

## 研究報告

## 克服鐘萼木種子的生理休眠

黃曜謀<sup>1)</sup> 江曜宇<sup>1)</sup> 陳怡蓓<sup>1)</sup> 蘇子豪<sup>1)</sup> 賴志銘<sup>1,2)</sup>

## 摘要

鐘萼木 (*Bretschneidera sinensis* Hemsl.) 種子是否具有休眠現象有所爭議。本研究確認此罕見子遺樹種的種子休眠性質，並評估種皮去除、低溫層積和激勃酸 (GA<sub>3</sub>) 浸泡的組合處理對鐘萼木種子發芽的影響。研究結果顯示未經任何處理的對照組種子在12週培養期間完全沒有發芽，表明種子具有顯著的休眠。相對地，經過不同組合處理的種子發芽率從0.8到65.0%不等。其中以經4週4°C低溫層積、種皮去除再100 ppm GA<sub>3</sub>浸泡24 h組合處理之種子發芽率最高且平均發芽時間最短。種皮去除和低溫層積顯著增加了種子發芽率，GA<sub>3</sub>浸泡有增加種子發芽率之趨勢，但未達到顯著水平。GA<sub>3</sub>浸泡顯著縮短種子平均發芽時間，種皮去除和低溫層積則對於種子平均發芽時間無顯著影響。本研究結果指出鐘萼木種子發芽表現主受種皮去除與層積溫度以及二者交感作用所影響。

關鍵詞：種皮去除、激勃酸 (GA<sub>3</sub>)、發芽率、低溫層積、平均發芽時間。

黃曜謀、江曜宇、陳怡蓓、蘇子豪、賴志銘。2023。克服鐘萼木種子的生理休眠。臺灣林業科學 38(2):101-114。

<sup>1)</sup> 林業試驗所育林組，100051 臺北市中正區南海路53號 Silviculture Division, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Zhongzheng Dist., Taipei 100051, Taiwan.

<sup>2)</sup> 通訊作者 Corresponding Author, E-mail: ljm8829@tfri.gov.tw

2023年2月送審 2023年4月通過 Received Feb 2023, Accepted Apr 2023.

## Research paper

## Overcoming Physiological Dormancy of *Bretschneidera sinensis* Hemsl. Seeds

Yao-Moan Huang<sup>1)</sup> Yao-Yu Chiang<sup>2)</sup> Yi-Chiann Chen<sup>3)</sup> Tzu-Hao Su<sup>4)</sup> Chih-Ming Lai<sup>3,5)</sup>

### 【 Summary 】

*Bretschneidera sinensis* Hemsl. is a rare relict tree species in Taiwan; however, the seed dormancy of this species is still controversial. In this study, we evaluated the effects of decortication, cold stratification, gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) immersion, and their interactions on the germination of *B. sinensis* seeds. Results showed that control seeds with no treatment did not germinate during a 12-wk incubation period, indicating that seeds had significant dormancy. In contrast, seeds with other treatment combinations exhibited 0.8% to 65.0% germination percentages. Among them, the highest germination percentage and shortest mean germination time were observed in the treatment combination with 4 wk. of 4°C cold stratification, decortication, and then immersion in 100 ppm GA<sub>3</sub> for 24 h. Decortication and cold stratification significantly increased seed germination percentages. Although GA<sub>3</sub> immersion also increased seed germination percentage, the effect did not reach a significance level. GA<sub>3</sub> immersion did significantly shorten the mean germination time of seeds, while decortication and cold stratification did not. This study demonstrated that fresh *B. sinensis* seeds have physiological dormancy, which can be overcome through a combination of cold stratification, decortication, and GA<sub>3</sub> immersion.

**Key words:** decortication, gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), germination percentage, cold stratification, mean germination time.

**Huang YM, Chiang YY, Chen YC, Su TH, Lai CM. 2023.** Overcoming physiological dormancy of *Bretschneidera sinensis* Hemsl. seeds. *Taiwan J For Sci* 38(1):101-114.

### 緒言

鐘萼木 (*Bretschneidera sinensis* Hemsl.) 又稱「伯樂樹」，在臺灣新北市瑞芳區猴硐稱為鐘古樹。先前普遍認為鐘萼木為鐘萼木科 (*Bretschneideraceae*) 底下唯一物種，與無患子科 (*Sapindaceae*) 和七葉樹科 (*Hippocastanaceae*) 關係密切 (Lu and Hu 1994, Tobe and Raven 1995, Lu and Boufford 2005)。在被子植物種系發生學組第4版本 (Angiosperm Phylogeny Group (APG) IV) 分類系統 (APG 2016)，根據分子親緣關係

研究結果 (Soltis et al. 2000)，將鐘萼木納入疊珠樹科 (*Akaniaceae*)。鐘萼木是第三紀泛熱帶植物群的孑遺植物 (Wolfe 1975)。由基因資訊估計鐘萼木歷史上族群數量波動，觀察到40百萬年前左右 (始新世-漸新世過渡期) 全球氣候變冷 (Zachos et al. 2001, Zhang et al. 2016, Kolmogorov et al. 2019, Tang et al. 2020)，鐘萼木族群量規模大幅下降，此後，族群量略有增加，約0.5百萬年前 *Naynayxungla* 冰河期再次造成鐘萼木族群量

大幅下降，形成族群稀少，延續至今 (Liu et al. 2022)，鐘萼木現代族群局限分布在北緯30度、海拔1,700公尺山地常綠闊葉林或常綠落葉混合林，地區包括寮國北方、越南北方、臺灣北部，以及中國大陸南方如浙江、福建、江西、湖南、湖北、廣東、廣西、四川、貴州、雲南等地 (Lu 1986, Wang et al. 2018)。與許多遺存植物一樣，所有鐘萼木天然族群規模很小 (Wang et al. 2018)，根據田野調查，每個族群中成熟個體通常不超過30棵 (Xu et al. 2013)，這可能由於開花個體稀缺、種子產量低、發芽率低、森林砍伐和對幼苗的破壞性收集，造成其族群數量大大減少 (Qiao et al. 2009)。中國的「中國植物紅皮書」將它列為一級保護樹種。在臺灣，鐘萼木僅稀疏分布在北部基隆、陽明山、金瓜石、侯硐、瑞芳和蘇澳一帶，海拔1,000公尺以下二次更新的森林內 (Lu et al. 1986, Huang 1995, Ying 2001)。農委會在1988年公告列為珍貴稀有植物進行保護，直到2002年1月才解除其稀有植物的身分 (Chen et al. 2013)。Wang et al. (2018) 曾廣泛進行鐘萼木族群cpDNA序列採樣分析，識別出13種單倍型 (haplotype)，從鐘萼木族群cpDNA單倍型推斷，雲貴高原東部和雲南東部被認為是冰河期避難所，待冰河期退卻，鐘萼木從這些避難所向東擴展其範圍，同時發現臺灣的陽明山族群具有獨特的單倍型，與中國地區12個基因型具有顯著的遺傳分化現象。鐘萼木雖非屬臺灣特有種，若就其遺傳獨特性，仍保有高度保育價值。

