

低能离子注入植物种子的深度分布及 生物效应机理研究*

陆 挺 周宏余 丁晓纪 汪新福 朱光华

(北京师范大学射线束技术与材料改性教育部重点实验室, 北京师范大学低能核物理研究所, 北京 100875)

(2005 年 3 月 25 日收到, 2005 年 6 月 20 日收到修改稿)

采用四种物理测量方法: 扫描电子显微镜和能量色散 x 射线分析, 质子激发 x 荧光分析, 双光子激光扫描显微技术和正电子湮没技术测定了能量为 200keV V^+ 注入干花生种子的深度分布. 测量结果表明, 注入的低能离子在干种子花生内的深度远比 TRIM95 的理论计算值为高. 对低能离子注入植物种子后的生物效应的机理进行了讨论.

关键词: 低能离子注入, 植物种子, 深度分布, 生物效应机理

PACC: 6180J

1. 引 言

近年来在辐射育种领域中, 我国在世界上首先使用低能 N^+ , C^+ 和 P^+ 等(能量一般在 30—200 keV) 注入植物干种子的胚部, 从而引起植物生理和遗传方面的变异^[1-5]. 这类变异的突变率高、突变谱广, 为辐射育种领域开辟了一个新的方向, 并在农作物育种上取得了显著的经济效益. 从核物理学的角度看, 如此低能量的离子在生物介质密度的均匀介质中的射程可按 TRIM95 程序模拟计算, 其射程均不足 $1\mu m$, 而一般种子的外皮在 $7\mu m$ 以上, 因此低能离子如何能穿过种皮进入种子胚部从而导至植物的生物变异, 一直是众多核物理学家和生物学家争论的焦点. 为了要正确地理解低能离子注入生物效应的机理, 就必须首先从物理实验上精确地测出低能离子注入植物干种子后的深度分布.

2. 实 验

2.1. 实验方法

采用 SEM + EDAX(扫描电子显微镜和能量色散 x 射线分析), PIXE(质子激发 x 荧光分析), TPLSM(双光子激光扫描显微技术)和 PAT(正电子湮没技

术)四种方法测定了能量为 200keV 的钒离子(V^+) 注入干花生种子后的深度分布. 四种测量方法原理不同, 灵敏度各异, 用他们同时进行测量, 可以进行互相补充和比较. 选择钒离子注入花生种子是因为预先以 PIXE 对花生种子内的元素成份进行分析后判定花生种子内无钒元素, 因而在花生种子内测出的钒均为外来的注入 V^+ 离子.

2.2. 样品准备

选择丰满、均匀、无损害的当年的花生干种子作为样品, 其大小切成 $4\text{ mm} \times 8\text{ mm} \times 12\text{ mm}$, 固定在铝合金盘上, 样品注入面的一半用厚铝箔盖严, 防止注入的 V^+ 从次半面进入其内.

2.3. 离子注入

在北京师范大学低能核物理所的 400keV 离子注入机上, 以扫描方式将能量 200keV 的 V^+ 均匀地垂直注入花生样品, 离子注入的剂量为 9×10^{16} 离子/ cm^2 . 在离子注入期间, 靶室的真空度为 $(6-7) \times 10^{-4}$ Pa, 靶流强度为 $0.4\mu A/\text{cm}^2$.

3. 结果和讨论

这几种物理测量方法的精确度各不相同. SEM + EDAX 是以扫描电子显微镜的扫描来获取深度的

* 国家自然科学基金重点项目(批准号: 10435020), 国家自然科学基金重大项目(批准号: 19890303)和北京师范大学分析测试中心测试基金资助的课题.

几何尺度,然后以能量色散 x 射线分析测得注入 V^+ 在不同深度的数量. PIXE 则以切片技术来获取深度的几何尺度,再以质子激发的 x 射线分析测得注入 V^+ 在不同深度的数量. 目前使用最好的生物切片机可切出 $10\text{--}15\mu\text{m}$ 的薄片. PIXE 分析灵敏度比背散射要高 3 个数量级,而 SEM + EDAX 的灵敏度与背散射接近. 因此,以 SEM + EDAX 对 $0\text{--}15\mu\text{m}$ 的干花生种子厚度内的 V^+ 数量进行测量,而对每个 $15\mu\text{m}$ 厚的花生切片内的 V^+ 数则采用 PIXE 方法进行微量元素分析. 这样就得到一条较完整的 200keV 的钒离子注入干花生种子的深度分布^[6,7].

