

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170615001

邓桂荣, 梅承芳, 陈燕玲, 等. 标准化测试种子发芽和根伸长毒性试验的基质应用研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(4): 191-196

Deng G R, Mei C F, Chen Y L, et al. Study of substrate application in a standardized toxicity test of seed germination and root elongation [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(4): 191-196 (in Chinese)

标准化测试种子发芽和根伸长毒性试验的基质应用研究

邓桂荣, 梅承芳, 陈燕玲, 梁燕珍, 许玉洁, 梁秋, 曾国驱*

1. 广东省微生物分析检测中心, 生态毒理与环境安全实验室, 广州 510070
2. 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070
3. 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广州 510070

收稿日期: 2017-06-15 录用日期: 2017-09-12

摘要: 种子发芽和根伸长毒性试验是研究和评价新化学物质对陆生生物危害性的重要手段之一。为探究在标准化测试中能否使用非推荐基质, 以及使用推荐基质时能否用灭菌法替代酸洗法处理石英砂, 选取 8 种植物种子在 5 种基质中进行试验。结果表明, 不同基质对种子发芽率的影响较小, 但基质较低的营养含量和特殊的物理结构易对部分种子根长形成胁迫, 甚至直接制约根系发育。生菜、水稻在 5 种基质中的发芽率和根长无显著性差异; 绿豆、甘蓝、西瓜在酸洗石英砂中的根长分别为 25.1、24.5、29.0 mm, 在其余 4 种基质中根长显著缩短; 青瓜在吸水纸和发芽纸中发芽率偏低, 仅为 83.3%; 玉米在酸洗石英砂和灭菌石英砂中的发芽率和根长无明显差异, 为 100%/45.7 mm 和 93.3%/44.8 mm, 其他基质中显著偏低。标准化测试条件下, 以推荐的酸洗石英砂上各种子的发芽率和根长为评判依据, 生菜和水稻试验可使用本研究中任意基质, 绿豆、甘蓝和西瓜试验仅可使用酸洗石英砂作为基质, 青瓜和玉米试验可使用干热灭菌法替代酸洗法处理石英砂, 并且青瓜试验还可使用滤纸基质。以上结果为测试机构在工作实践中优化试验条件提供理论依据。

关键词: 种子发芽; 根伸长; 基质; 石英砂; 滤纸; 吸水纸; 发芽纸

文章编号: 1673-5897(2018)4-191-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Study of Substrate Application in a Standardized Toxicity Test of Seed Germination and Root Elongation

Deng Guirong, Mei Chengfang, Chen Yanling, Liang Yanzhen, Xu Yujie, Liang Qiu, Zeng Guoqu*

1. Laboratory of Ecotoxicity and Environmental Safety, Guangdong Detection Center of Microbiology, Guangzhou 510070, China
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China
3. State Key Laboratory of Applied Microbiology, Southern China, Guangzhou 510070, China

Received 15 June 2017 accepted 12 September 2017

Abstract: Seed germination and root elongation toxicity test is one of the important technical means to study and evaluate the hazard of chemicals on terrestrial plants. Eight kinds of plant seeds were selected and tested in five different substrates in order to explore if non-recommended substrates could be used in the standardized test and if sterilization could replace pickling for pre-treatment when using the recommended substrates. The results showed

作者简介: 邓桂荣(1984-), 男, 学士, 研究方向为生态毒理及质量保证, E-mail: dengguirong@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zengqq@gddcm.com

little effect of different substrates on seed germination, but their lower nutrient content and special physical structure were likely to affect root length of some plants, or even directly constrained the root development. The seed germination and root length of lettuce and paddy had no significant differences when tested in all five substrates. The root lengths of mungbean, cabbage and watermelon in acid-washed quartz sand were 25.1, 24.5 and 29.0 mm, respectively, which were shortened significantly in other 4 substrates. The seed germination of cucumber was only 83.3% in blotting paper and germination paper. The seed germination and root length of corn were 100%/45.7 mm and 93.3%/44.8 mm when tested in acid-washed and sterilized quartz sand, which were significantly better than those in the other 3 substrates. So in a standardized test with the seed germination and root length of various seeds in acid-washed quartz sand being the criteria, (a) the lettuce and paddy tests can use any substrate in this study; (b) the mungbean, cabbage and watermelon tests can only use recommended substrates; (c) the cucumber and corn tests can use both acid-washed and sterilized quartz sand; (d) the filter paper can also be used as substrate in cucumber test. These results provide a theoretical basis for QC institutes to optimize test conditions in practice.