鐘萼木除具保育價值外，其材質優良，花形大、色豔麗，適合作為行道樹及庭園栽植，諸多相關育苗研究報導。在臺灣北部，鐘萼木種子的成熟期在11月間，成熟時種子顏色由青綠色轉變為紅色，蒴果開裂，內有三室，每室種子0-3粒不等。依蒴果的大小不同，每個蒴果有8粒紅色種子不等，平均約3粒。紅色種子有三層種皮 (外種皮、中種皮和內種皮)、二片子葉和胚軸，無胚乳 (Chen et al. 2013)。Yang (2014, 2021) 表示鐘萼木種子屬溫帶異儲型 (temperate recalcitrant)，不耐乾燥且沒有休眠現象，可在8週內完全發芽。Yang (1992) 指出鐘萼木種子無休眠性，在25°C，光照

條件下，播種後約一個月，極容易發芽。然而，Chen et al. (2013) 卻發現鐘萼木種子發芽率低，推測鐘萼木種子有休眠現象，進一步證實低溫處理可解除休眠，不僅隨低溫層積時間愈久，發芽率愈高，且發芽速率愈快之趨勢，以5°C低溫層積處理12週效果較佳，發芽率最高可達95%，高溫培養條件下如30和30/20°C則種子完全無法發芽，在30/15、25/15和25°C培養溫度下發芽率僅有16%，其餘不發芽的種子在播種10週後皆已敗壞。Huang (1997) 發現陽明山地區鐘萼木豐歉年種子發芽率相差甚多 (75% vs. 11%)。在中國方面，Li et al. (1997) 表示鐘萼木種子內缺乏發芽促進物是引起種子休眠主要原因，用300 ppm 激勃酸 (GA, gibberellic acid) 浸泡24 h或低溫 (5°C) 層積60天，可解除種子休眠。Ma and Liu (2012) 亦曾分別將鐘萼木種子用100及200 mg/L IAA (indole-3-acetic acid)、GA<sub>3</sub> 浸泡6、12及24 h後，再放到發芽箱中培養，其中以GA<sub>3</sub>浸12 h發芽率最高，達80%；GA<sub>3</sub>發芽率高於IAA處理者。Qiao et al. (2009) 記錄了鐘萼木田間試驗的發芽情況，發現只有1%種子發芽。

歸納前人育苗研究，雖有Yang (1992) 及Yang (2014) 認為鐘萼木種子不具休眠現象，然而，Chen et al. (2013)、Li et al. (1997) 及Ma and Liu (2012) 卻認為鐘萼木種子具有休眠現象，同時，建議育苗時需先去除種皮再經過低溫層積或GA處理予以解除休眠並加速發芽速度，提升種子發芽率。其中，種皮是造成種子休眠常見原因之一，包括種皮太硬而無法破裂、種皮不透水性、不透氧性及含有生長抑制劑等 (Villiers 1972)。具有這種「物理休眠」的種子，通常需要透過種皮刻傷或通過動物腸道 (經消化作用) 來破壞屏障並允許發芽 (Penfield 2017)，至於是否可藉由刻傷處理來克服鐘萼木種子休眠，仍未見相關報導。

本研究首先確認鐘萼木種子是否具有休眠現象，其次，依前所述低溫層積及GA<sub>3</sub>浸泡種子以外，新增種皮去除，再透過發芽試驗，來評估鐘萼木種子休眠性質，並分析何種處理方式對克服種子休眠效果較佳。

## 材料與方法

本次試驗材料來源係於2021年8月25日，採自新北市瑞芳區低海拔闊葉林 (25°7'35.7"N, 121°48'18.4"E) 的2株鐘萼木樹上果實，此時果實飽滿呈綠褐色，均尚未開裂 (Fig. 1)，採集果實數量約800粒，裝入同一塑膠袋中，攜帶回實驗室中進行形質測量及後續處理與發芽試驗。

逢機挑選其中400粒果實，測量平均長度、直徑及重量，分別為32.0 mm、27.7 mm和11.3 g。果實靜置在室內陰乾 (60% RH, 25°C) 1週後，約有50%果實開裂，未開裂果實則以修枝剪沿果皮接縫線掀開，取出種子，每一果實內發育完整

之種子數為 $3.3 \pm 1.5$ ，具鮮紅色外種皮新鮮種子，平均長度、直徑及重量，分別為14.9 mm、11.7 mm和1.0 g (Table 1)。果實與種子之物理性狀採用Pearson相關性分析進行探討，相關係數表示為 $r$ 。果實內種子數與果實直徑及重量呈顯著高度正相關 ( $r = 0.76-0.88, p < 0.01$ )，而與果實長度呈低度正相關 ( $r = 0.36, p < 0.01$ )。果實大小與重量和所含種子大小及重量，僅呈弱相關或無相關 ( $r = 0.08-0.30, p < 0.01$  or ns) (Table 2)。種子個體間顏色及尺寸變異度大顯示種子成熟度不均 (Fig. 2)。逢機取出20粒具鮮紅色外種皮尺寸大的種子，剖開種子顯微拍照，測量其胚長，為 $1.78 \pm 0.28$  mm (最小值-最大值=1.23-2.17 mm)。

本研究採用完全因子試驗設計 (full factorial



Fig. 1. Infructescence of *Bretschneidera sinensis*.

