Alisi C , Phanchaisri B , Apavatjrit P , Anuntalabhochai S 2000 *Surface and Coatings Technology* **128** 133459
- [6] Xue J M , Wang Y G , Yan S , Du G H , Zhao W J 2002 *Radiation Effects & Defects in Solids* **157** 459
- [7] Xie J W , Zhou H Y , Wang P , Ding X J , Liu Z G , Song H , Lu T , Zhu G H 2003 *Acta Phys. Sin.* **52** 2530 (in Chinese) [谢堯、周宏余、王平、丁晓纪、刘志国、宋海、陆挺、朱光华 2003 物理学报 **52** 2530]
- [8] Lu T , Zhou H Y , Ding X J , Wang X F , Zhu G H 2005 *Acta Phys. Sin.* **54** 4822 (in Chinese) [陆挺、周宏余、丁晓纪、汪新福、朱光华 2005 物理学报 **54** 4822]
- [9] Wang Y G , Du G H , Xue J M , Liu F , Wang S X , Yan S , Zhao W J 2002 *Phys. Lett. A* **300** 611
- [10] Ziegler J F , Biesack J P , Littmark U 1985 *Stopping and Range of Ions in Solids* (New York : Pergamon Press)
- [11] Tanaka A , Shikazono N , Yokota Y , Watanabe H , Tano A S 1997 *Int. J. Radiat. Biol.* **72** 121
- [12] Van den Berg C , Willemsen V , Hage W , Weisbeek P , Scheres B 1995 *Nature* **378** 62
- [13] Kranz A R , Bork U , Bucker H , Reitz G 1990 *Nuclear Tracks and Radiation Measurement* **17** 155
- [14] Shikazono N , Tanaka A , Kitayama S , Watanabe H , Tano N S 2002 *Radiat. Environ. Biophys.* **41** 159
- [15] Morgan W F 2002 *Oncogene* **22** 7094
- [16] Shao C L , Melvyn F , Barry D M , Kevin M P 2004 *PNAS* **101** 13495

Biological response of Arabidopsis seed to MeV proton irradiation at different region of its embryo^{*}

Qin Huai-Li¹⁾ Xue Jian-Ming¹⁾ Lai Jiang-Nan¹⁾ Wang Jian-Yong¹⁾ Miao Qi¹⁾
Zhang Wei-Ming¹⁾ Ma Lei¹⁾ Yan Sha¹⁾ Zhao Wei-Jiang¹⁾ Gu Hong-Ya²⁾ Wang Yu-Gang^{1)†}

¹ *Key Laboratory of Heavy Ion Physics, MOE, Peking University, Beijing 100871, China*

² *School of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China*

(Received 15 December 2005 ; revised manuscript received 30 March 2006)

Abstract

The water saturated Arabidopsis seeds were irradiated with protons in air. The ion energy is from 1.1MeV to 6.5MeV. According to TRIM simulation, the damaged region of the seed induced by the incident ions is near the surface region of the embryo, half of the embryo and the whole embryo, respectively. The protons with high energy can damage the shoot apical meristem (SAM) in the embryo while the protons with low energy cannot. The ion fluence used in this experiment was in the range of 4×10^9 to 1×10^{14} ions/cm². The experimental results showed that both the germination and survival rates decrease while increasing ion fluence, and the fluence-response curve for different damaged region of the embryo has different characters. Besides SAM, which is generally considered as the main radiobiological target, the existence of a secondary target besides SAM is proposed in this paper.

Keywords : irradiation, Arabidopsis, embryo region, biological effect

PACC : 6180J

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grants No. 10435020).

[†] Corresponding author. E-mail : ygwang@pku.edu.cn