

## NaCl 协同高压电场提高紫花苜蓿辐射敏感性的研究

徐凯迪, 陈浩\*, 宋智青, 丁昌江 (内蒙古工业大学理学院, 内蒙古呼和浩特 010051)

**摘要** 以紫花苜蓿为诱变材料, 通过研究 NaCl 和高压电场的协同作用, 探究高压电场诱变紫花苜蓿的有效方法。结果表明, 经过 NaCl 和高压电场的协同处理后, 存活率达到对照组的 50% 以下, 处理组紫花苜蓿的茎长、根长、苗高和鲜重都比对照组低, 活性氧(ROS)含量较对照组显著升高。结果表明, NaCl 能够提高电场对紫花苜蓿的辐射敏感性。同时, 为研究高压电场中的非均匀电场和离子风的各自贡献, 利用高压电场加遮挡处理紫花苜蓿, 结果证明, 在 NaCl 与高压电场的协同作用中, 离子风起了重要的作用。该研究找到 NaCl 与高压电场联合处理提高紫花苜蓿致死率的方法, 并为紫花苜蓿的诱变工作提供了新方法, 为高压电场诱变技术更广泛的应用提供了试验基础。

**关键词** NaCl; 高压电场; 紫花苜蓿; 辐射敏感性

**中图分类号** S541+.1 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2021)04-0001-04

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.04.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Study of NaCl Cooperating with High Voltage Electric Field to Improve Radiosensitivity of Alfalfa

XU Kai-di, CHEN Hao, SONG Zhi-qing et al (College of Science, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot, Inner Mongolia 010051)

**Abstract** Alfalfa was used as the mutagenesis material to explore the effective method of mutagenesis of alfalfa by HVEF through studying the synergistic effect of NaCl and HVEF. The experimental results showed that after the synergistic treatment of NaCl and HVEF, the survival rate was less than 50 percent of the control group, the stem length, root length, seedling height and fresh weight of alfalfa in the treatment group were lower than that in the control group, and the content of reactive oxygen species (ROS) was significantly higher than that in the control group. The experimental results showed that NaCl could improve the radiosensitivity of HVEF to alfalfa. At the same time, in order to study the contribution of non-uniform electric field and ion wind in high voltage electric field, alfalfa was treated with high voltage electric field and shielding. The results showed that ion wind played an important role in the synergy of NaCl and high-voltage electric field. In this research, a method was found to increase the fatality rate of alfalfa treated with NaCl combined with HVEF, which provided a new method for the mutagenesis of alfalfa and provided an experimental basis for the wider application of HVEF mutagenesis technology.

**Key words** NaCl; High voltage electric field; Alfalfa; Radiosensitivity

紫花苜蓿是多年生豆科开花植物, 它具有产量高、适应性强、草质优良、易于家畜消化等特点, 是养殖业首选饲料, 在畜牧业、农业耕作及生态环保等方面起着非常重要的作用<sup>[1]</sup>。目前, 天然草地的劣变导致饲草产量降低、品质下降, 草畜失衡的矛盾日益加剧, 严重制约了畜牧业可持续发展。紫花苜蓿的诱变育种工作具有重要的意义。当前对于紫花苜蓿已有变异性的发掘利用, 还远未接近理论上生产能力。因此, 诱变育种方法的改进和创新显得十分重要。

高压电场(high voltage electric field, HVEF) 诱变技术是一种新型的物理诱变技术, 它是通过将生物样品放在下极板上, 然后给上极板(针状、线状等不同形状的电极)加一定幅度的直流或交流高电压, 在两电极间形成电晕电场实现物理诱变。该诱变技术具有装置简便、能耗低、不污染环境、样品热效应低和诱变率高等优点, 已获得中国实用新型专利授权<sup>[2-3]</sup>。电晕电场是能产生局部电晕放电的非均匀电场。在非均匀电场中, 电极的尖端处电力线最集中, 电场强度也最大。当前的研究认为, 高压电晕电场诱变效应是 2 种物理因素协同作用产生的: 一种是非均匀电场的作用; 另一种是电晕放电产生的低温等离子体在电场作用下形成离子风, 离子