Table 1. Morphometric characters of fruits and seeds of *Bretschneidera sinensis*.

|        | Number | Length (mm)             | Diameter (mm)           | Weight (g)             | No. of seeds per fruit |
|--------|--------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Fruits | 400    | 32.0±3.8<br>(22.4–44.0) | 27.7±3.8<br>(18.3–37.5) | 11.3±3.6<br>(3.4–25.1) | 3.3±1.5<br>(1–10)      |
| Seeds  | 400    | 14.9±1.3<br>(11.1–18.4) | 11.7±1.0<br>(6.7–13.9)  | 1.0±0.2<br>(0.2–1.7)   | --                     |

Note: Numbers in brackets are the minimum–maximum values.

design) 進行，主要探討溫度、種皮處理及GA<sub>3</sub>處理等三因子對種子發芽之主效應及各交感效應。每因子包含2個梯度，共計8組處理 (2 溫度差異 × 2 種皮差異 × 2 GA<sub>3</sub>差異)。每處理分為4重複，每重複30顆種子，詳細操作條件如下：

挑選出具鮮紅色外種皮種子960粒，均分成2群，每群480粒種子，各裝入混有碎濕水苔的封口袋中 (只裝8分滿)。其中一袋置放在4°C冰箱低溫層積，另一袋放在25°C常溫層積，經過4週後，取出種子，以自來水沖洗並用菜瓜布洗刷掉含有抑制發芽物質的外種皮 (Yang 1992)，另可降低種子在發芽階段產生發霉機會 (Chen et al. 2013)。將經低溫層積且去除外種皮之種子，均勻分成2小群，其中一小群種子 (240粒種子) 用解剖刀手術

予以完全種皮去除。每一小群 (240粒種子) 再進一步細分成2子群，各120粒種子，其中一子群種子用100 ppm GA<sub>3</sub>浸泡24 h，另一子群種子用自來水浸泡24 h。常溫層積之種子，亦依循上述方式進行分群及處理。歸納上述作業為3個變因共8種處理方式，分別為：(1) 低溫層積-有種皮-GA<sub>3</sub>浸泡 (4°C-Coat-GA<sub>3</sub>)；(2) 低溫層積-有種皮-無GA<sub>3</sub> (4°C-Coat-Water)；(3) 低溫層積-種皮去除-GA<sub>3</sub>浸泡 (4°C-Naked-GA<sub>3</sub>)；(4) 低溫層積-種皮去除-無GA<sub>3</sub> (4°C-Naked-Water)；(5) 常溫層積-有種皮-GA<sub>3</sub>浸泡 (25°C-Coat-GA<sub>3</sub>)；(6) 常溫層積-有種皮-無GA<sub>3</sub> (25°C-Coat-Water)，此設為對照組；(7) 常溫層積-種皮去除-GA<sub>3</sub>浸泡 (25°C-Naked-GA<sub>3</sub>)；(8) 常溫層積-種皮去除-無GA<sub>3</sub> (25°C-Naked-Water)。



Fig. 2. Various maturity levels of *Bretschneidera sinensis* seeds

Table 2. Pearson's correlation coefficients (r) of morphometric characters between fruits and seeds of *Bretschneidera sinensis*

| Seed                   | Fruit | Length  | Diameter | Weight             |
|------------------------|-------|---------|----------|--------------------|
| Length                 |       | 0.21**  | -0.31**  | -0.28**            |
| Diameter               |       | -0.17** | 0.30**   | 0.08 <sup>ns</sup> |
| Weigh                  |       | -0.17** | 0.13**   | 0.08 <sup>ns</sup> |
| No. of seeds per fruit |       | 0.36**  | 0.76**   | 0.88**             |

Note: \*\*  $p < 0.01$ , ns,  $p > 0.05$ .



各處理方式120種子分裝到有人工培養土(蛭石:珍珠石:泥炭土=1:1:1)的密閉培養盒中培養,每種處理各4盒,每盒(重複)各播種30粒種子,培養過程中維持介質濕潤,培養溫度設定20/10°C,LED白光光照強度92–115  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光照時數12 h/天。播種後定期每週記錄種子發芽數,直至12週後所有具活力種子均發芽為止,發芽種子係指在適合環境下,胚細胞開始分裂分化,形成胚根突出種皮之種子(Bewley 1997)。本研究採用較受廣泛認可之發芽界定標準,即胚根突出種皮2 mm時,視為種子發芽。

修改Coolbear et al. (1984) 公式,計算種子最終發芽率(G):

$$G = \left(\frac{G_g}{G_t}\right) \times 100\%$$

其中,  $G_g$  為發芽種子總數,  $G_t$  則為受測種子數量。此外,修改Ellis and Roberts (1981) 之公式,計算平均發芽時間 (MGT, mean germination time):

$$\text{MGT} = \sum(n \times d) / N$$

其中  $n$  = 每週新增發芽種子數,  $d$  = 種子培養週數,  $N$  = 在試驗結束時發芽的種子總數。

將經不同組合處理所獲得之種子最終發芽率進行統計分析,比較各數據間的差異,以探討各種處理對種子發芽率之效應。分析工具採用SPSS version 20 (IBM, Armonk, NY, USA, released 2011) 進行廣義線性模型 (generalized linear model, GZLM) 運算, GZLM採用二項式分配及logit連結函數進行最終發芽率百分比資料檢定,經概化線性後,針對層積溫度、種皮去除及 $\text{GA}_3$ 浸泡等3個變因,採用Type III之Wald卡方檢定進行變因分析並以least significant difference (LSD) test進行事後檢定 ( $\alpha = 0.05$ )。種子最終發芽率及平均發芽時間採用單因子變異數分析 (one-way analysis of variance (ANOVA)) 針對各處理平均值進行差異檢定,並採用Tukey's honest significant difference (HSD) test進行事後檢定 ( $\alpha = 0.05$ ); 二者另進行Pearson相關性分析檢定,相關係數表示為 $r$ 。

## 結果

鐘萼木種子在為期4週無光照的層積處理期間,均未發芽。種子播種培養2週後,種子陸續發芽,發芽時下胚軸不伸長,兩片子葉仍位在種皮內且留在土中,只有上胚軸和胚芽伸出土面生成幼苗,為雙子葉留土發芽型 (hypogeal germination)。

