

DOI: 10.3969/j.issn.2095-9869.20241127004

http://www.yykxjz.cn/

郝紫冰, 高亚平, 蒋增杰, 袁明军, 王嘉琪, 焦明蕙, 李伟伟, 王静, 隋海东, 张义涛. 利用 Ca^{2+} 流速表征鳗草种子活力的可行性研究. 渔业科学进展, 2025, 46(6): 203–212

HAO Z B, GAO Y P, JIANG Z G, YUAN M J, WANG J Q, JIAO M H, LI W W, WANG J, SUI H D, ZHANG Y T. Feasibility study of using Ca^{2+} flow rate to characterize eelgrass (*Zostera marina*) seed viability. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(6): 203–212

利用 Ca^{2+} 流速表征鳗草种子活力的可行性*

郝紫冰^{1,2} 高亚平² 蒋增杰^{2①} 袁明军² 王嘉琪³ 焦明蕙¹
李伟伟² 王 静⁴ 隋海东⁴ 张义涛⁵

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 中国水产科学研究院碳汇渔业重点实验室 山东 青岛 266071;
3. 青岛大学生命与科学学院 山东 青岛 266071; 4. 北京市企业家环保基金会 北京 100012;
5. 荣成楮岛水产有限公司 山东 荣成 264312)

摘要 种子活力状态评价是包括鳗草(*Zostera marina*)在内的人工培育植物苗种的重要环节。本研究在采用不同干燥时间处理(0、1、2、4、8 h)来形成同批次鳗草种子活力差异的基础上,测定萌发率、相对电导率、含水率以及过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量的同时,利用非损伤微测技术(non-invasive micro-test technology, NMT)对种子的 Ca^{2+} 流速进行了测定,并探究了鳗草种子活力与 Ca^{2+} 流速之间的关系。结果显示,随着干燥处理时间的增加,含水率、萌发率逐渐降低,相对电导率上升。干燥处理 4 h 后的种子比未经处理的种子萌发率降低了 12%,处理 8 h 后的萌发率显著降低,比未经处理的种子萌发率降低了 68.7%。MDA 含量逐渐上升,CAT 活性也随着干燥处理时间的增加先上升后下降; Ca^{2+} 呈现外流现象,外流速率随着干燥处理时间的增加不断加大,且萌发率与 Ca^{2+} 外流流速呈显著负相关($y = -0.192\,2x + 94.09$, $R^2 = 0.860\,6$)。本研究表明, Ca^{2+} 流速与鳗草种子活力具有很强的相关性,具有发展成为快速无损伤评估鳗草种子活力方法的潜力。

关键词 鳗草种子; 干燥处理; 种子活力; Ca^{2+} 流速; 非损伤微测技术

中图分类号 Q948.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)06-0203-10

鳗草(*Zostera marina*)为木兰纲(Magnoliopsida)、泽泻目(Alismatales)、鳗草科(Zosteraceae)、鳗草属(*Zostera*),是一种多年生海洋种子植物,常见于近海浅滩、河流入海口等处,营沉水生活(Short *et al*, 2007)。鳗草主要分布于太平洋及北大西洋地区的欧亚、北非、北美沿海,是我国温带海域海草床典型的优势种类,具有净化水质(Gambi *et al*, 1990)、保护生物多样性(李文涛等, 2009; 刘旭佳等, 2013)、护堤减灾(Bos *et al*,

2007)、固碳(Duarte *et al*, 1999; 高亚平等, 2013)等重要生态服务功能(Short *et al*, 1996)。近年来,受海洋开发利用强度增大以及全球气候变化的影响,海草床资源呈现日益衰退迹象(Short *et al*, 1996; Park *et al*, 2007; Brodie *et al*, 2020; Xu *et al*, 2022),中国海草床退化速度也逐年加快(郑凤英等, 2013),在这样的背景下,海草床资源的保护和修复刻不容缓。

当前,除采取有效管理措施保护现存海草床外,

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2023TD54)、山东省“泰山学者青年专家计划”(tsqn201909166)和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-49)共同资助。郝紫冰, Email: 1261550209@qq.com

① 通信作者: 蒋增杰, 研究员, Email: jiangzj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-11-27, 收修改稿日期: 2025-01-06

通过人为干预手段科学修复海草床也是重要途径之一(Orth *et al*, 2000; Shafer *et al*, 2010; 王小康等, 2023)。目前采用的修复方法主要有生境恢复法、种子播撒法和成体移植法三类(Phillips *et al*, 1990; 张沛东等, 2013; 李森等, 2010)。其中, 生境恢复法所需周期很长; 种子播撒法中的种子贮存、萌发、播撒都存在许多困难。移栽人工栽培的海草幼苗进行海草床修复也是高效利用种子的一个方法, 因为与直接将种子播种到海区相比, 在人工条件下更容易控制温度、盐度、光照等对海草种子萌发和成苗率有重要影响的因子, 以保证有较高的萌发率和成苗率, 减少种子的浪费和损失(张壮志等, 2017; 韩厚伟等, 2012; Tanner *et al*, 2010)。利用海草种子经陆基人工育苗后移栽到海区的修复方式逐渐成为热点(王合虎等, 2013), 显现出广阔的应用前景。在这套技术工艺中, 种子活力状态评价是关键环节, 决定着种子萌发率、整齐度和幼苗建成率。近年来, 随着海草床的生态修复日益受到关注, 对陆基工厂化人工培育幼苗作为移植供体的需求量越来越大, 相应地对种子数量的需求量也越来越大, 通常可达到千万粒级甚至亿粒级, 如何快速、高效地判定巨量种子的活力状态已经成为亟待解决的关键技术问题。

目前, 鳎草种子活力检测仍主要依赖于发芽实验法、四唑染色法等传统方法, 但都具有一定局限性。发芽实验存在周期长的问题, 通常需要数周甚至数月才能得出结果(代蓓等, 2023); 四唑染色法虽能一定程度上反映种子活力, 但操作繁琐, 且对种子有一定损伤, 难以满足快速、无损检测种子活力的需求。传统检测种子活力的方法需进行大量的重复实验验证, 需要投入大量的人力、物力和时间, 还可能对样品造成损伤。总体来说, 传统种子活力检测方法虽操作简单、成本较低, 但存在耗时长、损伤种子等诸多局限性, 难以满足现代农业对种子(尤其是数量巨大的种子)活力快速、准确、无损检测的需求。随着技术的快速发展, 各类非接触式、无损、快速的种子活力检测方法开始涌现, 如非损伤微测技术(non-invasive micro-test technology, NMT)、近红外光谱扫描分析技术、高光谱成像技术、电子鼻检测技术等(瞿志杰等, 2020)。其中, NMT 是通过测定滴在种子表面的离子和分子流速来判断种子的活力。该技术是在不接触被测活体样品的情况下, 获得进出(活体)样品的离子和分子流速的多学科交叉集成技术(许越, 2021)。区别于传统膜片钳技术等需要将电极刺入样品的离子流速检测方式, 该技术可在不破坏样品细胞或组织的情