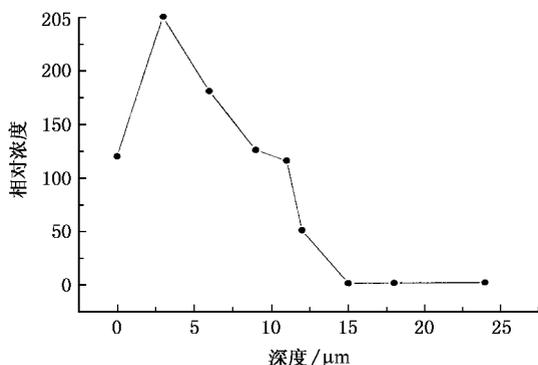


图 1 SEM 和 EDAX 测得的注入花生中 V^+ 的深度-浓度分布

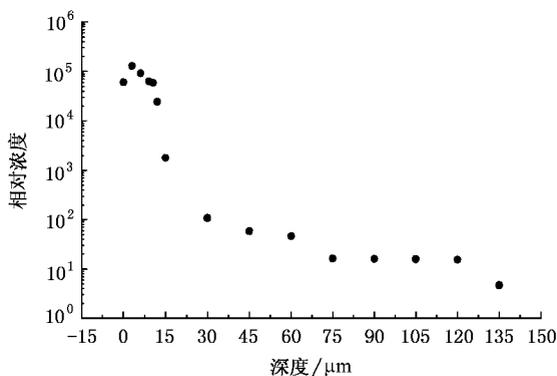


图 2 PIXE 和 SEM + EDAX 测得的注入花生中 V^+ 的深度-浓度分布

图 1 所示为 SEM + EDAX 方法测量得到的注入 V^+ 在花生种子内不同深度的分布. 可以看到,由于灵敏度较低,对花生种子内离注入表面超过 $15\mu\text{m}$ 的 V^+ 因数量较少,SEM + EDAX 方法已无法测量到其数目. 图 2 所示为 PIXE 方法测量得到的注入 V^+ 在花生种子内不同深度的分布,其中 $0\text{--}15\mu\text{m}$ 是由 SEM + EDAX 方法测到的数据. 由此可见,注入的 V^+

中有少数 V^+ 已达到了 $135\mu\text{m}$ 的深度.

SEM + EDAX 和 PIXE 方法均是以带电粒子激发元素的特征 x 射线进行分析,从而判定该元素的存在和数量. 然而,带电粒子进入介质内,因与介质相互作用而改变其速度和方向时会产生韧致辐射,这样就造成无法消除的本底,从而使测量的灵敏度受到限制. 而 TPLSM 是采用光子激发元素的特征谱线^[8],并不存在韧致辐射,且以双光子激发出元素的特征谱线,因而使测量灵敏度大为提高. TPLSM 的工作原理是以双光子激发为基础的. 双光子激发是 1931 年由 Maria-Mayer 从理论上预言^[9],并在 30 年后被实验观察到. 它来源于两个光子的同时吸收,其能量基本上为两光子的能量之和. 例如两个红光光子能够激发出一个紫外光子. 因为双光子激发需要两个光子,它的激发几率取决于激发光源瞬时强度的平方. TPLSM 发明于上世纪 80 年代,它有两个突出优点:一是具有亚微米级的空间分辨率;二是由于它既不会产生韧致辐射本底,又能几乎完全避免低能单光子激发产生的荧光本底,因而有非常高的信号本底比. 在本项研究中用的 TPLSM 是由 Bio-Rad 公司生产的 MRC1024 MP,它具有 82MHz 的锁模频率、 70fs 的脉冲宽度、 $720\text{--}1080\text{nm}$ 的波长范围、 $0.2\mu\text{m} \times 0.6\mu\text{m}$ 的最高空间分辨率. 下面所列图 3 为 TPLSM 方法测量得到的注入 V^+ 在花生种子内不同深度的浓度分布.

