

电场处理柠条种子对干旱条件下 幼叶基因表达的影响

刘翔宇¹, 杨体强^{1*}, 胡燕飞¹, 王 郑², 哈斯阿古拉², 刘 瑶¹, 王文星¹, 赵清春¹

(1 内蒙古大学 物理科学与技术学院, 呼和浩特 010021; 2 内蒙古大学 生命科学学院, 呼和浩特 010021)

摘 要:以沙生植物柠条锦鸡儿为材料, 设计自然对照(CK)、干旱处理对照(SCK)、电场处理(电场强度 2 kV/cm, 电场频率 15 kHz, 处理时间 5 min)种子后在干旱条件下进行种子发芽(ET), 并采用 3 个锚定引物和 26 个随机引物形成 78 组引物, 利用 DDRT-PCR 技术, 分析电场处理柠条种子在干旱胁迫条件下生长的幼苗幼叶基因表达水平的变化, 从基因转录水平探讨电场对柠条锦鸡儿抗旱性的影响机理。结果显示: (1) 干旱胁迫组相对于自然对照组增加条带 282 条, 缺失条带 179 条; 电场处理组相对于自然对照组增加条带 303 条, 缺失条带 200 条; 电场处理组相对于干旱胁迫组增加条带 236 条, 缺失条带 257 条。 (2) 回收差异片段获得电场处理诱导的 3 个差异表达序列(EST-1、EST-2、EST-3), 经 Blastn 比对, EST-1 与大豆 LOC100305895(LOC100305895)一致性为 76%, EST-2 与鹰嘴豆 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖 N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 SEC-like(LOC101506182)选择性剪切体 X2 一致性为 88%, EST-3 与百脉根克隆 JCVI-FLLj-5M12 一致性为 88%。 (3) 经 Blastx 比对, EST-1 与 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(390 aa)145~195 氨基酸序列一致性达到 52%, EST-2(308 bp)与氧连 N-乙酰葡萄糖胺转移酶(744 aa)706~744 氨基酸序列一致性高达 97%, EST-3 与酰基辅酶 A 结合蛋白(90 aa)氨基酸序列一致性高达 97%。研究结果为进一步从基因表达的角度分析电场的生物效应及其提高抗逆性的分子机理, 为电场处理植物种子的农业技术应用提供理论依据。

关键词: 电场; 柠条种子; 干旱胁迫; DDRT-PCR 技术

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Expression Difference of Genes in the *Caragana korshinskii* Young Leaves under Drought Stress by Electric Field Treatment on Seeds

LIU Xiangyu¹, YANG Tiqiang^{1*}, HU Yanfei¹, WANG Zheng²,
HASI Agula², LIU Yao¹, WANG Wenxing¹, ZHAO Qingchun¹

(1 School of Physical Science and Technology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; 2 College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract: In this study, a kind of psammophytes, *Caragana korshinskii* seeds, were used as experiment material. The seeds were treated by electric field and the seedling growth was under drought stress conditions and the expression difference of genes in the *C. korshinskii* young leaves were tested by mRNA differential display technology(DDRT-PCR). In order to compare the gene expression difference, young leaf tissues were classified three samples include nature control(called CK), drought stress control(called SCK) and electric field treatment group(strength 2 kV/cm, frequency 15 kHz, time 5 min, called ET). The 3 anchor

收稿日期: 2014-06-27; 修改稿收到日期: 2014-11-11

基金项目: 国家自然科学基金(51067005)

作者简介: 刘翔宇(1989—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事电场生物效应的分子机理研究。E-mail: lxxyy713@163.com

