

高级研修班结业心得



编者按：

为了更好地促进非损伤微测技术（NMT）在植物领域研究中的应用，分享高水平应用成果，学习非损伤微测技术（NMT）研究方法，根据 2022 年非损伤微测技术及其应用（植物领域）高级研修班“优秀结业论文”评选要求，经过中关村 NMT 产业联盟组委会评选认定，已评出“优秀结业论文”一等奖两篇、二等奖两篇、三等奖三篇。

一等奖		
序号	作者	单位
1	杜清	青海民族大学
2	谭定权	重庆传媒职业学院
二等奖		
序号	作者	单位
3	陈凌云	西南大学
4	贾博为 李媛	黑龙江八一农垦大学
三等奖		
序号	作者	单位
5	杨艺慧	北京农学院
6	王瑶	中国农业大学
7	彭银霞	沈阳农业大学

传统技术及 NMT 新技术检测植物种子活力的方法和应用

杜清^{1,2}

¹ 中国医学科学院 & 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 邮编: 100193

² 青海民族大学, 青海 西宁 邮编: 810007

摘要: 对传统技术和新技术 NMT 法测定植物种子活力的方法筛选并综合设计关于植物种子活力的研究方案, 并列明实验方法、判断依据和标准, 期望将其指导应用到今后具有研究基础的两种植物的种子活力研究、繁育种植及优良品种的筛选中。

关键词: 植物种子活力, 传统检测方法, 非损伤微测 NMT, 吸入氧速度, 固体流速传感器

种子活力的研究始于 19 世纪末 20 世纪初, 1876 年 Nobbe 用“生长力”描述了同一批种子不同个体的发芽及幼苗生长的速度差异。1950 年, 国际种子检验协会(International Seed Testing Association, 简称 ISTA) 主席 Frank 首次提出种苗活力(vigor), 并在年会上讨论, 1953 年成立了幼苗活力测定委员会, 1957 年, Isely 首次提出种子活力的概念(在不良的田间条件下有利于成苗的一切种子特性的总和), 1977 年, ISTA 活力委员会正式通过了种子活力的概念, 1980 年, 官方种子分析家协会(Association of Official Seed Analysts, 简称 AOSA)通过了种子活力的定义, 1981 年, ISTA 活力委员会出版《种子活力测定方法手册》中介绍了电导率测定、低温测定等 8 种种子活力测定方法 [1]。我国于 1980 年由著名植物种子生理学家、中国科学院植物研究所植物园研究员郑光华首次提出种子活力的概念。

种子生活力(viability)是指种子的发芽潜在能力或种胚所具有的生命力, 通常是

指一批种子中具有生命力(即活的、适宜条件下)种子数占种子总数的百分率。种子活力是衡量种子品质的重要指标, 是种子发芽率和出苗率、幼苗生长的潜势、植株抗逆能力和生产潜力综合判断的。种子从自然成熟后长时间放置, 种子的活力受采种时期, 采种方法、种子处理方法、贮藏条件和贮藏年限等的影响, 其活力会逐渐减弱。种子活力的不同会影响种植成本、劳动力和物质资源。生活力强的种子发芽率高、发芽整齐、幼苗生长健壮。通常简单的鉴定方法有目测种子质量, 染色观察和发芽试验测定等。常用的判断指标有: 发芽率、发芽势和活力指数。因此, 高效的种子活力检测方法有助于通过对种子按照实际的生长环境处理后各项指标的检测和合适的繁育方法提高农作物产量 [2]。

应用传统检测技术的相关方法和新型非

收稿日期: 2023-03-22
编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

损伤微测 NMT 的结合应用的技术方法对植物种子活力的研究方案设计并通过检测对比各种方法结果的判断依据和标准，以期为后续植物种子的繁育种植提供有价值的参考。

1. 传统技术检测植物种子活力的方法和评价标准

传统的种子活力检测方法有幼苗生长测定法、电导率测定法、加速老化实验测定法、氯化三苯基四氮唑法（TTC 法）、溴麝香草酚蓝法（BTB 法）、抗冷法、砂压法、低温法、加速衰老法、纸上荧光法等。其中 TTC（2,3,5-氯化三苯基四氮唑）是脂溶性光敏感复合物，与正常组织中的琥珀酸脱氢酶反应而呈红色，而活力低的组织内琥珀酸脱氢酶活性下降，不能反应，故不会产生变化呈苍白。1953 年开始国际种子检验协会就将生物化学四唑染色法列入农作物种子检验生活力的测定方法，我国也通用。