风会对生物体产生冲击作用。已有的研究发现, 利用高压电晕电场可产生多种生物效应, 例如可获得高效高产的突变菌; 可以提高豌豆、小麦、番茄、穿心莲等多种植物种子的萌发、生长和产量; 可对小麦和刺桐种皮产生刻蚀作用, 进而使其吸水能力提高等<sup>[4-9]</sup>。将高压电场诱变技术应用于紫花苜蓿的诱变育种工作具有重要的意义。

该研究首先利用高压电场对紫花苜蓿干种子进行处理, 结果显示电场处理对紫花苜蓿种子的萌发没有显著影响。在诱变育种工作中, 通常选择处理组相对致死率为 50% (甚至更高) 为合适的诱变剂量。当前的处理方式还达不到诱变育种的要求。研究表明, NaCl 会提高细胞和微生物的辐射敏感性, 从而增强辐射损伤<sup>[10-11]</sup>。将 NaCl 和高压电场诱变技术联用, 拟研究协同处理对紫花苜蓿存活率和初期生长的影响, 以期找到高压电场诱变紫花苜蓿的有效方法。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 供试的紫花苜蓿种子为中草 3 号, 由中国农业科学院草原研究所提供。试验前筛除不良籽粒, 蒸馏水冲洗表面杂质及浮土。

**1.2 仪器** 试验装置如图 1 所示。电源为交流电, 电压为 0~50 kV 连续可调, 频率为 50 Hz。电极系统为针横纵间距均为 4 cm、针长为 2 cm 的多针-板极阵列, 接地端为平面铝板, 电极尖端到接地端的距离为 4 cm。

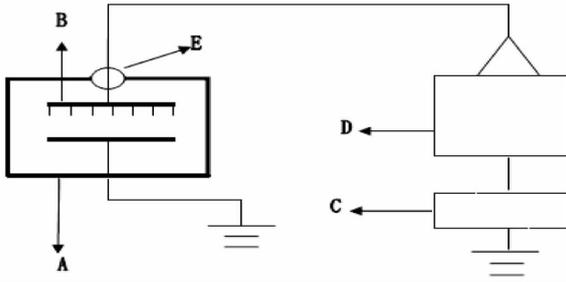
## 1.3 方法

**1.3.1 高压电场对紫花苜蓿干种子的处理。** 将筛选后的干

**基金项目** 国家自然科学基金项目(51767020); 内蒙古自然科学基金项目(2020MS01016, 2019MS06025)。

**作者简介** 徐凯迪(1993—), 男, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 研究方向: 电磁生物技术。\* 通信作者, 高级实验师, 博士, 从事环境生物物理方面的研究。

**收稿日期** 2020-07-23



注:A为超净工作台;B为电极系统;C为控制单元;D为高压电源;E为高压绝缘卡

Note: A was the ultra clean worktable; B was the electrode system; C was the control unit; D was the high voltage power supply; E was the high voltage insulation card

图1 高压电场装置

Fig.1 High voltage electric field (HVEF) device

种子均匀摆放在直径为10 cm、含有3层滤纸的培养皿内,每个培养皿50粒种子。对紫花苜蓿干种子进行电场处理,电压为临近击穿电压,处理时间为10、20、30和40 min,处理后测其发芽率。

**1.3.2 NaCl 适宜浓度的筛选。**为了研究 NaCl 对高压电场作用效果的影响,希望找出 NaCl 单独作用对紫花苜蓿萌发没有影响的浓度。将筛选后的干种子均匀摆放在直径为10 cm、含有3层滤纸的培养皿内,每个培养皿50粒种子。NaCl 浓度分别为0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%,设置对照组,每隔1 d 更换培养皿中的滤纸,以保持 NaCl 浓度和水分恒定。待第8天测其发芽率。

