

## 低能离子在植物样品中长程穿透行为的研究

刘 峰, 王宇钢, 薛建明, 王思学, 陈 江, 吕 钢, 杜广华, 颜 莎, 赵渭江

(北京大学重离子物理研究所, 北京 100871)

摘要: 采用透射法测量了一定厚度的植物样品在接受低能离子辐照时从其后表面出射的荷能粒子。所测样品包括 30、50 和 100 $\mu\text{m}$  芸豆子叶切片和 20 $\mu\text{m}$  的西红柿皮。测量结果表明低能离子在植物样品中存在长程穿透现象, 在芸豆切片中的穿透深度至少可达 60 $\mu\text{m}$ , 此时穿透的概率很小, 不大于  $10^{-5}$ ; 长程穿透的离子产生的损伤空间分布不均匀。样品的高能质子透射能谱显现辐照损伤不是特别严重, 推测这种长程穿透的现象由植物样品本身的结构决定。

关键词: 低能离子透射法; 扫描隧道显微镜; 高能质子透射能谱; 低能离子辐照; 植物样品

中图分类号: Q 691.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-673X(2002)01-0117-05

近年来, 低能离子的生物学效应日益为生物学界和物理学界所重视。低能离子注入应用于和微生物育种以及基因辅助介导等方面, 取得了显著成效<sup>[1]</sup>。其中, 农作物育种一般采用植物干种子接受低能离子注入。大量实验证明, 它可以产生当代可遗传的变异性状, 而且具有损伤小, 突变率高, 突变谱广的优点; 在同样的育种条件下, 遗传变异有一定的可重复性; 存活率随剂量变化区别于其他射线辐照育种中的指数存活曲线, 存在马鞍型存活曲线<sup>[2]</sup>。然而, 低能离子束育种的机制仍然没有完全澄清。辐射生物学的基本理论认为, 在植物干种子诱变育种中, 要产生可遗传的变异必须使种胚生长点细胞中的遗传物质发生改变<sup>[3]</sup>。生长点一般在胚中心, 从胚的表面到中心的距离至少大于 100 $\mu\text{m}$ , 胚外还有一层至少 30 $\mu\text{m}$  的种皮<sup>[4]</sup>。然而低能离子束育种中一般注入能量为几十到几百千电子伏的重离子如 N 离子, 这种离子在固体材料中的射程一般不会大于 1 $\mu\text{m}$ , 远小于种皮到生长点细胞的距离。因此, 低能离子束的诱变效应究竟是荷能粒子与生长点细胞遗传物质直接作用<sup>[5]</sup> 还是其它次级效应如软 X 射线<sup>[6]</sup>、二次电子或热效应<sup>[7]</sup>引起的, 这一问题还有争议。对这一问题最直接的回答是测量离子注入干种子时荷能粒子在其中的穿透深度。本文采用了一种新的低能离子透射法, 对一定厚度的芸豆子叶切片和西红柿果皮进行低能离子辐照, 直接测量从样品后表面出射的荷能粒子, 这些荷能离子具有足够的能量造成 DNA 损伤。并对这些荷能粒子能量沉积的空间分布进行了初步的研究, 它对育种机制的探

讨有重要意义。

### 1 实 验

#### 1.1 样品

芸豆子叶切片用植物切片机制作, 为了避免制作过程中的化学沾染可能对后续测量产生影响, 最大限度的保留了植物样品本身的结构特点, 制作方法如下: 芸豆干种子的子叶在经过浸泡晾干还保持一定湿度的情况下放入熔融的石蜡中, 迅速水冷使石蜡固化。固定在石蜡中的子叶可以在切片机上切出厚度比较均匀的 30-150 $\mu\text{m}$  厚的切片。实验中测量的是切片的中央区域, 可能受石蜡扩散影响的切片边缘区域都已经切除。采用三种厚度的切片, 它们的厚度在切片机上的标称值分别是 30、50 和 100 $\mu\text{m}$ , 采用精度为 1 $\mu\text{m}$  的测微器测量, 实测厚度略大, 分别约是 36.0、60.0 和 120.0 $\mu\text{m}$ (以下简称 30、50 和 100 $\mu\text{m}$  切片)。采用精度为 1 $\mu\text{g}$  的高精密度天平测量这些样品质量面密度, 后两种切片分别约为 6.90 和 13.90 $\text{mg}/\text{cm}^2$ , 除以厚度得到样品的体密度大约为 1.10 $\text{g}/\text{cm}^3$ 。用元素分析仪 (Vario EL) 测量了切片的化学组成, C/H/O/N 的比例大约为 3:3:6:0.3, 与切片主要成分淀粉的化学组成 ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) 很接近。用电子显微镜对切片样品进行了观察, 如图 1 所示, 可以发现切片是由尺寸约 100 微

收稿日期: 2001-07-06

基金项目: 国家自然科学基金重大课题(198090300)

作者简介: 刘峰, 1975 生, 硕士, 电话 (010) 62751879,

E-mail: ygwang@pku.edu.cn.