* 通信作者: 杨体强, 教授, 主要从事电场和低能离子束对植物影响的研究。E-mail: yangtq@imu.edu.cn

primers and 26 random primers were used to form 78 primer pairs. The DDRT-PCR was carried out 234 PCR reactions for the three kinds of samples. The cDNA bands showed significant difference between three young leaf tissue samples. (1) Compared with CK, SCK appeared 282 novel bands and disappeared 179 bands, and ET appeared 303 novel bands and disappeared 200 bands. Besides, compared with SCK, ET appeared 236 bands and disappeared 257 bands. (2) The novel bands were recovered and three differentially expressed cDNA fragments were obtained. All of the expressed sequence tags (EST) had the homology with known cDNA clones in Genbank databases. EST-1 was similar to *Glycine max* uncharacterized LOC100305895 (LOC100305895) and the identity was 76%; EST-2 was similar to *Cicer arietinum* probable UDP-N-acetylglucosamine—peptide N-acetylglucosaminyltransferase SEC-like (LOC101506182), transcript variant X2 and the identity was 88%; EST-3 was similar to *Lotus japonicus* clone JCVI-FLLj-5M12 and the identity was 88%. (3) After Blastx comparison, EST-1 was similar to the 145–195 aa of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (390 aa) and the identity was 52%; EST-2 was similar to the 706–744 aa of O-linked GlcNAc transferase like protein (744 aa) and the identity was 97%; EST-3 was similar to acyl-CoA-binding protein (90 aa) and the identity was 97%. Our result provides experimental basis to analyze the biological mechanisms of drought resistance improvement induced by electric field treatment on plant seeds from the gene expression difference.

Key words: electric field; *Caragana korshinskii* seeds; drought stress; DDRT-PCR

自 20 世纪 60 年代, Murr^[1] 与 Sidaway^[2] 先后研究电场对植物细胞膜透性和种子发芽率的影响后, 人们用电场对多种植物的种子进行处理, 研究电场对种子的萌发、生理生化反应、幼苗生长发育、产量与质量等表现特性的影响^[3-10]。20 世纪 90 年代, 研究人员在电场处理种子生物效应研究中, 又发现了高压电场对种子抗逆性(抗旱、抗冻等)的影响^[11-14]。已有的研究结果证明, 用恰当的电场处理种子, 可提高种子活力, 增强抗逆性, 促进幼苗生长, 提高产量与质量。电场处理种子所产生的作用, 与已有各种良种培育如农艺、生物、化学以及其它物理方法相比, 为农业生产提供了一种简便、快速、低能耗和无污染、并实现稳产和高产的新技术。但是, 电场处理种子的生物效应并没有得到广泛有效地开发利用, 其中一个很重要原因是电场生物效应机理尚不十分清楚, 缺乏理论指导。在电场生物效应的机理研究中, 人们从酶活性变化, 核酸、蛋白质代谢, 酶谱谱带, 酶蛋白分子构象以及自由基^[15-21]等不同角度进行了分析。本实验测定了电场处理柠条锦鸡儿种子对于干旱胁迫条件下幼叶基因表达的影响, 从基因转录水平分析电场对柠条锦鸡儿抗旱影响的机理, 为电场处理植物种子的农业技术提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

以柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii*)种子为材料(以下简称柠条种子), 柠条种子 2012 年采自鄂尔多斯草原。

1.2 实验方法

1.2.1 电场处理、种子萌发和幼苗培养 电场处理条件由场强、频率、处理时间 3 个变量组成。电场由 2 块直径 60 cm 的圆形金属平板电极产生。种子单层置于接地电极板上, 调节两极板电场频率和电压设置处理条件。可调频高压电源由大连理工大学静电与特种电源研究所制作。在电场强度 1~4 kV/cm, 电场频率 8~17 kHz, 处理时间 5~15 min 范围内 120 个不同电场处理条件中, 筛选出显著提高种子萌发和幼苗生长抗旱性的电场处理条件, 即电场强度 2 kV/cm, 电场频率 15 kHz, 处理时间 5 min。本实验用筛选所得电场条件处理柠条种子, 测定柠条幼苗幼叶基因转录水平的变化。实验设 2 个对照组和电场处理组(ET)。其中一个为自然对照组(CK), 另一个为干旱胁迫对照组(SCK)。SCK 和 ET 种子萌发时用 PEG-6000 模拟干旱胁迫。

CK 用 30 mL 去离子水、SCK 和 ET 用 30 mL 16% PEG-6000 溶液浸泡 10 h 后进行萌发。100 g 石英砂均匀铺在直径 15 cm 培养皿内作为种子发芽床, CK 加入 20 mL 水, SCK 和 ET 加入 20 mL 16% PEG-6000 溶液。种子萌发与生长在人工气候室中(温度为 25 ℃, 湿度为 50%)进行。种子萌发后第 3 天移到相同尺寸塑料花盆中, 花盆中盛有相等质量的蛭石和水分。各组幼苗生长的环境相同。生长期不再补充水分, 幼苗生长 7 d 时, 取幼叶提取总 RNA。