Keywords: seed germination; root elongation; substrate; quartz sand; filter paper; blotting paper; germinating paper

随着经济的高速发展,中国的化学品污染问题日益突出,已经严重影响了人们的生活质量,甚至直接危及了人们的身心健康。这已引起环境保护部门的密切关注和高度重视,并已采取各种手段,如陆续出台严厉的政策加强污染防治。尤其在新化学物质管理方面,注重源头控制,要求在新化学物质投入使用前,先对其开展环境危害性测试和风险评估^[1-2]。

由于陆生植物种子萌芽和根部伸长是植物生长周期中最为关键的阶段,也是对周围环境变化最为敏感的时期^[3-4],因此标准化测试种子发芽和根伸长毒性试验成为环境危害性评估的要素之一^[5]。通过研究化学物质对高等植物的生态毒理效应来监测环境污染程度,从生态学的角度衡量环境健康,进而评价该化学物质的排放可能对环境造成的不良影响^[6]。针对该类试验的基质应用已有较多研究^[7-9],但在标准化测试中能否使用其他物质替代填充惰性材料作为基质,以及标准化测试指定的石英砂处理方法与其他处理方法相比,试验结果是否存在差异,这些在国内尚未见报道。

根据《国际种子检验规程》,用于种子发芽试验的基质可以是纸或砂,或者某种状况的土壤^[10],而标准化测试要求使用填充惰性材料,并用强酸清洗,然后使用全玻璃蒸馏水或去离子水漂洗至接近中性。可能出于玻璃珠附着力小,不利于植物根部发育,使用玻璃珠进行研究较为少见,通常使用石英砂作为基质,但石英砂颗粒小,用量大,用水漂洗难以去除强酸,可能需要专业装备,成本较高。因此,在满足该试验质量控制要求的前提下,研究能否使用

替代性基质,或者使用石英砂基质时,能否采用其他更便捷的处理方法,以降低试验成本、提高工作效率、减少污染,具有重要的实用价值。

本研究以标准化测试推荐的石英砂处理方法(酸洗法)^[5]为基础,新增干热灭菌的石英砂处理方法,并引入在种子发芽试验中已有较多研究的滤纸和吸水纸,以及广泛应用于种子质量检测的发芽纸作为基质,选用8种植物种子进行试验,考察5种基质对种子发芽和根部伸长的影响,获得基质中可能存在的有毒物质对各种子生长初期影响的数据。采用SPSS软件比较酸洗石英砂与灭菌石英砂、滤纸、吸水纸、发芽纸之间种子发芽率和根长的差异情况,并以酸洗石英砂为基准,对使用灭菌石英砂替代酸洗石英砂以及将滤纸、吸水纸、发芽纸应用于标准化测试的可行性进行评估,为测试机构在工作实践中优化试验条件提供理论依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验材料

1.1.1 试剂

硝酸(65.0%~68.0%)。该试剂为分析纯,购自广州化学试剂厂。

1.1.2 试验种子

试验种子番茄(新星101)、青瓜(粤秀3号)、生菜(精选意大利)、甘蓝(甘秀333)、玉米(广甜3号)为标准化测试推荐的受试植物,绿豆、西瓜(美宝王)、水稻(钱优1号)为本地区重要的经济植物种类。其中,番茄、青瓜、生菜、玉米购自广东省农业科学院蔬菜研究所,绿豆、甘蓝和西瓜、水稻分别来源于广州祥胜种子有限公司、广州大田园种子有限公司和浙

江农科种业有限公司。所有植物种子在使用前均用去离子水漂洗和浸泡1 h。试验前未对种子消毒,试验时挑选大小和饱满度接近的种子。

1.1.3 基质及其处理

石英砂购自广东半岛石英砂厂,粒径为40~100 μm 。滤纸、吸水纸和发芽纸分别来源于杭州沃华滤纸有限公司、维达纸业(中国)有限公司和德州市德城区昊诚仪器供应站。各基质处理方法详见表1。

1.2 仪器设备

三按键电子数显卡尺(SF2000,中国,桂林广陆数字测控股股份有限公司),手提式pH测试仪(pH3210,德国,WTW),电感耦合等离子体质谱仪(Agilent 1260-7700e型,美国,安捷伦科技有限公司),离子色谱仪(ICS-1600型,美国,戴安公司),总有机碳分析仪(VarioTOC,德国,Elementar Analysensysteme GmbH),光照培养箱(PGX,中国,宁波莱福科技有限公司)。