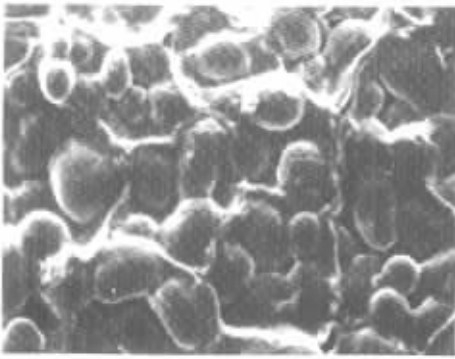


Fig.1 Morphology of kidney bean slices observed by SEM (490×)

米左右的储藏细胞组成，其中有许多几十 μm 大小的椭球状的淀粉颗粒。

西红柿果皮的制作过程同文献[5]。测量表明它的厚度为 20μm 左右，面密度大约是 2.4mg/cm<sup>2</sup>。

还有两种比较厚的样品作为实验的陪样，主要是 75μm 的 Mylar 膜（组分为聚对苯二甲酸乙二醇酯 C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>，密度 1.397g/cm<sup>3</sup>，还有 30μm 铝膜）。这两种膜都是质量分布均匀，比较耐辐照的样品。

所有样品均用铝袋包装。它是电和热的良导体，有利于辐照过程中对积累电荷的转移和散热；它易成形，能够很好的固定样品，同时能使样品处于力学自由状态。用铝袋包装好的植物样品在辐照时被固定在靶架的铝袋中，以保护样品拆装过程中不受损伤。

本实验选取的接收透射离子的材料是高定向热解石墨 (Highly oriented pyrolytic grahpite, 简称 HOPG, 美国 Advanced Ceremics 公司产品, 等级 ZYB)。HOPG 在非高真空扫描隧道显微镜 (STM) 观测中很容易得到原子分辨。实验中将 HOPG 切割成 3 mm × 3 mm 或 4 mm × 4mm 方块，用银导电胶粘在 0.5mm 厚的铝衬底上。用胶带粘贴 HOPG 解离最表层获得新鲜的石墨面。

1.2 实验方法

实验采用的低能粒子透射法的基本原理如图 2 所示，低能离子束入射到样品时，如果部分透射离子从样品后表面出射，就会轰击样品后的高定向石墨 (HOPG) 从而产生损伤<sup>[8]</sup>。测量中必须使样品后的 HOPG 保持全封闭，避免周围散射离子也入射 HOPG 产生损伤，从而增大实验的本底<sup>[9]</sup>。通过具有原子分辨的扫描隧道显微镜 (STM) 观测 HOPG 表面，可以观测到单个粒子轰击产生的孤立损伤。一般表现为一个线度为 1 - 5nm 高度 0.1 - 0.3nm

的小丘状突起。不同能量不同种类的离子入射产生损伤的概率 (即损伤效率) 不同，对于低能离子接近于 1，本实验采用的 Ar<sup>+</sup> 离子大约是 0.2 - 1<sup>[10]</sup>。通过 STM 大量观测可以得到不同区域的损伤分布图，本实验一般收集 100nm × 120nm 的单元扫描图。为了保证结果的可靠性，每种实验条件至少保证两个样品，每个样品至少选取五个不同区域 (范围 1μm × 1μm) 进行观测，每个区域至少 8 - 25 幅单元图，每个样品至少收集 50 幅单元图。统计所测的损伤，可以得到单位面积上的突起数即平均损伤数密度 D。根据损伤效率，可以反推透射离子数密度，此值除以入射离子数密度则可以得到低能离子通过所测样品的透射率。