1.2.2 柠条幼叶总 RNA 提取 柠条幼叶总 RNA 提取采用天根生化科技有限公司 RNApant plus 植

物 RNA 提取试剂盒进行。提取的总 RNA 经 DNase I 消化后,利用微量紫外分光光度计(ND-1000 型,NanoDrop)进行紫外比色确定其产量及纯度,用 1%非变性琼脂糖凝胶电泳(EB 染色)检测其完整性。

1.2.3 cDNA 第一链合成 cDNA 第一链合成采用天根生化科技有限公司 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒完成。利用 Thermo Cycler(VertiTM 96-well,ABI)进行 PCR 反应。PCR 反应体积为 20 μL ,包含 4 μg 总 RNA,2 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 锚定引物[生工生物工程(上海)],编号为 B0327、B0328、B0329(表 1),2 μL 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP,4 μL First Strand butter(5 $\times$),200 U M-MLI 逆转录酶,剩余体积用 RNase-free 超纯水补齐。于 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 50 min。

用表达量稳定的肌动蛋白(β -actin)内参引物 cDNA 进行 PCR 扩增以检验 cDNA 质量。PCR 反应体积为:1.5 μL cDNA 样品,12.5 μL Premix *Taq*TM(TaKaRa),1 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内参引物,10 μL RNase-free 超纯水。PCR 反应参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,20 个循环反应后,72 $^{\circ}\text{C}$ 补平 10 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 第一链合成情况。

1.2.4 DDRT-PCR 采用上述 3 个锚定引物和 26 个随机引物[生工生物工程(上海)],编号为 B0301~B0326(表 1),形成 78 组引物,分别以 CK、SCK、和 ET、逆转录产物为底物进行 3 $\times$ 78 个 PCR 反应。PCR 反应体积为 25 μL :1.5 μL cDNA 样品,12.5 μL Premix *Taq*,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 锚定引物和随机引物各 0.5 μL ,10 μL RNase-free 超纯水。PCR 反应参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,42 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,40 个循环反应后,72 $^{\circ}\text{C}$ 补平 10 min。扩增产物于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.5 变性聚丙烯酰胺电泳、银染及产物回收 用 6%尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离差显产物。取 2 μL PCR 产物加甲酰胺上样缓冲液 4 μL ,90 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,恒定电压 200 V,电泳 1 h。将凝胶浸泡在 AgNO_3 溶液(2 g/L AgNO_3 ,10%无水乙醇)中,于水平摇床(ZHWY-1102,上海智城分析仪器制造有限公司)上振荡染色 10 min,然后蒸馏水漂洗 2 次,于显色液(20 g/L NaOH,0.2%甲醛)中显色。直到银染 DNA 条带和背景有适宜对比度时(约 10 min),蒸馏水中漂洗数次中止显色。

使用生工生物工程(上海)UNIQ-10柱式PAGE

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequences(5'→3')
B0301	TACAACGAGG
B0302	TGGATTGGTC
B0303	CTTTCTACCC
B0304	TTTTGGCTCC
B0305	GGAACCATTC
B0306	AAACTCCGTC
B0307	TCGATACAGG
B0308	TGGTAAAGGG
B0309	TCGGTCATAG
B0310	GGTACATTGG
B0311	TACCTAAGCG
B0312	CTGCTTGATG
B0313	GTTTTCGCAG
B0314	GATCAAGTCC
B0315	GATCCAGTAC
B0316	GATCACGTAC
B0317	GATCTGACAC
B0318	GATCTCAGAC
B0319	GATCATAGCC
B0320	GATCAATCGC
B0321	GATCTAACCG,
B0322	GATCGCATTG
B0323	GATCTGACTG
B0324	GATCATGGTC
B0325	GATCATAGCG
B0326	GATCTAAGGC
B0327	AAGCTTTTTTTTTTTTA
B0328	AAGCTTTTTTTTTTTTG
B0329	AAGCTTTTTTTTTTTC