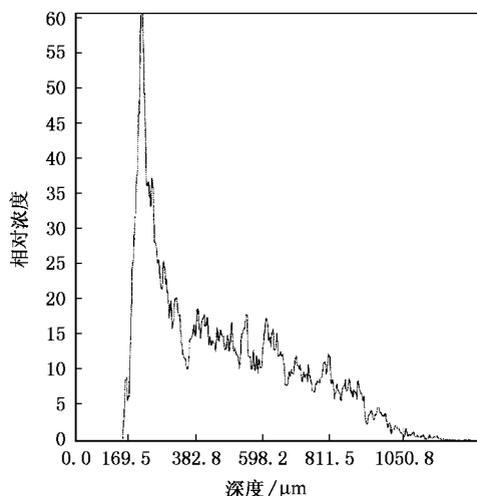


图 3 200keV 钒离子注入花生干种子的深度-浓度分布

由图 3 可以看到,确实有一部分 V^+ 离子能够穿透到很深的深度,最大可达 $800\mu\text{m}$ 以上. TPLSM 是迄今为止我们找到的测量低能离子注入植物干种子

的深度分布的灵敏度最高的方法。

为了要正确地理解低能离子注入生物效应的机理,就必须首先了解植物种子生物体的微观组织结构和低能离子对微结构的影响。利用 PAT 方法可探明植物种子微结构及其在低能离子作用下的变化和低能离子的作用深度^[10]。PAT 是一种独具特色的核探针技术,它利用 e^+ 与被测材料中的 e^- 发生湮没反应而产生 2γ 射线的方法来探知材料中的微观信息。尤其是当 e^+ 进入多孔材料时会形成正电子素 (O-Ps),而 O-Ps 的“撞击”湮没 (pick-off) 的寿命可直接反映出材料中原子尺寸量级的微孔洞大小。PAT 通常是用来探测金属、合金、半导体等材料的微结构和微缺陷的,并取得了极大的成功。本研究是首次把 PAT 用于生物材料的植物种子的微结构研究,实验

表 1 注入离子与未注入离子的花生样品的正电子湮没寿命和强度

样品种类	τ_1/ns	$I_1/\%$	τ_2/ns	$I_2/\%$	τ_3/ns	$I_3/\%$
注入 V^+ 样品	0.259 ± 0.003	66.28 ± 0.60	0.699 ± 0.005	17.94 ± 0.60	2.650 ± 0.009	15.78 ± 0.20
未注入 V^+ 样品	0.259 ± 0.003	65.24 ± 0.60	0.671 ± 0.005	18.49 ± 0.60	2.598 ± 0.009	16.27 ± 0.20

从表 1 中可知,花生样品的 τ_3 为 2.598,其相应的孔洞直径应为 0.7nm。这就是说在花生种子的组织体内存在许多 0.7nm 直径的孔洞,这些孔洞的体积之和约占花生总体积的 16.27%。

经过计算可知,由 ^{22}Na 正电子源发出的 544keV e^+ 在花生种子体内的慢化长度为 $200\mu\text{m}$,因此,在离花生种子表层 $200\mu\text{m}$ 深度处的结构若有变化,就应该在 τ_3 中反映出来。从表 2 中可知, τ_3 的数值在注入离子样品和未注入离子样品上是有区别的,这就说明 200keV 的 V^+ 注入花生后,会造成花生 $200\mu\text{m}$ 深度处的组织结构发生变化。此外,离子注入可以引起有机物的交联和剪切^[11],交联使有机物内的空洞变小,而剪切使有机物内的空洞变大。这 2 个作用是互相竞争的,哪个作用占优势将取决于离子注入的种类、能量和注量。从表 1 可以看到,花生经 V^+ 注入后, τ_3 值变大了。这说明,200keV V^+ 以 $9 \times 10^{16}\text{cm}^{-2}$ 的注量注入花生种子后,最后造成花生体内的微空洞变大了。但由于离子注入对有机体的交联和剪切作用是互相抵消的,所以 τ_3 值的变化是较小的。

