

國立臺灣大學生命科學院生態學與演化生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Ecology and Evolutionary Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



低溫層積與吉貝素處理對臺灣青楓種子

休眠解除之影響

The Effects of Cold Stratification and Gibberellin

Treatments on Breaking Seed Dormancy of

Acer serrulatum in Taiwan

王名偉

Ming-Wei Wang

指導教授：黃玲瓏 博士

簡慶德 博士

Advisor: Ling-Long Kuo-Huang, Ph. D.

Ching-Te Chien, Ph. D.

中華民國 105 年 12 月

December 2016

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

低溫層積與吉貝素處理對臺灣青楓種子

休眠解除之影響

The effects of cold stratification and gibberellin
treatments on breaking seed dormancy of *Acer
serrulatum* in Taiwan

本論文係 王名偉 君 (學號R02B44008) 在國立臺灣大學
生態學與演化生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國105
年7月11日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

臺灣大學農藝學系暨研究所

郭華仁 博士

郭華仁

臺灣大學植物科學研究所

林讚標 博士

林讚標

國立自然科學博物館生物學組

邱少婷 博士

邱少婷

行政院農業委員會林業試驗所育林組

簡慶德 博士

簡慶德

臺灣大學生態學與演化生物學研究所

黃玲瓏 博士

黃玲瓏

所長

王名偉

(簽名)



誌謝

轉眼間三年半過去了，在台大求學的日子即將結束。走在這條追求知識的道路上，有歡樂，有痛苦，有挫折，也有收穫，但不論路途如何高低起伏，最後仍能克服萬難，抵達終點，而這一切都要感謝一路上幫助過我的每一個人。

首先，我想要感謝我的指導教授黃玲瓏老師與簡慶德老師，兩位老師的教導讓我獲益良多，而老師們的關懷與鼓勵也讓我倍感溫暖，使我能不停往前邁進。此外，感謝黃老師總是願意耐心地和我討論並引導我思考，讓原本拙於邏輯思考的我能有所進益。感謝簡老師的包容與支持，從题目的訂定、實驗的進行到論文的撰寫，若沒有簡老師不厭其煩地大力幫助，這一切將不可能順利完成，能受到兩位老師的指導，實乃我之大幸，真的非常感謝兩位老師。另外，也要感謝陳香君老師與陳舜英老師的教導與幫助，兩位老師的教導讓我獲得了許多專業知識，而兩位老師的幫助則讓我的實驗能夠順利的進行。還要感謝郭華仁老師、林讚標老師與邱少婷老師願意在百忙中撥空擔任我的口試委員，細心地為我指出論文中的錯誤，並給予我寶貴的意見，尤其是郭老師的新書《種子學》更是我珍貴的知識來源，讓我在寫論文時受益匪淺。

其次，我要感謝植物解剖室與林試所的學長姊與同學們，感謝你們的照顧、幫助與陪伴，那是使我得以走完這條路的重要支柱。感謝麗分學姊總是在我需要幫助時拉我一把，使我不致落後，並且總是願意和我討論我的實驗，使它更加完整。感謝警竹學長的各種幫助與教導，不論是統計、影像處理還是實驗技術以及其他各種大小事，沒有學長的帶領，真不知道這一切要如何完成。感謝恬君學姊與綱祐的鼓勵與陪伴，能和你們一起奮鬥，讓我這一路走來更有動力，也讓我在實驗室的生活充滿快樂與溫暖。感謝凱淳學姊的教導，不僅讓我學到了新的技術，也讓我的實驗總是能順利進行。感謝舒瑜學姊的照顧，沒有學姊的各種提點與幫忙，我的實驗不可能如此順利進行，而若沒有學姊的幽默風趣，在林試所做實驗的日子不可能如此歡樂。感謝小咪學姊的寬容，總是默默地在許多事情上給予我協助和提醒，且包容我的健忘或粗心大意。另外，我也要感謝從大學時期就一路陪伴我的夥伴們，你們的陪伴讓我不會感到孤單，讓我在痛苦或難過時能有傾訴的對象，也讓我在台北的日子有許多美好的回憶。

最後，我要感謝在我背後默默給予支持的家人，沒有你們，這一切都將是不可能。感謝我的兄長，在最艱困的時刻裡擔下了許多責任，讓我可以毫無後顧之憂地讀研究所，也讓我可以快樂地做自己，走我想走的路。感謝我偉大的母親，你對我的包容、支持還有無比的愛不僅是我這一路走來，也是我人生中最大的支柱，不論過去、現在還是未來，我所達成的一切都要歸功於你無私的付出。

再一次感謝幫助過我的每一個人，你們的慷慨與善良，給了我繼續前行的勇氣，你們的智慧與無私，是指引我走過困境的光明。謝謝你們。



中文摘要

種子休眠在種子發芽時機的調控上扮演重要的角色，是植物適應環境的重要生理現象。槭樹屬植物是北半球重要的樹種，其種子普遍具有生理休眠的特性，因此國外學者針對多種槭樹屬植物種子休眠解除的方法，與解除過程中生理與生化變化進行詳盡的研究。然而，臺灣六種原生槭樹屬植物中，只有臺灣紅榨槭的種子休眠解除機制較有系統深入的研究。因此，本研究以廣泛分布於臺灣本島中低海拔的青楓種子為材料，探討低溫層積與外加吉貝素（GA）處理對種子休眠解除的效果，並利用化學定量分析與植物解剖技術研究休眠解除過程中種子內植物荷爾蒙與儲存物質的變化，同時也量測種子經 GA 處理發芽後在溫室內苗木的形態生長表現，以期進一步評估解除種子休眠在林產業育苗上的應用性。

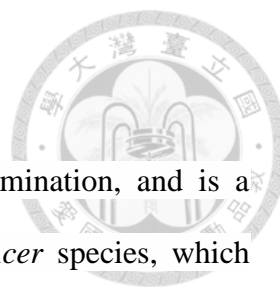
研究結果顯示，具休眠性的青楓種子胚胎發育完整，果皮與種皮不影響水分的滲透，低溫層積處理 12 週可以有效提升種子的發芽率，並使種子提早發芽，顯示其休眠種類為生理休眠。種子對於外加的 GA₄ 處理較 GA₃ 敏感，但兩者皆只稍微提升種子的發芽率，但無法使種子發芽提早。低溫層積與外加 GA 處理皆可使種子內離層酸（ABA）的含量顯著下降；但低溫層積處理後，種子內 GAs 的總含量並無顯著提升；外加 GA₃ 或 GA₄ 處理後，種子內該 GA 的含量極高，然隨著培養過程逐漸減少，但其他 GAs 的含量則沒有顯著變化。青楓新鮮種子以液胞中的蛋白質與油粒體中的脂質為其主要的儲存物質；低溫層積處理過程中與外加 GA 處理後，子葉內之蛋白質與脂質在種子發芽前皆無顯著的減少，胞器亦無明顯變化，唯 GA₄ 處理之種子其子葉內脂質開始代謝的時間稍微提早，可能與 GA₄ 促進脂質酶的活化有關。種子經低溫層積處理發芽後苗木的生長狀況與存活率皆較 GA 處理之種子佳。

總結來說，低溫層積處理在青楓種子休眠解除與苗木生長上有較好的表現，應用性較高。在種子休眠與發芽調控中，對植物荷爾蒙 ABA 與 GA 的敏感性或生

合成的能力比此兩者在種子內含量的變化來的重要。子葉內的儲存物質主要是提供發芽與其後的苗木生長所需，而在種子休眠解除過程中的變化不明顯。



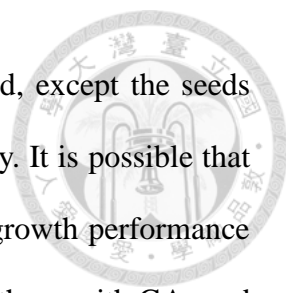
關鍵字：槭樹屬、種子休眠、低溫層積處理、吉貝素、離層酸、油粒體、蛋白質
儲存液胞、種子發芽



Abstract

Seed dormancy is important in regulating the timing of germination, and is a critical characteristic evolved for adapting to the environments. *Acer* species, which consist of important members in ecosystems of north hemisphere, commonly exhibit physiological dormancy. Therefore, the mechanism of seed dormancy of *Acer* receives considerable attention. However, among 6 native *Acer* species in Taiwan, only *Acer morrisonense* that grows at high elevation was studied systematically. *Acer serrulatum* is a famous ornamental tree distributed from low to medium elevations. This study aims to investigate the effects of cold stratification and exogenous gibberellin (GA) treatments on seed dormancy break of *A. serrulatum*. During dormancy break, biochemical analysis was applied to quantify the amounts of plant hormones in seeds, and plant anatomical techniques were used to observe the changes of storage substances. Seedling height and weight were also measured to evaluate the effects of seed pretreatments on seedling growth.

Our results showed that the seeds of *A. serrulatum* have fully developed embryos, and the pericarps and the seed coats do not block the entrance of water, showing no evidence of morphological or physical dormancy. Cold stratification for 12 weeks effectively increased seed germination percentage and reduced germination time, indicating that the seed has physiological dormancy. Both GA₃ and GA₄ treatments slightly increased seed germination percentage but not germination speed. After cold stratification or GA treatment, the content of abscisic acid (ABA) in seeds reduced significantly. However, cold stratification did not elevate the content of GAs. GA₃ or GA₄ treatments only increased the GA content of the same type and then reduced subsequently during incubation. The main storage organelles, protein storage vacuole (PSV) and lipid body (LB), in the seeds of *A. serrulatum* were found. Before seed



germination, amounts of the storage substances appeared unchanged, except the seeds treated with GA₄, whose lipid content in cotyledon decreased slightly. It is possible that GA₄ activates lipase which hydrolyzes lipid. The survival rate and growth performance of seedlings were better in seeds treated with cold stratification than those with GA₃ and GA₄.

In summary, cold stratification is the better method in breaking *A. serrulatum*'s seed dormancy and their subsequence to increase seedling growth, and is therefore a proper procedure in nursery practices. Regarding the hormone regulation during dormancy-break, the sensitivity or metabolism capability of ABA and GA to seeds is more important than their content in seeds. Moreover, while the seed reserves remained stable during dormancy break, it might play an important role in early seedling growth.

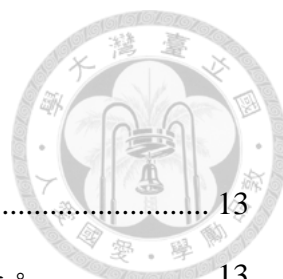
Keywords: *Acer*, seed dormancy, cold stratification, gibberellin, abscisic acid, lipid body, protein storage vacuole, germination



目錄

口試委員會審定書	I
誌謝	II
中文摘要	III
Abstract.....	V
目錄	VII
圖目錄	IX
表目錄	X
壹、前言	1
一、種子的休眠與發芽	1
(一) 種子的休眠	1
(二) 荷爾蒙的變化	3
(三) 種子儲存物質的代謝與轉移	6
二、荷爾蒙對苗木生長的影響	8
三、槭樹屬植物	9
四、研究目標	11
貳、材料與方法	12
一、材料	12
二、方法	14
(一) 低溫層積處理	14
(二) GA 處理	14
(三) 浸潤與減壓浸潤處理	14
(四) 種子發芽試驗	14
(五) 種子內荷爾蒙含量測定	15
(六) 種子初生葉長度測量與形態觀察	17
(七) 種子解剖構造觀察	18
(八) 種子苗後續生長調查	20
(九) 統計分析	21
參、結果	22
一、種子發芽試驗	22
(一) 最適發芽變溫試驗	22

(二) 低溫層積處理後之發芽試驗	22
(三) GA ₃ 、GA ₄ 處理後之發芽試驗	23
(四) 減壓浸潤處理後之發芽試驗	23
二、種子內荷爾蒙含量變化	26
(一) 低溫層積與 GA ₃ 、GA ₄ 處理後種子內 ABA 含量的變化	26
(二) 低溫層積與 GA 處理後種子內 GAs 含量的變化	28
三、種子解剖構造	31
(一) 成熟種子的形態、解剖構造與組織化學檢測	31
(二) 低溫層積與 GA 處理後種子初生葉長度的變化	35
(三) 低溫層積處理後種子內儲存物質的變化	36
(四) GA 處理後種子內儲存物質的變化	39
四、種子苗後續生長	44
肆、討論	46
一、低溫層積與 GA 處理對青楓種子休眠解除與促進發芽的效果	46
二、種皮對水分滲入種子的影響	46
三、ABA 與 GAs 在調控休眠與發芽中扮演的角色	47
(一) ABA	47
(二) GA	49
四、TEM 觀察下油粒體之電子緻密度的差異	51
五、子葉葉肉細胞內的晶簇狀結晶	51
六、休眠解除過程中儲存物質的代謝與轉移	52
七、低溫層積與 GAs 處理對溫室苗木生長的影響	54
伍、結論	57
陸、參考文獻	59



圖目錄

圖 1. 青楓照片。	13
圖 2. 南投縣仁愛鄉廬山氣象測站 2006 年至 2013 年間氣候資料。	13
圖 3. 未經處理之青楓種子在不同發芽溫度下與經不同處理後在 25/15°C 發芽溫度下的累計發芽率曲線。	24
圖 4. 低溫層積與 GA ₃ 、GA ₄ 處理後種子內部的 ABA 含量。	27
圖 5. 新鮮與 5°C 低溫層積處理後的青楓種子內部的 GAs 含量。	28
圖 6. GA 處理後的青楓種子內部 GAs 含量。	30
圖 7. 青楓種子內部構造與初生葉形態。	32
圖 8. 青楓新鮮成熟種子顯微結構觀察與組織化學染色。	33
圖 9. 青楓種子發芽後完全伸展且綠化之子葉內的結晶。	34
圖 10. 青楓新鮮種子子葉超微結構觀察。	34
圖 11. 青楓新鮮種子胚根超微結構觀察。	34
圖 12. 青楓新鮮與低溫層積處理種子子葉組織化學染色。	37
圖 13. 青楓新鮮與低溫層積處理種子之子葉與胚根的超微結構觀察。	38
圖 14. 青楓新鮮與 GA ₃ 處理種子子葉組織化學染色。	40
圖 15. 青楓新鮮與 GA ₄ 處理種子子葉組織化學染色。	41
圖 16. 青楓種子經 GA ₃ 處理後子葉與胚根之超微結構觀察。	42
圖 17. 青楓種子經 GA ₄ 處理後子葉與胚根之超微結構觀察。	43
圖 18. 青楓新鮮種子及三種不同處理後種子發芽後三個月苗木生長狀況。	45



表目錄

表 1. 未經處理之青楓新鮮種子在不同發芽溫度下或經不同處理後在 25/15°C 發芽溫度下的平均發芽率與平均發芽天數。.....	25
表 2. 低溫層積與 GA 處理後青楓種子初生葉長度。.....	35
表 3. 青楓種子經不同處理後發芽之小苗栽種 3 個月後之形質生長狀況與苗木品質指數。.....	44
表 4. 青楓種子經不同處理後結果之比較。.....	58




壹、前言

一、種子的休眠與發芽

(一) 種子的休眠

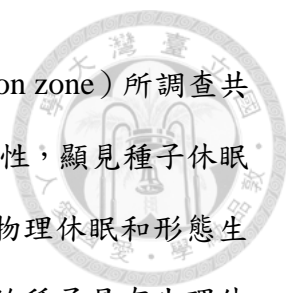
種子自古以來便是人類生活中不可或缺的一部分，從餐桌上的糧食(Ray et al., 2012)、衣料中的棉花，到工業用的油料與新興的生質能源(Pandey et al., 2012)，在可見人類對種子的利用與依賴。種子是植物行有性生殖後的構造，可藉由不同外力的協助，散播至適宜的環境，萌發生長成一個新的個體，此為植物物種存續的關鍵。但許多植物的種子具有休眠的特性，使其即使處在適宜的環境下仍無法順利發芽，對農業與林業的育苗經營上造成一定的困擾。另外，隨著人類對環境資源開發利用的與日俱增，瀕危植物保種及復育的工作格外重要，倘若不了解這些物種種子的休眠特性，也會使保育的工作受到阻礙(Jawad et al., 2000; Kaye et al., 1997)，可見種子的休眠性實為人類的一大課題。不過種子休眠的機制與成因各有不同，解除休眠的方式更是因物種不同而異，因此探討種子休眠形成與解除過程中形態、解剖構造、生理與生化機制的變化，乃至於基因層面的調控等研究確實是相當複雜的領域(Bewley, 1997)。不過，這些基礎科學研究不僅能使我們更加了解種子的休眠，並得以應用到農業、林業或保育等實務面上，因此，種子休眠的研究相當重要。

種子休眠 (seed dormancy) 簡化的定義是指「在各種適合其發芽的物理環境因子下，在一特定的期間內仍不具發芽能力者」(Baskin and Baskin, 2004)，換言之，即是指一具有活力的成熟種子在適當的條件下仍無法萌發，而須待種子的休眠解除或沒有休眠性後才會發芽。實質上，種子的休眠其實頗為複雜，可視為種子對於發芽環境需求範圍寬窄的指標，亦即可以發芽的環境範圍若越寬，休眠性越弱，



反之，則休眠性越強；而若具有活力的種子任何的環境下皆無法發芽，則其具有完全的休眠性，反之，則無休眠性。但無休眠性的種子可以發芽的環境仍有其需求範圍，超過此限度仍無法發芽（郭 2015）。從生態的角度來看，種子休眠使種子在環境因子足以使其幼苗存活生長時才發芽 (Eira and Caldas, 2000; Vleeshouwers et al., 1995)，進而能在合適的環境條件下發育成熟，因此，種子休眠在調控種子發芽的時機上扮演了重要的角色，是植物為適應環境所發展出來的一種策略 (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006)。

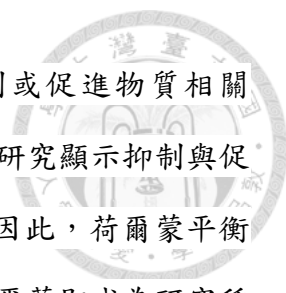
Baskin and Baskin (2004)以 Nikolaeva(1977; 1969)的分類系統為基礎，將種子的休眠按照其成因與性質整合成五大類群 (class)：(1) 生理休眠 (physiological dormancy; PD) 為胚外組織含有發芽抑制物質或胚本身具有生理抑制機制或生長潛勢過低等因素所造成；(2) 形態休眠 (morphological dormancy; MD) 為胚部尚未發育完全而導致；(3) 形態生理休眠 (morphophysiological dormancy; MPD) 為同時具有前述兩者休眠機制；(4) 物理休眠 (physical dormancy; PY) 為種皮或果皮對水分或空氣的不通透性所造成；(5) 組合休眠 (PY+PD) 為同時具有物理休眠與生理休眠。此外，依據種子解除休眠所需的條件及發芽適溫變化等資訊，將生理和形態生理休眠再分為等級 (level) 和型式 (type) 兩個層級。其中，生理休眠分為深度生理休眠 (deep PD)、中度生理休眠 (intermediate PD) 與淺度生理休眠 (non-deep PD) 三個等級，而淺度生理休眠則再細分成五個型式；形態生理休眠則分為淺度單純形態生理休眠 (non-deep simple MPD)、中度單純形態生理休眠 (intermediate simple MPD)、深度單純形態生理休眠 (deep simple MPD)、深度單純上胚軸形態生理休眠 (deep simple epicotyl MPD)、深度單純雙重形態生理休眠 (deep simple double MPD)、淺度複雜形態生理休眠 (non-deep complex MPD)、中度複雜形態生理休眠 (intermediate complex MPD) 與深度複雜形態生理休眠 (deep complex MPD) 八個等級，其下並沒有再以型式細分。