胶 DNA 回收试剂盒回收差异片段。以回收的差异条带为模板进行二次 PCR 扩增。

1.2.6 差异表达序列分析 利用 pMD₁₉-T Vector 载体(TaKaRa Biotechnology)连接、克隆二次扩增 PCR 产物,随后转入感受态细胞 DH5 α (天根生化科技有限公司)。筛选重组克隆进行测序[测序由生工生物工程(上海)完成]。

用 DNAMAN 6.0 软件(Lynnon Biosoft)人工去除克隆测序结果中的载体序列。采用 BLAST 对 EST 差异序列进行比对。

1.2.7 RT-PCR 验证差异基因 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。分别重新提取自然对照组、胁迫对照组和电场处理组的 RNA,重复 3 次并合成 cDNA 第一链。以合成的 cDNA 和回收的差异片段为模板,加入对应的上下游引物,通过 RT-PCR 扩增进行鉴定。用回收的差异片段扩增得到

的产物为标准条带进行假阳性鉴定。

2 结果与分析

2.1 DDRT-PCR 结果分析以及差异条带 RT-PCR 验证

柠条幼叶总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)显示, RNA 分子 28S、18S 的条带清晰, 完整性较好。实验中测得各组 RNA 的 $OD_{260/280}$ 和 $OD_{260/230}$ 均在 2.0 左右, 适用于差异显示分析。

从 β -actin 琼脂糖凝胶电泳结果(图 2)可知, 在 100~200 bp 之间出现清晰的单一条带, 条带位置与预期大小(180 bp)相符, 表明逆转录合成的 cDNA 第一链完整性较好。

分别以 CK 组、SCK 组和 ET 组的逆转录产物为底物, 采用 3 种锚定引物与部分随机引物形成 78

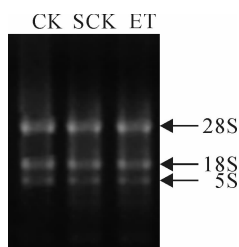


图 1 不同处理柠条幼叶总 RNA 电泳图

CK. 自然条件下的种子发芽幼苗; SCK. 干旱处理下的种子萌发幼苗; ET. 电场处理(电场强度 2 kV/cm, 电场频率 15 kHz, 处理时间 5 min)后的种子在干旱处理下萌发的幼苗; 下同

Fig. 1 Electrophoresis of *C. korshinskii* young leaves total RNA

CK. Nature control; SCK. Drought stress control; ET. Electric field treatment(strength 2 kV/cm, frequency 15 kHz, time 5 min); The same as below.

对引物组合进行 DDRT-PCR。结果(图 4)显示, 大多数高分辨力的差异片段在 2 000 kb 以下(图 4 中 2 000 kb 以下条带进行了标记)。每一组引物的 CK、SCK 和 ET 差异结果显示, 既有新出现的条带, 也有消失的条带。SCK 与 CK 间的差异条带数为 461 条, 其中增加 282 条, 缺失 179 条; ET 与 CK 间差异条带为 503 条, 其中增加 303 条, 缺失 200 条; ET 与 SCK 间差异条带数为 493 条, 其中增加 236 条, 缺失 257 条。

RT-PCR 鉴定得到 3 个差异表达的条带(图 3)。从图 3, a 可知, 只有 ET 出现清晰的单一条带, 条带位置与回收的差异片段位置相符, 表明 EST-1 是电场处理诱导表达的。从图 3, b 可看出, CK、SCK 和 ET 均出现清晰单一条带, 条带位置与回收的差异条带位置相符, 但可看出 SCK 的表达量明显少于 CK 和 ET, 说明 EST-2 在自然条件下是正常表达的, 干旱胁迫抑制了 EST-2 的表达, 使 EST-2 表达量下降, 而电场处理使 EST-2 的表达恢复正常。从图 3, c 可看出, 只有 SCK 在回收条带的相应

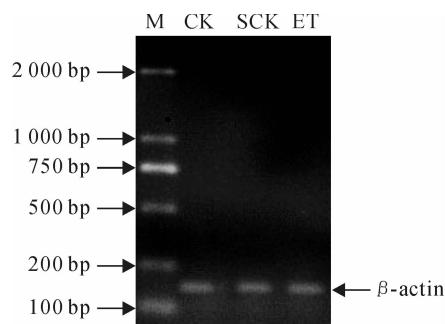


图 2 cDNA 第一链 β -actin 基因电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of cDNA first chain β -actin gene