以目前计算离子在介质中射程理论的核物理经典理论 LSS 理论研究靶中低速运动的重离子的射程分布。在这个理论中,入射重离子的能量损失分成两

结果表明这是一次十分成功的尝试,因而将对拓宽 PAT 的应用领域起到积极有效的作用。用 PAT 对注入 V 离子与未注入 V 离子的干花生种子样品进行测量,并对测得的正电子湮没寿命谱 (PAL) 进行拟合,所得到三个寿命成份及其相应的强度,列于表 1。表中的 τ_1 为自由正电子在被测样品体内的湮没寿命, I_1 为 τ_1 寿命成份湮没所占总正电子湮没的份额。 τ_2 为正电子在被测样品的空位中形成束缚态后湮没的寿命, I_2 则是该类湮没所占总湮没的份额。 τ_3 为正电子在被测样品的缺陷或孔洞中形成 O-Ps 后的 Pick-off 湮没寿命, I_3 是此类湮没占总的正电子湮没的份额。 τ_3 的大小反映了被测样品中缺陷或孔洞的大小, I_3 的数值则说明了该类缺陷或孔洞的体积之和占被测样品总体积的多少。

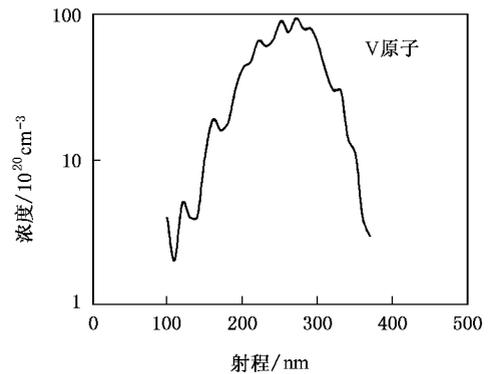


图 4 TRIM95 程序模拟 V^+ 注入花生的射程-浓度分布 (V 的注量 $9 \times 10^{16}\text{ions}/\text{cm}^2$)

部分:入射离子与靶原子的核外电子的非弹性碰撞的能量损失和入射离子与靶原子核的弹性碰撞的能量损失,即电子阻止 ($S_e(E)$) 和核阻止 ($S_n(E)$)。根据 $S_e(E)$ 和 $S_n(E)$,可以建立一个入射离子沿着其路径的射程几率分布的微积分方程。为了得到入射离子在无定形靶中的射程几率分布,这个微积分方程可以借助于 Monte-Carlo 方法来解决。TRIM95 就是解这个方程的程序。通过实验测得花生的密度是 $1.1002\text{g}/\text{cm}^3$ ^[12],由花生各种组分的分子式,通过计算得到元素 C, H, N 和 O 的原子比分别 0.3175,

0.594, 0.0125 和 0.0759. 分别把它们输入到 TRIM95 中进行计算, 就可以得到注入花生中的 V^+ 离子的浓度-投影射程分布^[12]. 图 4 显示了这个结果. 经过计算, V^+ 的平均投影射程为 $0.24\mu\text{m}$, 其标准偏差为 $0.05\mu\text{m}$. 在我们的实验测量中, 注入花生中的 V^+ 的平均投影射程远大于 TRIM95 的计算值. 这表明, LSS 理论的计算值与实验测量结果相差甚远. 离子与植物种子等非致密物质相互作用的规律已不能再用 LSS 理论来解决, 也不能用 TRIM95 程序来模拟了^[13]. 因为 LSS 理论要求无定形靶物质是均匀的和致密的, 而植物种子内有大量的微小孔洞, 结构疏松且密度不均匀. 这样注入离子进入孔洞达到下一阻

挡物质时, 损失较小的能量或不损失其能量, 所以注入的低能离子可以在其内达到很深的位置. 因此, 能量为 30-200 keV 的低能离子是能够穿过一般植物种子的种皮, 进入种子胚部, 并导致植物的生物变异的. 更由于进入种子胚部的离子的能量沉积和质量沉积作用, 使种子胚部有机体的长分子链断裂或交联, 并损伤其细胞的 DNA 结构, 在这个过程中, 还会产生大量的高活性的自由基, 从而引起辐射损伤^[14]. 再由于注入离子同种子内元素 K, Ca, P, S 等的相互作用产生的特征 x 射线可以穿透其深度达几百 μm ^[15], 也可以造成细胞的 DNA 损伤. 凡此种效应都可以使植物种子的后代发生变异.