種子發芽速度及發芽率隨處理方式而異。對照組種子(常溫層積-有種皮-無 $\text{GA}_3$ ),在整個試驗過程均未發芽,最終發芽率為0%。低溫層積-有種皮- $\text{GA}_3$ 浸泡之種子,播種3週後開始發芽,6週種子發芽率達到穩定不再增加階段,最終發芽率為27.5%。低溫層積-種皮去除- $\text{GA}_3$ 浸泡之種子,播種2週後開始發芽,是所有處理組當中,最早發芽者,3週後發芽率迅速增加至51.7%,隨後呈緩速增加,至第11週種子發芽率達到穩定階段,最終發芽率為65.0%,是所有處理組當中最高者。低溫層積-種皮去除-無 $\text{GA}_3$ 處理後之種子,播種8週後開始發芽,隨後種子發芽率呈穩定,直至第12週後不再增加,未發芽者均已腐敗,最終發芽率為52.5%,是所有試驗中唯二最終發芽率超過50%處理者。常溫層積-有種皮- $\text{GA}_3$ 浸泡之種子,僅於播種4週後發現單一粒種子發芽,就未見有其他種子發芽,最終發芽率為0.8%。常溫層積-種皮去除- $\text{GA}_3$ 浸泡之種子,播種3週後開始發芽,超過八成的幼苗在此時產生,顯示種子發芽時間具有高度集中度,4週後種子發芽率達到穩定不再增加階段,最終發芽率為26.7%。常溫層積-種皮去除-無 $\text{GA}_3$ 處理後之種子,播種3週後開始發芽,8週後種子發芽率達到穩定不再增加階段,最終發芽率為18.3% (Fig. 3)。

以廣義線性模型分析各種處理對種子最終發芽率之效益,結果顯示種皮及溫度二主因子具有顯著效應,且種皮效應略大於溫度效應,去種皮處理顯著高於保留種皮者,低溫層積種子高於未低溫層積者, $\text{GA}_3$ 對種子最終發芽率則未達顯著差異 (Table 3)。除了溫度  $\times$  種皮雙因子交感作用下達顯著水準,其餘二因子交感作用 ( $\text{GA}_3 \times$  溫

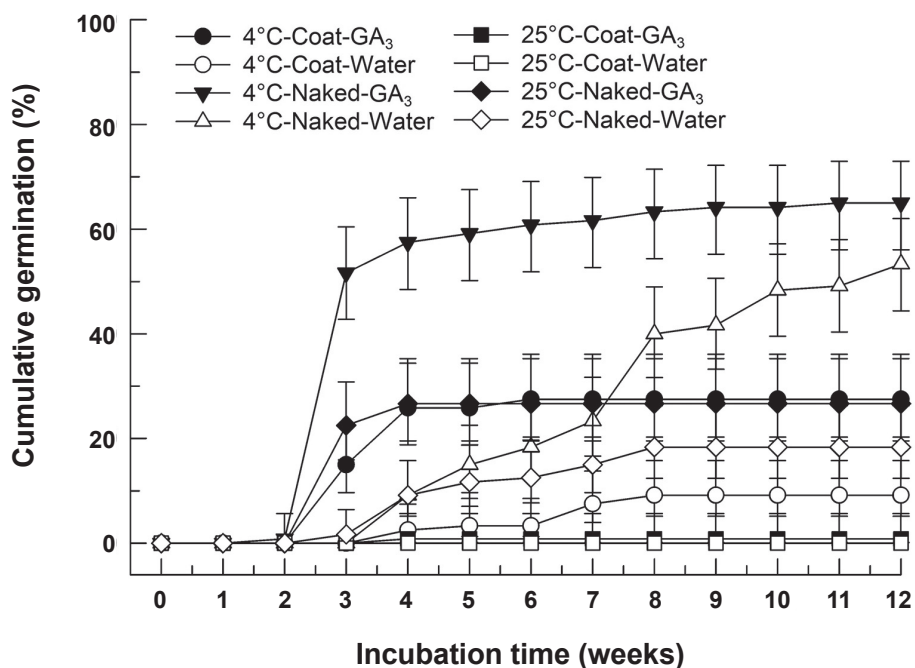


Fig. 3. Cumulative germination percentages of *Bretschneidera sinensis* seeds under different combination treatments

Table 3. Effects of different sources on final seed germination percentages of *Bretschneidera sinensis* with a generalized linear model analysis.

| Source  | Type III |                  |          |
|---|----------|------------------|----------|
|   | df       | Wald Chi-squared | <i>p</i> |
| (Intercept)                                   | 1        | 91.275           | < 0.001  |
| GA <sub>3</sub>                               | 1        | 2.257            | 0.133    |
| Temperature                                   | 1        | 39.221           | < 0.001  |
| Decortication                                 | 1        | 52.643           | < 0.001  |
| GA <sub>3</sub> × Temperature                 | 1        | 0.757            | 0.384    |
| Temperature × Decortication                   | 1        | 3.964            | 0.046    |
| GA <sub>3</sub> × Decortication               | 1        | 0.055            | 0.815    |
| GA <sub>3</sub> × Temperature × Decortication | 1        | 0.750            | 0.387    |

df, degrees of freedom; GA, gibberellic acid.

度、GA<sub>3</sub> × 種皮) 對種子最終發芽率均未達顯著差異。若就各雙因子交感作用細部解析，種皮 × 溫度交感作用下，種皮在不同溫度下的效益存在顯著差異，尤其在低溫層積下，種皮去除效益更為明顯 (Fig.4)。而GA<sub>3</sub>浸泡部分，種皮去除與否之間，效益沒有顯著差異 (Fig.4)；僅在低溫層積下，有顯著差異 (Fig. 4左)，但溫度 × GA<sub>3</sub>的未達顯著交感結果 (Table 3)，表示效應不強。綜合來看種皮去除及低溫層積是發芽率主要影響因子，GA<sub>3</sub>則是次要因子，在低溫層積下有一定效果。

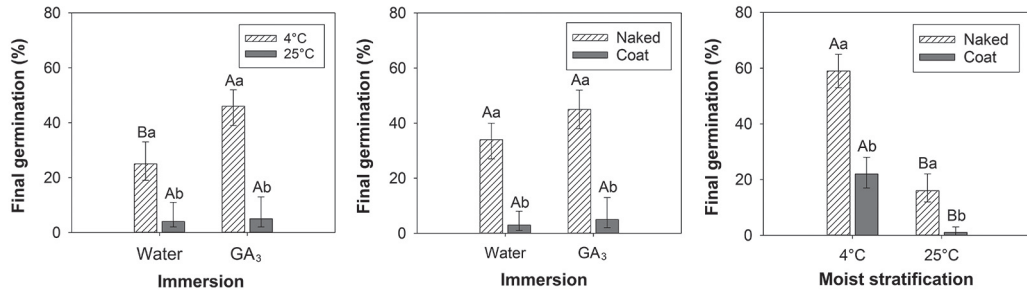
除了對照組種子未發芽無法計算種子發芽時

間，其餘7種處理之種子平均發芽時間 (MGT) 落在3.1-7.4週之間，其中4°C-Naked-Water 最高，25°C-Naked-GA<sub>3</sub>最低，而GA<sub>3</sub>浸泡處理在不同溫度及種皮處理下，皆具有縮短平均發芽時間之效果 (Table 4)。此外，MGT與最終發芽率之間無顯著相關性存在 ( $r = -0.008$  ns)。