况下灵敏地测出样品周围微粒流速, 也规避了检测所造成的细胞膜通透性改变对微粒流速的影响。可以长时间对单个样品进行检测、同时对多种微粒进行检测等是 NMT 的优点(丁亚男等, 2007)。该技术具有非损伤、多电极、多角度、高灵敏度、高分辨率等优点, 已被证明在传统植物生理学中具有重要的应用价值, 在很多藻类以及高等植物研究中被广泛应用(McLamore *et al*, 2010)。Zhu 等(2020)和 Li 等(2014)将 NMT 应用到大豆(*Glycine max* L. Merr.)、玉米(*Zea mays* L.)、柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii* Kom.)等种子活力评价研究, 建立了过氧化氢流速、 Ca^{2+} 流速与种子存活率的相关关系。

Ca^{2+} 是植物生长发育和逆境响应的核心调控因子。作为细胞中的第二信使, 当植物受到环境压力刺激时, 会产生钙信号, 通过一系列级联传导, 调控植物的细胞分裂、细胞伸长、各种胁迫反应以及生长发育等过程(刘贯山等, 2003)。非生物胁迫可引起 Ca^{2+} 浓度变化, 诱发植物细胞产生钙信号, 是评价种子活力状态的指标。近年来, 基于 NMT 检测 Ca^{2+} 流速在玉米等陆生植物领域已有应用, 但尚无关于鳎草种子活力与 Ca^{2+} 流速之间关系的报道。本研究拟通过非损伤微测系统测定不同活力条件下鳎草种子内 Ca^{2+} 流速及流动方向, 探究 Ca^{2+} 流速与鳎草种子活力之间的关系, 为建立快速、无损、高效的鳎草种子活力判定方法提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用鳎草种子取自山东省荣成市东楮岛海草床区域($37^{\circ}01' \sim 37^{\circ}09' \text{ N}$, $122^{\circ}24' \sim 122^{\circ}35' \text{ E}$)。实验室内于 15°C 天然海水环境中保存备用。开展实验前, 利用重力分选与人工挑选, 选取 3 500 粒颜色深棕黑色、质地坚硬、结构完整的成熟种子。用 3% 次氯酸钠溶液浸泡 3 min 进行消毒, 随后立即用消毒的自然海水冲洗表面的次氯酸钠溶液残余, 重复冲洗 5 次。将完成筛选及消毒工序的鳎草种子短时间保存于已消毒的盐度为 30 的海水中待用。

1.2 实验方法

1.2.1 不同活力水平种子的处理方法 在恒温恒湿培养箱中, 设置温度为 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 $(50 \pm 5)\%$ 的条件, 对鳎草种子干燥老化处理(Park *et al*, 2017)。经预实验后, 选出 5 个在含水率上有一定梯度的处理组, 分别为 0、1、2、4、8 h。预实验显示超过 8 h 的处理

组含水率降低到 10% 以下, 此时鳎草种子的活力较低, 不再适用于后续实验。处理结束后, 除含水率实验样本外, 其余种子立即浸入已消毒的盐度为 30 的海水中进行下一步实验。

1.2.2 种子萌发实验 将不同干燥时间老化处理后的鳎草种子置于 2 mL 装有已消毒的盐度为 10 的海水的离心管内, 使海水完全浸没种子。每个离心管 1 粒种子, 3 个重复, 每个重复 50 粒。将离心管置于 15 °C 恒温培养箱内避光培养, 每 24 h 取出统计各实验组总萌发数, 直至第 21 天, 计算萌发率(germination percentage, GP) (田璐等, 2014):

$$\text{GP} = \frac{\text{萌发种子数}}{\text{种子总数}} \times 100\%$$

1.2.3 电导率测定 选取每组经干燥处理后的 50 粒鳎草种子为一实验处理组, 每一实验处理组进行 3 个重复。用去离子水冲洗 3 遍, 用滤纸擦干浮水后将种子放入干净的 100 mL 烧杯内, 加入 50 mL 去离子水, 置于 25 °C 培养箱中平衡 12 h。摇匀后, 利用 YSI 水质分析仪检测各烧杯内液体电导率($\mu\text{S}/\text{cm}$)。最后, 将烧杯内种子及液体煮沸, 冷却至室温(25 °C)后, 再次测定电导率。将煮沸前后电导率作比, 所得相对电导率(relative conductivity, RC), 即为种子损伤率(Li *et al.*, 1998):

$$\text{RC} = \frac{\text{煮沸前电导率}}{\text{煮沸后电导率}} \times 100\%$$

1.2.4 含水率测定 选取干燥处理后的 20 粒鳎草种子为一实验处理组, 每一实验处理组进行 3 次生物学重复。利用分析天平测定干燥老化处理后的鳎草种子湿重。对于 0 h 干燥处理的鳎草种子, 在测定其重量前先用滤纸吸干种子表面水分。用锡箔纸将鳎草种子包裹后置于 70 °C 烘箱干燥 48 h, 再次用分析天平测定其干重。计算不同处理组种子的含水率(moisture content, MC), 公式如下(Li *et al.*, 2020):

MC =

$$\frac{\text{干燥前供检种子质量} - \text{干燥后供检种子质量}}{\text{干燥前供检种子质量}} \times 100\%$$

1.2.5 过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量测定 CAT 活性和 MDA 含量测定前先对样品进行蛋白定量测定, 得到待测样本蛋白浓度(g/L), 操作步骤如下: 准确称取经过干燥处理后的鳎草种子的重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质——100 mmol/L PBS 缓冲液(10 $\times$), 置于预冷的研钵中, 在冰浴上研磨匀浆, 转入离心管, 2 500 r/min 4 °C 离心 10 min, 取上清液(10%匀浆上清液)。按照南京建成生物工程研究所蛋白定量(TP)试剂盒操作方法, 在

595 nm 波长下测定样本蛋白浓度 C_{pr} (100 mg prot/mL); 再将离心管以 4 000 r/min、4 °C 条件下离心 5 min, 取 100 μL 上清液, 参照南京建成公司 CAT 测定试剂盒操作方法, 在 405 nm 波长下测得种子中 CAT 活性单位(U/mL), 除以 C_{pr} , 得到待测样本中 CAT 比活(U/100 mg prot)。

MDA 含量测定步骤如下: 准确称取经过干燥处理后的鳎草种子的重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质——100 mmol/L PBS 缓冲液(10 $\times$), 置于预冷的研钵中, 在冰浴上研磨匀浆, 于 4 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min, 取 50 μL 上清液, 参照南京建成生物工程研究所 MDA 测定试剂盒操作方法, 于 530 nm 波长下测定种子中 MDA 含量(nmol/g)。