实验还采用高能质子的透射实验对样品进行检测<sup>[11]</sup>，实验原理与以往文献中介绍的高能 α 离子透射能谱类似<sup>[5]</sup>。由离子加速器产生的 2.5 - 3MeV 质子穿透厚度为 200μg/cm<sup>2</sup> 的薄金箔发生散射，选取前散射角 20° 的散射束对样品进行检测。此束流密度与入射金箔的初始束流相比下降了 4 - 5 个数量级，从而保证检测时辐照对样品透射的影响可以忽略不计。通过半导体探测器接受这些散射束入射样品后的透射离子，测得透射能谱。由于能量为 3MeV 质子的射程较大，得到样品的全透射能谱，如果样品有微缝或微孔，则会有一部分透射离子几乎不损失能量，在能谱上表现为一个无能损透射峰，测量中一般透射离子总计数达到 10<sup>6</sup>，能检测到总面积大于 700μm<sup>2</sup> 的微孔区，约占整个测量面积的 10<sup>-4</sup>。

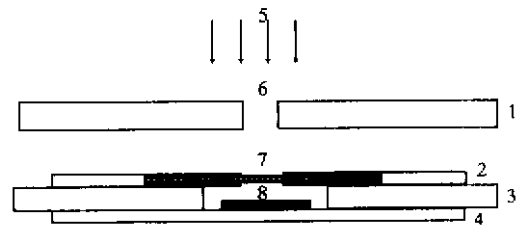


Fig.2 Schematic diagram of the low - energy ion transmission measurement. 1.Target cap 2.Target sample holder 3.Target board 4.HOPG (Higher Oriented Pyrolytic Graphite) sample substrate 5.Ion beam 6.Beam window 7.Target sample 8.HOPG sample

1.3 样品分析和测试

由于样品干而脆非常容易损坏，所有样品都经过了严格的检测挑选。首先是光学显微镜 (400×) 观察，保证样品没有裂纹或小孔。然后在北京大学重离子物理教育部重点实验室的 5SDH - 2 型

2 × 1.7 MeV 串联静电加速器(美国 NEC 公司制造)上进行质子透射能谱测量,挑出没有微孔区的样品。符合要求的样品进行低能离子透射实验。低能透射实验测量时样品接受低能重离子辐照,辐照实验在北京师范大学低能核物理研究所 400kV 离子注入机上进行,注入离子是能量为 40 和 100keV 的 Ar<sup>+</sup> 离子,辐照剂量与育种相当,分别为 5 和 50 × 10<sup>15</sup> ions/cm<sup>2</sup>。辐照靶室的真空为 1 × 10<sup>-3</sup> Pa。辐照过程中,有一部分样品作为陪样,目的是监测实验的本底。具体做法是,一部分样品进辐照靶室,但不接收辐照;另一部分则接收与植物样品同样的辐照。辐照后,再对样品进行了第二次检测,方法同辐照前。

对于样品后 HOPG 通过 STM 进行观测。所用 STM 由北京大学物理系表面物理实验室制造,型号为 DS-2000A。这是一台经过特殊改装的低真空扫描隧道显微镜,可以高效率进行损伤的统计测量。它的扫描腔真空度可达到 100Pa; 单次进针的扫描范围为 1 × 1 μm<sup>2</sup>; 可以自动移动扫描原点的位置进行连续扫描,自动存储扫描图。扫描采用恒定电流模式,一般扫描隧道电流 1nA, 偏压 300mV, 扫描速度 0.04nm/s。收集数据采用交流模式,反映样品表面形貌(或电子态密度)随扫描的相对变化。每个扫描图的由 200 × 200 个扫描点组成。

## 2 结果和分析

### 2.1 低能离子透射实验结果

通过 STM 观测了新解理或解理后保存了一段时间的 HOPG。大量扫描的结果表明这种离子孤立损伤状的形貌在未受荷能离子轰击的 HOPG 上几乎是没的,其出现的数密度小于 10<sup>8</sup> 个/cm<sup>2</sup>。低能离子透射实验之后,对陪样观测的结果也表明,由于得到了很好的封装,孤立突起数密度也小于 10<sup>8</sup> 个/cm<sup>2</sup>。因此数密度 10<sup>8</sup> 个/cm<sup>2</sup> 被作为实验本底。对于得到了同样封装的任何样品,只要所测孤立突起数密度远大于实验本底值,就可以认为低能离子穿透了该样品。