1.3 试验条件

将种子置于培养箱中培养,试验温度为 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,完全黑暗。

1.4 方法

按照标准测试方法^[5]要求操作。

1.4.1 试验设计

石英砂试验:按石英砂饱和含水量的60%(番茄、青瓜、生菜、甘蓝、西瓜、水稻、玉米)或80%(绿豆)添加去离子水^[11],混合均匀后,将石英砂分装至培养皿中,再将试验种子置于石英砂表面,保持种子胚根末端和生长方向成一直线。轻压入石英砂内后,覆盖少量石英砂,盖好培养皿。

滤纸试验:用干净的镊子将5层滤纸放入去离子水中,待吸足水分后取出,沥掉多余水分,放入培养皿。将种子均匀地排在纸床上,粒与粒之间保持一定的距离。

吸水纸和发芽纸试验方法参照滤纸试验。每个培养皿或发芽盒放置4层吸水纸或5层发芽纸。

使用保鲜膜将所有培养皿和发芽盒密封,然后置于培养箱中,呈极小的角度便于根的直线生长。

以酸洗石英砂试验为对照组,8种种子同时开展5种基质试验,每种种子在每种基质中的试验均设置3个平行,每个平行放置10粒种子,共30粒种子。

1.4.2 分析测定

试验开始时测定酸洗石英砂和灭菌石英砂的pH值^[12],另将石英砂和去离子水等比例混合,超声处理后离心、过滤,取滤液测试总有机碳(total organic carbon, TOC)、硝酸根离子(NO_3^-)以及钠、镁、铝、钾、钙等元素含量。当对照组的种子发芽率达到65%以上且根的长度至少20 mm时结束试验。从位于胚轴和根的转换点到根尖末端测定各种子根长。以种子初生根长度达5 mm时作为发芽的标志。

1.5 数据统计

采用Microsoft Office Excel 2007统计各种子发芽率、根长,应用SPSS Statistics 17.0软件对各种子的发育情况进行方差分析。

2 结果与分析(Results and analysis)

2.1 不同基质对种子发芽率的影响

由表2可知,对同一批次石英砂进行不同处理,各种子发芽率均未呈现出显著性差异。而使用不同

表1 基质处理方法
Table 1 Preparation of substrate

序号 No.	基质名称 Substrate name	基质处理方法 Preparation of substrate
1	酸洗石英砂 Acid-washed quartz sand	经 $7.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸清洗,再用去离子水漂洗直至 pH 值接近中性 The quartz sand was washed with $7.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitric acid and rinsed with deionized water until the pH of the washed substrate was near neutral.
2	灭菌石英砂 Sterilized quartz sand	经 $160 \sim 170 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 干热灭菌 2 h The quartz sand was dry-heat sterilized at $160 \sim 170 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h
3	滤纸 Filter paper	经 $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 30 min High pressure steam sterilization at $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min
4	吸水纸 Blotting paper	经 $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 30 min High pressure steam sterilization at $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min
5	发芽纸 Germination paper	经 $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 30 min High pressure steam sterilization at $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min

基质时,各种种子发芽率的响应情况并不一致。有些种子受到基质的影响不大,例如番茄、生菜、甘蓝和水稻,在5种不同基质中的发芽率与对照组相比均无统计学差异。但青瓜、绿豆和玉米在石英砂、滤纸上的发芽率和在吸水纸、发芽纸上的差别较大,对照组和吸水纸、发芽纸的发芽率有显著差异($P>0.05$),并且前者的发芽效果较后者理想。尤其是西瓜,在砂基质的发芽情况远优于纸基质,当酸洗石英砂和灭菌石英砂上发芽率分别达83.3%和93.3%时,滤纸、吸水纸和发芽纸上的发芽率依次仅为53.3%、50.0%和53.3%,说明该西瓜品种对这3种基质极不适应。