1.2.6 Ca^{2+} 流速测定 利用北京旭月科技有限公司非损伤微测系统(NMT100-SIM-XY)测定 Ca^{2+} 流速。溶液配制: 测试液和校正液 I、II。测试液配方为 8 mmol/L KCl、0.1 mmol/L Na_2SO_4 、0.5 mmol/L CaCl_2 、0.5 mmol/L MgCl_2 、540 mmol/L NaCl、2 mmol/L NaHCO_3 、pH 值为 7.8, 现配现用; 校正液 I 的配方为 8 mmol/L KCl、0.1 mmol/L Na_2SO_4 、0.1 mmol/L CaCl_2 、0.5 mmol/L MgCl_2 、540 mmol/L NaCl、2 mmol/L NaHCO_3 、pH 值为 7.8; 校正液 II 的配方为 8 mmol/L KCl、0.1 mmol/L Na_2SO_4 、1 mmol/L CaCl_2 、0.5 mmol/L MgCl_2 、540 mmol/L NaCl、2 mmol/L NaHCO_3 、pH 值为 7.8, 校正液现配现用。

在完成 Ca^{2+} 流速传感器组装后, 先利用校正液 I 与校正液 II 完成传感器校正以得到电位-浓度斜率。进行 Ca^{2+} 流速测定: ① 将配制好的两个校正液分别倒入 2 个 35 mm 塑料培养皿中, 将盛有校正液的培养皿放到载物台上, 将参比电极冲洗干净, 插入浓度高的校正液 I 中, 随后将微电极也放入同一校正液中开始校正, 观察流速传感器输出项, 待读数稳定后, 确定校正液 I 的最终读数; 将参比电极取出, 用去离子水冲洗干净, 用滤纸将表面溶液吸干, 流速传感器也从溶液中取出; 将流速传感器和参比电极放到校正液 II 中, 方法同校正液 I; 待电极校正合格, 即可开始测量。② 待测样品干燥处理后置于测试液内平衡至少 30 min, 将种子浸没在培养皿中的测试液中, 置于倒置显微镜下。从 3 mol/L KCl 中取出保存的参比电极, 用去离子水洗净后擦干, 放入培养皿内。调节倒置显微镜载物台, 使种子一侧尖端清晰出现在视野中央。检测时微电极的运动方向垂直于种子表面, 每次电极移动距离为 30 μm , 检测间隔时间为 600 s, 调节传感器所连运动控制器三维滑块, 使传感器尖端

一并清晰出现在视野中央偏上位置,尽可能贴近种子。

③ 调整传感器运动模式为 X-30 μm , Rotate 为 +90°, 即传感器垂直于自身轴向往返运动。启动 Motion 开关, 读数 10 min 直至流速示数稳定。④ 分析处理数据。非损伤微测系统通过传感器得到运动两点间相差电势 ΔI , 利用能斯特方程推导得出浓度梯度 dc , 并利用公式:

$$J = -D \times \left(\frac{dc}{dx} \right)$$

计算得到 Ca^{2+} 对应流速, 单位为 $\text{pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 。式中, J 为 Ca^{2+} 流速, D 为 Ca^{2+} 在测试液中扩散常数, dc 为 Ca^{2+} 浓度梯度, dx 为电极移动距离。

1.3 数据处理

实验数据使用 Excel 2010 软件整理; 采用 SPSS 26 统计软件进行单因子方差分析(one-way ANOVA), 采用 Duncan's 多重比较检验组间差异, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著; 采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图。利用 GraphPad Prism 9.1.0 软件对该时间范围内各种鳊草种子活力指标与 Ca^{2+} 流速进行相关性分析, 以 Ca^{2+} 流速为自变量, 种子活力指标为因变量。

2 结果与分析

2.1 干燥处理时间对鳊草种子萌发的影响

干燥处理 0、1、2、4 h 的鳊草种子经 14 d 左右萌发率达到平台期, 萌发率分别为 95.33%、92.00%、88.00%、83.33%, 干燥处理 8 h 第 17 天才达到平台期, 萌发率为 32.67% (图 1)。经干燥处理后的鳊草种子萌发率随干燥时间延长而显著降低 ($P < 0.05$), 其中经 8 h 干燥处理的种子萌发率降低极显著 ($P < 0.001$)。

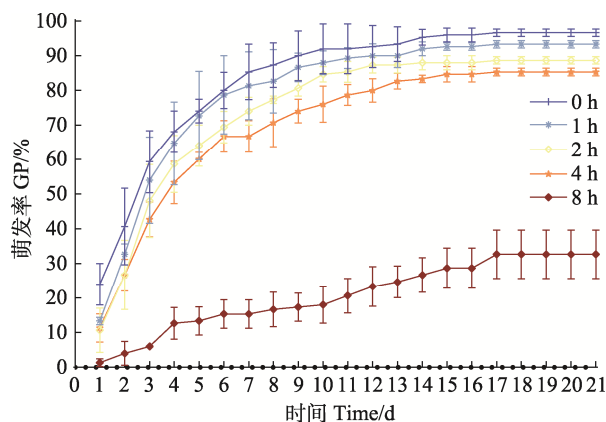


图 1 不同干燥时间对鳊草种子萌发率的影响

Fig.1 Effect of different drying time on the germination rate of eelgrass seeds

2.2 干燥处理时间对鳊草种子主要生理特性的影响

2.2.1 含水率 未经干燥种子的含水率约为 36.19%, 经过干燥处理后的种子含水率比未经干燥处理的种子含水率明显降低, 且种子的含水率随着干燥时间的延长而降低 (图 2)。干燥 1、2、4、8 h 后的种子比未经干燥处理的种子含水率分别降低了 4.75%、7.40%、16.08%、25.99%。

2.2.2 相对电导率 如图 3 所示, 经 1 h 和 2 h 干

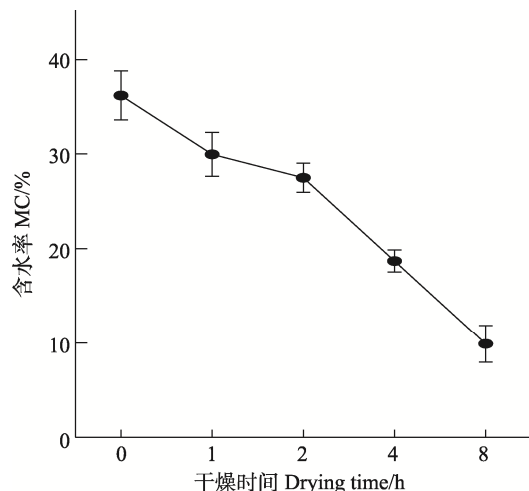


图 2 不同干燥时间对鳊草种子含水率的影响

Fig.2 Effect of different drying time on the moisture content of eel grass seeds

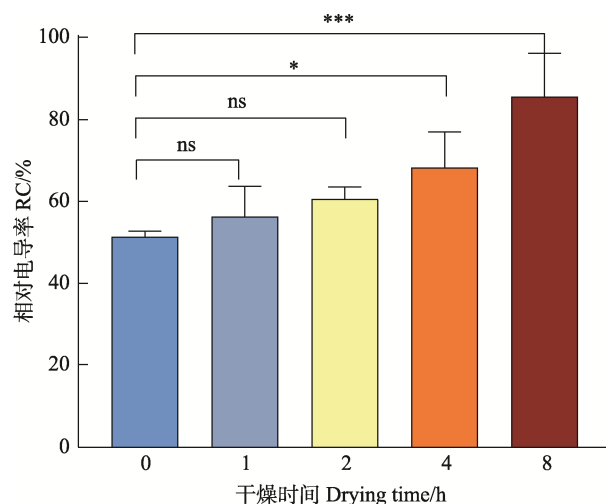


图 3 不同干燥时间对鳊草种子相对电导率的影响

Fig.3 Effect of different drying time on the relative conductivity of eel grass seeds