Baskin and Baskin (2014)就各文獻中各不同植被帶 (vegetation zone) 所調查共 13634 種植物中，每個植被帶皆有半數以上物種的種子具有休眠性，顯見種子休眠對於植物適應生育地的重要性，而其中以生理休眠最為普遍，物理休眠和形態生理休眠次之，形態休眠和組合休眠則較少。許多臺灣原生樹種的種子具有生理休眠，實務上多以層積處理或外加 GA 來協助種子解除休眠，例如臺灣黃蘗 (*Phellodendron amurense* var. *wilsonii*) (Chien et al., 2006)、臺灣紅豆杉 (*Taxus mairei*) (簡等 1995)、杜英 (*Elaeocarpus sylvestris*) (簡等 1998)、珊瑚樹 (*Viburnum odoratissimum*) (陳等 1999)、流蘇 (*Chionanthus retusus*) (許等 1999)、楊梅 (*Myrica rubra*) (簡等 2000)、山櫻花 (*Prunus campanulata*) (許等 2000)、布氏稠李 (*Prunus buergeriana*) (陳等 2005)、華山松 (*Pinus armandii* var. *mastersiana*) (許 2010)、霧社櫻 (*Prunus taiwaniana*) 與阿里山櫻 (*Prunus transarisanensis*) (彭 2011) 等種子可藉由低溫或暖低溫層積處理解除休眠；此外，楊梅 (簡等 2000)、山櫻花 (許等 2000)、布氏稠李 (陳等 2005)、霧社櫻和阿里山櫻 (彭 2011) 則以 GA₃ 處理後亦能使種子解除休眠，而 GA₄₊₇ 處理則可以使臺灣紅豆杉種子的休眠解除 (Chien et al., 1998)。雖然至今對於種子休眠的研究已不少，但探討的重點多半集中在尋求解除休眠的方法，對於解除休眠過程中種子內荷爾蒙與儲存物質的變化等生化與生理以及形態解剖層面的了解則較少。

(二) 荷爾蒙的變化

植物荷爾蒙是植物體內的代謝產物，對於調控植物的休眠、萌發、生長與發育等生理活動至關重要。植物荷爾蒙主要有生長素 (auxin)、吉貝素 (gibberellin; GA)、細胞分裂素 (cytokinin; CK)、離層酸 (abscisic acid; ABA) 與乙烯 (ethylene) 等，其中，GA 和 ABA 被認為在調控種子的發育、發芽與休眠上扮演了重要的角色 (Bewley and Black, 1994)。



在早期的研究中，種子休眠即被認為與種子內含的抑制或促進物質相關(Luckwill, 1952; Villiers and Wareing, 1960)，而後，越來越多的研究顯示抑制與促進發芽的物質共同調控了種子的休眠與發芽且彼此交互作用。因此，荷爾蒙平衡理論(hormone-balance theory)應運而生(Amen, 1968)，植物荷爾蒙即成為研究種子休眠機制的核心議題。Khan (1975)提出了各種植物荷爾蒙各司其職：GA 是促使種子發芽的首要物質，缺乏則種子無法發芽；ABA 具有抑制發芽的作用，可抵消 GA 的效用；CK 可消除 ABA 的抑制作用，使 GA 仍能促使種子發芽。隨著阿拉伯芥的各種突變株的篩選與研究系統逐漸成熟，Karssen 研究團隊(Hilhorst and Karssen, 1992; Karssen and Lacka, 1986; Karssen et al., 1989)對荷爾蒙調控種子休眠提出了遙控理論(remote control)，認為 ABA 與 GA 並沒有直接的交互作用，而是在種子不同的發育階段分別發揮影響：ABA 在種子發育後期形成而誘導休眠的產生，GA 則是促使種子的發芽，與其發芽能力相關，而成熟種子發芽時 GA 所需求的濃度則會受到發育後期種子內 ABA 的含量所調控。

ABA 於 1953 年被發現，當時稱其為「inhibitor β 」(Bennet-Clark and Kefford, 1953)，而後才被鑑定為 ABA(Cornforth et al., 1965; Ohkuma et al., 1963)。ABA 的生合成路徑目前已大致明瞭，其前驅物為 β -carotene，經過色素體與細胞質中一連串的生化反應而合成(Cutler and Krochko, 1999; Seo and Koshiba, 2002)。ABA 參與了植物體內許多生理機制的調控，如氣孔的開閉、逆境的耐受力與根的向地性等(Zeevaart and Creelman, 1988)。在種子方面，ABA 普遍存在於種皮、子葉或胚軸內(Karssen et al., 1983)，並參與了種子發育後期儲存性蛋白質與脂質的生合成以及誘導與維持種子的休眠與對脫水的耐受力(Finkelstein et al., 2008; Kermode, 2005; Kucera et al., 2005)。低溫可以降低樹木之休眠芽內的 ABA 含量(Powell, 1987)，而前人研究亦顯示，低溫層積處理可使種子內 ABA 的含量下降，如玫瑰(*Rosa rugosa*) (Tillberg, 1983)、桃(*Prunus persica*) (Mehanna et al., 1985)、臺灣紅豆杉(Chien et al., 1998)、阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*) (Ali-Rachedi et al., 2004)、山櫻花(Chen et al.,

2007)、楊梅(Chen et al., 2008)、臺灣黃蘗(Chen et al., 2010)、布氏稠李(陳等 2005)、華山松(許 2010)、黃蘗(*Cotinus coggygia*) (Deng et al., 2015)、四照花(*Cornus japonica* var. *chinensis*) (Fu et al., 2014)等種子在經過不同時間的低溫層積後，種子內 ABA 含量皆有不同程度的降低。

GAs 的發現最早可追溯至 1926 年 Kurosawa (1926)研究水稻徒長病時，發現其病原真菌 *Fusarium fujikuroi* 的培養液會造成水稻徒長，之後，Yabuta (1938)分離出其結晶物質，並將之正式命名為「Gibberellin」。GAs 為一群具有 19 或 20 個碳原子的 tetracyclic diterpenoid carboxylic acids 化合物，截至目前為止已辨認出 136 種不同的結構(Hedden and Thomas, 2012; Thomas et al., 2005)，並按照發現順序在末端加上數字來命名(MacMillan and Takahashi, 1968)。GAs 廣泛出現於植物界與真菌界中，其中，只有 GA₁、GA₃、GA₄、GA₇ 等為具有生物活性的種類，而又以 GA₁、GA₃、GA₄ 在高等植物中較為普遍，其餘皆為前驅物或代謝產物。GAs 在植物中主要參與調控植物的生長與發育，包括莖的延長、花部的發育、發育時期的轉化與花粉管的生長等(Metzger, 1995; Olszewski et al., 2002; Reid and Howell, 1995; Singh et al., 2002; Sun and Gubler, 2004)。種子內 GAs 的功能主要在於調控種子的發育與發芽(Brenner and Cheikh, 1995; Ritchie and Gilroy, 1998; Rock and Quatrano, 1995)，但不直接參與調控種子的休眠(Bewley, 1997; Gallardo et al., 2002; Hilhorst and Karssen, 1992)，而在種子發芽上，其主要是藉由增加胚的生長勢，並促進水解酵素的生成，進而使種子內部儲存物質運移與具機械性阻礙的胚乳或種皮弱化來調控發芽(Groot et al., 1988; Koornneef et al., 2002; Leubner-Metzger, 2003; Nonogaki, 2006)。而根據前人研究顯示，低溫層積處理可以使種子內 GAs 的含量上升，如花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)與糖松(*Pinus lambertiana*)(Taylor and Wareing, 1979)、桃(Mehanna et al., 1985)、臺灣黃蘗(Chen et al., 2010)、歐洲山毛櫸(*Fagus sylvatica*) (Fernández et al., 1997)、布氏稠李(陳等 2005)、華山松(許 2010)、四照花(Fu et

al., 2014)等種子在經過不同時間的低溫層積後，種子內 GAs 的含量皆有不同程度的上升。



(三) 種子儲存物質的代謝與轉移

廣義來說，無休眠性種子的發芽過程從其吸收水份，開始進行生化活動時展開，持續到胚根突出種皮為止(Rosental et al., 2014)。在此過程包含了許多生理機制與相關細胞結構的變化，如基因的轉錄與轉譯、細胞週期的活化、細胞損傷的修復、胞器的重組與發育及植物荷爾蒙的生合成與去活化等等(Bewley, 1997; Dure and Waters, 1965; Leymarie et al., 2012; Logan et al., 2001; Rajjou et al., 2012; Weitbrecht et al., 2011)，而這些作用所需的能量與材料皆有賴於種子內儲存物質 (seed reserve) 的新陳代謝。種子內的大分子儲存物質以澱粉、蛋白質與脂質為主，主要儲存在子葉或胚乳中，其代謝後的能量與其他產物主要用在發芽後幼苗的生長(Nonogaki, 2008)。發芽過程中種子內大分子儲存物質的代謝與轉移 (mobilization) 相當重要，且其參與了種子發芽的調控(Allen et al., 2010; Dekkers and Smeekens, 2007; Gibon et al., 2006)。

酵素等蛋白質的重新生合成對種子發芽來說是必要的，但成熟種子內儲存的胺基酸並不足以供應發芽所需，因此，勢必需要分解利用種子內的儲存性蛋白質 (Bewley et al., 2012)。種子內儲存性的蛋白質主要儲存在蛋白質儲存液胞 (protein storage vacuole) 或蛋白質體 (protein body) 中，藉由不同的蛋白質水解酵素，如內肽酶 (endopeptidase)、胺肽酶 (peptidase)、羧肽酶 (aminopeptidase) 等，分解成寡肽與胺基酸(Nonogaki, 2008)。在發芽的早期階段，儲存性蛋白質便開始水解 (Sreenivasulu et al., 2008)，其使用的酵素是在種子發育階段便已合成並儲存在蛋白質儲存液胞中(Yomo and Varner, 1973)，而分解後產生的胺基酸則多運用於所在組織的蛋白質合成(Müntz et al., 2001)。在種子發芽的晚期，接近胚根突出時，種子開始合成新的蛋白質水解酵素以供加速分解蛋白質所需(Yang et al., 2007)，而產生

的胺基酸除了供應來源組織本身的蛋白質合成外，大部分則運往胚根供應其生長所需(Joosen et al., 2013; Sheoran et al., 2005)。

種子內的脂質主要是以三酸甘油酯(triacylglycerol)的形式儲存於油粒體(lipid body)中，其代謝涉及了一連串的化學反應與許多酵素，主要在油粒體、乙醛酸體(glyoxysome)、粒線體(mitochondria)與細胞質(cytosol)中分工進行。三酸甘油酯的代謝主要可以分成三個階段：(1) 三酸甘油酯在油粒體中水解成脂肪酸(fatty acid)與甘油(glycerol)。(2) 脂肪酸在乙醛酸體中經由 β -氧化作用(β -oxidation)分解成乙醯輔酶A(acetyl CoA)，再經由乙醛酸循環(glyoxylate cycle)生成琥珀酸(succinate)。(3) 琥珀酸進入粒線體中經酵素轉化成蘋果酸(malate)與草醯乙酸(oxaloacetate)，接著進入細胞質中經由糖質新生(gluconeogenesis)的過程生成蔗糖，而三酸甘油酯分解後生成的甘油經過一連串反應後亦可進入糖質新生合成蔗糖(Bewley et al., 2012)。種子內儲存的脂質主要用作發芽後幼苗生長所需(Bewley, 1997; Eastmond and Graham, 2001)，而在許多物種中，脂質的代謝與轉移和水解酵素的活化在發芽早期即已開始，如阿拉伯芥、大麥(*Hordeum vulgare*)與稻米(*Oryza sativa*) (He et al., 2011; Sreenivasulu et al., 2008; Weitbrecht et al., 2011)，其代謝模式或與蛋白質類似，發芽早期的代謝產物主要用在原本的部位，後期的代謝產物則多運往胚根以供應其生長(Rosental et al., 2014)。

種子發芽過程中，其內儲存物質的代謝與轉移過程在多個模式物種中已有較詳細的研究(Bewley, 2001; Rosental et al., 2014)，其物種間僅有些微的差異。然而對具休眠性的林木種子在低溫層積解除休眠的過程中，其內部儲存物質代謝與轉移的研究則較少。在阿拉伯芥種子低溫層積處理的過程中，已知其呼吸速率、天門冬胺酸(Aspartic acid)與果糖-6-磷酸(fructose 6-phosphate)和葡萄糖-6-磷酸(glucose 6-phosphate)的含量增加，大部分的胺基酸含量則減少，可推論在層積過程中種子內已進行產生能量的代謝反應(Angelovici et al., 2011; Fait et al., 2006)，而脂質酶(lipase)的轉錄組(transcriptome)亦開始累積，亦即已為脂質的分解做



準備(Weitbrecht et al., 2011)。而在蘋果 (*Malus domestica*) 種子中，油粒體隨著低溫層積處理的時間逐漸減少，且在胚軸發生的時間略早於子葉，而此現象並沒有在控制組中被觀察到(Dawidowicz-Grzegorzewska, 1989)；此外，蛋白質體亦在低溫層積處理的過程中逐漸減少，且胚軸亦早於子葉(Dawidowicz-Grzegorzewska and Zarska-Maciejewska, 1979)。在歐洲榛 (*Corylus avellana*) 的種子中，胚軸與子葉內脂質代謝的相關酵素之活性皆在低溫層積處理的過程中顯著增加，且胚軸中的澱粉含量亦增加，可推論低溫層積處理過程中脂質代謝產物經糖質新生而合成次級儲存物質，而在控制組中並沒有觀察到此一現象(Li and Ross, 1990a; Li and Ross, 1990b)。但在核桃 (*Juglans regia*) 種子的研究中發現，不論在低溫層積或控制組的種子中，脂質的代謝皆會發生，顯示種子浸潤水分便足以使脂質分解；然而澱粉粒與可溶性醣類的累積卻只在低溫層積處理中發生，且過氧化氫與過氧化脂質的含量亦較控制組低(Nezamdoost et al., 2009)。

二、荷爾蒙對苗木生長的影响

植物的生長與發育過程，從胚的發育、營養或生殖生長到老化主要受到 auxin、gibberellins (GAs)、cytokinin (CK)、brassinosteroids (BRs)、strigolactones (SLs) 等荷爾蒙的調控 (Durbak et al., 2012)。植物體的發育包括細胞的增殖與緊接而來的分化與延長(Depuydt and Hardtke, 2011)，這些過程受到許多荷爾蒙調控：根尖分生組織 (root apical meristem, RAM) 主要受到 auxin 與 CK 的調控，auxin 維持分生組織的數量與活性，而 CK 則抑制 auxin 所產生的訊息傳遞路徑，使分生組織四周的細胞得以分化，另外，表皮層由 BRs 所引發的訊息傳遞路徑亦協助分生組織的維持(Durbak et al., 2012; Kepinski, 2006)；莖頂分生組織 (shoot apical meristem, SAM) 的主要調控則是 CK、GAs 與 auxin，分生組織中高濃度的 CK 和低濃度的 GAs 使其得以維持，而 auxin 則在周邊區域累積，促進了葉原 (leaf primordia) 的生成(Durbak et al., 2012; Shani et al., 2006)；細胞延長則與細胞壁的鬆弛與新物質的

合成有關，而這些過程均受到 auxin、GAs 與 BRs 的調控(Sánchez-Rodríguez et al., 2010)。

如前所述，外加 GA 對種子休眠解除與發芽促進的相關研究頗多，但種子經 GA 處理對發芽後幼苗生長之影響的研究則較少並集中在 GA₃ 處理，且結果並不一致。目前已知高粱 (*Sorghum bicolor*) 種子經 GA₃ 處理後，幼苗早期的高度較低、乾重較輕，但植株到了開花期後，株高與乾重則沒有顯著差異(Yen and Carter, 1972)；杏仁桉 (*Eucalyptus regnans*) 與疏花桉 (*Eucalyptus pauciflora*) 的種子經 GA 處理後，幼苗的高度增加，但根部的生長與整體乾重減少(Bachelard, 1968)；大豆 (*Glycine max*) 種子經 GA₃ 處理後，幼苗高度、根部生長、莖部直徑、葉片面積與整體乾重皆呈現減少的趨勢(Leite et al., 2003)；番茄 (*Solanum lycopersicum*) 種子經 GA₃ 處理後，苗高、乾重、根部長度與葉面積皆呈現較高的趨勢，但並沒有顯著差異(Balaguera-Lopez et al., 2008)；Nemaguard”與”Halford”兩種桃樹品系的種子經 GA₃ 處理後則呈現不同的結果，”Nemaguard”品系沒有顯著差異，”Halford”品系的苗高則較矮(Mehanna et al., 1985)；鳳丹牡丹 (*Paeonia ostii* “Fengdan”) 的上胚軸休眠種子在胚根萌發後經 GA₃ 處理，苗高、乾重與葉面積皆增加，葉片內可溶性蛋白與醣類的含量亦較高(Cheng and Du, 2008)。

三、槭樹屬植物

槭樹屬 (*Acer*) 在分類上原本被歸類在槭樹科 (Aceraceae)，但新的 APG 分類法依據分子證據將槭樹科併入無患子科(Sapindaceae)(APG II, 2003; Gadek et al., 1996; Harrington et al., 2005)。槭樹屬植物的分布橫跨不同的生態與氣候帶，主要分布於北半球的東亞、北美與歐洲的溫帶與亞熱帶地區，少數物種則出現在熱帶地區，是落葉闊葉林與常綠闊葉林中的主要樹種(Grimm et al., 2007)。槭樹屬內約有近 150 種物種(Zhang et al., 2010)，主要特徵為木本、葉片對生、具盤狀蜜腺與八個雄蕊和兩個心皮的花以及刀狀的翅果(Huang et al., 2002)，其中，有許多物種具




有觀賞與經濟價值，如糖楓 (*Acer saccharum*)、挪威楓 (*Acer platanoides*) 與歐亞槭 (*Acer pseudoplatanus*) 等等(Li et al., 2006)。

槭樹屬植物因其廣泛分布的特性與高經濟及觀賞價值而成為許多研究的焦點，關於其種子休眠的研究頗多，但對於解除種子休眠過程中荷爾蒙變化及儲存物質代謝與轉移的相關研究則較少。雖然槭樹屬植物分布於各不同的生態區，但大部分皆具有不同程度的種子生理休眠，而低溫層積處理是其解除休眠的主要方法(Baskin and Baskin, 2014)。在荷爾蒙變化的前人研究中已知：糖楓種子內 CK 的含量在低溫層積 20 天時開始增加，而 GA 則在 40 天時開始增加，但更長時間的層積處理則會使兩者下降，而 ABA 的含量在不論 5°C 低溫或 17°C 暖溫層積處理後皆會下降(Enu-Kwesi and Dumbroff, 1978; Van Staden et al., 1972; Webb et al., 1973)；挪威楓種子內 CK 的含量在低溫層積 17 天時短暫上升，但之後便無法觀測到，GA 的含量則在 73 天時逐漸增加，而 ABA 的含量則是在 50 天時逐漸下降(Pinfield and Davies, 1978; Pinfield et al., 1990)；歐亞槭種子則是不論在 5°C 低溫或 17°C 暖溫層積處理後，ABA 的含量皆會下降(Pinfield et al., 1987; Pinfield et al., 1990)。