周亚东等^[13]指出,基质不同,其养分含量及物理结构均存在差异。就吸水性和保水性而言,石英砂比滤纸、吸水纸和发芽纸都要强,而且使用石英砂作

为基质时,将种子置入后,在上面覆盖一层石英砂,使得种子在整个萌发过程中始终得到全方位的水分供给,而滤纸、吸水纸或发芽纸上的种子只能通过底部接触面吸取水分。对于小颗粒种子,如番茄而言,尽管在纸基质中仅通过部分表面吸取水分,但已足以使其正常发育,而对较大颗粒种子如西瓜就显得明显不足,可以认为不同种子的颗粒大小与正常发芽所需水分呈正相关关系。这也解释了为何较大颗粒种子在石英砂中发芽率较高。另外,彭云霞^[14]在研究发芽床对秦艽种子萌发特性的影响时,发现秦艽在纸发芽床下种子活力低于砂床,并认为可能是种子自身带有病菌在滤纸上的感染率高于砂床,而砂床对种子有隔离作用,减少了种子发生次生感染的机会。该结论与本研究所得结果较为吻合。

表2 不同基质对种子发芽率的影响

Table 2 Effects of different substrate on seed germination

序号 No.	种子名称 Seed name	发芽率/% Germination rate/%				
		酸洗石英砂 Acid-washed quartz sand	灭菌石英砂 Sterilized quartz sand	滤纸 Filter paper	吸水纸 Blotting paper	发芽纸 Germination paper
1	番茄 Tomato	90.0±17.3	76.7±15.3	90.0±10.0	93.3±5.8	93.3±11.5
2	青瓜 Cucumber	96.7±5.8	93.3±5.8	93.3±5.8	83.3±5.8*	83.3±11.5*
3	生菜 Lettuce	100.0±0.0	90.0±0.0	73.3±15.3	80.0±17.3	83.3±15.3
4	绿豆 Mungbean	100.0±0.0	93.3±11.5	90.0±10.0	76.7±21.8*	76.7±5.8*
5	甘蓝 Cabbage	86.7±15.3	86.7±5.8	93.3±5.8	96.7±5.8	90.0±10.0
6	西瓜 Watermelon	83.3±11.5	93.3±5.8	53.3±15.3*	50.0±17.3*	53.3±20.8*
7	水稻 Paddy	96.7±5.8	93.3±5.8	86.7±5.8	86.7±5.8	90.0±10.0
8	玉米 Corn	100.0±0.0	93.3±11.5	90.0±10.0	76.7±20.8*	76.7±5.8*

注:表中数据为平均值±标准差,数据后带有“*”表示该结果与对照组(酸洗石英砂)存在显著性差异($P=0.05$);下同。

Note: Data in the table are mean ± standard deviation. It means there is difference at a significance level of 0.05 between the seed germination rate in the substrate and that in control group (Acid-washed quartz sand) when the result is followed by “*”. Similarly hereinafter.

表3 不同基质对种子根长的影响

Table 3 Effects of different substrate on root elongation

序号 No.	种子名称 Seed name	暴露时间 Exposure Time	根长/mm Root length/mm				
			酸洗石英砂 Acid-washed quartz sand	灭菌石英砂 Sterilized quartz sand	滤纸 Filter paper	吸水纸 Blotting paper	发芽纸 Germination paper
1	番茄 Tomato	9 d	14.9±6.9	44.8±30.0*	98.9±42.4*	54.1±31.0*	101.6±37.7*
2	青瓜 Cucumber	3 d	32.6±9.6	35.2±11.6	38.7±12.3	27.3±13.9	31.9±16.0
3	生菜 Lettuce	12 d	20.3±9.6	25.6±13.6	16.2±15.1	16.3±13.0	29.5±24.5
4	绿豆 Mungbean	2 d	25.1±9.6	38.0±13.5*	13.9±4.5*	18.2±8.4	23.2±9.2
5	甘蓝 Cabbage	9 d	24.5±13.1	56.7±31.8*	101.6±37.8*	66.3±25.8*	99.1±41.8*
6	西瓜 Watermelon	4 d	29.0±14.7	44.7±18.1*	10.4±12.6*	8.2±10.6*	12.7±13.5*
7	水稻 Paddy	4 d	29.9±8.4	31.5±13.5	35.7±16.2	30.3±15.9	34.5±15.0
8	玉米 Corn	2 d	45.7±13.3	44.8±16.1	35.1±17.4*	28.6±19.6*	30.4±18.5*

有研究表明,发芽率受外界物质影响较小,这是因为种子发芽过程主要受胚内养分供应,可以直接从胚乳中吸取营养。一般种子先通过吸水、膨胀,然后体内酶原活化,并合成新酶,进而开始进入发芽状态^[15-16]。这个观点在番茄、生菜、甘蓝和水稻种子于5种不同基质中的发芽结果以及青瓜、绿豆、西瓜和玉米种子于2种不同方法处理的石英砂上的试验数据均得到印证。