干燥处理组与未经处理鳊草种子相比, ns 表示差异不显著 ($P > 0.9999$), * 表示差异显著 ($P < 0.05$), *** 表示差异极其显著 ($P < 0.001$)。

Drying treatment group compared with non-treatment group, ns denotes no significant difference ($P > 0.9999$); * denotes significant difference ($P < 0.05$); *** denotes highly significant difference ($P < 0.001$).

干燥处理后的鳊草种子相对电导率较未经处理鳊草种子无明显变化($P>0.999\ 9$); 经 4 h 干燥处理后的鳊草种子相对电导率较未经处理鳊草种子显著上升($P<0.05$), 上升可达 17.09%。鳊草种子细胞膜透性已明显受干燥影响而增大。经 8 h 干燥处理的鳊草种子相对电导率上升更加显著($P<0.001$)。

2.2.3 MDA 含量和 CAT 活性 随着干燥时间的增加, 鳊草种子 MDA 含量逐渐升高, 从干燥 2 h 后升高明显, 到干燥 8 h 后的 MDA 含量达到了 107.73 nmol/g, 比未经干燥处理的鳊草种子高 40.73 nmol/g (图 4)。在干燥处理下, 鳊草种子中 CAT 活性随干燥时间增加而逐渐提高: 未经干燥处理鳊草种子中 CAT 活性为 43.66 U/100 mg prot, 直至干燥约 2 h 达到顶点, CAT 活性提高至 64.66 U/(100 mg prot), 而后快速下降。到干燥处理 8 h, 其 CAT 活性下降至 27.33 U/100 mg prot。

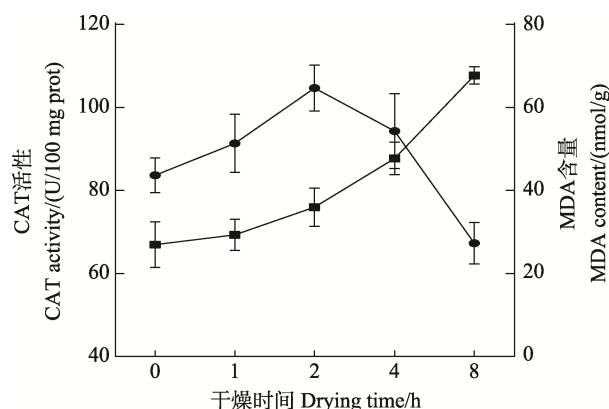


图 4 不同干燥时间对鳊草种子 CAT 活性和 MDA 含量的影响

Fig.4 Effect of different drying time on the CAT activity and MDA content of eel grass seeds

2.3 干燥处理时间对鳊草种子 Ca^{2+} 流速的影响

无种子的空白组流速稳定在 0 附近, 其余不同干燥处理组种子 Ca^{2+} 流速可近似视作净流速值, 且在一定范围内波动。未经干燥处理的鳊草种子 Ca^{2+} 流速稳定在 $-64.84\text{ pmol}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$ 左右, 此时, 鳊草种子 Ca^{2+} 轻微内流。从干燥 1 h 后, Ca^{2+} 外流流速增加。在经 1 h 干燥处理后, 鳊草种子 Ca^{2+} 流速约为 $28.46\text{ pmol}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$, 较未经处理组鳊草种子 Ca^{2+} 发生显著外流。当干燥 2 h 时, 鳊草种子 Ca^{2+} 流速在 $51.26\text{ pmol}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$ 附近波动, 为正值。经 4 h 干燥处理后, 鳊草种子 Ca^{2+} 流速约为 $130.57\text{ pmol}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$, 8 h 干燥处理后升至 $299.25\text{ pmol}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$ (图 5)。

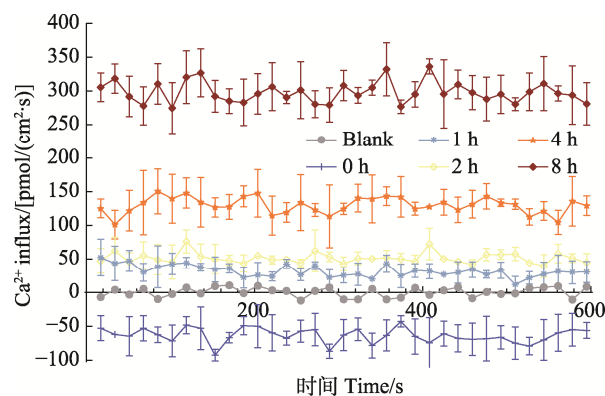


图 5 不同干燥时间对鳊草种子 Ca^{2+} 流速的影响

Fig.5 Effect of different drying time on the Ca^{2+} influx of eel grass seeds

2.4 Ca^{2+} 流速与活力指标的相关性分析

通过拟合线性方程得出 Ca^{2+} 流速与各种子活力指标的关系, Ca^{2+} 流速与萌发率的相关性达极显著水平, 拟合的线性方程为 $Y = -0.192\ 2 \times X + 94.09$, R^2 为 0.860 6 (图 6); Ca^{2+} 流速与相对电导率呈显著线性正相关, R^2 为 0.980 8; Ca^{2+} 流速与含水率、MDA 含量都呈显著的负相关关系, R^2 为 0.961 3; 与 CAT 活性相关性不显著, R^2 为 0.311 6。

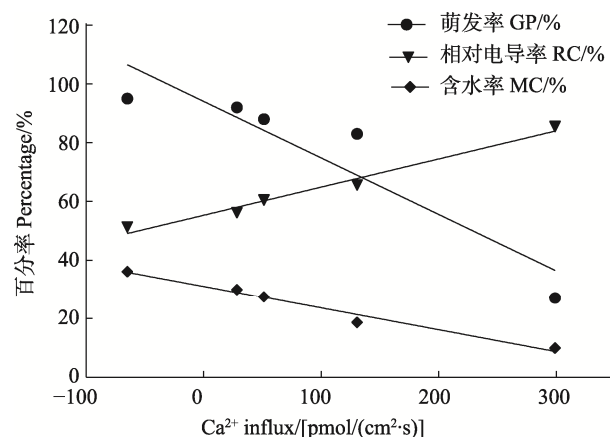


图 6 Ca^{2+} 流速与鳊草种子活力相关指标的线性相关性

Fig.6 Linear correlation between Ca^{2+} influx and indicators related to eelgrass seed vigor