在種子內儲存物質的前人研究，主要集中在休眠解除過程中蛋白質合成的變化：糖楓種子在 4°C 低溫層積處理下，胚軸與子葉內蛋白質的合成皆會逐漸增加，且胚軸內的增加一直持續到發芽時，而子葉內的則在層積 20 天後開始減少(Hance and Bevington, 1992)；挪威楓種子在 3°C 低溫層積處理下，胚軸內的蛋白質合成在前 2 週時維持不變，之後開始持續增加，而子葉則是在前 2 週時持續增加，之後便逐漸下降，另外，在低溫層積的過程中，數種蛋白質消失，作者認為是因為這些蛋白質遭到水解所導致(Malinowski and Szczotka, 2014; Pawłowski et al., 2014)。

臺灣原生的槭樹屬植物共有 6 種，包括臺灣紅榨槭 (*Acer morrisonense*)、青楓 (*Acer serrulatum*)、尖葉槭 (*Acer kawakamii*)、樟葉槭 (*Acer albopurpurascens*)、臺灣掌葉槭 (*Acer palmatum* var. *pubescens*) 與臺灣三角楓 (*Acer buergerianum* var. *formosanum*) (Li and Lo, 1993)。臺灣三角楓僅分布於臺灣本島北部的海濱地區，



臺灣掌葉槭則零星散布於中北部的中低海拔山區，其餘四種則廣泛分布於臺灣全島，其分布海拔分別為臺灣紅榨槭 1600-2400 m；青楓 300-2500 m；尖葉槭 500-2500 m；樟葉槭 500-1800 m (楊和林 1999)。研究 (楊和林 1999) 顯示，臺灣紅榨槭、青楓、尖葉槭、樟葉槭與臺灣三角楓的種子皆具生理休眠，而 4°C 低溫層積處理皆可促進此五種槭樹種子發芽，其中，樟葉槭與臺灣三角楓在層積 1 個月後開始自行發芽，臺灣紅榨槭、青楓與尖葉槭則於層積 2 個月後才開始。槭樹屬植物是北半球闊葉林的重要物種，許多種類具有經濟及觀賞價值，且種子普遍具有生理休眠，因此幾種較受重視的種類在休眠解除過程中生理與生化的變化方面已有相關研究，然而臺灣的六種槭樹屬植物中除了臺灣紅榨槭有較詳盡的研究外，其他皆付之闕如。而 Chen et al. (2015) 則對臺灣紅榨槭種子以低溫層積解除休眠過程中，荷爾蒙的變化與儲存物質的代謝與轉移有更詳細的研究，其結果顯示，臺灣紅榨槭種子在解除休眠的過程中伴隨著 ABA 含量的下降與 GA 含量的上升、油粒體與蛋白質體的大量減少以及可溶性醣類與胺基酸的增加。

四、研究目標

種子休眠是植物為適應環境而演化出來的重要生存策略，但我們對其了解仍然有限。種子的休眠從形成、維持到解除與緊接而來的種子發芽，每一個過程中皆伴隨著許多如基因調控、生理代謝、生化反應與解剖構造等不同層面的變化，而對於此種種的研究皆有助於我們更加了解種子的休眠，有利於農林業等產業的發展。

本研究以採自中海拔的青楓種子為實驗材料，首先調查低溫層積和外加 GA 兩種方法對其種子休眠解除與發芽的效果與影響，並在不同階段測量數種荷爾蒙的含量，觀察種子的形態與解剖構造，藉以了解休眠解除與發芽的過程中，青楓種子在生理與解剖構造上的變化，並進一步與其他槭樹屬植物的相關研究進行比較與討論，以期對本屬植物種子休眠解除過程能有更全面的了解。



貳、材料與方法

一、材料

青楓 (*Acer serrulatum* Hayata) (圖 1A) 的成熟果實 (圖 1B) 於 2013 與 2014 年 11 月採自南投霧社地區，該地區海拔高度約 1200 公尺，2006-2013 年均溫為 17.3 °C，最暖月均溫為 24.9°C，最冷月均溫為 8.9°C，年降雨量為 2916mm (圖 2)。種子採集後立即置於通風良好的採集袋內，且於送回實驗室後陰乾 7 日，再以肉眼粗略篩選品質不佳與過小的種子後，測量種子的基本物理特性與含水率，並置於 5 °C 冷藏室內儲存以備後續實驗進行。最適發芽變溫、低溫層積與外加 GA 處理之種子發芽試驗使用 2013 年採集的翅果；浸潤與減壓浸潤處理之種子發芽試驗使用 2014 年採集的翅果；荷爾蒙含量測定與形態、解剖構造觀察使用 2013 年採集的翅果經去果皮後之種子 (圖 1D) 進行實驗；種子苗之後續生長試驗則使用 2014 年採集的翅果。

2013 年採集的青楓果實含翅長度為 18.5 ± 1.6 mm，每升果實粒數為 7600 粒。去翅後的果實 (圖 1C) 長 5.6 ± 0.5 mm、寬 3.3 ± 0.3 mm、厚 2.9 ± 0.2 mm，每升果實粒數為 24500 粒，每升果實重量為 431.02 ± 7.35 克，含水率則為 12.2 %。2014 年採集的青楓果實長度為 22.3 ± 2.1 mm，每升果實粒數為 5050 粒。去翅後的果實長 5.1 ± 0.5 mm、寬 3.5 ± 0.3 mm、厚 3.3 ± 0.3 mm，每升果實粒數為 18150 粒，每升果實重量為 404.18 ± 10.87 克。

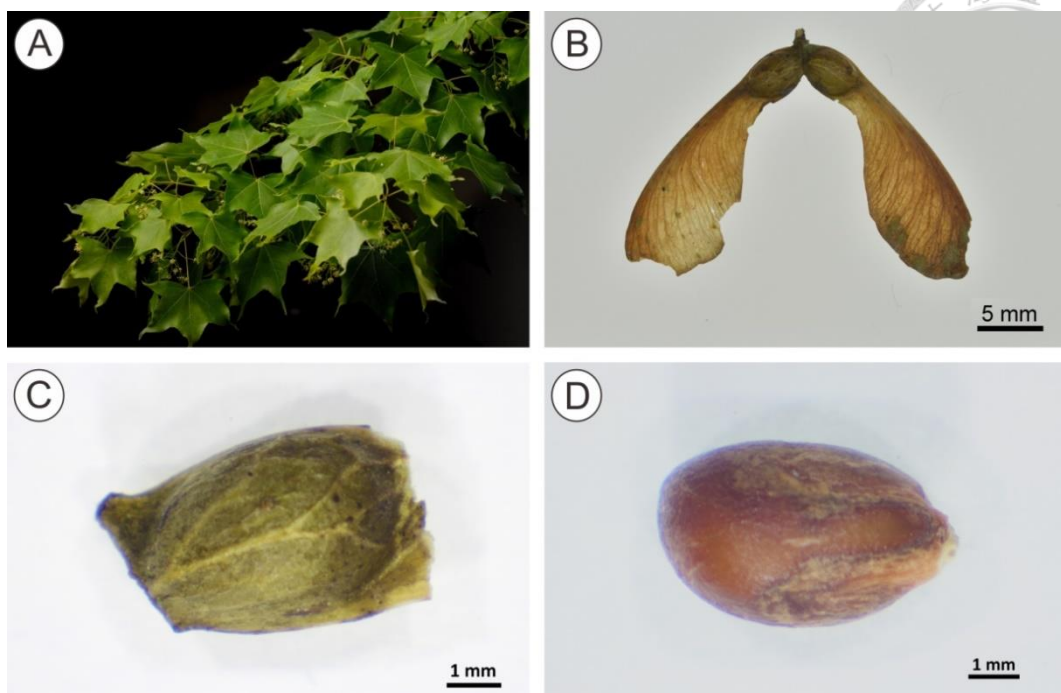


圖 1. 青楓照片。A. 枝條；B. 果實；C. 去翅果實；D. 種子。

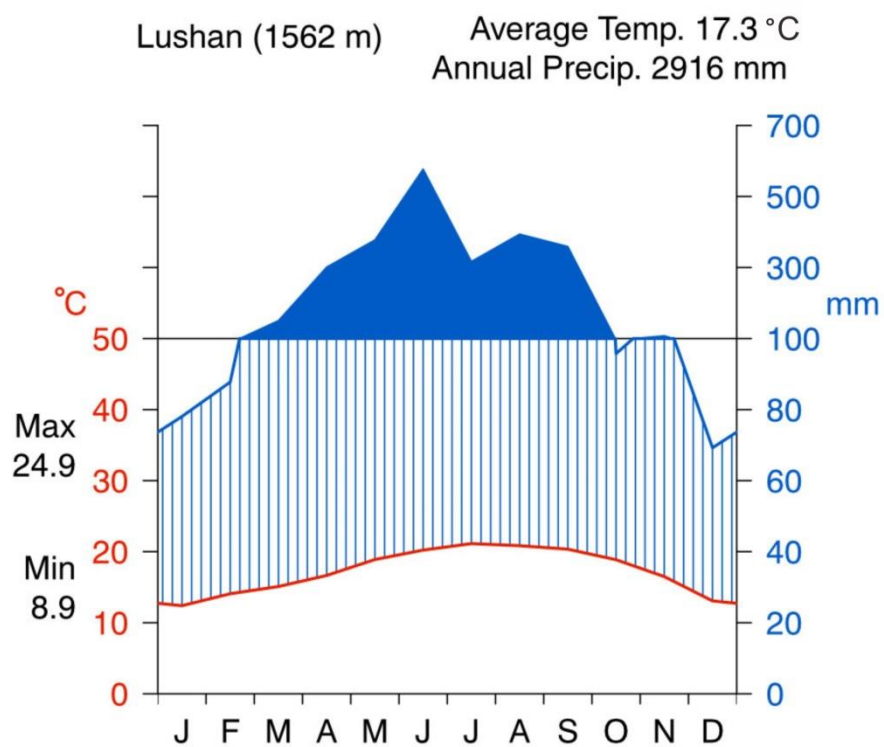


圖 2. 南投縣仁愛鄉廬山氣象測站 2006 年至 2013 年間氣候資料。



二、方法

(一) 低溫層積處理

青楓種子放入 PE 封口袋內與適量濕水苔混合，放入 5°C 冷藏室中，經 4、8、12 個星期後取出進行後續實驗。本實驗中所使用之水苔含水率約為 75-80%，並預先經過浸泡與絞碎處理，而低溫處理過程中亦會每月一次檢查水苔含水狀況，並打開封口袋翻動水苔使袋內與外界的空氣交換。

(二) GA 處理

選用 GA₃ (potassium salt, 95% purity, Sigma, USA) 與 GA₄ (90% purity, from Professor Lewis N. Mander, Australian National University) 對青楓種子進行處理，將青楓種子分別浸入濃度為 25、250、500、2500 μM 的兩種 GA 水溶液中一天，取出後將多餘水溶液拭乾並進行後續實驗。

(三) 浸潤與減壓浸潤處理

浸潤處理為將青楓種子浸入純水溶液中浸泡一天，減壓浸潤處理是將種子浸泡純水中並同時置於 30 cmHg 的壓力下一天，結束後將多餘水分拭乾並進行後續實驗。

(四) 種子發芽試驗

此試驗每袋種子 50 粒，每組溫度或處理 3 袋，即為三重複。將未經過處理的成熟青楓種子放入 PE 封口袋內與適量濕水苔混合，各別放入 30/20°C、25/15°C、20/10°C、15/5°C 四種日夜 (12/12 h) 變溫之生長箱及 30°C 與 25°C 的恆溫生長箱中。此外，低溫層積處理與 GA 處理後的青楓種子同樣放入 PE 封口袋內與適量濕水苔

混合，並放入 25/15°C 的變溫生長箱中。放入生長箱的種子每個星期檢查及記錄種子發芽數，用以計算發芽率 (germination percentage) 與平均發芽天數 (mean germination time; MGT)，並於實驗結束後將未發芽種子剖開確認其內部狀況，而發芽之判斷以胚根突出果皮 1mm 以上之種子為準。發芽率的計算是以種子發芽總數除以該處理之播種量，再乘以 100。而平均發芽天數則可評估種子的發芽速率與發芽高峰期(Naylor, 1981)，其計算公式如下：

$$MGT = \frac{\sum n_i t_i}{N}$$

n_i 表示自試驗開始後 t_i 天之種子發芽數；

N 為至試驗結束止之總發芽數。

(五) 種子內荷爾蒙含量測定

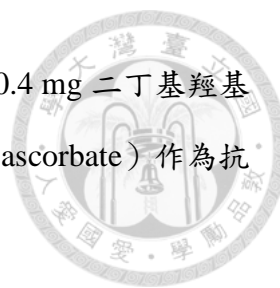
本實驗分析青楓種子內 ABA、GA₁、GA₃、GA₄、GA₇、GA₂₀ 的含量，測定的種子包括以下 12 種狀況：成熟的新鮮種子；經低溫層積處理 4 週、8 週與 12 週(已發芽)之種子；經 GA₃ 和 GA₄ 500 μ m 處理後放在 25/15°C 下培育 0 週、2 週、4 週與發芽之種子。每種處理皆有 3 重複，每重複各取 30 粒種子。分析前，先將翅與果皮剝除，分別用 -40°C 低溫冷凍乾燥機乾燥兩天後秤重並記錄乾重。分析方法及步驟如下(Chen et al., 2008; Chien et al., 2004)：

1. 萃取

將秤重後的樣品放入研鉢中並加入液態氮，待其揮發後加入適量海砂研磨。樣品磨成細碎粉末狀後，裝入離心管內，以 10mL 的 80% 甲醇 (methanol) 作為萃取溶劑，分次清洗研鉢中的殘餘粉末後倒入離心管中，放入 5°C 冷藏室中震盪 2 小時後，以高速離心機離心獲得萃取液，離心後的沉澱物則再次添加 10mL 的 80% 甲醇進行二次萃取，並將兩次萃取液混合。

2. 添加抗氧化劑及內標

混合後的萃取液加入 100 ng [²H₆] ABA 和 [17,17-²H₂]GA₇ 與 50 ng



[17,17-²H₂] GAs (GA₁, GA₃, GA₄, GA₂₀) 作為內標，並加入 0.4 mg 二丁基羥基甲苯 (butylated hydroxytoluene; BHT) 和 2 mg 抗壞血酸 (ascorbate) 作為抗氧化劑，以氮氣吹去甲醇至萃取液剩約 1 mL。

3. 酸鹼萃取

將剩餘的萃取液加入 0.05 M K-Pi 緩衝溶液，調整 pH 值至 8.5。調整完 pH 值後，將萃取液加入 15 mL 正己烷 (hexane)，快速攪拌 3 分鐘，以高速離心機離心後，將上層液抽出丟棄，共重複三次。接著，將下層的溶液以 0.5M pH 2.0 的 K-Pi 緩衝溶液將 pH 值調整至 3.0，再加入 15 mL 的乙酸乙酯 (ethyl acetate) 攪拌三分鐘，離心後收集上層液，重複三次，並將收集的上層液以真空離心乾燥機濃縮乾燥。

4. 高效液相層析儀 (HPLC) 純化

將乾燥後的樣品以純甲醇溶解後，用塑膠針筒吸取樣品並濾過 0.45 μm 之針筒過濾器 (syringe filter)，再將樣品以真空離心乾燥機濃縮乾燥。接著，將過濾後的乾燥樣品以 200 μL 0.1% 醋酸-30% 甲醇溶解，抽取打入 HPLC (column: RP-18e) 儀器中，每一分鐘分流收集一管。ABA 和 GAs 出現的時間如下：17-22 分為 GA₁ 和 GA₃；24-29 分為 ABA 和 GA₂₀；31-36 分為 GA₄ 和 GA₇。收集完成後，將樣品以真空離心乾燥機濃縮乾燥。

乾燥後的樣品分別以 200 μL 0.1% 醋酸-99.9% 甲醇溶解，再分別打入 HPLC (column: Nucleosil) 儀器中，每一分鐘分流收集一管，將待測的荷爾蒙完全分離，ABA 與 GAs 出現的時間則以其標準樣品測試後決定。

5. 甲基化、矽化

自 HPLC 分離出的溶液分別以真空離心乾燥機濃縮乾燥後，加入重氮甲烷醚 (ethereal diazomethane) 進行甲基化作用，以氮氣吹乾後，再分別加入 50 μL 吡啶 (pyridine) 和 100 μL 雙 (三甲基硅烷基) 三氟乙醯胺-三甲基氯硅烷 (BSTFA-TMCS)，放在 90°C 溫度下 30 分鐘進行矽化作用，再以真空離心乾燥



機濃縮乾燥。

6. 氣相層析質譜儀 (GC-MS) 定量

將衍生化後的樣品溶解在 10 μ L 吡啶中，再以自動樣品機抽取 1 μ L 打入 GC-MS(HP 6890 GC 與 5973 MSD)，以 GC-MS-SIM(Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Selected Ion Monitoring) 定量樣品中的 ABA 和 GAs。

(六) 種子初生葉長度測量與形態觀察

本實驗以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope; SEM) 觀察青楓成熟新鮮種子之初生葉 (first true leaf; FTL) 的形態，並測量不同處理後其長度的變化，觀測的種子包括以下 12 種：成熟的新鮮種子；經低溫層積處理 4 週、8 週與 12 週 (已發芽) 之種子；經 GA₃ 和 GA₄ 500 μ m 處理後放在 25/15 $^{\circ}$ C 下培育 0 週、2 週、4 週與發芽之種子。每種處理各觀測 5-23 粒種子。

1. 初生葉長度測量

將種子的種皮剝除後，小心切除部分子葉以便觀察胚軸頂端의 初生葉，並在 Leica S8 APO 解剖顯微鏡下以 Canon EOS 650D 數位相機拍照記錄，再將照片檔匯入 Image J 程式中測量初生葉長度。

2. SEM 材料的製備與觀察

將種子的種皮剝除後，小心切除部分子葉以便觀察初生葉，以 Karnovsky's 固定液 [0.5% 戊二醛 (glutaraldehyde) 與 1% 多聚甲醛 (paraformaldehyde) 於 0.1 M 磷酸根緩衝溶液] 固定一天，接著以 0.1M 磷酸根緩衝溶液清洗三次，每次 20 分鐘；再以 1% 四氧化鐵 (osmium tetroxide) 溶於 0.1M 磷酸根緩衝液進行後固定 4 小時後，以 0.1M 磷酸根緩衝溶液清洗三次，每次 20 分鐘；以乙醇 (ethanol) 序列 (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%) 進行脫水，每個步驟各 30 分鐘，再以純丙酮 (acetone) 置換乙醇，共兩次，每次 30 分鐘；接著以 Hitachi HCP-1 型臨界點乾燥機進行 CO₂ 臨界點乾燥，乾燥後的材料以碳

雙面膠黏貼於鋁製樣本台上，再以 IB-2 離子覆膜機將樣本鍍上金膜，最後以 FEI Inspect S 掃描式電子顯微鏡觀察與拍照。



(七) 種子解剖構造觀察

本實驗為觀察青楓成熟與不同處理後共 10 種種子胚部的儲存物質及相關胞器的變化，包括成熟的新鮮種子；經低溫層積處理 4 週、8 週與 12 週（已發芽）之種子；經 GA₃ 和 GA₄ 500 μ m 處理後放在 25/15 $^{\circ}$ C 下培育 2 週、4 週與發芽之種子，每種處理各取 6-12 粒種子。製備切片前，先將翅與果皮剝除，並在解剖顯微鏡下以 5 號鑷子將外層的咖啡色種皮剝除，以利固定液的滲透。