在 30 和 50 μm 切片后观测到了孤立损伤,其中

一些典型的损伤分布如图 3 所示。图中每一个突起都是一个损伤。所测植物样品中观测到了孤立损伤的样品辐照条件和损伤数密度如表 1 所示。对于 100 μm 芸豆子叶切片和西红柿皮,没有测得损伤或所测损伤接近本底。由此推断,低能离子在植物样品中的穿透深度可超过 60 μm 左右,远大于其在一般固体样品中的射程。也就是说,低能离子在植物样品中存在长程穿透现象。这种长程穿透具有以下特点:

1、它的概率很小,即使是所测损伤率最大的 30 μm 切片,考虑到 Ar<sup>+</sup> 离子的损伤在 0.2 - 1 之间,其穿透率也不过 10<sup>-4</sup>。

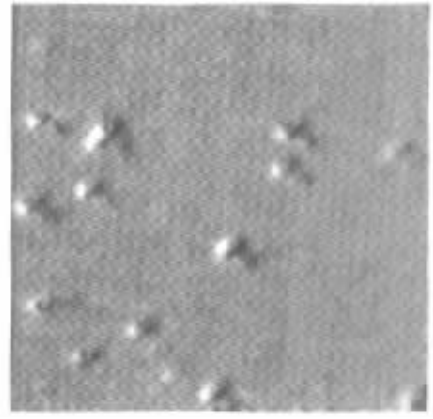


Fig.3 Typical topography of ion - induced damage on HOPG behind botanic samples

2、它的概率随同类样品的厚度增加而迅速减少。如 50 μm 切片的厚度比 30 μm 切片大将近一倍,透射概率小 1 - 2 个数量级。

3、它的概率在不同植物样品中有较大差别。总体来讲,西红柿皮穿透率较低,30 μm 和 50 μm 芸豆切片穿透率较高。

由于荷能粒子与 HOPG 作用产生 STM 可以观测的损伤至少需要大于 C 原子在其表面的移位能 34.5eV<sup>[12]</sup>,而诱导 DNA 单链断裂(SSB)的能量约是 30 - 40 eV<sup>[13]</sup>,两者是相当的。从这个意义上讲,HOPG 可以作为观测荷能粒子与 DNA 作用的一种

Table 1 STM observation results of HOPG put behind botanic samples

Sample	Ion energy (KeV)	Ion dose (ions/cm <sup>2</sup> )	Density of protrusion (cm <sup>-2</sup> )	protrusion to dose
S30-1	40	5 × 10 <sup>15</sup>	1.9 × 10 <sup>10</sup>	3.8 × 10 <sup>-6</sup>
S30-2	40	5 × 10 <sup>15</sup>	2.1 × 10 <sup>11</sup>	4.2 × 10 <sup>-5</sup>
S50-1	100	5 × 10 <sup>16</sup>	2.7 × 10 <sup>10</sup>	5.2 × 10 <sup>-7</sup>
S50-2	100	5 × 10 <sup>16</sup>	1.3 × 10 <sup>11</sup>	2.6 × 10 <sup>-6</sup>

模拟材料, 如果荷能粒子能够在 HOPG 上产生损伤, 它同样可以使 DNA 产生损伤。由本实验的测量结果, 可以推测: 对于芸豆干种子, 极少一部分低能离子至少可以使深度在  $60\mu\text{m}$  左右的 DNA 产生损伤。

通过对所观测的单元扫描图进行统计分析, 研

究了长程穿透的粒子在 HOPG 上产生的损伤在空间分布上的离散程度。具体做法是计算出在某一植物样品后的 HOPG 上的所有单元扫描图的损伤孤立突起数的标准方差, 反映损伤分布在毫米尺度上的离散程度; 同时计算了离子直接辐照 HOPG 的损伤分布。结果如表 2 所示。

**Table 2** The statistics results of damage distribution on HOPG ( $S_{d0} = \sqrt{N}$ ,  $S_d$  is the standard deviation of the number of damage in unit image)