3 讨论

3.1 干燥处理时间对鳊草种子主要生理特性的影响

种子活力是种子发芽和出苗率、幼苗生长潜势、植株抗逆能力和生产潜力的总和, 是种子品质的重要指标。提前了解种子活力情况, 将种子活力列入种子的筛选项目之中, 有利于生产实践, 降低生产成本,

提高出苗质量。传统种子活力检测方法主要包括幼苗生长测定法、氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法、逆境检测法、电导率法等,且含水率、CAT 等物质也与种子活力有密不可分的关系。电导率的测定是种子活力测定中生理生化方法之一,相对电导率可以反映鳗草种子的细胞膜透性。本研究中,随着干燥处理时间的延长,鳗草种子细胞膜透性已明显受干燥影响而增大。经 4 h 和 8 h 干燥处理的鳗草种子相对电导率上升更加显著。在细胞膜透性增加的同时,部分膜结构严重损坏的细胞可能在扩散作用下释放细胞内溶物,从而形成自胞内向胞外环境方向的离子流,因此电导率增加。种子含水率的大小直接影响种子的萌发率和存活率,对大多数种子来说,种子的含水率影响着种子的活力和寿命(颜启传等, 2001); MDA 是脂质被氧化的终产物,其积累可以反映植物在干旱胁迫下细胞膜以及细胞内抗氧化系统的受损程度,MDA 含量越高,细胞膜受损程度越大。因此,可通过 MDA 含量反映膜脂过氧化程度,以间接测定膜系统受损程度及植物的抗逆性(何璇等, 2024)。本研究中,鳗草种子 MDA 含量和相对电导率均随着干燥时间的延长而上升,与玉米(刘明久等, 2008)的研究结果趋势相同。MDA 含量升高会加快细胞脂质过氧化反应,同时抑制酶活性,自由基累积,进一步加速生物膜受损,导致浸出液电导率升高。CAT 在生物防御体系中扮演关键角色,是生物体抗衰老的保护酶之一(南芝润等, 2008),能够维护细胞膜的稳定性和完整性。此外, CAT 具有提高植物抗逆水平、增强植物光合作用、延缓衰老等多种作用,其活性可以间接反映种子活力的大小(南芝润等, 2008; Wei *et al.*, 2019)。但在干旱情况下,植物抗氧化酶活性以及渗透调节物质的含量均有所增加(Imahori *et al.*, 2016)。在本研究中,当干旱胁迫发生时,植物细胞内会堆积自由基、过氧化物等严重危害细胞正常生理进程与结构完整的化合物,抗氧化酶的过量表达可以间接反映植物积极应答干旱胁迫造成的损伤(Wu *et al.*, 2016)。在干燥处理 1 h 之前,鳗草种子中 CAT 活性随干燥时间增长而逐渐提高,直至 2 附近达到顶点,而后快速下降。到干燥处理 8 h 时,其 CAT 活性下降至最低点。1 h 和 2 h 干燥处理下,鳗草种子 CAT 活性的提高由抗氧化应答通路主导。但随干燥时间增长,鳗草种子含水率逐渐下降。CAT 因水溶性环境变化而逐渐变性失活,导致 CAT 活性迅速下降。此时,细胞内其他种类结构蛋白与功能性酶均在干燥环境下相继失活,造成鳗草种子的活力大幅下降甚至死亡。一般来说,种子活力越低,发芽率、含水率越低,相对电导率和 MDA 含量越高(郝楠等,

2015; Kauth *et al.*, 2015),本研究也得到了相同的结果。但 CAT 活性和以往研究有所不同,当植物感受到非生物胁迫时,可激活植物 Ca^{2+} 通路诱导植物产生抗逆反应。外界环境刺激传递给膜上的受体,受体接到信号后通过膜上一系列磷酸化反应激活膜上的钙通道,引起 Ca^{2+} 流入细胞质,导致细胞质内 Ca^{2+} 浓度增加,从而产生钙信号(Chinnusamy *et al.*, 2004)。钙信号往往伴随着植物细胞内抗氧化相关通路的开启,可引发细胞内抗氧化酶系的过量表达,这与 CAT 活性测定的数据吻合。

3.2 干燥处理时间对鳗草种子 Ca^{2+} 流速的影响

Ca^{2+} 作为一种多功能的第二信使,在几乎所有的非生物胁迫响应中都发挥着多方面的作用,包括干旱胁迫、盐胁迫、低温和高温刺激等多种胁迫(Ranty *et al.*, 2006),已有研究表明,不同的非生物胁迫信号能改变细胞内 Ca^{2+} 水平。对于某种非生物胁迫, Ca^{2+} 不仅与其感知相互关联,而且多功能地保证了后续的信号转导(Dong *et al.*, 2022)。 Ca^{2+} 之前已被证明在植物抗旱过程中发挥着重要作用(张晶晶等, 2013)。本研究中,鳗草种子在干燥处理 0 h 时为内流现象,但是干燥处理 1 h 时 Ca^{2+} 外流,且随着干燥时间的增长, Ca^{2+} 外流逐渐增大,鳗草种子内 Ca^{2+} 逐渐减少。有研究者在检测抗旱型与水分亏缺敏感型大豆叶肉细胞 Ca^{2+} 流时发现,敏感型大豆 Ca^{2+} 外排强烈(Mak *et al.*, 2014);此外,有实验发现,油松(*Pinus tabulaeformis* Carriere)和柴松(*Pinus tabulaeformis* f. *Shekannesis* Yao et Hsü)在长期干旱胁迫下,柴松的 Ca^{2+} 外流显著升高,而柴松的抗旱性不及油松(王树源等, 2018),与本研究结果类似。研究证实,绿萝(*Epipremnum aureum*)在受到机械损伤后周边 Ca^{2+} 呈外流趋势,而长寿花(*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.) Ca^{2+} 呈内流趋势(王文军等, 2012),且绿萝与鳗草都为木兰纲,泽泻目植物,表现为受到非生物胁迫时会发生 Ca^{2+} 外流现象。推测,干燥处理 0~1 h,鳗草种子由于干燥带来的胁迫产生了钙信号,可以有效调控下游信号与生理响应过程。但植物细胞钙浓度需要维持在一定范围内才能正常生长,持续升高对植物正常细胞有危害作用。此时一般情况下,植物细胞将迅速通过膜 Ca^{2+} -ATP 酶以及 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 转运体将细胞内多余的 Ca^{2+} 转移至质外体或者膜外,以维持 Ca^{2+} 的平衡,这就呈现出实验中 Ca^{2+} 的持续外流。另外,通过对近年来资料的分析 and 总结,发现 Ca^{2+} 在植物抗逆中的主要作用是稳定植物的细胞壁和细胞膜; Ca^{2+} 在植物中还有调节膜透性的功能(张鹏飞等, 2023);激活和抑制细胞