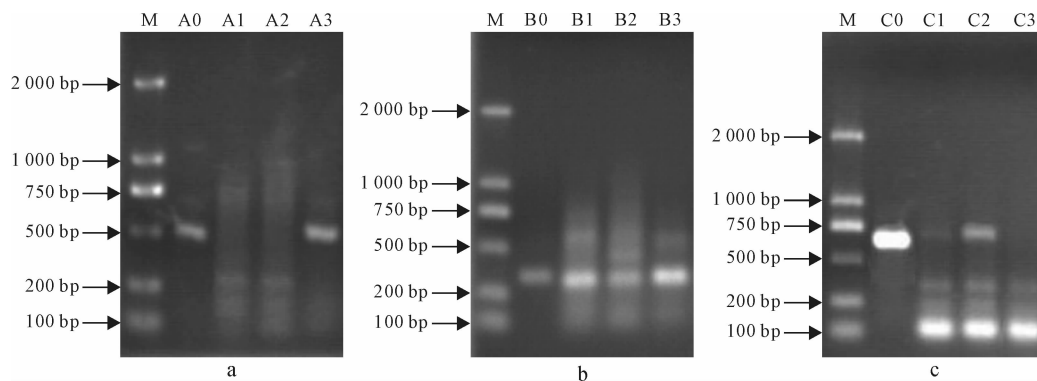


图 3 RT-PCR 结果

M. DL2000; 0. 回收得到的差异片段; A. EST-1; B. EST-2; C. EST-3; 1. CK; 2. SCK; 3. ET

Fig. 3 RT-PCR results

M. DL2000; 0. Differential fragments recovered; A. EST-1; B. EST-2; C. EST-3; 1. CK; 2. SCK; 3. ET

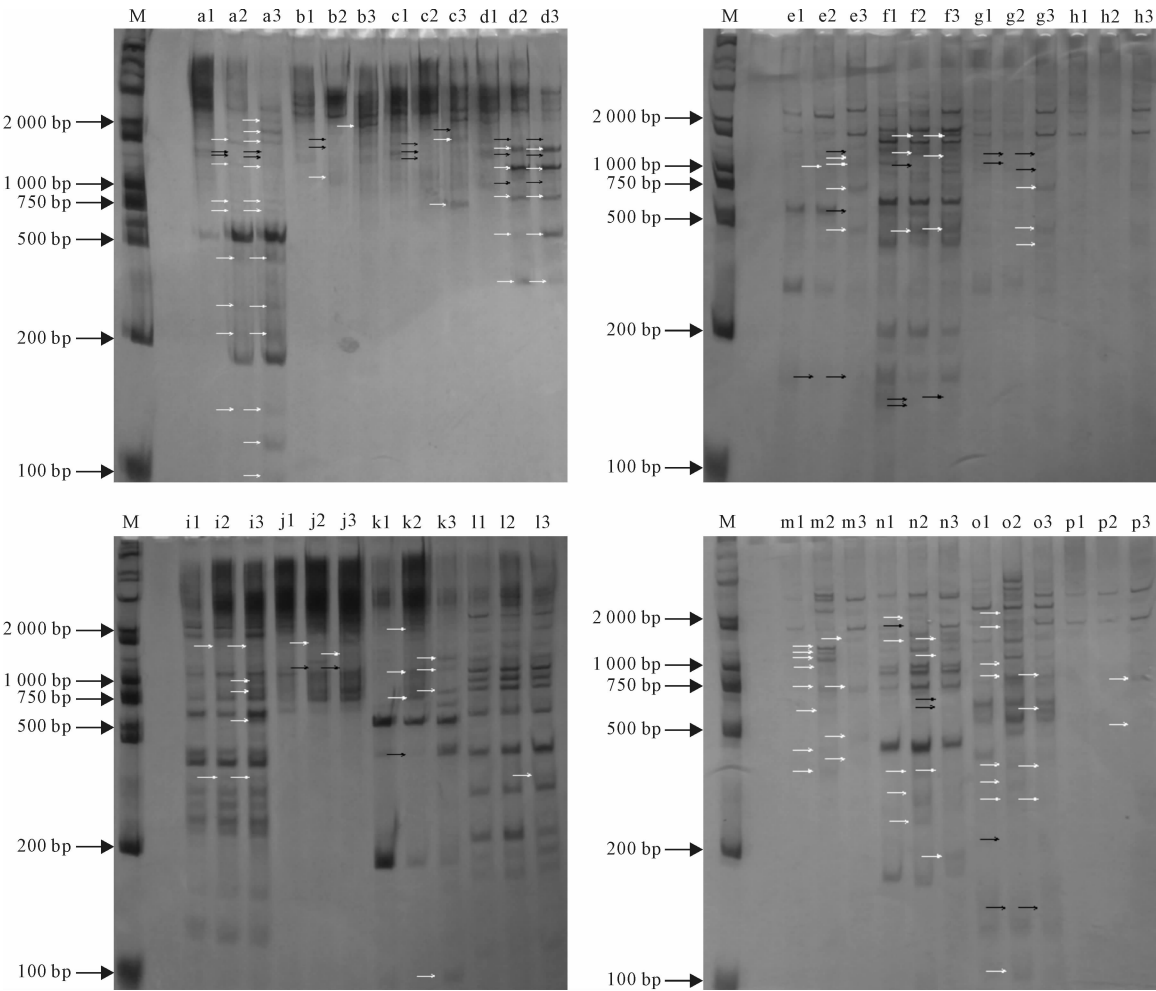


图 4 部分差异条带结果

M. DL2000;1. CK;2. SCK;3. ET;a~p. 不同引物对扩增结果;白色箭头为增加条带,黑色箭头为缺失条带

Fig. 4 Partial results of the differential bands

M. DL2000;1. CK;2. SCK;3. ET;a~p. Differential display results of each primer pair;The white arrows represent appeared bands and the black arrows represent disappeared bands

表 2 差异表达序列的 Blastn 比对结果

序列 Sequence	长度 Length/bp	同源序列 Homologue sequence	一致性 Identity/%
EST-1	534	大豆 LOC100305895(LOC100305895) <i>Glycine max</i> uncharacterized LOC100305895(LOC100305895)	76
EST-2	308	鹰嘴豆 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖肽 N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 SEC-like (LOC101506182), 选择性剪切体 X2 <i>Cicer arietinum</i> probable UDP-N-acetylglucosamine—peptide N-acetylglucosaminyltransferase SEC-like(LOC101506182), transcript variant X2	88
EST-3	472	百脉根克隆 JCVI-FLLj-5M12 <i>Lotus japonicus</i> clone JCVI-FLLj-5M12	88

位置出现单一清晰条带,自然条件 EST-3 是不表达的,干旱胁迫诱导 EST-3 表达,而电场处理后,EST-3 不再表达了,表明 EST-3 是干旱胁迫诱导表达的。