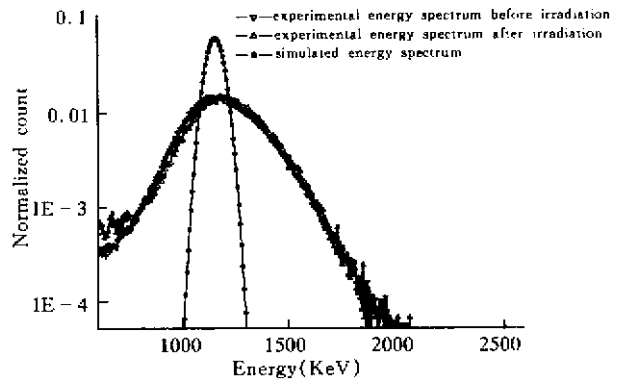
Sample	Ion energy (KeV)	Ion dose (ions/cm <sup>2</sup> )	average protrusions per unit image N	$S_d$	$S_{d0}$
\	100	$2 \times 10^1$	8.7	2.8	2.9
\	40	$2 \times 10^1$	10.0	2.7	3.3
S50-1	100	$5 \times 10^6$	3.4	3.5	1.8
S50-2	100	$5 \times 10^6$	13.1	7.3	3.6

对于均匀分布的损伤, 由于统计涨落, 标准方差  $S_d$  为平均损伤数  $N$  的平方根。可见对于直接辐照 HOPG 上的损伤的离散程度与均匀分布相当; 植物样品后的 HOPG 的损伤分布的离散程度明显大于均匀分布。实验中还计算了样品某一扫描区的所有单元扫描图损伤孤立突起数的  $S_d$ , 来反映损伤分布亚微米尺度上的离散程度。实验表明当平均损伤数密度较小时, 这种分布上的不均匀更为显著, 如对 HOPG 不同区域进行  $4 \times 4$  个单元图的连续扫描, 当所有 16 幅单元图的损伤数只有 3-4 个时, 发现损伤往往都集中在其中的某一两幅单元图中, 这在均匀分布情况下出现的概率较小。损伤的分布反映了透射粒子的分布, 也就是辐照过程中入射离子在植物样品中的能量沉积的空间分布特征。这对于低能粒子育种机制的研究具有重要的意义。微剂量学指出有必要在细胞和分子水平, 即微米到纳米量级的微观空间, 研究电离辐射能量沉积的规律, 提供有关辐照对生物作用机制的信息<sup>[14]</sup>。本实验表明低能离子在植物样品中长程穿透的概率很小, 对于低能离子育种的剂量而言, 到达  $60\mu\text{m}$  左右深度时荷能离子的数密度不超过  $10^{10}$  ions/cm<sup>2</sup>, 可以预计能够到达干种子胚生长点附近的离子会更少, 也就是说胚生长点中的 DNA 分子接受的可能是极低剂量的辐照。对于这种极低剂量下的损伤分布, 本实验表明它在亚微米尺度下很不均匀。考虑到植物染色体的尺寸为几百纳米, 这暗示低能离子辐照干种子时, 染色体的损伤可能会集中在某几个位点。而 X 射线等与染色体的作用是比较均匀的, 这一特点可能与低能离子育种的特点有一定关系。损伤的分布还可以间接的反映植物样品的结构。因为损伤的分布反

映了透射粒子的分布, 而透射粒子的分布又是由它所穿透的样品靶结构来决定的。本实验结果也在一定程度上反映了植物样品的质量分布在亚微米尺度上的不均匀性。

**2.2 高能质子透射能谱**

辐照前后切片和西红柿皮典型的高能质子透射能谱如图 4 所示。植物样品的透射谱能量展宽明显大于将其视作质量分布均匀的样品所得模拟谱的展宽, 表明植物样品在质量分布上是不均匀的, 这与以往植物样品透射能谱实验结果是一致的。奇怪的是, 辐照前后透射能谱并没有发生显著的变化, 而且在透射谱中没有出现无能量损失的离子形成的峰, 这与以往西红柿皮的  $\alpha$  离子透射能谱有一定差别。两者测量的样品差别不大, 只是辐照条件有所不同, 文献报道的辐照剂量率比本实验大将近一个数量级<sup>[5]</sup>。辐照条件对在植物样品中低能离子穿透能力的影响还需要进一步研究。可以推测, 如果植物样品的辐照损伤特别严重, 低能离子在其中的穿透深



**Fig.4** Typical energy spectra of 2.5 MeV proton transmit  $50\mu\text{m}$  thick kidney bean slices

度还会加大。在本实验的辐照条件下,低能离子辐照对植物样品的损伤并没有极大的改变植物样品的结构。也就是说,所观测到的长程穿透现象与植物样品本身结构的关系更密切。推测植物样品本身结构中可能存在一些可供低能离子损失能量很小的穿透通道,比如干种子中的气孔<sup>[15]</sup>,细胞壁上存在通过胞间连丝的纹孔等。