膜上各种离子通道, 达到细胞内外离子浓度平衡。随着 Ca^{2+} 的外流, 鳎草种子的 Ca^{2+} 储存量逐渐减少, 生物膜的通透性随之改变。鳎草种子通过 Ca^{2+} ATPase 和 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运蛋白促进细胞 Ca^{2+} 外流, 保持胞质内低 Ca^{2+} 浓度, 鳎草种子活力逐渐下降且生物膜结构破损, 鳎草种子机能损伤严重。随着生物膜功能的损坏, 植物细胞液泡及内质网中储存的 Ca^{2+} 由于化学势的作用向细胞外扩散速率增大。持续的 Ca^{2+} 外流不利于鳎草种子响应干燥带来的胁迫, 因此随处理时间的延长, 鳎草种子 Ca^{2+} 逐渐出现外流趋势, 且 Ca^{2+} 流速不断增大。当 Ca^{2+} 外流增大时, 伴有种子萌发率降低、细胞膜透性增加、抗氧化酶活性下降等表型与生理指标变化。且鳎草种子又为顽拗性种子, 干燥脱水能导致顽拗性种子细胞中水介质流动性下降, 产生代谢胁迫; 另一方面诱导脂质相变, 降低脂肪酸的不饱和程度, 生成过氧化物, 造成膜结构蛋白的不可逆外流和膜功能的丧失, 最终使顽拗性种子的活力逐渐丧失。研究表明, 基于 NMT 的 Ca^{2+} 流速测定方法具有作为一种重要的机理研究技术用于鳎草种子活力检测的应用潜力, 但在方法的普适性、深层次生理机制解析等方面仍需进一步深化和提升。目前的研究仅聚焦于特定实验区域的鳎草, 该技术是否适用于不同地理区域、生境条件下的鳎草以及其他种类的海草种子有待明确。目前虽已初步建立 Ca^{2+} 流速与种子活力的表观相关关系, 但二者之间深层次的逻辑关系尚不清楚, Ca^{2+} 信号转导网络的关键基因、蛋白和信号分子及其在鳎草种子萌发及幼苗早期生长中的调控机制等尚需深入研究。

参 考 文 献

- BOS A R, BOUMA T J, DE KORT G L J, *et al.* Ecosystem engineering by annual intertidal seagrass beds: Sediment accretion and modification. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2007, 74(1/2): 344–348
- BRODIE G, HOLLAND E, DE RAMON N'YEURT A, *et al.* Seagrasses and seagrass habitats in Pacific small island developing states: Potential loss of benefits via human disturbance and climate change. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 160: 111573
- CHINNUSAMY V, SCHUMAKER K, ZHU J K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(395): 225–236
- DAI B, XU S J, SHI W, *et al.* Comparison on testing methods of rice seed vigor. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2023(19): 1–4 [代蓓, 徐四静, 石伟, 等. 水稻种子活力测定方法比较研究. *现代农业科技*, 2023(19): 1–4]
- DING Y N, XU Y. Non-invasive micro-test technology and its applications in biology and medicine. *Physics*, 2007, 36(7): 548–558 [丁亚男, 许越. 非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用. *物理*, 2007, 36(7): 548–558]
- DONG Q Y, WALLRAD L, ALMUTAIRI B O, *et al.* Ca^{2+} signaling in plant responses to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(2): 287–300
- DUARTE C M, CHISCANO C L. Seagrass biomass and production: A reassessment. *Aquatic Botany*, 1999, 65(1/2/3/4): 159–174
- GAMBI M C, NOWELL A, JUMARS P A. Flume observations on flow dynamics in *Zostera marina* (eelgrass) beds. *Marine Ecology Progress Series*, 1990, 61: 159–169
- GAO Y P, FANG J G, TANG W, *et al.* Seagrass meadow carbon sink and amplification of the carbon sink for eelgrass bed in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 17–21 [高亚平, 方建光, 唐望, 等. 桑沟湾大叶藻海草床生态系统碳汇扩增力的估算. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 17–21]
- HAN H W, JIANG X, PAN J H, *et al.* Characteristics of seagrass seed and restoration of seagrass bed. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2012, 36(8): 909–917 [韩厚伟, 江鑫, 潘金华, 等. 海草种子特性与海草床修复. *植物生态学报*, 2012, 36(8): 909–917]
- HAO N, WANG J H, LI H F, *et al.* The development and evaluation method of seed vigor. *Seed*, 2015, 34(5): 44–45, 49 [郝楠, 王建华, 李宏飞, 等. 种子活力的发展及评价方法. *种子*, 2015, 34(5): 44–45, 49]
- HE X, ZHANG P A, DING G W, *et al.* A study on the effects of exogenous selenium on selenium enrichment, antioxidant response and nutritional quality of cucumber. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2024, 38(8): 1568–1574 [何璇, 张平安, 丁光武, 等. 外源硒对黄瓜富硒及抗氧化反应和营养品质的影响研究. *核农学报*, 2024, 38(8): 1568–1574]
- IMAHORI Y, BAI J H, BALDWIN E. Antioxidative responses of ripe tomato fruit to postharvest chilling and heating treatments. *Scientia Horticulturae*, 2016, 198: 398–406
- KAUTH P J, BIBER P D. Moisture content, temperature, and relative humidity influence seed storage and subsequent survival and germination of *Vallisneria americana* seeds. *Aquatic Botany*, 2015, 120: 297–303
- LI J G, WANG Y, PRITCHARD H W, *et al.* The fluxes of H_2O_2 and O_2 can be used to evaluate seed germination and vigor of *Caragana korshinskii*. *Planta*, 2014, 239(6): 1363–1373
- LI L, STADEN J, JÄGER A K. Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulation*, 1998, 25(2): 81–87
- LI S, FAN H Q, QIU G L, *et al.* Review on research of seagrass beds restoration. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(9): 2443–2453 [李森, 范航清, 邱广龙, 等. 海草床恢复研究进展. *生态学报*, 2010, 30(9): 2443–2453]
- LI W T, ZHANG X M. The ecological functions of seagrass meadows. *Periodical of Ocean University of China*, 2009,