2.2 不同基质对种子根长的影响

不同基质对种子根长的影响如表3所示。相对于种子发芽而言,根部发育过程比较复杂,干扰因素更多。

表3显示,除玉米外,对照组种子的平均根长均低于灭菌石英砂,特别是番茄种子,当对照组平均根长为14.9 mm时,灭菌石英砂的平均根长已高达44.8 mm,后者是前者的3倍。结合2种石英砂的指标测试结果(表4)分析,2种不同处理石英砂的pH值接近中性且几乎相等,不应是制约种子根部生长的主要因素,推测是因为对照组的石英砂经过硝酸清洗和去离子水漂洗后,TOC、NO₃⁻和各元素含量明显低于仅经过干热灭菌的石英砂造成的。值得一提的是,直至试验结束,番茄种子在对照组中平均根长仍未达到20 mm的质量控制要求,但试验已经进

行至第9天,且该组部分种子出现了茎部萎焉甚至发黑腐烂等异常情况,不得不提前结束。究其原因,应是酸洗石英砂中的营养成分含量不足以维持番茄根部正常发育所致,说明该番茄品种对基质要求较高。

类似于发芽率,种子颗粒体积也是根部发育的重要影响因素。若种子颗粒较大,对石英砂基质的适应性更强,在纸基质上则出现根长缩短,例如绿豆、西瓜和玉米,尤其是西瓜的平均根长明显偏低,主要因为纸基质上的种子生长所需的水分严重不足。陈秋丽等^[17]认为,在空气充足的条件下,水分过少将影响种子的吸胀。相反,小颗粒种子在纸基质上的活力更为旺盛,例如番茄和甘蓝,在3种纸基质上的根长远超出对照组。此时水分不再是种子根系生长的主要制约因素,可能是因为种子萌发过程中,呼吸产生的有害物质在纸基质中容易清除,但在石英砂中难以及时排出,使种胚中毒,进而影响根部生长^[18]。至于青瓜、生菜和水稻的根长与自身颗粒大小的相关度不大,可能具有偶然性,具体原因有待进一步探查。

种子在不同基质上的根部生长和发芽结果的相关性未呈现规律性,推测是由于作用机制的差别。番茄、生菜、甘蓝和水稻在5种基质中的发芽情况类似,各基质之间均无显著性差异,但在根长方面,只有生菜和水稻得到一致的相关性,而对照组上番茄和甘蓝的根长与其余4种基质均存在较大差异。

综上所述:

(1) 同一种子对不同基质的适应性存在一定差别。种子在不同基质中萌芽受外界环境条件影响较小,但根部发育则容易受到多种因素制约。

(2) 开展标准化测试种子发芽和根伸长毒性试验时,生菜和水稻试验基质可使用酸洗石英砂、灭菌石英砂、滤纸、吸水纸和发芽纸中任何一种;绿豆、甘蓝和西瓜的理想试验基质为标准推荐的酸洗石英砂;青瓜除了和玉米一样可使用干热灭菌法替代酸洗法处理石英砂外,还可使用滤纸作为基质,但应慎用吸水纸和发芽纸。

(3) 影响种子发芽和根伸长毒性试验结果的因素较多,如基质(这里指石英砂)来源、有机质含量、所使用的种子及其品种。若使用的石英砂处理方法不同,甚至使用标准推荐以外的基质,并采用未经验证的植物种子及其品种进行试验时,同一化学品的毒性结果可能存在较大差异,甚至得到截然相反的

表4 石英砂指标分析结果

Table 4 Index analysis results of quartz sand

指标 Indexes	酸洗石英砂 Acid-washed quartz sand	灭菌石英砂 Sterilized quartz sand
pH值 pH value	7.15	7.12
总有机碳/(mg·L ⁻¹) TOC/(mg·L ⁻¹)	1.02	2.49
硝酸根离子/(mg·L ⁻¹) NO ₃ ⁻ /(mg·L ⁻¹)	2.71	3.60
钠/(μg·L ⁻¹) Na/(μg·L ⁻¹)	<551.27	<551.27
镁/(μg·L ⁻¹) Mg/(μg·L ⁻¹)	<3.80	48.38
铝/(μg·L ⁻¹) Al/(μg·L ⁻¹)	6.27	15.43
钾/(μg·L ⁻¹) K/(μg·L ⁻¹)	192.61	2 535.19
钙/(μg·L ⁻¹) Ca/(μg·L ⁻¹)	119.60	1 230.83