**1.3.3 NaCl 协同高压电场对紫花苜蓿种子的处理。**对紫花苜蓿种子进行48 h左右的预处理(分别浸泡于NaCl和去离子水中),等种子吸胀、萌动后再进行电场处理。采用的电压为17 kV、NaCl 浓度为0.8%(通过NaCl 浓度筛选试验发现,0.8% NaCl 处理紫花苜蓿的发芽率与对照组没有太大变化)。把种子分为6组,每组3皿,分别记为NaCl+HVEF、HVEF、NaCl、对照组(Con)、NaCl+HVEF+Cov(加厚度为1 mm的聚丙烯培养皿盖遮挡,简称NHC)、HVEF+Cov(简称HC)。高压电场处理方式为先在电场下处理4 h,关闭电场,待12 h后,再继续电场下处理4 h。在电场下处理时,待滤纸快干时更换滤纸。每次处理重复3次。

**1.3.4 存活率检测。**将处理完的种子放在含有3层滤纸的培养皿中,每隔1 d 更换每个培养皿中的滤纸,以保持NaCl 浓度和水分恒定。将种子置于光照培养箱中26℃恒温培养,种子出芽后,给光照培养箱加140 lx光照条件,连续光照14 h、黑暗10 h进行培养,8 d后统计存活率。经高压电场处理后,HVEF、NaCl、Con、NaCl+HVEF+Cov、HVEF+Cov 这5组以种子发芽率为存活率,通过观察发现经NaCl+HVEF处理后,紫花苜蓿幼苗在长势上不如3组对照且萌发后的种子接下来也会慢慢凋亡,所以规定经NaCl+HVEF处理后,紫花苜蓿幼苗苗高在3.5 cm(包括3.5 cm)以上时能够成活。

**1.3.5 形态学检测。**培养8 d后分别测量其茎长、根长和苗高,并测量第2、4、6、8天的鲜重。

**1.3.6 幼苗活性氧(ROS)含量测定。**分别在接种第2天随机选取0.2 g同一处理的幼苗冰浴研磨后进行ROS的测定,检测采用的底物是2',7'-二氯氢化荧光素乙二酯。采用Sudhakar等<sup>[12]</sup>的方法,待测样品用10 mmol/L的CM-H<sub>2</sub>DCFDA在25℃下黑暗反应30 min,然后放入酶标仪(SPECTRAMAX I3, MOLECULAR DEVICES Corporation, USA)中,以485 nm的激发光激发,检测530 nm发射光的荧光强度。6次以上重复。

**1.3.7 数据分析。**所有处理都至少进行3次重复,数据取平均值±标准偏差。采用SPSS统计软件和单因素方差分析(ANOVA)分析数据差异, $P<0.05$ 认为具有显著性差异。

## 2 结果与分析

**2.1 高压电场对紫花苜蓿干种子发芽率的影响** 由图2可知,在电压为20 kV时,随着处理时间的增加,紫花苜蓿的发芽率并没有明显变化。说明在临近击穿电压下,处理时间对紫花苜蓿发芽率无太大影响。选用NaCl对紫花苜蓿种子进行预处理之后,再放在电场下进行处理,以期找到高压电场对紫花苜蓿半致死的方法。

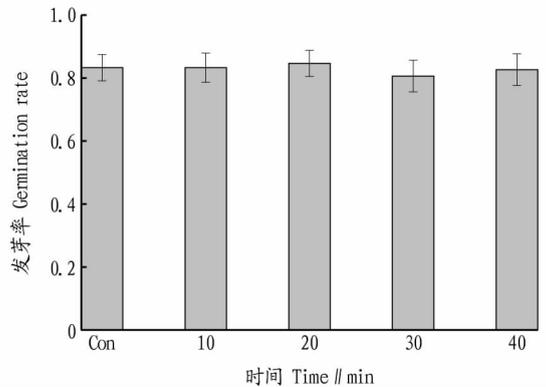


图2 高压电场处理对紫花苜蓿干种子发芽率的影响

Fig.2 Effects of HVEF treatment on germination rate of alfalfa dry seeds

**2.2 NaCl 适宜浓度的筛选** 由图3可知,在0.2%、0.4%、0.6、0.8%的NaCl中,紫花苜蓿干种子的发芽率同对照组相比没有显著变化。当浓度为1.0%时,紫花苜蓿干种子的发芽率开始下降。0.8% NaCl 是紫花苜蓿适宜的浓度。