- 39(5): 933–939 [李文涛, 张秀梅. 海草场的生态功能. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(5): 933–939]
- LI X Z, SIMPSON W R, SONG M L, *et al.* Effects of seed moisture content and *Epichloe* endophyte on germination and physiology of *Achnatherum inebrians*. South African Journal of Botany, 2020, 134: 407–414
- LIU G S, CHEN J. Roles of calcium dependent protein kinases (CDPKs) in plant calcium signal transduction. Chinese Bulletin of Botany, 2003, 38(2): 160–167 [刘贯山, 陈珈. 钙依赖蛋白激酶(CDPKs)在植物钙信号转导中的作用. 植物学通报, 2003, 38(2): 160–167]
- LIU M J, WANG T G, CHEN S L, *et al.* Physiological and seed vigour changes of maize seeds during artificial aging course. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2008, 22(4): 510–513 [刘明久, 王铁固, 陈士林, 等. 玉米种子人工老化过程中生理特性与种子活力的变化. 核农学报, 2008, 22(4): 510–513]
- LIU X J, ZHOU Y, YANG H S, *et al.* Evaluation of eelgrass debris as a food source for *Apostichopus japonicus*. Marine Sciences, 2013, 37(10): 32–38 [刘旭佳, 周毅, 杨红生, 等. 大叶藻碎屑作为刺参食物来源的实验研究. 海洋科学, 2013, 37(10): 32–38]
- MAK M, BABLA M, XU S C, *et al.* Leaf mesophyll K^+ , H^+ and Ca^{2+} fluxes are involved in drought-induced decrease in photosynthesis and stomatal closure in soybean. Environmental and Experimental Botany, 2014, 98: 1–12
- MCLAMORE E S, JAROCH D, CHATNI M R, *et al.* Self-referencing optrodes for measuring spatially resolved, real-time metabolic oxygen flux in plant systems. Planta, 2010, 232(5): 1087–1099
- NAN Z R, FAN Y X. Advance of researches on catalase in plants. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2008, 14(5): 27–29 [南芝润, 范月仙. 植物过氧化氢酶的研究进展. 安徽农学通报, 2008, 14(5): 27–29]
- ORTH R J, HARWELL M C, BAILEY E M, *et al.* A review of issues in seagrass seed dormancy and germination: Implications for conservation and restoration. Marine Ecology Progress Series, 2000, 200: 277–288
- PARK J I, KIM J H, KIM J R. Germination rate and moisture content of eelgrass, *Zostera marina* upon desiccation. The Sea, 2017, 22(3): 69–76
- PARK J I, LEE K S. Site-specific success of three transplanting methods and the effect of planting time on the establishment of *Zostera marina* transplants. Marine Pollution Bulletin, 2007, 54(8): 1238–1248
- PHILLIPS R C, PETER M C. Seagrass research methods. Paris: United National Educational Scientific and Culture Organization, 1990, 51–54
- QU Z J, JIA L Q, QI H N, *et al.* Research advances in non-destructive detection methods of seed vigor. Journal of Zhejiang A & F University, 2020, 37(2): 382–390 [瞿志杰, 贾良权, 祁亨年, 等. 种子活力无损检测方法研究进展. 浙江农林大学学报, 2020, 37(2): 382–390]
- RANTY B, ALDON D, GALAUD J P. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: Multifaceted relays to decode calcium signals. Plant Signaling & Behavior, 2006, 1(3): 96–104
- SHAFFER D, BERGSTROM P. An introduction to a special issue on large-scale submerged aquatic vegetation restoration research in the Chesapeake Bay: 2003–2008. Restoration Ecology, 2010, 18(4): 481–489
- SHORT F T, WYLLIE-ECHEVERRIA S. Natural and human-induced disturbance of seagrasses. Environmental Conservation, 1996, 23(1): 17–27
- SHORT F, CARRUTHERS T, DENNISON W, *et al.* Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2007, 350(1/2): 3–20
- TANNER C E, PARHAM T. Growing *Zostera marina* (eelgrass) from seeds in land-based culture systems for use in restoration projects. Restoration Ecology, 2010, 18(4): 527–537
- TIAN L, ZHANG P D, NIU S N, *et al.* Effects of different treatments on seed germination and seedling establishment of eelgrass *Zostera marina* L. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(9): 2408–2413 [田璐, 张沛东, 牛淑娜, 等. 不同处理对大叶藻种子萌发和幼苗建成的影响. 生态学杂志, 2014, 33(9): 2408–2413]
- WANG H H, ZHANG Y H, LI W T, *et al.* Effects of different cultivation methods on seedling establishment and physiology of the eelgrass *Zostera marina*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 239–249 [王合虎, 张彦浩, 李文涛, 等. 不同栽培方式对鳗草实生苗建成和生理的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 239–249]
- WANG S Y, WANG F, TANG J Q, *et al.* Effect of drought stress on potassium and calcium fluxes in *Pinus tabulaeformis* and *Pinus tabulaeformis f. shekanensis*. Journal of Northwest A & F University (Natural Science), 2018, 46(1): 21–29 [王树源, 王富, 唐佳琪, 等. 干旱胁迫对油松和柴松钾钙离子流的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(1): 21–29]
- WANG W J, YE B, XV Y. The correlation between H_2O_2 and Ca^{2+} flow rates in different plant leaves after mechanical damage. Abstract of papers from the 9th National Symposium on Calcium Signaling and Cell Function. National Symposium on Calcium Signaling and Cellular Function, 2012, 1 [王文军, 叶斌, 许越. 机械损伤后不同植物叶片 H_2O_2 和 Ca^{2+} 流速的相关性. 第九届全国钙信号和细胞功能研讨会论文摘要集. 全国钙信号和细胞功能研讨会, 2012, 1]
- WANG X K, YANG H J, ZHAO P. Research progress in seagrass restoration ecology and technology. Marine Science Bulletin, 2023, 42(2): 232–240 [王小康, 杨海杰, 赵鹏. 海草恢复生态学与修复技术研究进展. 海洋通报, 2023, 42(2): 232–240]
- WEI M L, GE Y H, LI C Y, *et al.* G6PDH regulated NADPH production and reactive oxygen species metabolism to enhance disease resistance against blue mold in apple fruit