1. JB-4 軟膠切片製備與觀察

將剝除種皮的種子按照胚根、初生葉、子葉下半部等不同部位取樣，取樣後以 Karnovsky's 固定液固定一天，接著以 0.1M 磷酸根緩衝溶液清洗兩次，每次 30 分鐘；以乙醇序列（30%，50%，70%，80%，95%，100%）進行脫水，每個步驟各 30 分鐘；接著以 JB-4 滲透劑於室溫下做序列性置換，每次 12-24 小時，待置換完成後，再以 JB-4 包埋劑進行包埋；之後，將已置入樣本的包埋板放入抽氣櫃中並抽至 -15MPa 的壓力，靜待一天直至膠塊聚合完成，聚合完成後的膠塊則放置於濕度 40% 左右之乾燥箱保存。

將膠塊進行適當的修整後，即可以超薄切片機及製刀機製成的玻璃刀手動切成厚 5-6 μ m 的切片，將切片以蒸餾水貼於玻片上後置於 60 $^{\circ}$ C 之加熱板上展片，待切片乾燥後，即可供後續組織染色使用，或以 Toluidine blue O 染色 20 秒，於 Leica DMRB 光學顯微鏡下觀察，並以 Nikon D3 數位相機拍照記錄。

2. 塑膠切片製備與觀察

將剝除種皮的種子按照上述方法取樣後，以 Karnovsky's 固定液固定一天，接著以 0.1M 磷酸根緩衝溶液清洗三次，每次 20 分鐘；再以 1% 四氧化鐵溶於 0.1M 磷酸根緩衝液進行後固定 12 小時後，以 0.1M 磷酸根緩衝溶液清洗三次，

每次 20 分鐘；接著將樣本以丙酮序列（30%，50%，70%，80%，95%，100%）進行脫水至純丙酮，每個步驟各 30 分鐘，再以 Spurr's resin(Spurr, 1969)進行序列性置換，過程約需 2 天；置換完成的樣本以純 Spurr's resin 進行包埋，再置入 70°C 的烘箱中 16 小時以上進行聚合反應，過程中需要避免過度潮濕與水氣。

將聚合完成的 Spurr's resin 膠塊取出後，經過適當修整，即可以超薄切片機及製刀機製成的玻璃刀進行半薄與超薄切片，半薄切片的厚度設定為 950nm，超薄切片的厚度設定為 80-95nm。半薄切片以 1% STA-ON 黏貼於玻片上，並以少許氯仿（chloroform）薰蒸防止切片皺褶，再放置於 60°C 加熱板上，待切片乾燥後，即可供後續組織染色使用。超薄切片則挑選介於金黃色與銀白色之間的切片，以附有支持膜的 75 mesh 或 100 mesh 之銅網撈起並陰乾至少一天，再以醋酸鈾鹽（uranyl acetate）染色並陰乾一天，使用 Hitachi H-7650 穿透式電子顯微鏡（Transmission Electron Microscopy；TEM）觀察，並拍照紀錄（陳等 1991）。


3. 組織化學染色

使用上述未染色的軟膠與塑膠切片，以組織化學染色法檢測種子胚部不可溶性多醣類、蛋白質與脂質的分布情形。

(1) 多醣類

將軟膠切片置於 0.4% 高碘酸（periodic acid）溶液中，並放置在 56 °C 烘箱中靜置 30 分鐘後，將切片取出以蒸餾水清洗三次，再將切片置於西佛試劑（Shiff's reagent）中於室溫下靜置 15 分鐘，接著將切片放入 0.5% NaHSO₄ 溶液中兩分鐘，以蒸餾水清洗三次，待切片乾燥後於 Leica DMRB 光學顯微鏡下觀察，並以 Nikon D3 數位相機拍照記錄，呈紫紅色為正反應(Gahan, 1984)，顯示此部位含有不可溶性多醣類。

(2) 蛋白質



將軟膠切片置於 7% 醋酸 (acetic acid) 水溶液 2 分鐘，取出切片浸入考馬斯藍試劑 (0.15% Coomassie Brilliant Blue R in 10% HOAc- 50% MeOH) 中靜置 20 分鐘後，將切片浸入 10% HOAc- 20% MeOH 溶液中洗去多餘染劑，並以蒸餾水清洗三次，待切片乾燥後於 Leica DMRB 光學顯微鏡下觀察，並以 Nikon D3 數位相機拍照記錄，呈深藍色為正反應(Gahan, 1984)，顯示此部位含有蛋白質。

(3) 脂質

將塑膠切片置於 70% 乙醇溶液 2 分鐘，取出切片浸入蘇丹黑 B 試劑 (0.3% Sudan Black B in 70% EtOH) 中並放置在 56°C 烘箱中靜置 30 分鐘，再將切片取出置於 70% 乙醇溶液 5 分鐘洗去多餘染劑，並以蒸餾水清洗三次，待切片乾燥後於 Leica DMRB 光學顯微鏡下觀察，並以 Nikon D3 數位相機拍照記錄，呈黑藍色為正反應(Bronner, 1975)，顯示此部位含有脂質。

(八) 種子苗後續生長調查

本實驗為測量青楓成熟與不同處理後共 4 種種子的種子苗後續形質生長狀況，包括未經處理與經低溫層積處理 8 週和經 2500 μ m GA₃ 和 GA₄ 水溶液處理後放在 25/15°C 下培育的種子之種子苗各 60 株，共 240 株，混和種植於 9*9 穴植盤中，每盤 80 株，共三盤。穴植管內的介質皆為泥炭土、黃土、珍珠石按比例混合，並置放於定時定量灑水的溫室中，以保持土壤濕潤，且實驗過程中未提供植株任何化學肥料。

自種植後一個月起每月測量苗高 (seedling height) 一次，共三個月，並在實驗最後一次測量時加測植株地際直徑 (root collar diameter) 與存活率 (survival rate)，並在測量完成後將植株的地上部與地下部分開，以清水洗淨後置入 70°C 烘箱中 2

天，再測量各部位乾種，據以了解苗木後續的生長狀況並計算品質指數 (Dickson quality index)：



$$\text{品質指數} = \frac{\text{苗木乾重(g)}}{\frac{\text{苗高(cm)}}{\text{地際直徑(mm)}} + \frac{\text{地上部乾重(g)}}{\text{地下部乾重(g)}}}$$

(九) 統計分析

本研究之檢測結果利用 R 電腦軟體進行變異數分析 (one-way ANOVA with unequal variance)，若分析結果呈顯著者，再以 Tukey's honest significant difference 進行處理均質之差異顯著性比較，差異基準設定為 5%。



參、結果

一、種子發芽試驗

(一) 最適發芽變溫試驗

成熟的新鮮青楓種子放入 30/20°C、25/15°C、20/10°C 與 15/5°C 四種變溫及 30°C 和 25°C 兩種定溫的生長箱中發芽，得到種子的累計發芽率曲線（圖 3A）、平均最終發芽率與平均發芽天數（表 1）。如圖 3A 所示，青楓的種子在不同溫度下皆在 3 至 5 週後開始發芽，並且大部分的種子皆在 15 週以前萌發完畢。但 30/20°C、30°C 和 25°C 下的種子發芽率極低，其最終發芽率分別為 2.7 %、0.7 % 和 7.3 %，而 25/15°C、20/10°C 與 15/5°C 三種變溫下的種子，以 15/5°C 的發芽率 60.0 % 最高，但平均發芽天數為 66.6 天最長，20/10°C 和 25/15°C 的發芽率則為 45.3 % 和 30.7 %，平均發芽天數則分別為 53.8 和 52 天。剩餘未發芽之種子在實驗結束後經剖開確認內部皆已腐敗。

(二) 低溫層積處理後之發芽試驗

成熟的新鮮青楓種子先放入 5°C 低溫冷藏室中低溫層積處理 4 週、8 週和 12 週，再放入 25/15°C 變溫的生長箱中發芽，得到種子的累計發芽率曲線（圖 3B）、平均最終發芽率與平均發芽天數（表 1）。未經任何處理的新鮮種子在 25/15°C 下的發芽率為 30.7 %，平均發芽天數則為 52 天。而經過 5°C 低溫層積處理 4 週和 8 週後的種子放入 25/15°C 下發芽，發芽率雖有些為提升，分別為 33.3 % 和 31.3 %，但統計分析後發現並沒有顯著差異，平均發芽天數則明顯降低為 30.9 和 10.7 天。而 5°C 低溫層積處理 12 週的種子在處理的過程中大部分皆已發芽，其最終發芽率為 58.7 %。剩餘未發芽之種子在實驗結束後經剖開確認內部皆已腐敗。



(三) GA₃、GA₄處理後之發芽試驗

成熟的新鮮青楓種子分別浸泡入 25、250、2500 μM 三種濃度的 GA₃ 和 GA₄ 水溶液一天後，再放入 25/15 $^{\circ}\text{C}$ 變溫的生長箱中發芽，得到種子的累計發芽率曲線 (圖 3C、D)、平均最終發芽率與平均發芽天數 (表 1)。以 25 μM GA₃ 處理的青楓種子發芽率為 32.0 %，與未經任何處理的種子發芽率差異不大，經 250 和 2500 μM GA₃ 處理的青楓種子發芽率則提高為 42.0 % 和 40.0 %，但統計分析結果顯示三種濃度處理後種子的發芽率與未經處理的種子發芽率皆沒有顯著差異。而三種濃度處理後種子的平均發芽天數則分別減少為 46.5、49.3 和 40.7 天。

以 25、250 和 2500 μM 三種濃度的 GA₄ 處理的種子發芽率分別提高為 48.0 %、42.0 % 和 46.7 %，但統計分析的結果顯示三種濃度處理後種子的發芽率與未經處理的種子發芽率亦沒有顯著差異。而三種濃度處理後種子的平均發芽天數則分別減少為 45.2、43.0、43.2 天。

(四) 減壓浸潤處理後之發芽試驗

成熟的新鮮青楓種子以純水浸泡並置於一大氣壓力 (76 cm Hg) 或 30 cm Hg 的減壓下一天，再與未經處理之種子放入 25/15 $^{\circ}\text{C}$ 變溫的生長箱中發芽，得到種子的累計發芽率曲線 (圖 3E)、平均最終發芽率與平均發芽天數 (表 1)。未經處理之種子於 25/15 $^{\circ}\text{C}$ 發芽溫度下的平均發芽率為 14.7 %，平均發芽天數則為 71.6 天。經過浸潤以及減壓浸潤處理之種子的平均發芽率分別提升至 26.7 % 與 23.3 %，平均發芽天數則減少為 67.9 與 67.4 天。

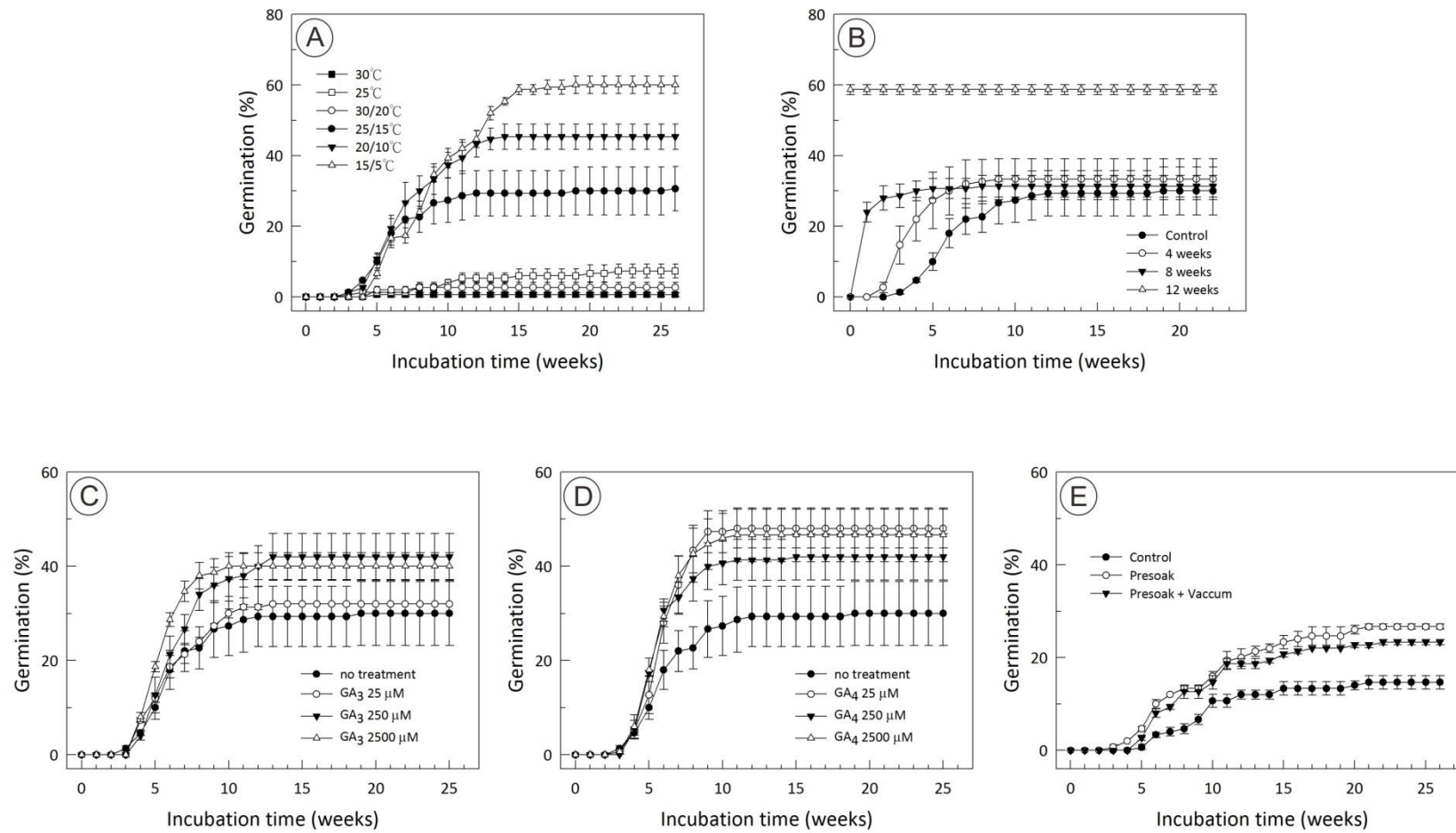


圖 3. 未經處理之青楓種子在不同發芽溫度下與經不同處理後在 25/15°C 發芽溫度下的累計發芽率曲線。A. 不同發芽溫度；B. 5°C 低溫層積處理；C. GA₃ 處理；D. GA₄ 處理；E. 減壓浸潤處理。

表 1. 未經處理之青楓新鮮種子在不同發芽溫度下或經不同處理後在 25/15°C 發芽溫度下的平均發芽率 (mean ± SD; n=3) 與平均發芽天數。

Treatments	Germination (%)	MGT (days)	
Incubation temperature	30°C	0.7 ^a ± 0.9	35.0
	25°C	7.3 ^a ± 3.4	81.3
	30/20°C	2.7 ^a ± 2.5	38.5
	25/15°C	30.7 ^b ± 10.9	52.0
	20/10°C	45.3 ^{bc} ± 6.2	53.8
	15/5°C	60.0 ^c ± 4.3	66.6
Cold stratification (incubated at 25/15°C)	0 week	30.7 ^a ± 10.9	52.0
	4 week	33.3 ^a ± 10.0	30.9
	8 week	31.3 ^a ± 5.2	10.7
	12 week	58.7 ^b ± 2.5	7.0
GA ₃ treatment (incubated at 25/15°C)	0 μM	30.7 ^a ± 10.9	52.0
	25 μM	32.0 ^a ± 0.0	46.5
	250 μM	42.0 ^a ± 8.6	49.3
	2500 μM	40.0 ^a ± 4.9	40.7
GA ₄ treatment (incubated at 25/15°C)	0 μM	30.7 ^a ± 10.9	52.0
	25 μM	48.0 ^a ± 7.1	45.2
	250 μM	42.0 ^a ± 8.5	43.0
	2500 μM	46.7 ^a ± 9.8	43.2
Vacuum infiltration (incubated at 25/15°C)	control	14.7 ^a ± 2.5	71.6
	only presoak	26.7 ^b ± 0.9	67.9
	presoak & vacuum	23.3 ^b ± 0.9	67.4

¹ Pairwise comparison using Tukey HSD was denoted by alphabetical letters.



二、種子內荷爾蒙含量變化

(一) 低溫層積與 GA_3 、 GA_4 處理後種子內 ABA 含量的變化

由圖 4 可知，每 1 g 的成熟青楓種子乾重內 ABA 的含量是 1049 ng。而經過低溫層積處理後青楓種子內的 ABA 含量顯著下降：經 4 週的低溫層積處理後，每 1 g 乾重中 ABA 的含量降為 161 ng；經 8 週低溫層積處理的種子，每 1 g 乾重中 ABA 的含量則降至 87 ng；經層積而發芽的種子每 1 g 乾重中含有 39 ng 的 ABA(圖 4A)。而青楓種子在 GA_3 水溶液中浸泡一天後，種子內 ABA 的含量大幅下降至每克乾種 138 ng，在放入 25/15°C 變溫生長箱中培養的過程中 ABA 的含量也持續降低：2 週時降為 74 ng，4 週時降至 33 ng，但在發芽後測得的 ABA 含量則微幅提升至 90 ng (圖 4B)。經過 GA_4 水溶液浸泡一天的青楓種子情況亦然，浸泡後 ABA 含量大幅下降至每克乾種 93 ng，放入 25/15°C 變溫生長箱中培養 2 週後降為 70 ng，4 週後降至 32 ng，而發芽後測得的 ABA 含量亦微幅提升至 89 ng (圖 4C)。

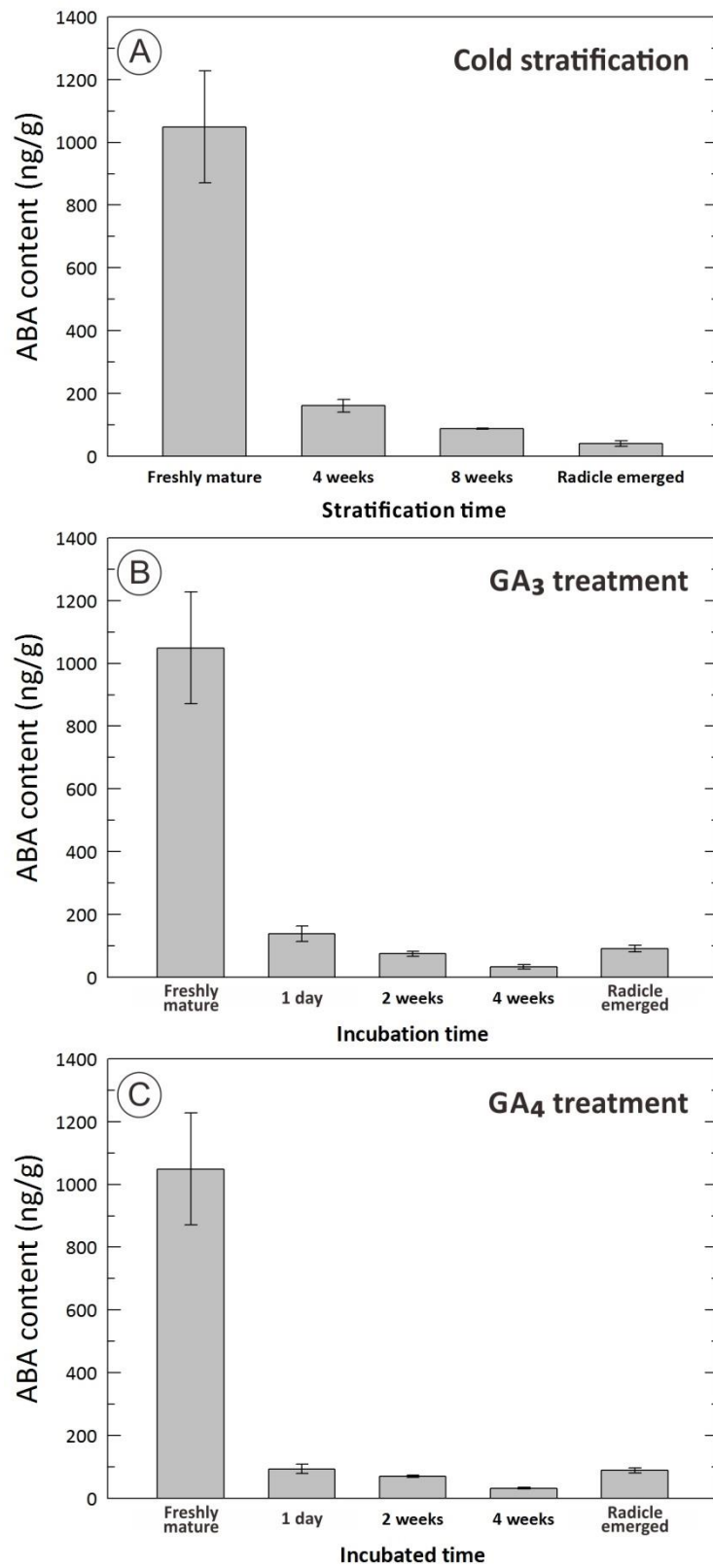
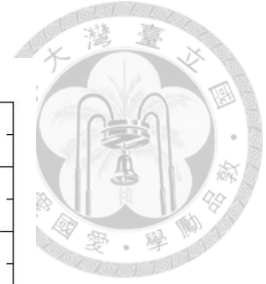