## 討論

### 鐘萼木種子特性及生育地環境

Parolin et al. (2003) 調查亞馬遜中部洪氾區31



**Fig. 4.** Histogram of the 2-factor interaction of treatments including stratification temperature, decortication, and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) immersion. Note: Data are presented as the mode-adjusted mean and 95% Wald confidence interval; uppercase and lowercase English letters respectively indicate significant differences between and within groups (LSD test;  $\alpha = 0.05$ ).

**Table 4.** Mean germination times and final germination rates of seeds of *Bretschneidera sinensis* under various treatments

| Treatment                  | Mean germination time (wk) | Final germination rate (%) |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 4°C-Coat-GA <sub>3</sub>   | 3.6 ± 0.1 <sup>d</sup>     | 27.5 ± 3.2 <sup>b</sup>    |
| 4°C-Coat-Water             | 6.2 ± 1.0 <sup>b</sup>     | 9.2 ± 4.2 <sup>bc</sup>    |
| 4°C-Naked-GA <sub>3</sub>  | 3.6 ± 0.4 <sup>d</sup>     | 65.0 ± 16.9 <sup>a</sup>   |
| 4°C-Naked-Water            | 7.4 ± 0.3 <sup>a</sup>     | 53.3 ± 18.3 <sup>a</sup>   |
| 25°C-Coat-GA <sub>3</sub>  | 4.0 <sup>c</sup>           | 0.8 ± 1.7 <sup>bc</sup>    |
| 25°C-Coat-Water            | NA                         | 0.0 <sup>c</sup>           |
| 25°C-Naked-GA <sub>3</sub> | 3.1 ± 0.2 <sup>d</sup>     | 26.7 ± 4.7 <sup>b</sup>    |
| 25°C-Naked-Water           | 5.2 ± 0.5 <sup>c</sup>     | 18.3 ± 5.8 <sup>b</sup>    |

Note: Different superscript letters indicate that the mean difference among treatments reached a significant level (Tukey's HSD test;  $\alpha = 0.05$ ). NA, no data; GA, gibberellic acid.



種樹木種子發芽型，具留土發芽型種子樹種中，有80%樹種出現在土壤貧瘠區域，而土壤營養區域僅30%，推論留土發芽型種子可儲備較多的營養提供幼苗初期快速生長，有利於在土壤貧瘠區域建立族群。同屬留土發芽型鐘萼木種子，長約1.5 cm、鮮重約1 g，推測已具幼苗初期快速生長所需養分，支持該物種在土壤養分較為貧瘠的開墾、採礦、火災人為干擾地區，維持族群存活優勢 (Huang 1997)。不過，Parolin et al. (2003) 另外提到留土型發芽種子，具有高發芽率，則與本研究結果不符，其中可能涉及種子成熟度、儲存特性及休眠作用。

臺灣鐘萼木種子的成熟期在11月間，成熟時種子顏色轉變為紅色，蒴果開裂 (Chen et al. 2013)，本研究在8月分下旬採集尚未開裂的果實，剖開果實有許多尚未轉紅的種子。除了種子不再增加乾重以外，種子顏色的變化，或果實種子結構的其他視覺變化，也是生理成熟的優良形態指標 (Shaw and Loomis 1950, Bareke 2018)，從種子顏色及大小推斷本研究所取樣種子，可能有部分種子尚未真正達到生理成熟階段。本研究中最發芽率僅65%，相較其他前人對鐘萼木種子發芽試驗所發表數據95% 偏低 (Huang 1997, Ma and Liu 2012, Chen et al. 2013)，種子發芽率隨著種子成熟度的增加而增加 (Gurusamy and Thiagarajan 1998)，過早採收種子的胚尚未發育到足以發芽的階段，或是缺乏足夠營養來支持發芽後增長過程 (Bewley and Black 1994)。

鐘萼木種子屬溫帶異儲型 (temperate

recalcitrant)，對高溫及水分喪失敏感，一旦遇到高溫或乾燥就會快速喪失發芽能力 (Yang 2021)。在臺灣，鐘萼木族群主要分布在北部及東北部終年潮濕山谷地形環境 (Huang 1997)，可能與種子儲存特性有關，因為具對乾燥敏感種子的植物，最常出現在潮濕且無明顯乾濕季交替的棲息地 (Tweddle et al. 2003)。在本研究試驗過程中，種子洗去外種皮立刻用濕水苔包覆，維持種子高濕度保存狀態，因此，排除因乾燥導致種子喪失發芽能力因素之一。鐘萼木種子在較低溫度培養下，如20/10和15/5°C會有較高的發芽率，但在高溫培養下，如30和30/20°C則種子完全無法發芽，而在30/15、25/15和25°C溫度下培養，發芽率也僅有13–16%，其餘不發芽的種子皆已敗壞 (Chen et al. 2013)，綜合本研究種子採集的新北市瑞芳區2010–2021年氣象資料分析，顯示11月至隔年3月平均最高溫< 30°C，平均最低溫< 15°C (Table 5)，是一年當中最適合種子發芽的時段，臺灣鐘萼木種子的成熟期在10–11月間，正值搭配適合發芽月分初期。

種子休眠是植物中普遍存在的現象，植物發育處於停滯的一個階段，分散後代植株時間及空間上的分布，對物種的存續及基因交流扮演著關鍵角色 (Baskin and Baskin 1998, Fenner and Thompson 2005, de Casas et al. 2015)。根據Huang (1994) 的資料，鐘萼木果實成熟後直落樹下，其種子散佈以樹基為中心的 6 m半徑範圍內，且與樹基部的距離成對數性負相關，即愈近樹基，落種愈多，而鐘萼木種子休眠現象，延長種子自果