### 3 结 论

低能重离子在植物样品中存在长程穿透现象。

本实验测量表明,能量 40–100keV 的 Ar 离子在芸豆切片中的穿透深度至少可以大于 60 $\mu$ m 左右,而且在此深度处足以使 DNA 分子产生损伤;这种长程穿透的概率很小,育种中生长点细胞所受的辐照可能是极低的剂量;在低剂量下,损伤在亚微米尺度上很不均匀;本实验辐照条件下,辐照损伤对植物样品的结构影响不是特别严重,所观测到的长程穿透的产生可能与植物样品本身结构的关系更密切。

#### 参考文献:

- [1] Z Yu. Ion Beam Application in Genetic Modification[J]. *IEEE Transaction Plasma Science*, 2000,28(1):128–132.  
 [2] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996.176–190.  
 [3] 徐冠仁. 植物诱变育种学[M]. 北京:中国农业出版社,

- 1996.68–70  
 [4] 徐是雄,等. 小麦形态和解剖结构图谱[M]. 北京:北京大学出版社,1983.12.  
 [5] 韩建伟,余增亮. 低能离子对番茄果皮蚀与穿透作用的研究[J]. *生物物理学报*,1998,14(4):757–761  
 [6] 韩光武,卫增泉,马受武等. 注入低能离子在模拟细胞中的能量沉积[J]. *核技术*,1996,19(3):147–151  
 [7] 卫增泉,韩光武,周光明等. 超低能离子注入作物育种的一种重要机制[J]. *生物物理学报*,1996,14(2):315–320  
 [8] Wang Yugang, Kang Yixiu, Zhao Weijiang, et al. Studies on surface damage induced by ion bombardment[J]. *J Appl Phys*, 1998,83(3):1341–1345.  
 [9] Feng Liu, Yugang Wang, Jianming Xue, et al. STM observation of damage on HOPG induced by energetic ions escaped from thick botanic samples[J]. *Phys Lett A*, 2001,283–367.  
 [10] 刘峰. 基于 STM 观测的荷能离子在植物样品种长程穿透行为的研究[D]. 北京大学硕士学位论文,2001.34–38.  
 [11] 王思学. 荷能离子在植物样品种输运过程的透射能谱方法研究[D]. 北京大学硕士学位论文,2001.30–32.  
 [12] Marton D, Boyd KJ, Lytle T. et al. Near-threshold ion-induced defect production in graphite[J]. *Phy Rev B*, 1993,48:6757–6766.  
 [13] 杨垂绪,梅曼彤. 太空放射生物学[M]. 广州:中山大学出版社,1995.40.  
 [14] 李志恒. 辐射剂量学[M]. 北京:原子能出版社,1992.120.  
 [15] 叶常丰,戴心维. 种子学[M]. 北京:中国农业出版社,1994.46.

## STUDIES ON THE LONG-RANGE PENETRATION BEHAVIOR OF LOW-ENERGY IONS IN BOTANIC SAMPLES

LIU Feng, WANG Yu-gang, XUE Jian-ming, WANG Si-xue,  
 CHEN Jiang, Lü Gang, DU Guang-hua, YAN Sha, ZHAO Wei-jiang  
 (Ion Beam Group, Institute of Heavy Ion Physics, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract:** Knowing the possible penetration depth of low-energy ions in botanic samples is essential to understand the mechanism of crop breeding induced by low-energy ion implantation to dry plant seeds. Energetic particles penetrated through certain botanic samples with thickeners of 30 $\mu$ m, 50 $\mu$ m and 100 $\mu$ m kidney bean slices and 20 $\mu$ m tomato peel in low-energy ion irradiation have been detected with transmission measurement. The experimental results demonstrated that the penetrated depth of low-energy ions in these botanic samples such as kidney bean slices was at least 60 $\mu$ m, which is much larger than the projectile range of such ions in normal solids samples. The probability of such long-range penetration was no more than  $10^{-5}$ . The distribution of damage induced by long-penetrated ions was not homogeneous. The energy spectra of high-energy protons transmit through samples were also obtained. It indicated that the damage to the botanic samples during the irradiation was not severe and the long-range penetration of low-energy ions in the botanic samples may result from the special structure of the samples.

**Key Words:** Low energy ion irradiation; Ion transmission measurement; STM;  
 Energy spectrum of high energy proton; Botanic samples