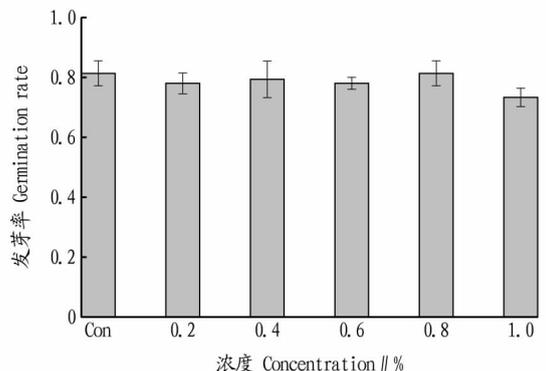
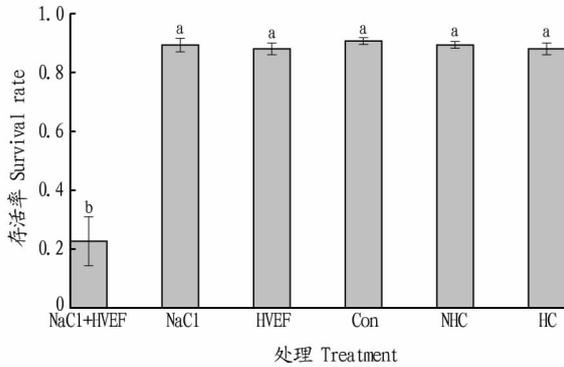


图3 不同浓度NaCl中紫花苜蓿干种子发芽率的变化

Fig.3 Changes of germination rate of alfalfa dry seeds under different NaCl concentration

**2.3 NaCl 协同高压电场对紫花苜蓿存活率的影响** 由图 4 可知,在经高压电场(HVEF)、NaCl 处理后无论有无遮挡的种子,它们的存活率与对照组(Con)相比差异都不明显。但经 NaCl+HVEF 处理后,紫花苜蓿存活率最低,并与其他组有显著性差异。



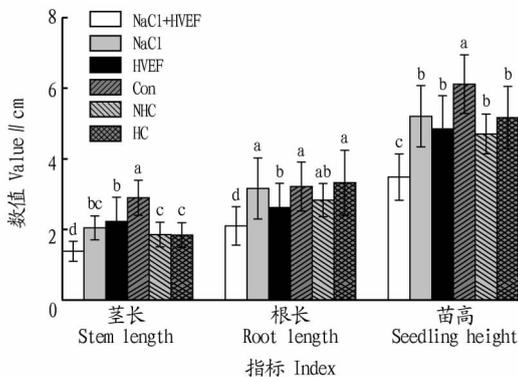
注:不同字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different letters indicated significant differences between treatments ( $P<0.05$ )

图 4 NaCl 协同高压电场处理对紫花苜蓿存活率的影响

Fig.4 Effects of NaCl+HVEF treatment on survival rate of alfalfa

**2.4 NaCl 协同高压电场对紫花苜蓿茎长、根长和苗高的影响** 由图 5 可知,茎长在 6 种处理下,NaCl 与 HVEF、NHC、HC 组之间无显著差异;从根长看,NHC 与 NaCl、HVEF、Con 组之间无显著差异,HC 与 NaCl、Con 组之间无显著差异;从苗高看,NaCl、HVEF、HC、NHC 这 4 组之间无显著差异。从整体可以看出,NaCl+HVEF 处理的紫花苜蓿茎长、根长和苗高最短,且与其他 5 组有显著差异。



注:不同字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different letters indicated significant differences between treatments ( $P<0.05$ )

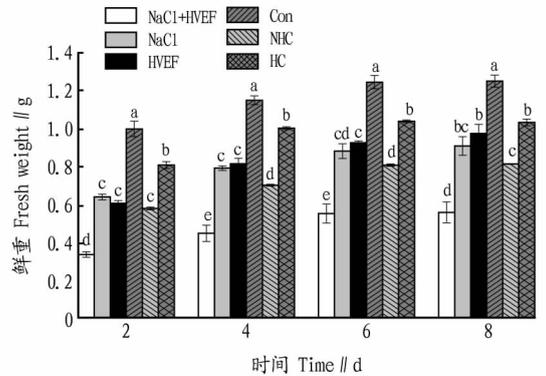
图 5 NaCl 协同高压电场处理对紫花苜蓿种子茎长、根长和苗高的影响

Fig.5 Effects of NaCl+HVEF treatment on stem length, root length and seedling height of alfalfa seeds