**Table 5. Average monthly temperature (°C) in Rueifang from 2010 to 2021 (data source: Central Weather Bureau 2022)**

| Temp.   | Month |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|         | 1     | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
| Maximum | 24.6  | 26.9 | 28.9 | 31.2 | 33.9 | 35.4 | 36.1 | 35.7 | 34.6 | 31.5 | 29.1 | 26.4 |
| Minimum | 7.8   | 8.6  | 9.2  | 11.7 | 16.8 | 21.1 | 23.3 | 23.0 | 19.8 | 16.5 | 13.2 | 8.9  |
| Mean    | 15.3  | 15.8 | 17.4 | 20.5 | 24.1 | 26.7 | 28.3 | 27.9 | 26.3 | 23.2 | 20.5 | 16.6 |

實釋出到發芽長苗時間間隔，增進長距離的散布的機會。

種子中的休眠深度不是固定的，這些差異可能在出現同一物種的不同族群之間，同一族群的個體間，同一株植物的不同花序之間，甚至在同一個花序中 (Baskin and Baskin 2004)。在所有這些層面上，種子可能在休眠程度和對破壞休眠因素的敏感性均所不同，導致不同的發芽率 (Baskin and Baskin 1998)，如擬南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 植株在生產種子期間處於低溫條件，顯著增加種子休眠深度 (Chen et al. 2014)，相反地，處在溫暖的溫度下往往減少種子休眠的深度 (Schmuths et al. 2006, Huang et al. 2014, Burghardt et al. 2016)，推測溫度調節ABA生物合成或信號傳導，間接影響種子發育過程中的休眠深度。此種子發芽率受到母株所面臨的環境條件的顯著影響 (Chahtane et al. 2017)，如同Huang (1997) 發現陽明山地區鐘萼木豐歉年種子發芽率相差甚多 (75 vs. 11%)，至於導致原因為何，仍有待未來更多研究探討。

#### 鐘萼木種子休眠主要破除因子

種子休眠意指在適宜的環境條件下，種子無法發芽 (Baskin and Baskin 2014, Chien 2018)，Baskin and Baskin (2014) 將種子休眠分為5大類，其中以生理的休眠最為普遍，特徵是胚生長潛力低或胚無法突破覆蓋結構，例如種皮、胚乳、外胚乳和/或果皮 (Nikolaeva 1977, Baskin and Baskin, 2004, 2014, Finch-Savage and Leubner-Metzger 2006)。種子生理休眠可再依其強度分為深度、中度、淺度三個層次，大多數種子具有淺度生理休眠 (Baskin and Baskin 2004, Finch-Savage and Leubner-Metzger 2006)，這種類型的休眠可以通過短時間 ( $\leq 2$ 個月) 的低溫層積、後熟 (乾燥儲存) 或激勃酸處理來打破，本研究結果支持鐘萼木種子屬於淺度的生理休眠，可經由4週4°C低溫層積、100 ppm GA<sub>3</sub>浸泡及種皮去除組合方式解除，此時種子處在有利的發芽條件時逐漸獲得發芽能力，轉換為非休眠狀態，其中，低溫層積與種皮去除是鐘萼木種子破除休眠的主要影響因子

(Table 3)。比對前人及本研究結果，發現鐘萼木種子休眠程度並非恆定不變，從無休眠性、淺度的生理休眠到中度的生理休眠均有之 (Yang 1992, Chen et al. 2013, Chien 2018)。

許多溫帶樹木的種子，如山櫻花 (*Prunus campanulata* Maxim.) 在發芽之前即需要低溫層積來打破休眠，在被打破休眠過程中種子的蛋白質具顯著變化，低溫層積過程中合成GA的酵素被誘導形成，有助於GA的新增 (Lee et al. 2006)；此現象也於桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch.) (Mathur et al. 1971)、榛實 (*Corylus avellana* L.) (Williams et al. 1974) 和蘋果 (*Malus domestica* Borb., cv. Antonówka) (Halińska and Lewak 1987) 等物種獲得證實。低溫層積對於鐘萼木種子的蛋白酵素，甚或植物生長素的組成及濃度發生何種效應，目前尚未見相關研究報告。

此外，發芽期間胚根通常會穿透種皮，然而，種皮太硬而無法破裂將造成種子休眠，一個常見原因是種皮細胞壁已被木質化，形成機械性約束、氧氣不透性、和水分吸收受阻 (Villiers 1972)。雖然本研究證實種皮去除可顯著增加種子發芽率，試驗結果並不足以證實種皮會造成鐘萼木種子發生物理休眠。根據鐘萼木種子構造解剖學資料顯示，鐘萼木與同科另一物種疊珠樹一樣具有外種皮，然而內種皮沒有像疊珠樹般具有細胞增厚現象，中種皮細胞稍厚具內部通氣組織 (inner aerenchymatous) (de Craene et al. 2002)。由種皮並無明顯木質化或角質化構造來推測，即使本研究鐘萼木種子進行去除外種皮前處理，中種皮及內種皮可能仍含有如ABA生長抑制劑，阻止種子發芽，一旦種皮去除後，除可增加水分及氧氣吸收效率外，也一併去除生長抑制劑。

#### 組合性發芽處理之效益

除了主效應外，本研究亦發現層積溫度與種皮去除與否等二因子間，存在顯著的交感作用，即去除種皮可以提升最終發芽率，然而該效應在低溫層積下更為明顯 (Fig. 4)。此現象表明去除種皮除了可增加種子的浸潤作用以提升發芽率外，也能進一步促進低溫層積過程中的生化反應，在

二者組合處理的情況下，存在更好的發芽率提升效益。此外，植物整體生長和發育受到各種激素之間複雜的相互作用調節，對不同的發育階段至關重要 (Vishal and Kumar 2018)，目前已鑑定出九大類植物激素，即生長素 (auxin)、細胞分裂素 (cytokinins (CKs))、激勃酸、離層酸 (abscisic acid (ABA))、乙烯 (ethylene (ETH))、油菜素內酯 (brassinosteroids (BRs))、水楊酸鹽 (salicylates (SAs))、茉莉酸鹽 (jasmonates (JAs)) 和獨腳金內酯 (strigolactones (SLs)) (Gomez-Roldan et al. 2008)。調節種子相關生理過程的兩種關鍵植物激素是GA和ABA (Visha and Kumar 2018)，而二者間的調控存在拮抗關係 (Kucera et al. 2005)。在低溫層積下，GA/ABA的比值提升，使休眠種子逐漸趨向萌發，而若再結合去除種皮的處理條件，使內源性的ABA含量下降，將可使GA在低溫層積下的生合成獲得上調，使種子發芽更具成效。