2.2 差异条带生物信息学分析

由于 GenBank 中没有柠条的基因组信息,利用 Blastn 对 EST 序列进行同源比对(表 2),发现 EST-

1 与大豆 LOC100305895 (LOC100305895) 一致性为 76%,EST-2 与鹰嘴豆 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖肽 N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 SEC-like(LOC101506182) 选择性剪切体 X2 一致性为 88%;EST-3 与百脉根克隆 JCVI-FLLj-5M12 一致性为 88%。

利用Blastx对EST序列比对,结果(表3)表明

表 3 差异表达序列 Blastx 比对结果

Table 3 The results of comparing differential expressed sequences with Blastx

序列 Sequence	长度 Length/bp	同源序列 Homologue sequence	一致性 Identity/%
EST-1	534	1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(390 aa) 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase(390 aa)	52
EST-2	308	氧连 N-乙酰葡萄糖胺转移酶(744 aa) O-linked GlcNac transferase like protein(744 aa)	97
EST-3	472	酰基辅酶 A 结合蛋白(90 aa) acyl-CoA-binding protein(90 aa)	97

EST-1 与 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(390 aa) 145~195 比较,E=3.0,相同残基数为 18 个(Identities=18/51),相同和相似残基数总和为 27 个(Positives=27/51),氨基酸序列一致性达到 52%;EST-2 与氧连 N-乙酰葡萄糖胺转移酶(744 aa) 706~744 比较,E=1e-18,相同残基数为 36 个(Identities=36/39),相同和相似残基数总和为 38 个(Positives=38/39),氨基酸序列一致性高达 97%;EST-3 与酰基辅酶 A 结合蛋白(90 aa)比较,E=4e-52,相同残基数为 80 个(Identities=80/90),相同和相似残基数总和为 88 个(Positives=88/90),氨基酸序列一致性也高达 97%。