2. NMT 新技术检测植物种子活力的方法和评价标准

目前对种子活力进行检测的新技术有红外光谱的测定法、激光散斑技术测定法、红外热成像技术测定法、PCR 技术检测和非损伤微测 NMT 的技术方法 [3]。

非损伤微测技术（Non-invasive Micro-test Technology, NMT）及其命名，是前美国航空航天局高级研究院、美国扬格公司和北京旭月公司创始人许越教授，在匡廷云院

士、杨福愉院士、林克椿教授的启发和帮助下，以美国科学家 Lionel F. Jaffe 离子振荡电极技术为理论基础，经过 20 多年的不懈努力，经过模块化、自动化、专业化、智能化、标准化的技术创新，商品化、商业化、产业化、国产化、国际化的应用创新，以及‘活体功能组学’提出的理论创新，成功创建自主知识产权的 NMT 技术，并于 2021 年通过科技部‘世界领先’评审。NMT 是一种超高灵敏度，非接触方式、以流速为单位，检测材料外部离子分子浓度及其梯度的技术，目前有一系列的设备应用于活体的 NMT 技术称为非损伤微测系统。NMT 具有鲜明的特点，可对活体、原位、非损伤测量，对整体或分离后的样品不造成损伤，获取正常生理状态下的信息；实时、动态测量（5 秒左右）获取数据；能够同时测量某两种离子，或者同时测量一种离子和一种分子；可进行长达几个小时，甚至更长时间的实时和动态监测；预先知道测定的是何种离子或分子，无需用放射性、化学或药理学等标记方法进行标记；可进行流速和浓度的点、线、面及立体矢量扫描测量，且支持实时、手动、自动及编程等多种方式；具有时间（5S）和空间（ $1\mu\text{m}$ ）的高分辨率），离子分子浓度测定精度（ 10^{-9}M ），离子分子流速测定精度（ $10^{-15}\text{mol}/\text{cm}^2\cdot\text{s}$ ），可以直接测量，不需要研磨等传统的提取方法；适用于整体、器官、组织、细胞、甚至富集细胞器都可以测量（原则上大于 $5\mu\text{m}$ 即可）；并可进行立体 3D 流速测量，在样品外进行 X、Y、Z 三维数据采集，清晰阐明样品及流速的空间相互关系 [4-7]。

在 2022 年 10 月 20 日的由中关村 NMT 产业联盟组织培训的 NMT 微测技术高研班中。我们不仅深入了解了 NMT 技术的原理和一些方法，且对专家教授对于应用 NMT 技术取得的研究成果感悟颇深。比如刘蕴琦工程师讲授的《NMT 在植物科学领域的应用情况》中提到，NMT 应用在植物抗盐等逆境研究、蛋白功能研究、植物发育调控、光合 / 呼吸作用、植物营养、植物与微生物相互作用、植物发育调节机制、重金属污染与治理等研究方面。许卫峰教授的专家讲座内容《植物向水性与根醇营养》中根的向水性是由于向水侧细胞中所含自由水较多，代谢旺盛，生长素由背水侧更多的移到向水侧，而根对生长素敏感，较高浓度的生长素抑制其生长，故使向水侧生长慢，背水侧生长快，从而表现出根的向水性。将 NMT 技术应用到植物向水性的检测并探讨根部营养不同的影响性。目前较为关系的相关技术问题在马跃工程师的讲座《NMT 在种业应用的研修班》内容中得以明确，并且已经在上海市农业科学院实际开展应用。

3. 植物种子活力检测的实验方案设计和判断标准

3.1 实验材料

3.1.1 新鲜植物种子

不同年份的发育成熟的明党参 / 斑花黄堇植物种子，少量水将表面浮沉清洗干净，阴干备用。

3.1.2 检验仪器设备

非损伤微测系统（科研平台）或非损伤微测系统（研发平台）

使用耗材：NMT 专用固体 O₂ 流速传感器

所需药品：KCl、CaCl₂、C₆H₁₃NO₄S、pH6.0

用具：烧杯、镊子、培养皿、滤纸、样品固定专用树脂块

3.2 实验方案及判断标准

3.2.1 目测种子质量及判断

直接观察种子，凡种粒饱满，种皮有光泽，粒重而有弹性，胚及子叶呈乳白色的种子，为活力强的种子；而种粒瘪小，种皮发白且发暗无光泽，弹性小或无弹性，胚及子叶变黄或污白，都是生活力减退或失去生活力的种子。对种壳坚硬的种子，应砸开硬壳检查胚的情况。计算正常种子与劣质种子的百分数，判断种子活力情况。