此外，缺乏生長促進劑如GA也會導致胚胎休眠，而種子在後熟過程對中GA 敏感性逐漸增加 (Hauvermale et al. 2015)。許多關於GA作為種子發芽促進劑的研究表明，將天然萃取出來或人工合成之GA應用於休眠種子，可以替代低溫層積打破休眠需求 (e.g., Rascio et al. 1998)。前人研究如 Li et al (1997) 及 Ma and Liu (2012) 皆證實外施GA<sub>3</sub> 可打破鐘萼木種子休眠現象，提升種子發芽率。儘管在本研究中，GA<sub>3</sub>的施用在整體試驗處理上並未於最終發芽率存在顯著主效應，同時相關之交感作用亦未達顯著水平，然而仍可發現在低溫層積條件下，GA<sub>3</sub>之處理能顯著提升最終發芽率 (Fig. 4)；同時，GA<sub>3</sub>處理也能顯著的縮短平均發芽時間，促進發芽的整齊 (Table 4)。綜上結果證實，外施GA<sub>3</sub>確實可對於鐘萼木種子發芽存在助益，同時也表明了育苗實務上，組合性的發芽處理相當重要，有助於在短時間獲取更多的發芽種子，提升後續育苗效益。

## 結論

鐘萼木是兼具保育及經濟價值的原生樹種，結合生態、植株生長發育及林木育苗多層面探

究，是未來研究一個趨勢。鐘萼木新鮮種子具有休眠現象，形成繁殖的瓶頸。本研究試驗結果顯示鐘萼木種子具有顯著的淺度生理休眠。經4週4°C低溫層積、種皮去除，再100 ppm GA<sub>3</sub>浸泡24 h組合處理之種子，可於短時間內獲最高發芽率，促進後續苗木的培育效益。

## 謝誌

本研究承蒙臺灣自然保育基金會委託之專題研究計畫「臺灣原生植物保種中心鐘萼木培育與栽植計畫」經費補助。洪士琪先生慷慨提供種原植株，陳翠霞女士在種子採集上的協助，僅此致謝。

## 引用文獻

- APG (Angiosperm Phylogeny Group). 2016.** An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc* 181:1-20.
- Bareke T. 2018.** Biology of seed development and germination physiology. *Adv Plants Agric Res* 8(4):336-46.
- Baskin CC, Baskin JM. 1998.** Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego, CA: Academic Press. 666 p.
- Baskin CC, Baskin JM. 2004.** A classification system for seed dormancy. *Seed Sci Res* 14:1-16.
- Baskin CC, Baskin JM. 2014.** Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. 2nd edition. San Diego, CA: Elsevier, Academic Press. 1586 p.
- Bewley JD. 1997.** Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055-66.
- Bewley JD, Black M. 1994.** Development regulation and maturation. In: Bewley JD,

- Black M, editors. Seeds, physiology of development and germination, 2nd edition, New York, NY: Plenum Press. p 117-45.
- Burghardt LT, Edwards BR, Donohue K. 2016.** Multiple paths to similar germination behavior in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 209:1301-12.
- Central Weather Bureau. 2022.** CWB observation data inquire system, Rueifang 2010–2021. Available at <https://e-service.cwb.gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp>. Accessed 22 March 2022.
- Chahtane H, Kim W, Lopez-Molina L. 2017.** Primary seed dormancy: a temporally multilayered riddle waiting to be unlocked. *J Exp Bot* 68(4):857-69.
- Chen M, MacGregor DR, Dave A, Florance H, Moore K, Paszkiewicz K, et al. 2014.** Maternal temperature history activates flowering locus T in fruits to control progeny dormancy according to time of year. *PNAS USA* 111:18787-92.
- Chen SY, Chien CT, Wu JC, Hung SC. 2013.** The germination and propagation of the seeds of the precious tree *Bretschneidera sinensis* Hemsl. *For Res Newsl* (4):13-5. (in Chinese).
- Chien CT. 2018.** Seed dormancy (1). *Q J Chin For* 51:369-75. (in Chinese with English abstract).
- Coolbear P, Francis A, Grierson D. 1984.** The effect of low temperature pre-sowing treatment on the germination performance and membrane integrity of artificially aged tomato seeds. *J Exp Bot* 35(11):1609-17.
- de Casas RR, Donohue K, Venable L, Cheptou PO. 2015.** Gene-flow through space and time: dispersal, dormancy and adaptation to changing environments. *Evol Ecol* 29:813-31.
- de Craene LPR, Yang TYA, Schols P, Smets EF. 2002.** Floral anatomy and systematics of *Bretschneidera* (Bretschneideraceae). *Bot J Linn Soc* 139:29-45.
- Ellis RH, Roberts EH. 1981.** The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Sci Technol* 9:373-409.
- Fenner M, Thompson K. 2005.** The ecology of seeds. New York, NY: Cambridge Univ Press. 260 p.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006.** Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* 171:501-23.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, et al. 2008.** Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455:189-94.
- Gurusamy C, Thiagarajan CP. 1998.** The pattern of seed development and maturation in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). *Phyton* (Horn, Austria) 38(2):259-68.
- Halińska A, Lewake St. 1987.** Free and conjugated gibberellins in dormancy and germination. *Physiol Plant* 69:523-30.
- Hauvermale AL, Tuttle KM, Takebayashi Y, Seo M, Steber CM. 2015.** Loss of *Arabidopsis thaliana* seed dormancy is associated with increased accumulation of the *GID1* GA hormone receptors. *Plant Cell Physiol* 56:1773-85.
- Hilhorst HWM. 1995.** A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Sci Res* 5:61-73.
- Huang S. 1994.** Genetic structure of *Bretschneidera sinensis* Hemsl. of Taiwan. *Ann Taiwan Mus* 37:49-67.
- Huang S. 1997.** Conservation and genetics of *Bretschneidera sinensis* Hemsl. of Taiwan. Project report. Taipei, Taiwan: Yangmingshan National Park Headquarters. p 20. (in Chinese with English abstract).
- Huang YM. 1995.** Vegetation analysis of *Sphaeropteris lepifera* (Hook.) Tryon plant community at Su-Ao area [Master's thesis]. Taipei, Taiwan: Forestry Department, National Taiwan Univ. p 85. (in Chinese with English abstract).
- Huang Z, Footitt S, Finch-Savage WE. 2014.** The effect of temperature on reproduc-



tion in the summer and winter annual *Arabidopsis thaliana* ecotypes Bur and Cvi. *Ann Bot* 113:921-9.

**Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner P. 2019.** Assembly of long error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol* 37:540-6.

**Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005.** Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* 15(4):281-307.

**Lee CS, Chien CT, Lin CH, Chiu YY, Yang YS. 2006.** Protein changes between dormant and dormancy-broken seeds of *Prunus campanulata* Maxim. *Proteomics* 6:4147-54.

**Li TH, Zhou YX, Duan XP. 1997.** Preliminary study on physiological dormancy characteristics of *Bretschneidera sinensis* seeds. *J Cent South For Univ* 17:41-4.

**Liu HL, Harris AJ, Wang ZF, Chen HF, Li ZA, Wei X. 2022.** The genome of the Paleogene relic tree *Bretschneidera sinensis*: insights into trade-offs in gene family evolution, demographic history, and adaptive SNPs. *DNA Res* 29(1):dsac003. doi: 10.1093/dnares/dsac003.

**Lu J, Hu YX. 1994.** Structural study of secondary xylem in *Bretschneidera sinensis* Hemsl. *Acta Bot Sin* 36:459-65.

**Lu LL, Boufford DE. 2005.** Bretschneideraceae. 8:197. In: Wu ZY, Raven PH, Hong DY, editors. *Flora of China*. Volume 8. Beijing: Science Press; St. Louis, MO: Missouri Botanical Garden Press. 506 p.

**Lu SY, Hsu KS, Fan FH. 1986.** Bretschneideraceae, a new record plant family in Taiwan. *Q J Chin Forest* 19:115-9.

**Ma DX, Liu RL. 2012.** Comparative study on germination of *Bretschneidera sinensis* seeds treated with solution extracted from forest litter and other methods. *For Res* 25:632-7. (in Chinese with English abstract).

**Mathur DD, Couvillon GA, Vines HM, Hendershott CH. 1971.** Stratification effects

on endogenous gibberellic acid (GA) in peach seeds. *HortScience* 6:538-9.

**Nikolaeva MG. 1977.** Factors controlling the seed dormancy pattern. In: Khan AA, editor. *The physiology and biochemistry of seed dormancy*. Amsterdam, Netherlands: North Holland. p 51-74.

**Parolin P, Ferreira LV, Junk WJ. 2003.** Germination characteristics and establishment of trees from central Amazonian flood plains. *Trop Ecol* 44(2):155-67.

**Penfield S. 2017.** Seed dormancy and germination. *Curr Biol* 27(17):874-8.

**Qiao Q, Chen HF, Xing FW, Liu DM, Hou XG. 2009.** Seed germination protocol for the threatened plant species *Bretschneidera sinensis* Hemsl. *Seed Sci Technol* 37:70-8.

**Rascio N, Mariani P, Vecchia FD, Rocca NL, Profumo P, Gastaldo P. 1998.** Effects of seed chilling or GA3 supply on dormancy breaking and plantlet growth in *Cercis siliquastrum* L. *Plant Growth Regulat* 25:53-61.

**Schmuths H, Bachmann K, Weber WE, Horres R, Hoffmann MH. 2006.** Effects of preconditioning and temperature during germination of 73 natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* 97:623-34.

**Shaw RH, Loomis WE. 1950.** Bases for the prediction of corn yields. *Plant Physiol* 25:225-44.

**Soltis DE, Soltis PS, Chase MW, Mort ME, Albach KC, Zanis M, et al. 2000.** Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Bot J Linn Soc* 133:381-461.

**Tang H, Li SF, Su T, Spicer RA, Zhang ST, Li SH, et al. 2020.** Early Oligocene vegetation and climate of southwestern China inferred from palynology. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 560:109988.

**Tobe H, Raven PH. 1995.** Embryology and relationships of *Akania* (Akaniaceae). *Bot J Linn Soc* 118:261-74.



- Tweddle JC, Dickie JB, Baskin CC, Baskin JM. 2003.** Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J Ecol* 91:294-304.
- Villers TA. 1972.** Seed dormancy. In: Kozłowski TT, editor. *Seed biology*. Vol 11. New York, NY: Academic Press. 540 p.
- Vishal B, Kumar PP. 2018.** Regulation of seed germination and abiotic stresses by gibberellins and abscisic acid. *Front Plant Sci* 9:838.
- Wang MN, Duan L, Qiao Q, Wang ZF, Zimmer EA, Li ZC, Chen HF. 2018.** Phylogeography and conservation genetics of the rare and relict *Bretschneidera sinensis* (Akaniaceae). *PLoS One* 13(1):e0189034. doi.org/10.1371/journal.pone.0189034.
- Williams PM, Bradbeer JW, Gaskin P, MacMillan J. 1974.** Studies in seed dormancy. VIII. The identification and determination of gibberellin A1 and A9 in seeds of *Corylus avellana* L. *Planta* 117:101-8.
- Wolfe JA. 1975.** Some aspects of plant geography in the northern hemisphere during the late Cretaceous and Tertiary. *Ann Missouri Bot Gard* 62:264-79.
- Xu GB, Liang Y, Jiang Y, Liu X, Hu S, Xiao Y, Hao B. 2013.** Genetic diversity and population structure of *Bretschneidera sinensis*, an endangered species. *Biodivers Sci* 21:723-31.
- Yang JC. 2014.** Collection and restoration of rare trees with greening potential. Project report. Taipei, Taiwan: Taiwan Forestry Research Institute. (in Chinese with English abstract).
- Yang JC. 2021.** Ecological afforestation always comes from provenance collection. *Taiwan For J* 47(1):47-56. (in Chinese).
- Yang SC. 1992.** Research on rare and special plant propagation in Yangmingshan National Park [Master's thesis]. Taipei, Taiwan: Department of Horticulture, National Taiwan Univ. p 79. (in Chinese).
- Ying SS. 2001.** *Bretschneidera sinensis*, one of rare plants in Taiwan. *Taiwan For J* 27(1):45-8. (in Chinese).
- Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E, Billups K. 2001.** Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292:686-93.
- Zhang QQ, Smith T, Yang J, Li CS. 2016.** Evidence of a cooler continental climate in East China during the warm Early Cenozoic. *PLoS One* 11:e0155507. doi.org/10.1371/journal.pone.0155507.