**2.5 NaCl 协同高压电场对紫花苜蓿幼苗鲜重的影响** 由图 6 可知,高压电场处理之后,在第 8 天,NaCl 与 HVEF、NHC、HC 之间无显著差异,但经过 NaCl+17 kV 处理过的紫花苜蓿幼苗鲜重最低,且与其他 5 组有显著差异。

**2.6 高压电场处理后紫花苜蓿幼苗 ROS 含量的变化** 研究

表明,ROS 在介导 DNA 损伤以及辐射诱导的旁效应方面非常重要<sup>[13-15]</sup>。为检测 ROS 是否起到了重要作用,定量检测了辐射后 ROS 的产生,结果表明,处理组 ROS 含量显著高于对照组。



注:不同字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different letters indicated significant differences between treatments ( $P<0.05$ )

图 6 NaCl 协同高压电场处理对紫花苜蓿幼苗鲜重的影响

Fig.6 Effects of NaCl+HVEF treatment on fresh weight of alfalfa seedlings

### 3 讨论

该研究以中草 3 号紫花苜蓿种子为试材,用 NaCl 协同高压电场共同作用于紫花苜蓿,观察其幼苗形态指标,结果表明,NaCl 和高压电场共同处理紫花苜蓿种子达到了诱变育种对存活率的要求,NaCl 和高压电场分别单独作用紫花苜蓿,对其存活无显著影响,说明 NaCl 可以提高高压电场对紫花苜蓿的辐射敏感性。经过处理后,紫花苜蓿茎长、根长、苗高和鲜重较对照组显著降低。这表明 NaCl 协同高压电场共同作用于紫花苜蓿,可以使紫花苜蓿的生长活力降低,进而使紫花苜蓿生长缓慢。

通常认为,种子在吸胀萌发期间,细胞膜的完整性和修复能力是影响种子萌发的重要因素。膜修复快,外渗物质少,种子活力则较高;反之,外渗物质多,种子活力则较低。过高的电场将产生过大的显质力和场致伸缩应力,不仅无助于膜相和功能的恢复,而且可能会进一步破坏种子的膜相,导致种子活力大大降低。该研究显示,在去离子水和高压电场作用下,紫花苜蓿的茎长、根长、苗高和鲜重都比在去离子水中低,且有显著差异,这表明高的电场会使种子活力降低,但达不到诱变育种的条件。经过 NaCl 和高压电场共同作用过的紫花苜蓿在所测指标上更低,这可能是 NaCl 加深了电场对种子细胞膜的破坏,外渗物质增多,使种子活力降低。

高压电场生物技术是一种新型高效的生物诱变技术,高压电场生物效应是由多种因素协同复合作用产生的。对其物理特性分析可知,高压电场的生物效应主要由 2 种因素作用形成:一是非均匀电场的作用,二是放电等离子体的作用。为了进一步探究高压电场中两因素的各自作用及贡献,在处理紫花苜蓿种子时,一组直接暴露于高压电场中,一组加培养皿盖遮挡,以阻断离子风对种子的物理化学刻蚀。结果发

现,当有培养皿盖遮挡时,通过对 NaCl、NaCl+HVEF、NHC 这 3 组处理进行分析,无论是茎长、根长、苗高,还是鲜重,都可以说明在 NaCl 与高压电晕电场的协同作用中,离子风起到了重要的作用。