圖 4. 低溫層積與 GA₃、GA₄ 處理後種子內部的 ABA 含量。A. 低溫層積處理；
B. GA₃ 處理；C. GA₄ 處理。



(二) 低溫層積與 GA 處理後種子內 GAs 含量的變化

如圖 5 所示，在測量的五種 GA 中，新鮮成熟的青楓種子內可以測量得到 GA₃、GA₄、GA₇ 和 GA₂₀，其中以 GA₄ 的含量最高 (11.9 ng/g)，GA₇ 次之 (2.8 ng/g)，GA₃ 與 GA₂₀ 則每 1 g 乾種中不足 1 ng，但新鮮種子內並沒有 GA₁，且在低溫層積處理過程中至發芽後皆未測到 GA₁。而比較低溫層積處理的過程中，每處理階段之 GA₃、GA₄ 和 GA₂₀ 的變化量不大，且種子發芽後此 3 種 GA 亦存在種子內，以 GA₄ 含量較高，唯層積處理 8 周後和種子發芽時並無測得 GA₇ (圖 5)。

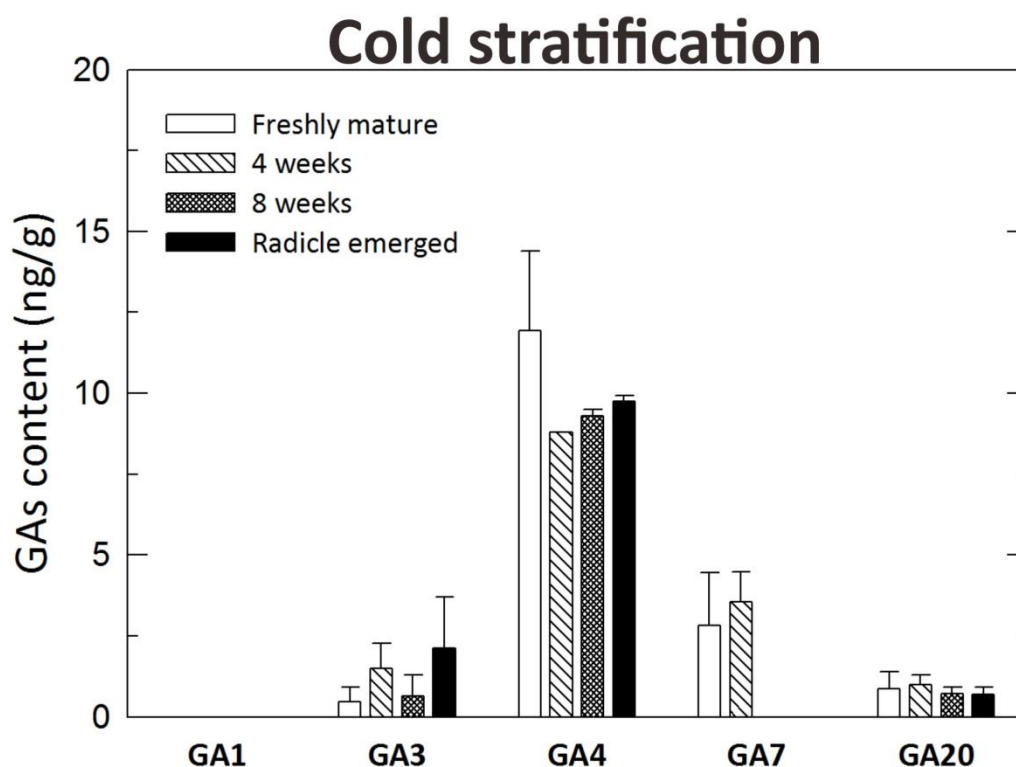
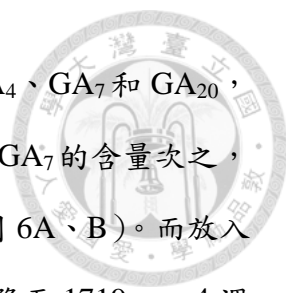


圖 5. 新鮮與 5°C 低溫層積處理後的青楓種子內部的 GAs 含量。



浸泡過 500 μ m GA₃ 水溶液的青楓種子內可以測得 GA₃、GA₄、GA₇ 和 GA₂₀，其中以 GA₃ 的含量最高，每克乾重中的含量高達 3018 ng，GA₄ 和 GA₇ 的含量次之，分別為 17.7 ng 和 12.2 ng，GA₂₀ 的含量最少，只有大約 1 ng (圖 6A、B)。而放入 25/15 $^{\circ}$ C 變溫生長箱中培養後，種子內 GA₃ 的含量在 2 週時大幅降至 1719 ng，4 週時降為 665 ng，發芽後則降為 104 ng (圖 6A)，而在培養到發芽的過程中種子內 GA₄、GA₇、GA₂₀ 的含量雖有起伏卻變化不大。但浸泡過 GA₃ 水溶液的種子雖沒有立即測得 GA₁ 的存在，但是在放入 25/15 $^{\circ}$ C 變溫生長箱中培養 2 週後卻測得每克乾重中有 1.3 ng 的 GA₁，不過培養 4 週後與發芽時卻沒有再測得 (圖 6B)。

浸泡過 500 μ m GA₄ 水溶液的青楓種子內同樣可以測得 GA₃、GA₄、GA₇ 和 GA₂₀，其中以 GA₄ 的含量最高，每克乾重中的含量高達 6906 ng，GA₇ 的含量為 14.6 ng 次之，GA₃ 和 GA₂₀ 的含量最少，只有大約 1 ng (圖 6C、D)。而放入 25/15 $^{\circ}$ C 變溫生長箱中培養後，種子內 GA₄ 的含量在 2 週時並未減少，甚至些微提升至 7292 ng，4 週時卻降為 5186 ng，發芽後則大幅降至 1294 ng (圖 6C)，而在培養到發芽的過程中種子內 GA₃、GA₇、GA₂₀ 的含量同樣有起伏卻變化不大。而浸泡過 GA₄ 水溶液的種子並沒有測得 GA₁，且在培養中與發芽後都沒有測得 (圖 6D)。

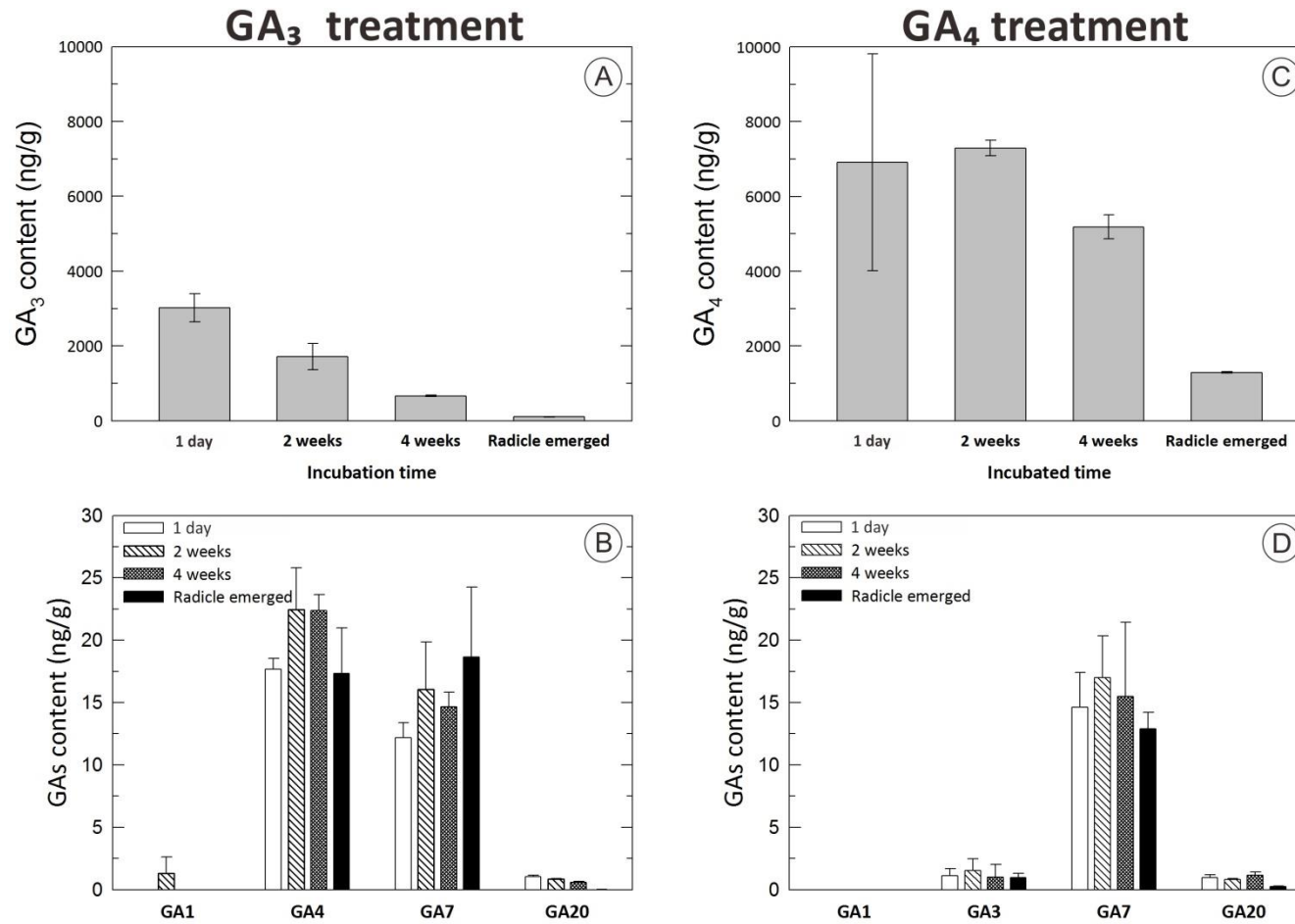


圖 6. GA 處理後的青楓種子內部 GAs 含量。A. GA₃ 處理後種子內 GA₃ 含量；B. GA₃ 處理後種子內 GAs 含量；C. GA₄ 處理後種子內 GA₄ 含量；D. GA₄ 處理後種子內 GAs 含量。



三、種子解剖構造

(一) 成熟種子的形態、解剖構造與組織化學檢測

一粒青楓果實內含有單粒種子，果皮與種子間有空隙。種子外層為一層褐色的種皮，種子內有發育完好的胚，未見明顯胚乳，兩片子葉捲曲且末端摺疊（圖 7A）。兩片子葉間具有兩枚初生葉，初生葉平均長度為 $127.3 \pm 23.2 \mu\text{m}$ ，兩枚初生葉間則有些微隆起的頂端分生組織（圖 7B）。

青楓的子葉具有一層表皮細胞，葉肉組織未分化成柵狀與海綿組織，最外側一至兩層葉肉細胞內的液胞染色顏色較淺，且液胞內含有囊泡但不具結晶；內層的葉肉細胞內液胞則染色顏色較深，且具有結晶但不具囊泡（圖 8A），而液胞內的結晶在種子發芽的過程中並不會消失，發芽後自捲曲狀態完全伸展且綠化的子葉內仍可觀察到（圖 9）。根據組織化學染色的結果來看，青楓的子葉內並沒有觀察到澱粉粒，而內層葉肉細胞的液胞內則含有多醣類物質，另外，因細胞壁亦是由多醣類組成，因此皆有染上紫紅色（圖 8B）；表皮與外、內層葉肉細胞內的液胞皆具有蛋白質（圖 8C），而脂質則分布在細胞質中（圖 8D）。從 TEM 的觀察結果中可以看出，脂質是以油粒體的形式分布在細胞質中，顏色較淺，電子緻密度較低，而葉肉細胞的油粒體數量多，密布整個細胞質；內層葉肉細胞的液胞顏色較深，顯示內含電子緻密度較高的物質，而外層葉肉細胞的液胞內囊泡的顏色較淺，與液胞和囊泡間物質的電子緻密度不同（圖 10A、B）。

青楓的胚根頂端具有根端分生組織；外側為數層細胞所構成的根冠，根冠細胞內可觀察到明顯的細胞核與密布許多小液胞；內側則為原始表皮、基本分生組織與原形成層，細胞內亦可觀察到明顯的細胞核與密布許多小液胞（圖 8E）。根據組織化學染色的結果來看，胚根內並沒有觀察到澱粉粒的存在，液胞內亦不含多醣類的物質（圖 8F）；根冠、原始表皮、基本分生組織與原形成層的液胞內則儲存

有蛋白質，脂質則儲存在細胞質中（圖 8G、H）。而根端分生組織的靜止區中並不具有儲存蛋白質的液胞，細胞質中亦沒有脂質分布。根據 TEM 的觀察結果來看，胚根的脂質同樣是以油粒體為其儲存的胞器，但胚根的油粒體在 TEM 觀察下顏色較深，顯示其內含物質的電子緻密度較高；胚根的根端分生組織細胞較小且細胞核明顯，因此細胞核佔細胞面積較大的比例，而油粒體與蛋白質儲存液胞的密度較低，並沒有將細胞完全佔滿，此外，細胞中亦可觀察到許多膜系構造（圖 11A）；基本分生組織的細胞內密布蛋白質儲存液胞與油粒體，而蛋白質儲存液胞內具有囊泡但不具結晶，且大部分的顏色較深，但少部分的顏色較淺且內部呈現顆粒狀（圖 11B）；原形成層的細胞外觀呈長條狀，內部可觀察到明顯的細胞核，細胞內亦具有蛋白質儲存液胞與油粒體，但並沒有將細胞完全佔滿（圖 11C）。

青楓的初生葉外層為原始表皮，內層的細胞則尚未分化，而兩枚初生葉間則有莖頂分生組織，初生葉與莖頂分生組織的細胞內皆可觀察到明顯的細胞核與許多小液胞（圖 8I）。根據組織化學染色的結果來看，初生葉與莖頂分生組織的細胞內並沒有觀察到澱粉粒的存在，液胞內亦不含多醣類的物質（圖 8J）；初生葉與莖頂分生組織的細胞內亦有蛋白質儲存液胞，但數量較少，脂質則儲存在細胞質中（圖 8K、L）。

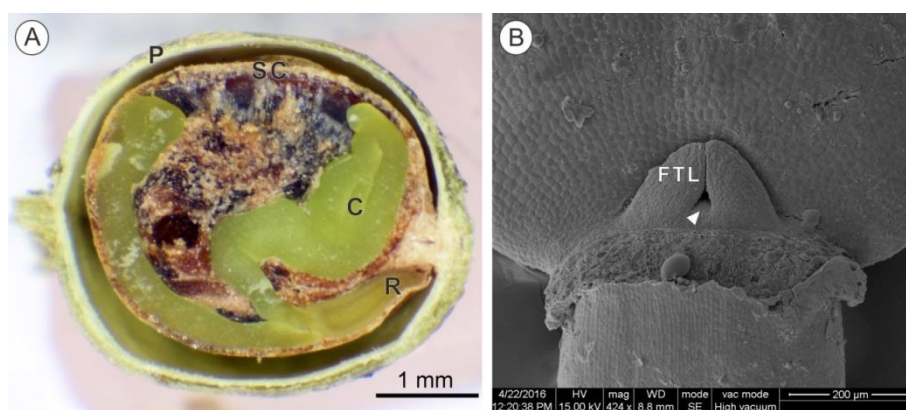


圖 7. 青楓種子內部構造與初生葉形態。A. 青楓種子縱剖面；B. 初生葉的 SEM 觀察。C= cotyledon, FTL= first true leaf, P= pericarp, R= radicle, SC= seed coat, arrowhead= shoot apical meristem。

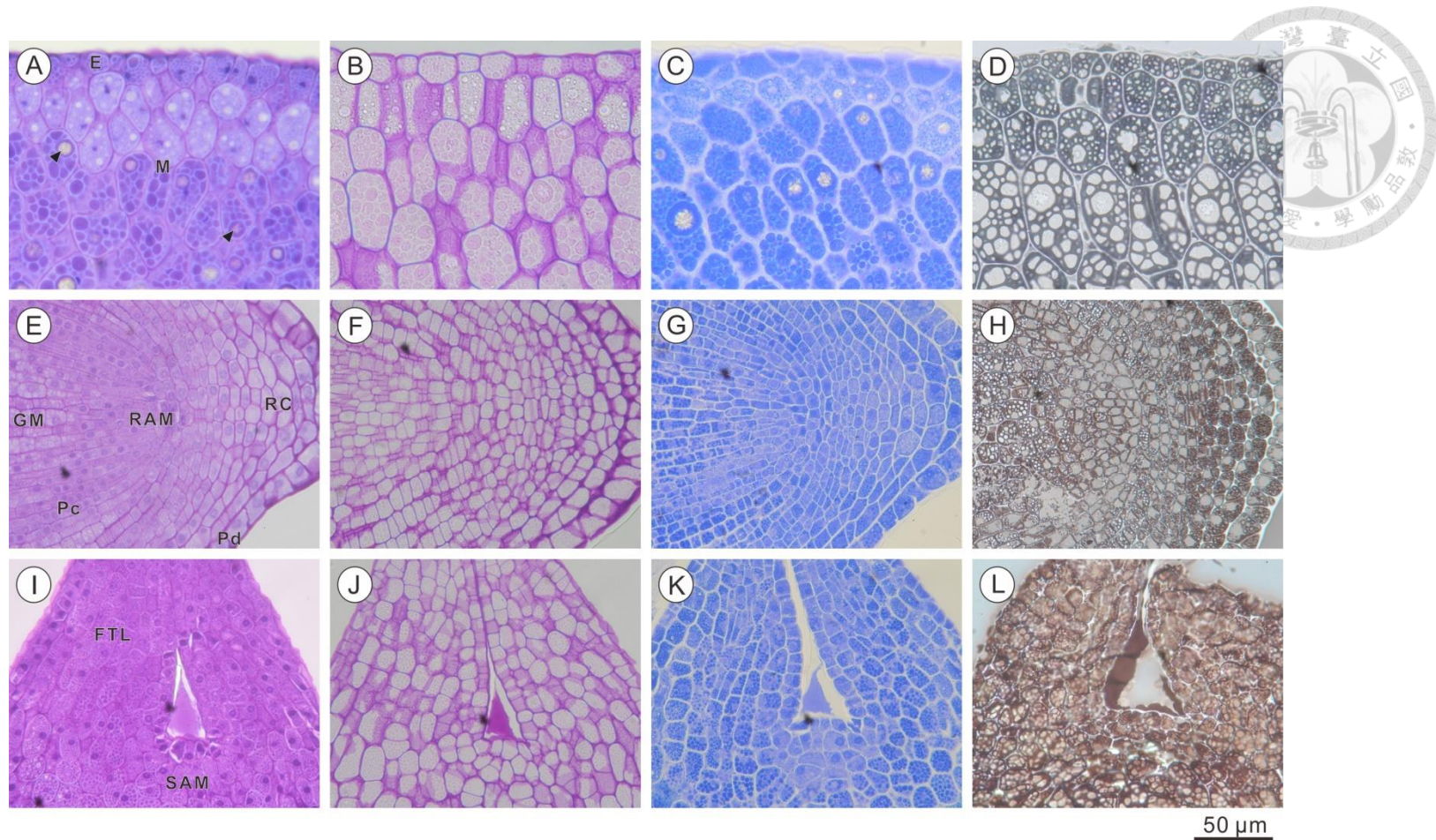


圖 8. 青楓新鮮成熟種子顯微結構觀察與組織化學染色。A-D. 子葉；E-H. 胚根；I-L. 初生葉；A、E、I. TBO 染色；B、F、J. PAS 染色；C、G、K. CBBR 染色；D、H、L. Sudan black 染色。E= epidermis，FTL= first true leaf，GM= ground meristem，M= mesophyll，Pc= procambium，Pd= protoderm，RAM= root apical meristem，RC= root cap，SAM= shoot apical meristem，arrowhead= druse。