- by acibenzolar-S-methyl. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 148: 228–235
- WU X L, YUAN J, LUO A X, *et al.* Drought stress and re-watering increase secondary metabolites and enzyme activity in *Dendrobium moniliforme*. *Industrial Crops and Products*, 2016, 94: 385–393
- XU S C, ZHANG Y, ZHOU Y, *et al.* Warming northward shifting southern limits of the iconic temperate seagrass (*Zostera marina*). *iScience*, 2022, 25(8): 104755
- XU Y. Non-damage micro-measurement technology and its application. Beijing: Xuyue (Beijing) Technology Co, Ltd, 2021-06-15 [许越. 非损伤微测技术及其应用. 北京: 旭月(北京)科技有限公司, 2021-06-15]
- YAN Q C. Seed science. Beijing: China Agriculture Press, 2001. [颜启传. 种子学. 北京: 中国农业出版社, 2001]
- ZHANG Z Z, PAN J H, LI X J, *et al.* Study on techniques for *Zostera marina* L. seedling raising and transplantation. *Periodical of Ocean University of China*, 2017, 47(5): 80–87 [张壮志, 潘金华, 李晓捷, 等. 大叶藻种子育苗及移栽技术研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, 47(5): 80–87]
- ZHANG J J, LI J J, NIAN H J. The role of calcium/calmodulin signaling pathways in the stresses: Progress in researches. *Chinese Journal of Microecology*, 2013, 25(7): 858–860 [张晶晶, 李金金, 年洪娟. 钙/钙调素信号途径在胁迫中的作用研究进展. 中国微生态学杂志, 2013, 25(7): 858–860]
- ZHANG P D, ZENG X, SUN Y, *et al.* Research progress in seagrass shoot transplanting method. *Marine Sciences*, 2013, 37(5): 100–107 [张沛东, 曾星, 孙燕, 等. 海草植株移植方法的研究进展. 海洋科学, 2013, 37(5): 100–107]
- ZHANG P F, WANG L F, LIU Q Q, *et al.* Research progress on physiological functions of Ca^{2+} in plants. *South-Central Agricultural Science and Technology*, 2023(5): 227–232 [张鹏飞, 王立峰, 刘倩倩, 等. 植物中 Ca^{2+} 生理功能的研究进展. 中南农业科技, 2023(5): 227–232]
- ZHENG F Y, QIU G L, FAN H Q, *et al.* Diversity, distribution and conservation of Chinese seagrass species. *Biodiversity Science*, 2013, 21(5): 517–526 [郑凤英, 邱广龙, 范航清, 等. 中国海草的多样性、分布及保护. 生物多样性, 2013, 21(5): 517–526]
- ZHU P, SONG X, MAO Y, *et al.* The flux rate of Ca^{2+} into embryo can be used to evaluate the vigour level of maize seeds. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2020, 12(2): 81–88

(编辑 马璀璨)

Feasibility Study of Using Ca^{2+} Flow Rate to Characterize Eelgrass (*Zostera marina*) Seed Viability

HAO Zibing^{1,2}, GAO Yaping², JIANG Zengjie^{2①}, YUAN Mingjun², WANG Jiaqi³,
JIAO Minghui¹, LI Weiwei², WANG Jing⁴, SUI Haidong⁴, ZHANG Yitao⁵

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Key Laboratory of Carbon Sink Fisheries, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. College of Life and Science, Qingdao University, Qingdao 266071, China;

4. Society of Entrepreneurs and Ecology (SEE) Foundation, Beijing 100012, China;

5. Rongcheng Chudao Aquaculture Corporation, Rongcheng 264312, China)

Abstract Eelgrass (*Zostera marina*), a perennial marine seed plant of Magnoliaceae, is commonly found in offshore shallows and river inlets and lives in submerged water. Eelgrass has important ecological services, such as water purification, protection of biodiversity, dike protection, disaster mitigation, and carbon sequestration. In recent years, with the increasing intensity of marine development and utilization and the impact of global climate change, seagrass bed resources have shown signs of increasing decline. The degradation rate of, China's seagrass beds also accelerates annually. Thus, the protection and restoration of seagrass bed resources cannot be delayed. In addition to taking effective management measures, scientific restoration of seagrass beds through human intervention is another important approach to protect existing seagrass beds. Transplanting artificially cultivated seagrass seedlings for seagrass bed restoration is also a way to utilize the seeds efficiently,

① Corresponding author: JIANG Zengjie, Email: jiangzj@ysfri.ac.cn

and the evaluation of seed vigor status is the key to determine the germination rate and seedling establishment rate. Seed vigor is an important index for screening high germination rate, high seedling emergence rate, and other high-quality varieties. It is also the main index reflecting the rapid and neat emergence of seeds and the normal growth of seedlings. At present, methods commonly used to test eelgrass seed vigor are low-temperature germination assay, conductivity assay, enzyme vigor assay, and 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining assay. However, low-temperature germination test cannot reflect the real vigor level of seeds well, especially in eelgrass seeds, because the germination time needs more than 2 weeks. Seedling growth determination, germination rate determination, and other traditional methods for detecting seed vigor need to be verified by a large number of repetitive experiments, which require large amounts of manpower, material resources, and time, as well as a large amount of investment in the development and development of eelgrass seeds. Similarly, conductivity measurement, enzyme activity measurement, and seedling growth rate measurement need to be validated by a large number of repetitive tests, which require a large investment of labor, material, and time, and may also damage seed samples. With the rapid development of technology, various non-contact, non-destructive, rapid seed viability testing methods have emerged. These methods include non-invasive micro-measurement, near-infrared spectroscopy, hyperspectral imaging, electronic nose detection. Among them, non-invasive micro-measurement determines seed viability by means of the sample. It also determines seed vigor by measuring the ion or molecular flow rate of drops on the seed surface. Given its advantages of non-damage, multi-electrode, multi-angle, high sensitivity, and high resolution, this technique has been applied in different plant research fields, such as plant salt resistance, plant pathology, and plant heavy metal resistance. In this study, we determined the Ca^{2+} flow rate and direction in eelgrass seeds with different activities obtained from drying treatment by a non-invasive microbolometer system to investigate the relationship between Ca^{2+} flow rate and eelgrass seed vigor, and provide a new method for the rapid, non-invasive, and *in vivo* identification of eelgrass seed vigor. Prior knowledge of seed viability status is a crucial aspect of artificial seedling cultivation, including eelgrass. In this study, eelgrass seeds were subjected to different degrees of drought stress for their special recalcitrant properties, and the same batch of eelgrass seeds was artificially treated to create differences in vigor. While different indicators were used to describe the physiological state of the seeds after the drying treatment, non-invasive micrometry was used to determine the Ca^{2+} flow rate of the seeds and investigate the relationship between eelgrass seed vigor and Ca^{2+} flow rate. In this study, drying treatments were used to artificially create viability differences in eelgrass seeds from the same batch, totaling five drying times (0, 1, 2, 4, and 8 h) and 20 groups of samples. Germination rate, relative conductivity, water content, catalase activity, and malondialdehyde content were determined. Non-invasive micro-measurement was applied to the detection research of eelgrass seed vigor. Its primary objectives were to verify the feasibility of seed vigor grading through preliminary experiments, formulate a demonstration scheme, and further lay a solid foundation for the subsequent establishment of a standardized system for eelgrass seed vigor grading. Results showed that the germination rate gradually decreased and the relative conductivity increased with treatment time, the germination rate of the seeds after 4 h of treatment was 12% lower than that of the untreated seeds, and the germination rate after 8 h of treatment significantly reduced and was 68.7% lower than that of the untreated seeds. Catalase activity also significantly changed with treatment time. The Ca^{2+} was effluxed, and the efflux rate increased with treatment time. The germination rate and Ca^{2+} efflux flow rate were significantly negatively correlated, and the fitted linear equation was $y = -0.192\ 2x + 94.09$, with an R^2 of 0.860 6. This study proved that the Ca^{2+} flow rate could serve as an eelgrass seed vigor detection index, providing a basis for the rapid and non-destructive identification of eelgrass seed vigor.

Key words Eelgrass seeds (*Zostera marina*); Drying treatment; Seed viability; Ca^{2+} flow rate; Non-invasive micrometry techniques