3.2.2 染色观察

根据种子染色情况，判断活力大小，常用靛蓝胭脂红、曙红为染色剂，或用四唑（氯化（或溴化）三苯基四氮唑，C₁₉H₁₅N₄Cl（Br））。随机采取 3 ~ 5 份待检测的种子，小粒种子每份 100 粒，大粒种子为 50 粒，浸水 1 ~ 2 天，待种皮柔软后剥去种皮进行染色，染色后以清水漂洗，检查染色情况，计算各类种子的百分数。根据染色剂的不同，有活力的种子分着色与不着色两种类型，具体染色方法及活力判断标准根据实际分别列

明。

3.2.3 发芽试验

可直接测定种子发芽能力。供测定的材料必须是无休眠或已解除休眠的种子。每次使用 50 ~ 100 粒种子，重复 3 ~ 5 次。置于培养皿或瓦盆中，衬垫滤纸、脱脂棉或清洁河沙，添加清水，以手压衬垫物不出水为度。将种子均匀地摆布其上，保持 20 ~ 25°C 较恒定的温度，每天检查 1 次，记载发芽种子数，注意添加水分，用滴管滴水，避免冲动种子。凡长出正常幼根、幼芽的种子都为可发芽的种子。幼根幼芽畸形、残缺、中间细、根尖发褐停止生长的，为不发芽种子。根据发芽种子数量，计算出发芽率，判断种子的活力。

3.2.4 NMT 方法

(1) 取 20 粒种子浸泡在测试液中进行吸胀 2h。

(2) 取出吸胀好的种子放在培养皿中，使用滤纸、样品固定专用树脂块进行固定。

(3) 使用 NMT 非损伤微测系统检测胚轴的氧流速。

4. 结果及判断依据

4.1 活力指标

发芽势、发芽率和活力指数来表示种子的活力情况。

4.2 发芽势

表示测定种子发芽速度和能力的强弱，

是以发芽试验中一定时间内种子发芽的粒数占试验种子总数的百分率表示，数值大表示种子发芽整齐，活力高。其计算公式为：

发芽势 = 发芽高峰期发芽的种子数 / 供试种子数 × 100%

4.3 发芽率

表示种子发芽的能力，结合发芽势考虑，可以进一步说明种子活力的情况。以此确定该种子能否作为播种材料，以及适宜的播种量。以发芽试验中发芽种子的总粒数占试验种子总粒数的百分率来表示。

4.4 发芽指数 (GI)

在种子发芽试验期间，每天记载发芽粒数，然后计算发芽指数。计算公式为：

发芽指数 = $\sum Gt/Dt$

式中：Gt 为发芽试验终期内每日发芽数，Dt 为发芽日数， \sum 为总和。

4.5 活力指数 (VI)

表示种子活力比较全面的一项指标，它把种子的发芽能力和幼苗长势综合起来表示，指数数值高，种子活力大。其计算公式为：

活力指数 (VI) = $GI * S$

式中：S- 定时期内幼苗长度 (cm) 或幼苗重量 (g)

4.6 NMT 法测定种子氧吸收的强弱。

检测活体种子萌发过程中氧气的消耗，当种子萌发时会消耗氧气来促进细胞代谢，活力小的种子在萌发中的耗氧量小于活力高

的种子，通过 NMT 检测种子的吸入氧的速度来判别种子的活力。

5. 植物种子活力检测结果和标准的应用

结合以上方法实验研究方案对已有研究基础的两种植物明党参 (*Changium smyrnioides* Wolff) [8-10] 和斑花黄堇 (学名: *Corydalis conspersa* Maxim.) [11] 开展种子活力检测方面的研究 [12], 在了解两种植物种子的形态特征、生理特性和物理性状等方面的基础上, 特异性且探讨性的研究实验方案中的技术适用于植物抗逆性生理 (比如抗盐碱、抗病性、抗旱^[13-14]、抗涝、抗冷及抗重金属毒害) 研究方面的应用 [15], 同时研究在植物发育、植物与环境微生物互作研究及植物生态适应性研究中的以上技术的应用 [16], 期望对两种植物的繁育和种植起到切实的指导作用。