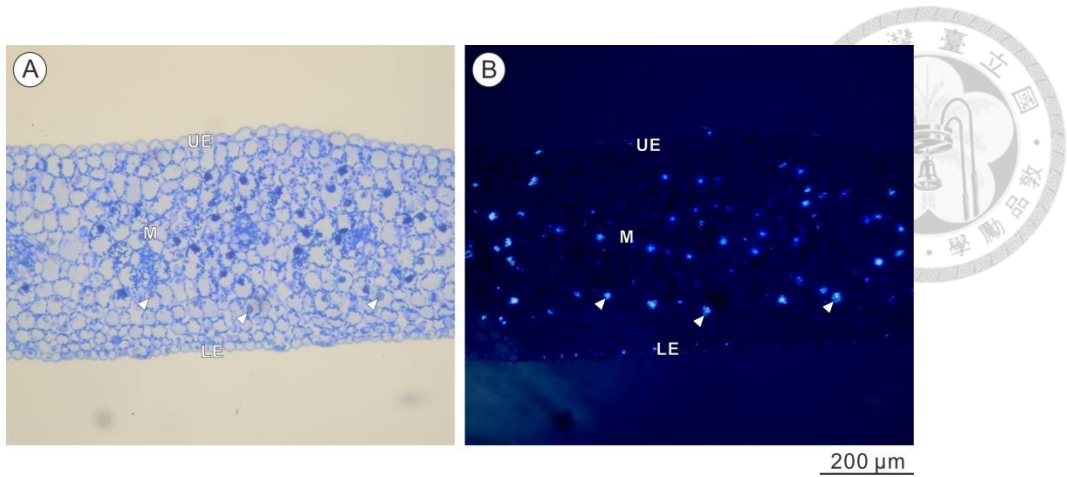


圖 9. 青楓種子發芽後完全伸展且綠化之子葉內的結晶。A. 亮視野；B. 偏光。
LE=lower epidermis，M= mesophyll，UE=upper epidermis，arrowhead= druse。

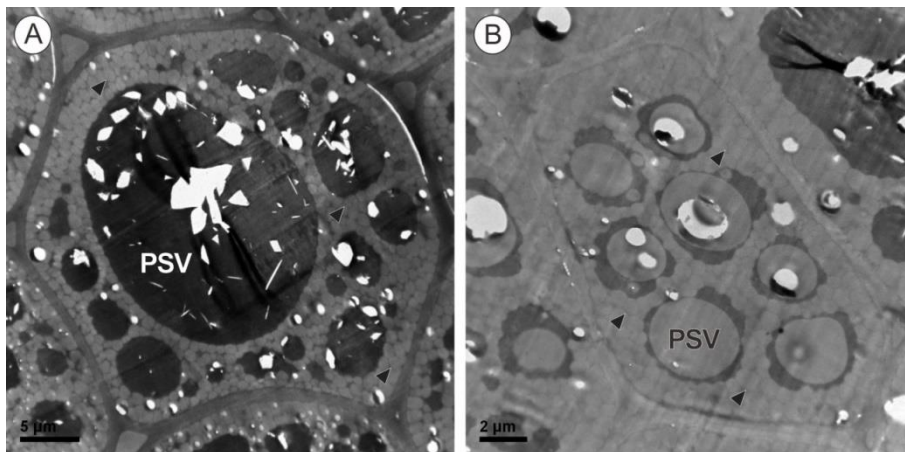


圖 10. 青楓新鮮種子子葉超微結構觀察。A. 內層的葉肉細胞；B. 外側的葉肉細胞。
PSV= protein storage vacuole，arrowhead= lipid body。

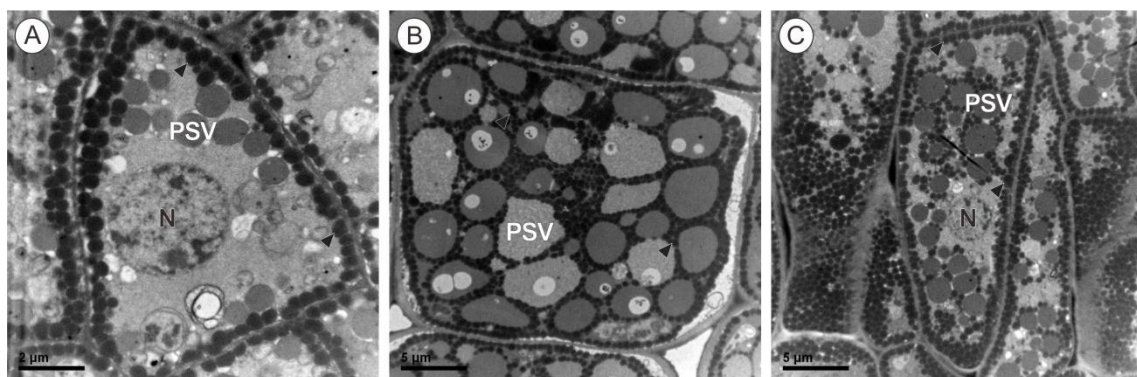


圖 11. 青楓新鮮種子胚根超微結構觀察。A. 根尖分生組織；B. 基本分生組織；
C. 原形成層。N= nucleus，PSV= protein storage vacuole，arrowhead= lipid body。



(二) 低溫層積與 GA 處理後種子初生葉長度的變化

表 2 顯示，青楓種子內初生葉的長度在低溫層積處理 4 週與 8 週時雖有逐漸變長，但統計上並無顯著差異，直到層積處理 12 週，種子在袋內自行發芽時，初生葉長度才有顯著增加。而種子分別經 GA₃ 與 GA₄ 處理後，初生葉的長度在培養 2 週與 4 週後亦皆有增加，但統計上並無顯著差異，直到發芽時測量的初生葉長度才有顯著增加。整體而言，青楓種子在低溫層積處理與暖溫培養的過程中，初生葉長度皆不會有顯著變化，須待種子發芽時初生葉長度才會顯著增長。

表 2. 低溫層積與 GA 處理後青楓種子初生葉長度。

Treatments	First true leaf length (μm)	
Cold stratification	0 week	127.3 ^a ± 23.2
	4 week	149.2 ^a ± 24.9
	8 week	222.5 ^a ± 73.9
	Germination	686.0 ^b ± 330.3
GA ₃	0 week	132.9 ^a ± 20.1
	2 week	157.2 ^a ± 26.9
	4 week	182.4 ^a ± 52.3
	Germination	719.5 ^b ± 519.4
GA ₄	0 week	132.8 ^a ± 20.1
	2 week	159.4 ^a ± 26.9
	4 week	196.2 ^a ± 52.3
	Germination	1084.2 ^b ± 519.4

¹ Pairwise comparison using Tukey HSD was denoted by alphabetical letters.



(三) 低溫層積處理後種子內儲存物質的變化

青楓種子在低溫層積處理 4 週後，子葉細胞內的多醣類物質、蛋白質與脂質並沒有明顯改變（圖 12B、F、J），子葉與胚根細胞內的蛋白質儲存液胞仍尚未開始聚集，油粒體亦仍佔滿整個細胞質（圖 13D、E、F）；低溫層積處理 8 週後，子葉內的多醣類物質與蛋白質仍沒有明顯變化（圖 12C、G），但脂質稍微減少（圖 12K），從 TEM 觀察結果來看，子葉與胚根細胞的蛋白質儲存液胞開始聚集，但子葉細胞的油粒體沒有明顯變化（圖 13G），而胚根細胞的油粒體則開始減少（圖 13H、I）；低溫層積處理 12 週後，子葉液胞內的多醣類物質消失（圖 12D），蛋白質開始減少，尤以表皮細胞為最（圖 12H），而脂質亦持續減少，同樣以表皮細胞最為明顯（圖 12L），子葉與胚根細胞的蛋白質儲存液胞則逐漸聚集成中央大液胞，且顏色變淺，另外，兩者的油粒體的數量皆明顯減少，且子葉細胞的油粒體顏色轉為黑色，顯示液胞與油粒體內物質的電子緻密度發生轉變（圖 13J），而胚根細胞內則可觀察到澱粉粒的形成（圖 13K、L）。

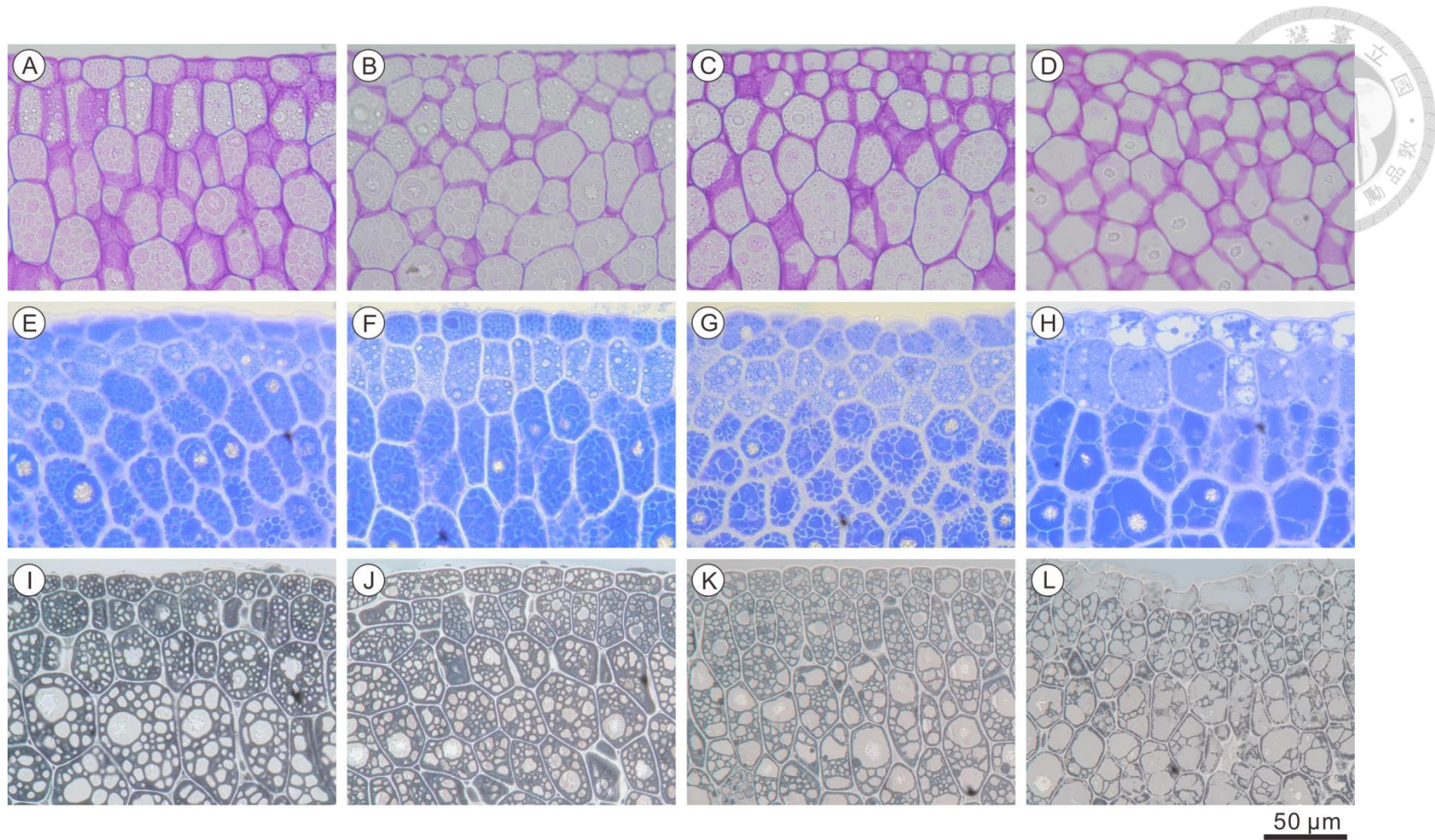


圖 12. 青楓新鮮與低溫層積處理種子子葉組織化學染色。A-D. PAS 染色；E-H. CBBR 染色；I-L. Sudan black 染色；A、E、I. 新鮮種子；B、F、J. 層積 4 週；C、G、K. 層積 8 週；D、H、L. 層積 12 週。

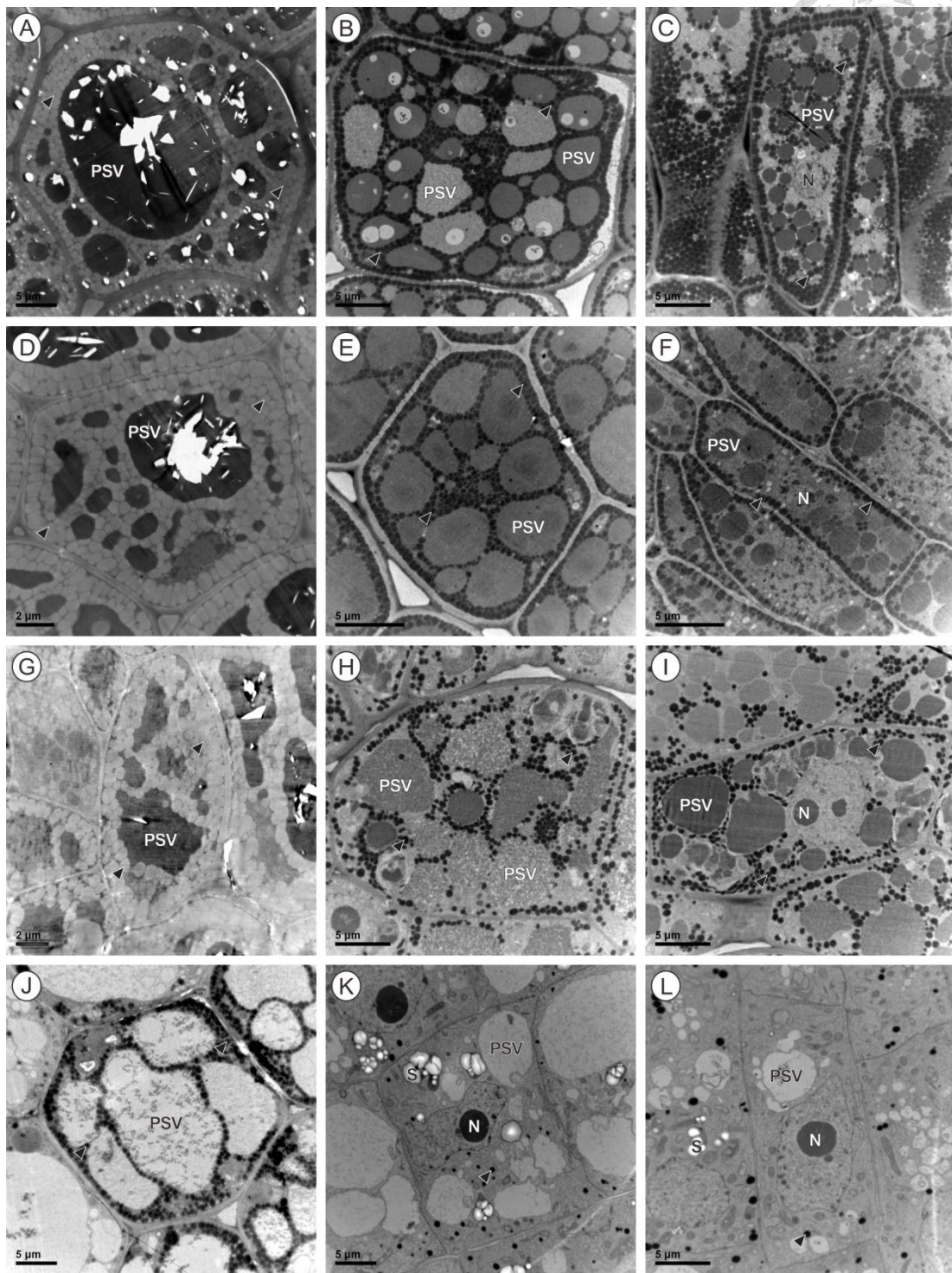


圖 13. 青楓新鮮與低溫層積處理種子之子葉與胚根的超微結構觀察。A- C. 新鮮種子；D- F. 層積 4 週；G- I. 層積 8 週；J- L. 層積 12 週；A、D、G、L. 子葉；B、E、H、K. 胚根之基本分生組織；C、F、I、L. 胚根之原形成層。N= nucleus，PSV= protein storage vacuole，S= starch granules，arrowhead= lipid body。



(四) GA 處理後種子內儲存物質的變化

青楓種子以 500 μM 的 GA_3 水溶液浸泡一天後，放入 25/15 $^{\circ}\text{C}$ 的生長箱中培養。2 週與 4 週後，子葉內的多醣類物質、蛋白質與脂質皆沒有明顯的變化（圖 14B、C、F、G、J、K），子葉細胞的油粒體亦沒有明顯改變（圖 16F、J），蛋白質儲存液胞則要到 4 週時才可觀察到開始聚集（圖 16E、I），胚根細胞的油粒體在 2 週時亦沒有明顯變化（圖 16G、H），4 週時則稍微減少（圖 16K、L），而蛋白質儲存液胞亦要到 4 週時才可觀察到開始聚集，且胚根之基本分生組織的細胞在 4 週時可以觀察到少量的澱粉粒（圖 16K）。種子發芽後，子葉內的多醣類物質仍然存在於液胞中（圖 14D），蛋白質與脂質開始減少，尤以表皮細胞最為明顯（圖 14H、L），子葉細胞內的蛋白質儲存液胞則聚集成中央大液胞，且顏色變淺，油粒體則明顯減少，且顏色轉為黑色，顯示液胞與油粒體內物質的電子緻密度發生轉變（圖 16M）。