3 讨 论

研究表明^[22],电场处理柠条种子增强了种子萌发期和幼苗期的抗旱性。本研究结果表明,电场处理的柠条种子在干旱胁迫条件下生长的幼苗基因转录发生了变化。

已有研究表明,电场对 ATP 合成产生影响^[23]。ATP 作为生命活动过程中的初级能源,参与生命现象中很多生理生化过程,包括转录和翻译。电场作用过程是一个能量输入过程,电场能诱导细胞内 ATP 的形成^[24],ATP 的增加有可能使植物开启某

些抗逆基因的概率提高。

EST-1 可能是电场处理诱导激活了耐干旱性相关基因的表达,其产物可能与降低干旱胁迫对柠条造成伤害有关。EST-2 被干旱胁迫抑制,在 SCK 组表达量减少,电场处理使 EST-2 表达恢复正常,可能是电场处理修复了干旱胁迫造成的损伤。EST-3 可能转录的产物为酰基辅酶 A 结合蛋白(ACBP)。ACBP 是一个参与植物逆境反应的蛋白家族。该家族的蛋白结构保守,一个酰基辅酶 A 结合结构域(ACB),能与长链的酰基辅酶 A 结合,在酰基辅酶 A 代谢中发挥作用。大分子 ACBP 影响植物的生长发育,在植物抗生物胁迫和非生物胁迫的反应中起着重要作用。SCK 组表达 EST-3 而 ET 组未表达,说明电场处理减轻了干旱胁迫程度,从而降低了干旱胁迫的损伤。

GenBank 中无 EST-1、EST-2、EST-3 及其同源序列的功能信息。本实验分离到的 EST 序列较小,不一定能代表差异表达基因的全部信息。因此还需进一步获得差异表达序列的全长 cDNA 并对基因片段的功能进行鉴定,以期分析电场处理柠条种子对其抗旱性影响的分子机理。生物功能是由基因的表达实现的,分析电场对基因表达的影响,可能是阐明电场处理种子生物效应原发机制的有效途径。

参考文献:

[1] MURR L E. Mechanism of plant-cell damage in an electrostatic field[J]. *Nature*,1964,**201**(4 926):1 305—1 306.

[2] SIDAWAY G H. Influence of electrostatic field on seed germination[J]. *Nature*,1966,**211**(5 046):303—303.

[3] STONE R B,CHRISTIANSEN M N,NELSON S O,*et al*. Induction of germination of impermeable cottonseed by electrical treatment[J]. *Crop Science*,1973,**13**(2):159—161.

[4] SEIICHIRO I,NOBUAKI I. Effect of electric field on physical states of cell-associated water in germinating morning glory seeds observed by H-NMR[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*,1999,**1 426**(1):17—31.

[5] JAE-DUK M,HWA-SOOK C. Acceleration of germination of tomato seed by applying AC electric and magnetic fields[J]. *Journal of Electrostatics*,2000,**48**(2):103—114.

[6] BERA A K,MAITY U. Enhancing yield potential in rice by pre-sowing electric current treatment of rice grains[J]. *Plant Archives*,2004,**4**(1):17—24.