注释:

非损伤微测技术 NMT (Non-invasive Micro-test Technology): 是一种在不损伤样品的情况下, 快速原位获取离子 / 小分子跨膜转运信息的技术。

发芽势 (germinability): 在发芽过程中日发芽种子数达到最高峰时, 发芽的种子数占供测样品种子数的百分率, 一般以发芽试验规定期限的最初 1/3 期间内的种子发芽数占供测种子数的百分比为标准。

发芽率 (ratio of germination): 发芽率指测试种子发芽数占测试种子总数的百分比。

活力指数 (vitality index): 幼苗的生

长势与发芽指数的乘积, 即为种苗生长量 × 发芽指数。

参考文献

1. 徐本美等 (1993) 译. 《国际种子检验协会 (ISTA) 种苗评定与种子活力测定方法手册》, 北京农业大学出版社, ISBN9787810024280.
2. 胡晋 (2009). 《种子生活力测定原理和方法》, 农业出版社出版, ISBN9787109135512.
3. 许越. NMT 与种子活力研究和检查.
4. 生理及生态 NMT 实验指导, 非损伤微测技术科研及教学资料编写委员会, 中关村旭月非损伤微测技术产业联盟.
5. Xin X, et al (2013). A real-time, non-invasive, micro-optrode technique for detecting seed viability by using oxygen influx. *Sci Rep*, 3, 3057.
6. Liu MY, et,al (2014). Spermidine Enhances Waterlogging Tolerance via Regulation of Antioxidant Defence, Heat Shock Protein Expression and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in *Zea mays*. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200, 199-211.
7. Li J, et al (2014). The fluxes of H₂O₂ and O₂ can be used to evaluate seed germination and vigor of *Caragana korshinskii*. *Planta*, 239, pp.1363-1373.
8. 王长林, 郭巧生, 程搏幸 (2018). 明党参及其土壤中矿质元素特征分析, *中国中药杂志*. 2018,43, pp.1579-1587.

9. 郭巧生, 王长林, 厉彦森, 汪涛 (2022). 中药材种子(种苗) 明党参, 全国中药材种子(种苗) 标准化技术委员会 (SAC/TC 479).
10. 殷现伟, 常杰, 葛滢, 等 (2002). 濒危植物明党参与非濒危种峨参种子休眠和萌发比较, 生物多样性, 2002, 10, pp. 425-430.
11. 杜清, 陈志, 吴江, 刘明地, 郭苏城, 候永强 (2021). 一测多评法同时测定斑花黄堇药材中 4 种生物碱成分, 中草药. 2021,52, pp.6038-6044.
12. 刘建 (2018), 活力检测在我国种子质量检测体系中的重要性, 中国种业, 2, pp.25-28.
13. Lin Zhang, Guangjie Li, Gangqiang Dong, Meng Wang, Dongwei Di, Herbert J. Kronzucker and Weiming Shi. Characterization and comparison of nitrate fluxes in *Tamarix ramosissima* and cotton roots under simulated drought conditions. *Tree Physiology* 39, 628-640.
14. Juan Liu, Mirza Hasanuzzaman, Huili Wen, Jing Zhang, Ting Peng, Huwei Sun, Quanzhi Zhao (2019). High temperature and drought stress cause abscisic acid and reactive oxygen species accumulation and suppress seed germination growth in rice. *Protoplasma*. 256,1217-1227.
15. 李静, 韩庆庆, 段丽婕, 王沛, 李惠茹, 王锁民, 张金林 (2014). 非损伤微测技术在植物生理学研究中的应用及进展, 植物生理学报, 50, pp. 1445~1452.
16. 贾代东, 刘爱琴, 李惠通, 于洋洋, 魏志超, 王俊男, 周丽丽 (2017). 非损伤微测技术在植物生理生态学研究中的应用进展, 应用与环境生物学报, 23, pp. 0175-0182.
17. 许越. 非损伤微测技术—2022[J]. *NMT 通讯*, 2022(01):11-17

(责任编辑: 李雪霏)