青楓種子以 500 μM 的 GA_4 水溶液浸泡一天後，放入 25/15 $^{\circ}\text{C}$ 的生長箱中培養。2 週後，子葉內的多醣類物質、蛋白質與脂質沒有明顯的變化（圖 15B、F、J），子葉與胚根細胞內的蛋白質儲存液胞與油粒體亦沒有明顯改變（圖 17E、F、G）；4 週後，子葉內的多醣類物質與蛋白質仍沒有明顯的變化（圖 15C、G），但脂質開始減少（圖 15K），子葉與胚根細胞的蛋白質儲存液胞開始聚集，且內部出現深色顆粒，油粒體的數量則開始減少（圖 17H、I、J），另外，子葉細胞內的油粒體顏色逐漸轉深，顯示液胞與油粒體內物質的電子緻密度發生轉變（圖 17H），而胚根之基本分生組織的細胞內則可觀察到少量的澱粉粒（圖 17I）；種子發芽後，子葉的表皮與外層葉肉細胞的多醣類減少，內層葉肉細胞的多醣類則沒有明顯變化（圖 15D），蛋白質亦開始減少，尤以表皮細胞為最（圖 15H），而脂質則持續減少，同樣以表皮細胞最為明顯（圖 15L），子葉細胞的蛋白質儲存液胞則聚集成中央大液胞，且顏色變淺，油粒體則明顯減少，且顏色轉為黑色（圖 17K）。

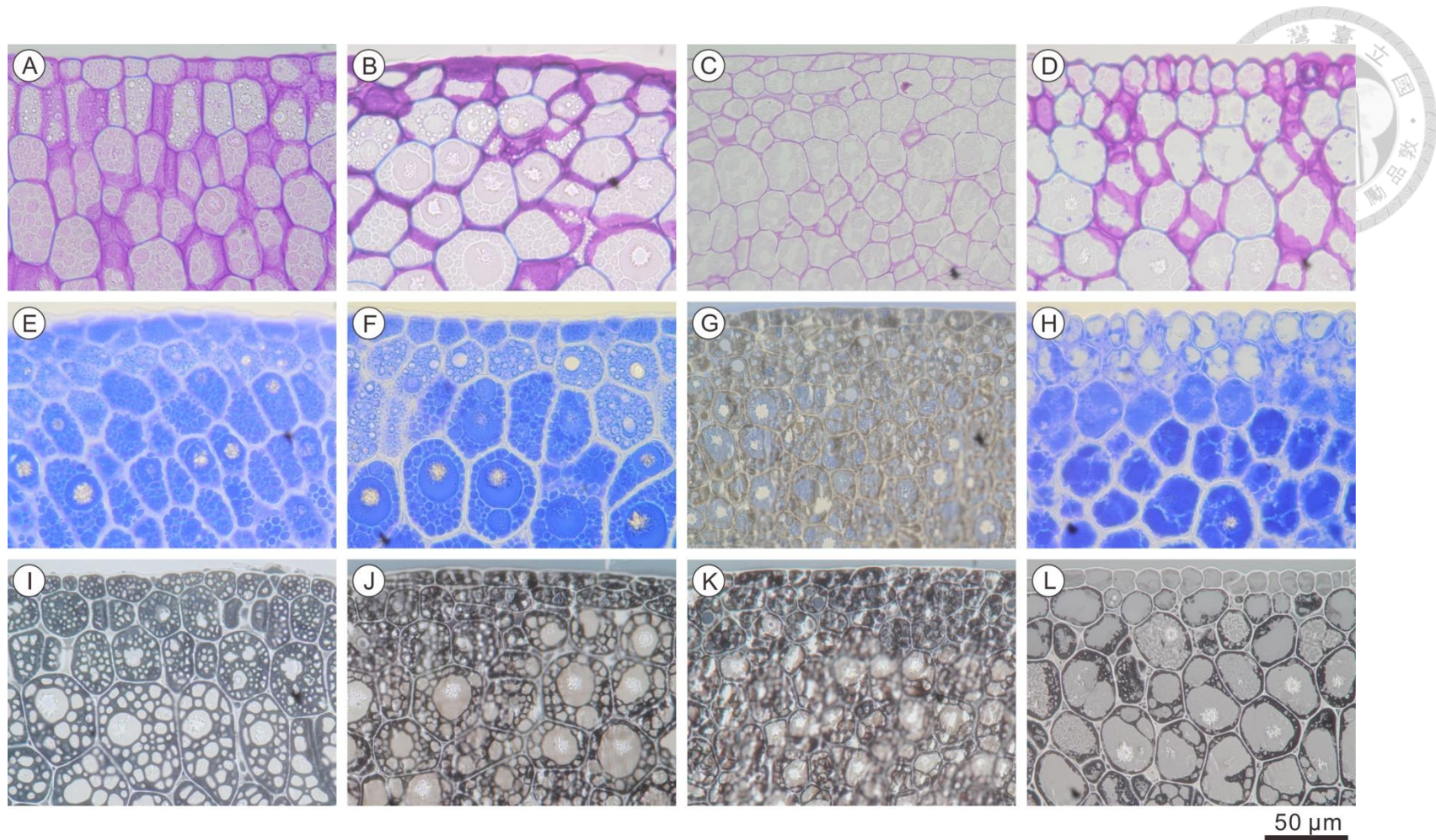


圖 14. 青楓新鮮與 GA_3 處理種子子葉組織化學染色。A-D. PAS 染色；E-H. CBBR 染色；I-L. Sudan black 染色；A、E、I. 新鮮種子；B、F、J. 培養 2 週；C、G、K. 培養 4 週；D、H、L. 發芽種子。

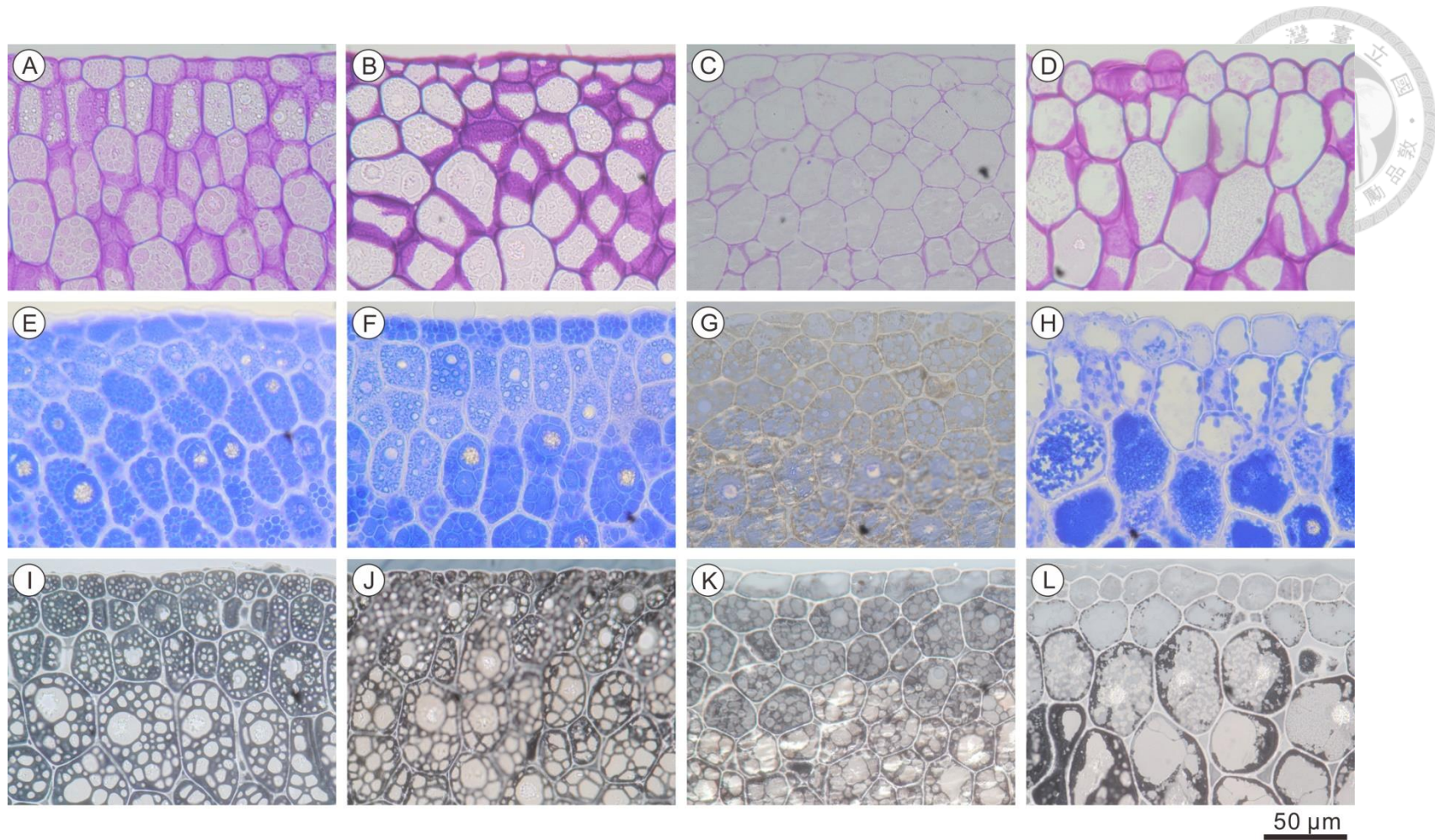


圖 15. 青楓新鮮與 GA_4 處理種子子葉組織化學染色。A-D. PAS 染色；E-H. CBBR 染色；I-L. Sudan black 染色；A、E、I. 新鮮種子；B、F、J. 培養 2 週；C、G、K. 培養 4 週；D、H、L. 發芽種子。

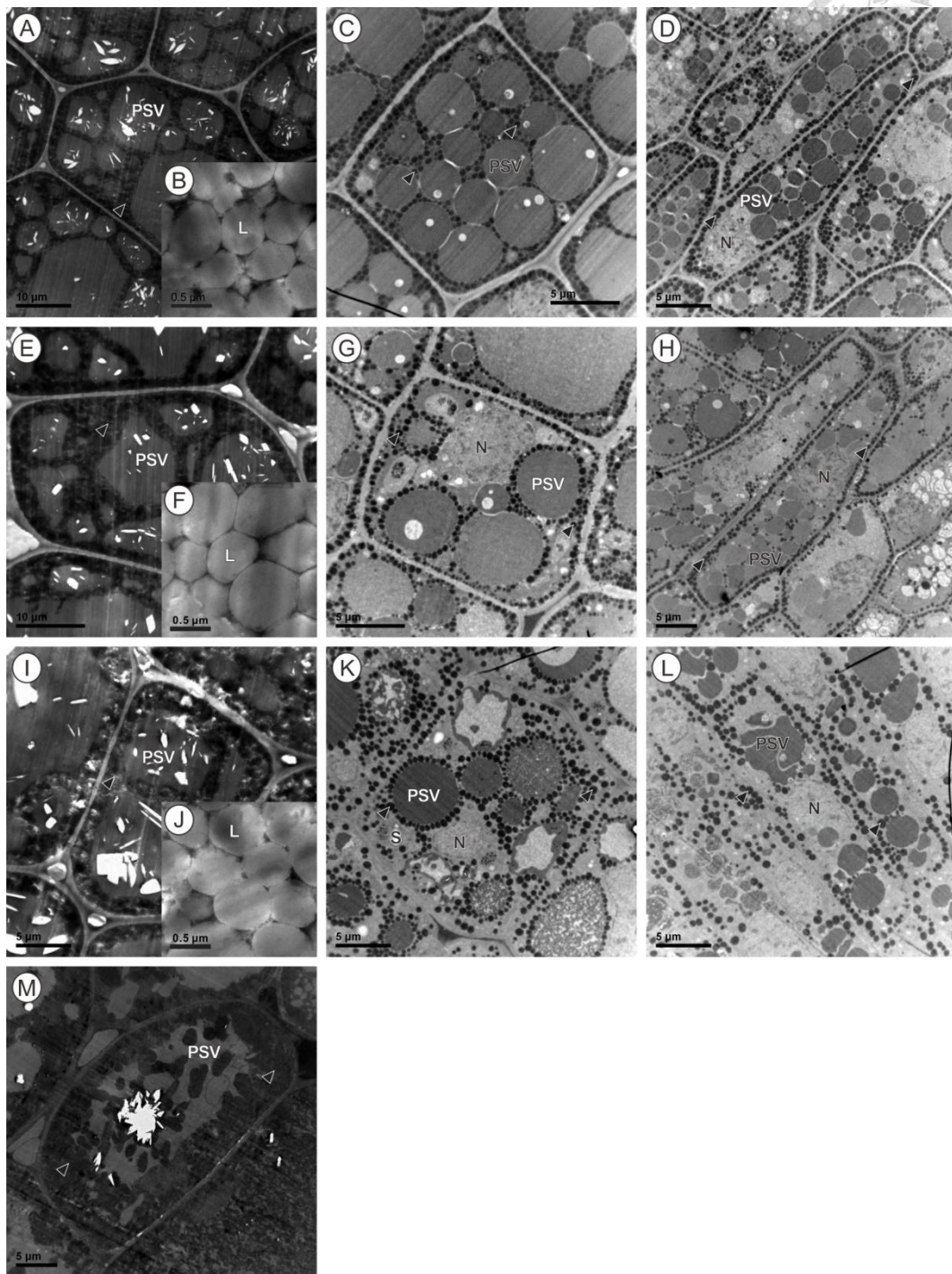


圖 16. 青楓種子經 GA_3 處理後子葉與胚根之超微結構觀察。A-D. 培養 0 週；E-H. 培養 2 週；I-L 培養 4 週；M. 發芽種子；A、E、I、M. 子葉；C、G、K. 胚根之基本分生組織；D、H、L. 胚根之原形層成；B、F、J. 培養 0、2、4 週之子葉油粒體。L= lipid body, N= nucleus, PSV= protein storage vacuole, S= starch granules, arrowhead= lipid body。

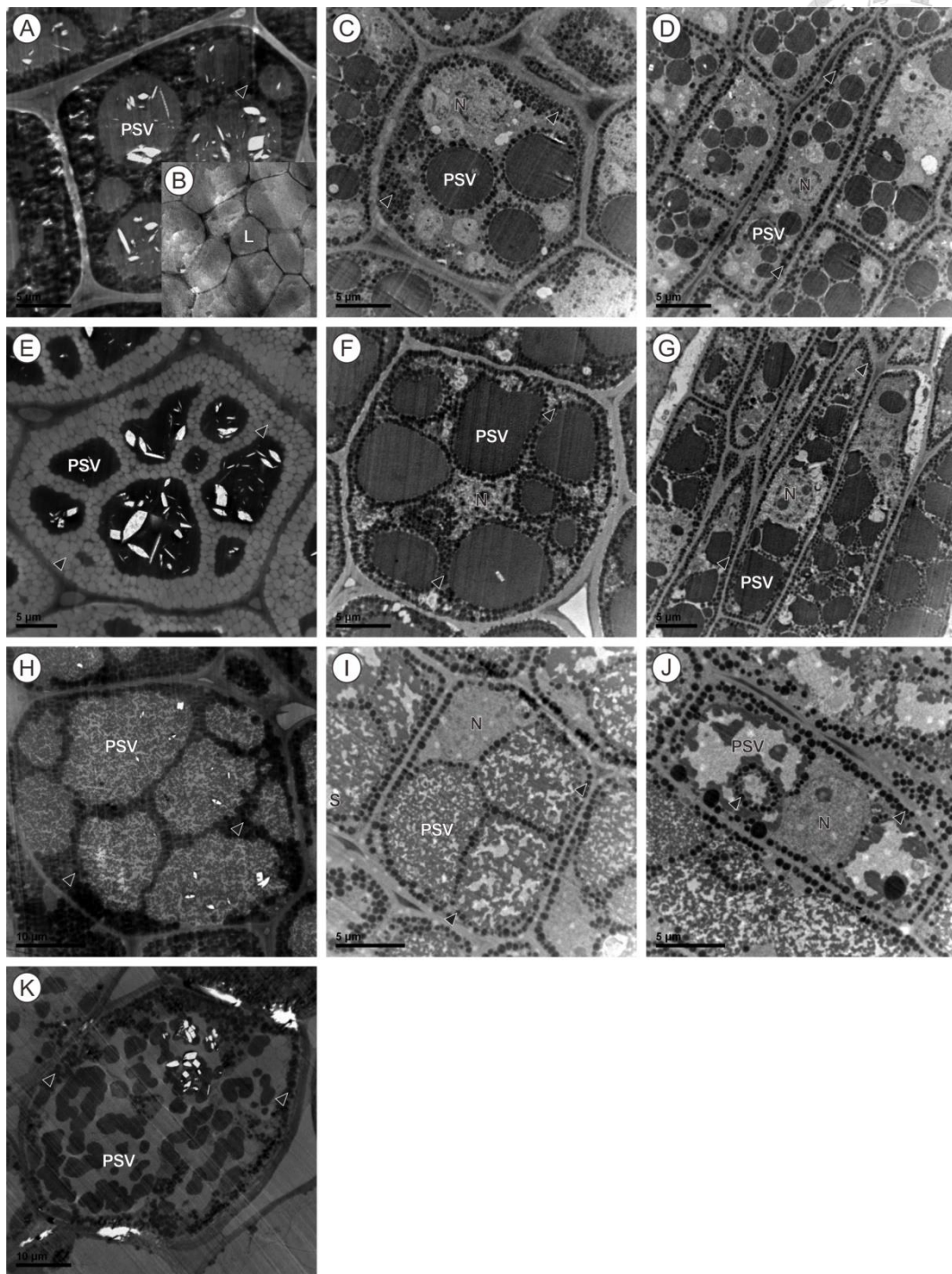


圖 17. 青楓種子經 GA_4 處理後子葉與胚根之超微結構觀察。A-D. 培養 0 週；E-G. 培養 2 週；H-J 培養 4 週；K. 發芽種子；A、E、H、K. 子葉；C、F、I. 胚根之基本分生組織；D、G、J. 胚根之原形層成；B. 培養 0 週之子葉油粒體。L= lipid body, N= nucleus, PSV= protein storage vacuole, S= starch granules, arrowhead= lipid body。



四、種子苗後續生長

將新鮮的成熟種子、低溫層積 8 週、GA₃ 和 GA₄ 2500 μM 水溶液處理共四種不同處理後的發芽種子在放入溫室培養三個月後，測量其苗木的高度、地際直徑、地上與地下部乾種，以計算其品質指數，數據呈列於表 3 中。結果顯示，GA₄ 處理的苗木平均高度最高，可達 112.25 mm；低溫層積處理的苗木平均高度次之，為 108.94 mm；未經任何處理與 GA₃ 處理的苗木平均高度最矮，分別為 92.06 mm 和 90.18 mm（圖 18A）。而四種不同處理後的發芽種子中，未經任何處理的苗木平均地徑最寬，可達 1.90 mm；低溫層積處理的苗木平均地徑次之，為 1.88 mm；GA₄ 和 GA₃ 處理的苗木平均地徑最窄，分別為 1.76 mm 和 1.68 mm（圖 18B）。存活率的部分則是低溫層積與 GA₃ 處理的苗木存活率最高，同為 96.67%；未經任何處理的苗木存活率次之，為 91.67%；GA₄ 處理的苗木存活率最低，為 81.67%（圖 18C）。而苗木的品質指數以未經處理與低溫層積處理的苗木最高，皆為 0.0058；GA₄ 處理的苗木次之，為 0.0051；GA₃ 處理的苗木最低，只有 0.0046（表 3）。