- [7] CHRISTIAN J, SIMONE B, MICHAEL P, *et al.* Effects of nanosecond pulsed electric field exposure on *Arabidopsis thaliana* [J]. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 2009, **16**(5): 1 322—1 328.
- [8] DYMEK K, DEJMEK P, PANARESE V, *et al.* Effect of pulsed electric field on the germination of barley seeds [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, **47**(1): 161—166.
- [9] XI G (习 岗), LIU K (刘 锴), XU Y K (徐永奎), *et al.* Effects comparison of seeds germinating treated by extremely low frequency PEF and HVEF [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* (农业工程学报), 2013, **29**(1): 265—271 (in Chinese).
- [10] WANG SH H (王淑惠), LI X D (黎先栋), SONG CH X (宋长铤). Effects of wheat seedlings growth and chemical composition by high voltage electrostatic field treatment on seeds [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1991, **18**(5): 392—393.
- [11] ZHANG X H (张新华), LI F J (李富军). Research advances of several physical techniques in improving plant resistance [J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2005, **25**(9): 1 894—1 899 (in Chinese).
- [12] YANG T Q (杨体强), LIANG Y ZH (梁运章), LI M L (李梦莲), *et al.* Study on the drought resistance of seedling growth for oil sunflower seed treated with electric field [J]. *Journal of Inner Mongolia University* (Nat. Sci. Edi.) (内蒙古大学学报·自然科学版), 1998, **9**(2): 282—283 (in Chinese).
- [13] LÜ J G (吕剑刚), YANG T Q (杨体强), SU E G (苏恩光), *et al.* Effect of electric field treatment of wheat seeds on the salt resistance of growth in seedling stage [J]. *Journal of Inner Mongolia University* (Nat. Sci. Edi.) (内蒙古大学学报·自然科学版), 2001, **32**(6): 707—710 (in Chinese).
- [14] CAKMAK T, DUMLUPINAR R, ERDAL S. Chilling resistance of *Phaseolus vulgaris* and *Brassica oleracea* under a high-intensity electric field [J]. *Zeitschrift für Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences*, 2010, **65**(5—6): 380—386.
- [15] WEN SH B (温尚斌), MA F R (马福荣), XU SH M (许守民), *et al.* The mechanism of ion absorption stimulated by the high voltage electrostatic field [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展), 1995, **22**(4): 377—379 (in Chinese).
- [16] RUKUI H, SUTVEE S, LOP P, *et al.* Changes in antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation and seedling growth of cucumber seed induced by hydropriming and electric field treatments [J]. *Natural Sciences*, 2006, **40**(4): 825—834.
- [17] ZHANG R M (张汝民), GAO Y (高 岩), SHI X H (史绣华). The effect of static electric field on metabolism of nucleic acids and proteins during seed germination of *Hedysarum scoparium* [J]. *Journal of Arid Land Resources and Environment* (干旱区资源与环境), 1996, **10**(4): 87—90 (in Chinese).
- [18] WANG X (王 莘), WANG D H (王德辉), ZHU W (祝 威), *et al.* Effect of HVEF on isozyme strip of *Oenothera biennis* L. seeds during their sprouting period [J]. *Journal of Jilin Agricultural University* (吉林农业大学学报), 1998, **20**(2): 93—95 (in Chinese).
- [19] XU Q (许 强), YANG T Q (杨体强), AO DUNGERILE (敖敦格日勒), *et al.* Study on the effect of electric field on the secondary structure of HRP by circular dichroism [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 2007, **27**(3): 565—568 (in Chinese).
- [20] LIU Y Y (刘燕燕), ZENG X A (曾新安), CHEN X D (陈晓东), *et al.* Effects of pulsed electric fields and heat treatments on SPI structure analyzed by FTIR [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 2010, **30**(9): 2 340—2 344 (in Chinese).
- [21] BAI Y X (白亚乡), HU Y C (胡玉才). Original mechanism of biological effects of electrostatic field on crop seeds [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* (农业工程学报), 2003, **19**(2): 49—51 (in Chinese).
- [22] YANG T Q (杨体强), ZHU H Y (朱海英), HUA H X (华宏旭), *et al.* Sensitivity to drought stress of the germination and seedling growth of *Caragana Korshinskii* from seeds treated with electric field [J]. *Journal of Desert Research* (中国沙漠), 2013, **33**(6): 1 717—1 722 (in Chinese).
- [23] CAO Y J (曹永军), XI G (习 岗), SONG Q (宋 清), *et al.* Effects of long-term treatment with different electrostatic fields on photosynthetic and physiological indices of three crops [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2007, **28**(1): 86—90 (in Chinese).
- [24] YU SH G (郁士贵), XIE Q D (谢勤东), CHEN ZH G (陈哲良). Studies on the effect of external electrical field on structure and function of spinach chloroplasts Ⅲ. Enhancement of ATP synthesis induced by external electrical field in spinach chloroplasts [J]. *Plant Physiology Journal*, 1983, **9**(3): 269—274 (in Chinese).