结果,影响结论的可靠性。由于我国开展化学品种子发芽和根伸长毒性试验的时间较短,基础性数据相对缺乏,应在获得更多种子及若干品种在不同基质上的发芽率和根长数据的基础上开展进一步比较和研究,为推动国内测试条件的规范化和标准化提供更多的科学依据,以确保测试结果的科学性,进而保证环境保护部门最终实现目标化学品在生态系统中潜在风险的有效控制。

致谢:感谢广东省微生物研究所李恩泽老师在文章英文摘要修改中给予的帮助。

通讯作者简介:曾国驱(1966-),男,博士,研究员,主要研究方向为生态毒理学,发表学术论文30余篇。

参考文献(References):

- [1] 中华人民共和国环境保护部. 新化学物质环境管理办法[EB/OL]. (2010-02-04)[2017-06-15]. http://www.gov.cn/flfg/2010-02/04/content_1528001.htm
- [2] 中华人民共和国环境保护部. 新化学物质申报登记指南[S]. 北京: 中华人民共和国环境保护部, 2010
- [3] Sfaxi-Bousbih A, Chaoui A, Ferjani E E. Cadmium impairs mineral and carbohydrate mobilization during the germination of bean seeds [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73: 1123-1129
- [4] Liu T T, Wu P, Wang L H, et al. Response of soybean seed germination to cadmium and acid rain [J]. *Biological Trace Element Research*, 2011, 144: 1186-1196
- [5] OPPTS. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200 Seed germination/root elongation toxicity test [S]. Washington DC: US EPA, 1996
- [6] Knoke K L, Marwood T M, Cassidy M B, et al. A comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil [J]. *Soil Water, Air and Soil Pollution*, 1999, 110: 157-169
- [7] Mariappan N, Srimathi P, Sundaramoorthi L, et al. Effect of growing media on seed germination and vigor in biofuel tree species [J]. *Journal of Forestry Research*, 2014, 25 (4): 909-913
- [8] Geng H X, Yan T, Zhou M J, et al. Comparative study of the germination of *Ulva prolifera* gametes on various substrates [J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2015, 163: 89-95
- [9] 刘同明. 锦带花种子发芽试验[J]. *林业勘查设计*, 2014 (1): 89-91
Liu T M. Germination experiment of *Weigela florida* seed [J]. *Forest Investigation Design*, 2014(1): 89-91 (in Chinese)
- [10] 国际种子检验协会(ISTA). 国际种子检验规程[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-150
- [11] 浙江农业大学种子教研组. 种子检验简明教程[M]. 北京: 农业出版社, 1980: 68-69
- [12] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业行业标准. NY/T 1377—2007 土壤 pH 的测定[S]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2007
- [13] 周亚东, 周有标, 颜速亮, 等. 不同基质对美丽梧桐种子育苗的影响[J]. *热带生物学报*, 2013, 4(4): 322-326
Zhou Y D, Zhou Y B, Yan S L, et al. Effects of different substrates on seed germination and seedling growth of *Firmiana pulcherrima* Hsue [J]. *Journal of Tropical Biology*, 2013, 4(4): 322-326 (in Chinese)
- [14] 彭云霞. 发芽床对秦艽种子萌发特性的影响[J]. *甘肃农业科技*, 2014, 12: 23-25
- [15] 范飞, 周启星, 王美娥. 基于小麦种子发芽和根伸长的麝香酮污染毒性效应[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(6): 1396-1400
Fan F, Zhou Q X, Wang M E. Toxic effect of musk ketone based on the determinations of wheat (*Triticum aestivum*) seed germination and root elongation [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(6): 1396-1400 (in Chinese)
- [16] 金彩霞, 郝苗青, 王庆纬, 等. 利巴韦林对4种作物种子发芽的影响[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(1): 37-41
Jin C X, Hao M Q, Wang Q W, et al. Effects of ribavirin on seed germination of four crops [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(1): 37-41 (in Chinese)
- [17] 陈秋丽, 李淑更, 张可方, 等. 污泥农用对蔬菜种子发芽与根伸长抑制的影响[J]. *仲恺农业工程学院学报*, 2013, 26(1): 17-22
Chen Q L, Li S G, Zhang K F, et al. Effects of agricultural use of sludge on inhibition of seed germination and root elongation of vegetables [J]. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, 2013, 26(1): 17-22 (in Chinese)
- [18] 佟宗宝. 不同发芽床对玉米种子发芽率的影响[J]. *现代种业*, 2002(4): 29 ◆