高压电场非均匀放电同时还产生一些化学物质,如活性氧(ROS)。研究表明,ROS 在细胞增殖、分化和凋亡中发挥着重要作用,并且拥有信号分子的功能。ROS 是电磁因果链原初作用中连接物理和生物解释的一个重要标志,等离子体作用后,在细胞基质中产生的 ROS 进入细胞,与细胞中的大分子发生作用,从而改变细胞的代谢活性和遗传特性。大量研究表明,ROS 在高浓度下对有机体极其有害,而在低浓度下,ROS 能作为第二信使介导植物对激素或环境胁迫的多种应答反应<sup>[16-17]</sup>。NaCl 协同高压电场共同作用过的紫花苜蓿 ROS 含量比对照组高很多,这表明紫花苜蓿所受的损伤程度更高,不利于种子生长。

#### 4 结论

NaCl 可以增强高压电场对紫花苜蓿辐射敏感性,提高致死率;在 NaCl 与高压电晕电场的协同作用中,离子风起到了重要作用;NaCl 协同高压电场的处理方法可以应用于紫花苜蓿的诱变育种工作。

#### 参考文献

- [1] 谢开云,何峰,李向林,等.我国紫花苜蓿主产田土壤养分和植物养分调查分析[J].草业学报,2016,25(3):202-214.
- [2] 宋智青,丁昌江,栾欣昱,等.高压电晕电场生物效应研究评述[J].核农学报,2019,33(1):69-75.
- [3] 宋智青,陈浩,王景峰,等.一种细胞分子诱变修饰装置:CN 201721824820.8[P].2018-08-07.
- [4] STOLÁRIK T, HENSELOVÁ M, MARTINKA M, et al. Effect of low-temperature plasma on the structure of seeds, growth and metabolism of endogenous phytohormones in pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Plasma chemistry and plasma processing, 2015, 35(4): 659-676.
- [5] ZAHORANOVÁ Z, HENSELOVÁ M, HUDECOVÁ D, et al. Effect of cold

- atmospheric pressure plasma on the wheat seedlings vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface [J]. Plasma chemistry and plasma processing, 2016, 36(2): 397-414.
- [6] ZHOU Z W, HUANG Y E, YANG S Z, et al. Introduction of a new atmospheric pressure plasma device and application on tomato seeds [J]. Agricultural sciences, 2011, 2(1): 23-27.
- [7] BORMASHENKO E, GRYNIOV R, BORMASHENKO Y, et al. Cold radio-frequency plasma treatment modifies wettability and germination speed of plant seeds [J]. Scientific reports, 2012, 2: 1-8.
- [8] LI L, JIANG J F, LI J G, et al. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean [J]. Scientific reports, 2014, 4: 1-7.
- [9] LI Y J, WANG T C, MENG Y R, et al. Air atmospheric dielectric barrier discharge plasma induced germination and growth enhancement of wheat seed [J]. Plasma chemistry and plasma processing, 2017, 37(6): 1621-1634.
- [10] 朱玲燕. NaCl 环境影响辐射旁效应机理的研究 [D]. 合肥: 中国科学院合肥物质科学研究院, 2008.
- [11] KE Z G, CHEN Z, HUANG Q. Effect of chloride on bacterial inactivation by discharge plasma at the gas-solution interface: Potentiation or attenuation? [J/OL]. Plasma processes and polymers, 2018, 15(3) [2020-04-05]. <https://doi.org/10.1002/ppap.201700153>.
- [12] SUDHAKAR BABU T, AKHTAR T A, LAMPI M A, et al. Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: Implication of reactive oxygen species as common signals [J]. Plant & cell physiology, 2003, 44(12): 1320-1329.
- [13] ZHOU H N, RANDERS-PEHRSON G, WALDREN C A, et al. Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2000, 97(5): 2099-2104.
- [14] MOTHERSILL C, SEYMOUR C B. Radiation-induced bystander effects-implications for cancer [J]. Nature reviews cancer, 2004, 4(2): 158-164.
- [15] AZZAM E I, DE TOLEDO S M, SPITZ D R, et al. Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures [J]. Cancer research, 2002, 62(19): 5436-5442.
- [16] APEL K, HIRT H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. Annual review of plant biology, 2004, 55(1): 373-399.
- [17] BAXTER A, MITTLER R, SUZUKI N. ROS as key players in plant stress signalling [J]. Journal of experimental botany, 2014, 65(5): 1229-1240.