[1] Yu Z L 1998 *An Introduction to Ion Bean Technology in Biology* (Hefei: Anhui Science and Technology Publication House) (in Chinese) [余增亮 1998 离子束生物技术引论 (合肥: 安徽技术出版社)]

[2] Yu Z L 2000 *IEEE Transactions on Plasma Science* **28** 128

[3] Lu T, Wei J Z, Zhu F S et al 1991 *J. Beijing Normal University (Nature Science)* **27** 421 (in Chinese) [陆挺、卫俊智、朱凤绥等 1991 北京师范大学学报 (自然科学版) **27** 421]

[4] Lu T, Zhu F S, Xie L Q et al 1994 *Nucl. Tech.* **17** 444 (in Chinese) [陆挺、朱凤绥、谢立青等 1994 核技术 **17** 444]

[5] Lu T 1995 *Looking to the 21st Century, Proceedings of the First International Conference on Frontiers of Physics* (Shantou, China) p 135

[6] Wang X F, Zhou Y L, Zhou H Y et al 2001 *Nucl. Sci. Tech.* **12** 26 (in Chinese) [汪新福、周云龙、周宏余等 2001 核科学与技术 **24** 26]

[7] Zhu G H, Zhou H Y, Wang X F et al 2001 *Nucl. Tech.* **24** 456 (in Chinese) [朱光华、周宏余、汪新福等 2001 核技术 **24** 456]

[8] Xie J Y, Zhou H Y, Wang P et al 2003 *Acta Phys. Sin.* **52** 2530 (in Chinese) [谢竞、周宏余、王平等 2003 物理学报 **52** 2530]

[9] Goppert-Mayer M 1931 *Ann. Phys.* **9** 273

[10] Lu T, Yu W Z, Zhou H Y et al 2001 *Chin. Phys.* **10** 145 (in Chinese) [陆挺、郁伟中、周宏余等 2001 中国物理 **10** 145]

[11] Venkatesan T 1985 *Nucl. Instrum. Methods B* **7/8** 461

[12] Wang X F, Lu T, Zhou H Y et al 2002 *Atomic Energy Science and Technology* **36** 531 (in Chinese) [汪新福、陆挺、周宏余等 2002 原子能科学与技术 **36** 531]

[13] Fan X J 2000 *Nucl. Tech.* **23** 61 (in Chinese) [范湘军 2000 核技术 **23** 61]

[14] Yao X M, Liu H Q, Huang X D et al 1992 *Trends Nucl. Phys.* **2** 21 (in Chinese) [姚新民、刘宏青、黄兴鼎等 1992 核物理动态 **2** 21]

[15] Wei Z Q, Han G W, Ma S W et al 1995 *Nucl. Tech.* **18** 90 (in Chinese) [卫增泉、韩光武、马受武等 1995 核技术 **18** 90]

The study of depth distribution for ion with low energy implanted into plant seeds and mechanism of biological effect^{*}

Lu Ting Zhou Hong-Yu Ding Xiao-Ji Wang Xin-Fu Zhu Guang-Hua

(*Key Laboratory for Beam Technology and Materials Modification of Education Ministry ,
Institute of Low Energy Nuclear Physics , Beijing Normal University , Beijing 100875 , China*)

(Received 25 March 2005 ; revised manuscript received 20 June 2005)

Abstract

The depth distribution of 200keV Vanadium ions implanted into the dry peanut seeds have been determined by SEM + EDAX , PIXE , TPLSM and PAT. The results of measurements show that the depth of ion with low energy implanted into the dry peanut seeds are much greater than the value of depth calculated by of TRIM95 program. The mechanism of biological effect of ion with low energy implanted to the plant seed was discussed.

Keywords : ion implantation with low energy , plant seeds , depth distribution , mechanism of biological effect

PACC : 6180J

^{*} Project supported by the Key Program and the Major Program of the National Nature Science Foundation of China (Grant Nos. 10435020 and 19890303) and Foundation of Analysis and Measurement Center of Beijing Normal University.