表 3. 青楓種子經不同處理後發芽之小苗栽種 3 個月後之形質生長狀況與苗木品質指數。

	Seedling height (mm)	Root collar diameter (mm)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Dickson quality index
Without treatment	92.06	1.9	0.2302	0.0761	0.0058
GA ₃ treatment	90.18	1.68	0.2011	0.0628	0.0046
GA ₄ treatment	112.25	1.76	0.2628	0.0862	0.0051
Cold stratification	108.94	1.88	0.2757	0.0807	0.0058

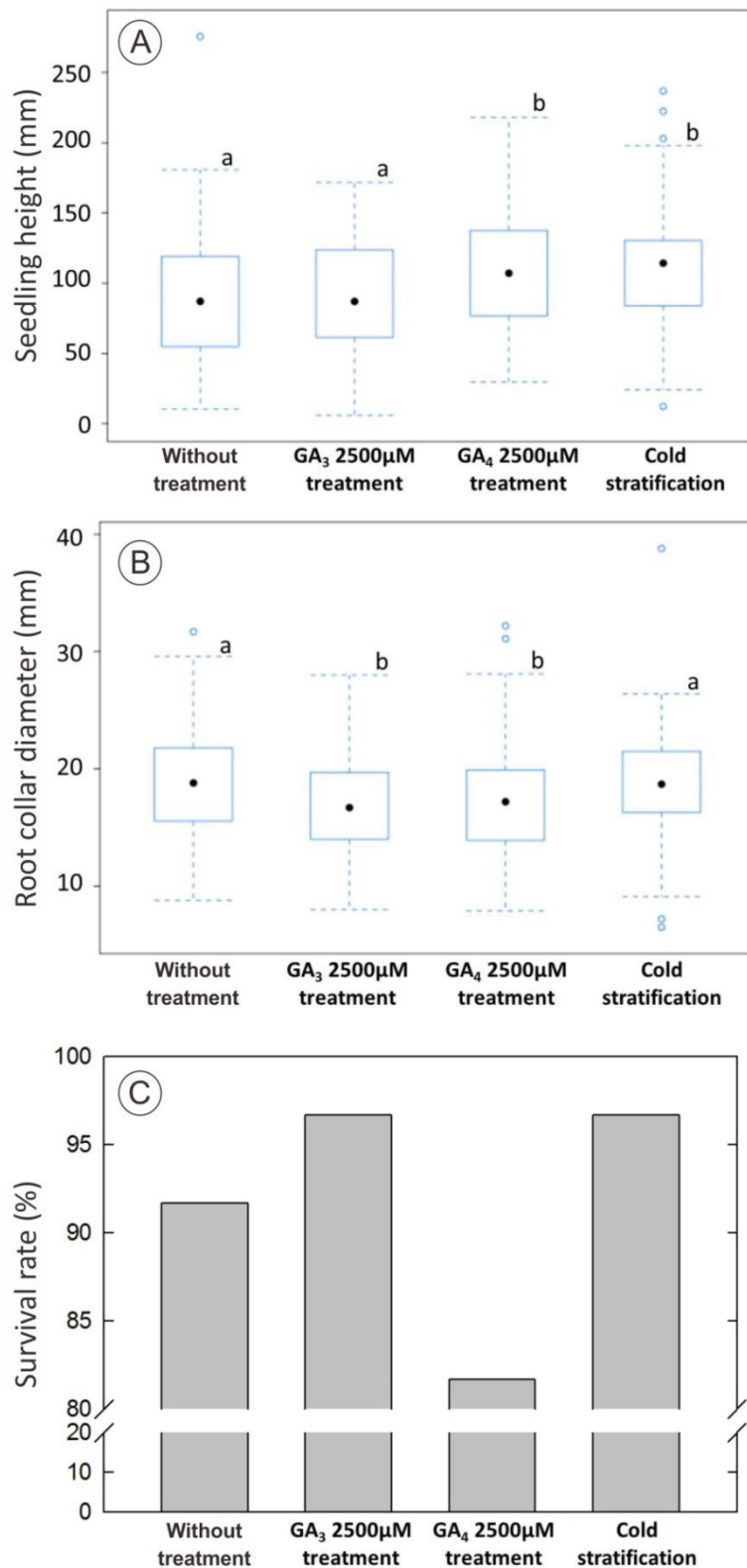
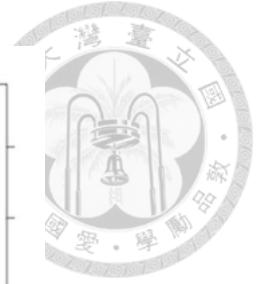


圖 18. 青楓新鮮種子及三種不同處理後種子發芽後三個月苗木生長狀況。A. 苗木高度；B. 苗木地際直徑；C. 苗木存活率。



肆、討論


一、低溫層積與 GA 處理對青楓種子休眠解除與促進發芽的效果

低溫層積處理已廣泛運用於解除種子的生理休眠，並可促進種子發芽和發芽速率的提升(Schopmeyer, 1974; Wang and Berjak, 2000)。青楓新鮮種子在不同發芽溫度下皆於 3-5 週後才開始發芽(圖 3A)，顯示青楓種子具有休眠性，而最終平均發芽率隨發芽溫度越低而增加，顯示低溫具有促進發芽效果，且有效溫度應該低於 15°C。低溫層積處理 4 週與 8 週可以明顯降低青楓種子的平均發芽天數(表 1)，且第一顆種子發芽的時間從未處理的第 3 週提早自第 1 週(圖 3B)，表示發芽速率已增加，但並未增加種子發芽率，而 12 週的低溫層積處理使種子在 1 週內近乎全數發芽，且發芽率已接近本批種子上限發芽率 60%，顯示青楓種子具生理休眠，而 8 至 12 週的低溫層積處理可完全解除休眠。

在許多物種中外加 GA 可以替代種子對低溫層積的需求，使種子的休眠解除(Chien et al., 1998; Hidayati et al., 2000; Nicolás et al., 1996; Powell, 1987)。本研究結果顯示，250、2500 μM 的 GA_3 和 25、250、2500 μM 的 GA_4 處理均能提升青楓種子的發芽率(圖 3C、D)，但統計分析的結果顯示並無顯著差異，且種子最早發芽的時間並沒有提早，平均發芽天數的下降程度亦不如低溫層積處理明顯(表 1)，顯示外加 GA 處理對於解除青楓種子的生理休眠的效果並不如低溫層積處理有效，再加上青楓種子需要 8 至 12 週的低溫層積處理來完全解除休眠。根據 Baskin and Baskin (2004)的種子休眠分類，推測青楓種子之生理休眠應為中度生理休眠。

二、種皮對水分滲入種子的影響

在臺灣紅榨槭(Chen et al., 2015)的實驗結果中，GA 處理能大幅提升種子的發芽速率，各種 GAs 濃度處理之種子約 4 週後皆能達到 40% 以上的發芽率，而未經




GAs 處理的種子則需要 16 週。但有趣的是，該實驗的控制組，浸泡在未添加 GA 的純水溶液並置於 30 cmHg 壓力下 16 小時的種子，在約 4 週後亦達到 40 % 以上的發芽率，顯示發芽速率的提升與 GA 無關，而可能是受到水分滲入種子的速率所影響。前人對糖楓種子的研究(Webb and Dumbroff, 1969)亦證實其種皮會顯著地限制水分的通過，使低溫層積所需的時間大幅延長，因為種子需要吸收足夠的水分才能進行所需的代謝反應而解除休眠與發芽。本實驗 2014 年採集的種子的實驗結果顯示，不論是否有同時置於 30 cmHg 減壓下，浸泡水中 22 小時的種子放入 25/15°C 培養後平均發芽率雖有提升(圖 3E)，但平均發芽天數的減少並不明顯(表 1)，而此一結果或許表示青楓的果皮與種皮並未對水分滲入種子造成影響。

三、ABA 與 GAs 在調控休眠與發芽中扮演的角色

(一) ABA


Kermode (2005)在其文獻回顧中指出，許多物種的種子在低溫層積處理後種子內 ABA 的含量會顯著下降，且伴隨著發芽能力的提升，而此現象可能是造成種子休眠解除的原因(Cutler and Krochko, 1999; Schmitz et al., 2000)，但 ABA 在休眠解除中扮演的角色仍缺乏直接證據(Bewley, 1997)，而低溫層積使 ABA 含量下降的原因亦較少探討。

經過 5°C 低溫層積處理後青楓種子內 ABA 的含量即顯著下降(圖 4A)，而經浸泡 GA₃ 和 GA₄ 水溶液處理一天，立即測量青楓種子內 ABA 的含量亦已分別下降至每克乾重含 138.1 ng 與 93.5 ng(圖 4B、C)，雖仍稍高於發芽種子中的含量，但已低於低溫層積處理 4 週之種子，且與低溫層積處理 8 週之種子內的含量相近。Tillberg (1983)對玫瑰瘦果的研究顯示，成熟的新鮮玫瑰瘦果內含有高量的 ABA，而瘦果內 ABA 的含量在 4°C 低溫層積的早期階段即顯著下降，而分析其浸潤種子的水即含有大量的 ABA，顯示此階段種子內 ABA 含量的下降是由種子內滲漏所



造成的，而本實驗經 GAs 處理後青楓種子 ABA 含量立即下降，推測 ABA 滲漏可能亦是造成此現象的原因之一。此外，從不同時間低溫層積處理後 ABA 下降的趨勢來看（圖 4A），青楓種子的 ABA 含量皆在低溫層積早期即顯著下降，之後的下降趨勢則較為平緩，下降曲線呈指數型，或許也暗示了在低溫層積處理過程早期青楓種子內 ABA 大幅的減少可能是因滲漏造成，而非低溫的影響。Chen et al. (2015) 對紅榨槭的研究顯示，其種子在低溫層積過程中 ABA 含量的下降呈線性而非指數型，亦暗示了紅榨槭的果皮或種皮影響了水份的滲入，進而限制了種子內 ABA 的滲漏的可能性，而青楓種子的外圍構造則因不會對水分的滲入造成影響，因此 ABA 可能在低溫層積處理過程中會從種子滲漏至外界。

前人研究已表明 ABA 調控種子的休眠，而 GA 則調控種子的發芽(Bewley, 1997; Jacobsen et al., 2002; Koornneef et al., 2002)，低溫層積與 GA 處理後皆可使青楓種子內 ABA 的含量顯著降低，但從發芽試驗的結果來看，GA 處理後的種子仍要在培養 3 至 4 週後才會陸續開始發芽（圖 3C、D），與未經處理的種子相同，可能表示 GA 處理後的種子雖然 ABA 已下降，但休眠尚未解除。當然，種子發芽與否與休眠是否解除不可混為一談，但在考量到外加的 GA 或已補足種子發芽對 GA 的需求，GA 處理的種子卻未如低溫層積處理的種子休眠解除，暗示了 ABA 含量的下降在青楓種子中並非導致其休眠解除的主要因素。Kermode (2005)在其文獻回顧中提到，ABA 的含量應無法立即的表明種子的休眠程度，種子內 ABA 合成與分解的能力才是較好的指標。而在 *Lolium rigidum*(Goggin et al., 2009)和 *Oryza sativa f. spontanea*(Gianinetti and Vernieri, 2007)等草本植物的研究中指出，其種子的休眠程度與種子對 ABA 的敏感性有關而非 ABA 的含量，另外，在 *Chamaecyparis nootkatensis*(Schmitz et al., 2002)和 *Pseudotsuga menziesii*(Corbineau et al., 2002)等裸子植物的研究中亦顯示低溫層積處理會使種子對 ABA 的敏感性降低且導致種子休眠解除。因此，我們推測青楓種子休眠解除與否並非由其內的 ABA 含量決定，而是取決於種子對 ABA 的敏感性或其合成與代謝 ABA 的能力。



Feurtado et al. (2004)在對 *Pinus monticola* 的研究中指出：其種子內 ABA 的合成與分解的平衡在低溫層積處理時開始轉換，ABA 分解的能力逐漸超過合成，ABA 的含量逐漸下降；而到了發芽時，種子內 ABA 的含量雖已降低，但種子仍更傾向分解 ABA；但在從發芽轉換到幼苗生長時，此平衡轉回傾向於 ABA 的合成，且 ABA 的含量增加。而這或許可以解釋為何本實驗中低溫層積處理後的發芽種子 ABA 的含量較處理 4 週及 8 週的未發芽種子低，但經 GA₃ 與 GA₄ 處理之種子發芽後 ABA 的含量卻分別從培養 4 週時的每克乾重含 33.7 ng 與 31.5 ng 提升至 90.8 ng 與 88.7 ng。因為低溫層積處理的發芽種子取的是低溫層積處理 12 週後的種子，青楓種子在低溫層積處理 12 週的過程中已在封口袋內自行發芽，但仍保留在胚根突出的階段，子葉與胚軸並未突出，表示種子停留在發芽的階段而沒有轉向幼苗生長，因此內部的 ABA 含量仍較低。但培養在 25/15°C 下的種子在胚根突出後子葉與胚軸即快速生長，而本研究的實驗方法為每個星期收集發芽種子一次，因此難免會收集到已經從發芽階段轉為幼苗生長階段的種子，進而導致 GA 處理後的發芽種子測量到的 ABA 含量較高。

(二) GA

新鮮成熟的青楓種子內具生物活性的 GA 以 GA₄ 含量最高，並有少量的 GA₃ 和 GA₇ (圖 5)。從發芽試驗的結果來看 (圖 3C、D)，GA₄ 在濃度 25 μM 時即可提升青楓種子的發芽率，GA₃ 則要在濃度 250 μM 才能有此效果，顯示青楓種子對 GA₄ 的敏感性較高。而荷爾蒙分析的結果顯示，青楓種子在分別以同樣濃度的 GA₃ 和 GA₄ 處理完後，GA₄ 處理之種子內 GA₄ 的含量是 GA₃ 處理之種子內 GA₃ 含量的兩倍左右 (圖 6A、C)，且 GA₃ 處理之種子內 GA₃ 的含量在培養的過程中持續大幅減少，發芽種子內 GA₃ 的含量只剩每克乾種含 104 ng，但 GA₄ 處理之種子內 GA₄ 的含量在培養 2 週時並未下降，直到培養 4 週時才觀察到含量降低，且發芽種子內 GA₄ 的含量仍高達 1294 ng，顯示 GA₃ 可能在青楓種子內較快被代謝或轉為其他

物質，GA₄ 在青楓種子中則較穩定。綜合以上所述，我們推論 GA₄ 在青楓種子發芽過程中扮演了較關鍵的角色。

如前所述，前人研究已表明 GA 調控種子的發芽(Bewley, 1997; Jacobsen et al., 2002; Koornneef et al., 2002)，經低溫層積處理後的青楓種子，在處理 4 週與 8 週之種子內具活性的 GAs 含量並沒有顯著增加（圖 5），發芽率亦沒有提升（圖 3B），但層積處理 12 週之種子具活性之 GAs 含量亦沒有顯著增加，最終發芽率卻大幅提升。此外，Cadman et al. (2006)的研究顯示，ABA 和 GA 的比例對於休眠的維持與解除相當重要，而在青楓種子低溫層積處理的部分，種子內具活性的 GA 整體來說並沒有顯著增加，但因為 ABA 的含量明顯下降（圖 4A），因此 ABA/GA 的比列亦明顯降低，與前人研究相符，但 GAs 處理後之種子內 ABA 的含量亦顯著下降（圖 4B、C），且 GAs 處理之種子因外加的 GA 而使 ABA/GA 下降的更加明顯，不過其種子休眠並沒有因此提早解除，發芽率的提升亦不顯著，這或許表示種子內 ABA 和 GA 含量的比例在青楓種子中不是影響其休眠與發芽的主要因素。前人研究顯示(Debeaujon and Koornneef, 2000; Derkx and Karssen, 1993a; Derkx and Karssen, 1993b; Koornneef et al., 2002)，阿拉伯芥的種子在低溫層積處理後對 GA 的敏感性提升，進而促使種子發芽，因此，我們推測低溫層積處理 12 週的種子可能也是因為對 GA 的敏感性提升，因此使最終發芽率提高，而這或許也可解釋外加的 GA 為何對發芽率的提升並不顯著，因為種子對 GA 的敏感性並未提升。

未經處理、低溫層積和 GA₄ 處理之青楓種子中並沒有測量到 GA₁，唯獨在 GA₃ 處理後之種子在培養 2 週時有觀察到少量的 GA₁（圖 6B）。在楊梅的前人研究中發現(Chen et al., 2008)，GA₃ 處理後之楊梅種子可能藉由 GA 3 β -hydroxylase 將 GA₃ 轉變為 GA₁，並促進種子發芽。因此，我們推測青楓種子亦可能將部份外加的 GA₃ 轉變為 GA₁，但 GA₁ 亦很快地代謝或去活化。另外，在低溫層積處理過程中，GA₇ 只出現在處理早期（圖 5），但 GAs 處理後之種子卻在培養至發芽的過程中皆觀測得到 GA₇（圖 6B、D），而這或許暗示了低溫層積會影響種子內 GA 的生合成路徑。

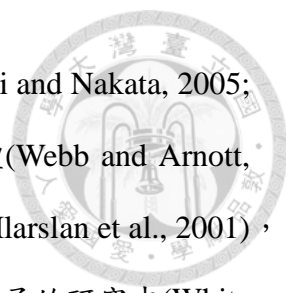


四、TEM 觀察下油粒體之電子緻密度的差異

在 TEM 觀察下，青楓種子的子葉葉肉細胞內的蛋白質儲存液胞顏色較深，油粒體顏色則較淺（圖 10），顯示油粒體的電子緻密度較低，但在胚根的根尖分生組織、基本分生組織與原形成層的油粒體呈現深色（圖 11），顯示其電子緻密度較高。此外，在 Chen et al. (2015) 的研究中顯示，紅榨槭種子的子葉葉肉細胞內的油粒體在 TEM 觀察下顏色呈現深色，顯示其電子緻密度高。電子緻密度高的可能原因為後固定處理中四氧化鐵染色的結果，四氧化鐵可與不飽和脂肪酸中的不飽和烴或色胺酸與組胺酸等胺基酸的芳香基團鍵結，因而對脂質與蛋白質具染色效果(Ruzin, 1999)，但飽和脂肪酸則不與四氧化鐵反應(Adams et al., 1967)，因此脂質的種類會影響其對四氧化鐵的染色特性(Bozzola and Russell, 1999)。因而我們推測油粒體在 TEM 觀察下電子緻密度的差異可能是因為其內脂質的成分及不飽和與飽和脂肪酸比例的差異影響其對四氧化鐵的結合能力所造成。而前人對椰子胚乳(Balachandran et al., 1985)與花生種子(Fedeli et al., 1968)的研究顯示，椰子胚乳在不同空間分布上其脂肪酸成分會有差異，而花生種子的子葉與胚之其他部分的油脂的脂肪酸組成亦有不同，子葉以外的部分的不飽和脂肪酸含量較高，此外，前人對原生生物 *Schizochytrium* sp. 的研究(Ashford et al., 2000)顯示，其油粒體內不同成分之結構可藉由電子顯微鏡脂觀察來判斷，顯示青楓與臺灣紅榨槭之間及青楓種子在不同部位的油粒體內脂質成分的不同確實有可能藉由電子顯微鏡的觀察而得知。

五、子葉葉肉細胞內的晶簇狀結晶

青楓種子的子葉的葉肉細胞在解剖構造上有些微差異（圖 8A），靠近表皮的一至兩層葉肉細胞的蛋白質儲存液胞內具有囊泡，而內層的葉肉細胞的蛋白質儲存液胞內則不具囊泡，但具有晶簇狀結晶。植物細胞內結晶體的主要成分多數為草酸鈣(Finley, 1999)，其在植物體內被認為具有多種重要的功能，如鈣離子的調節、



植物保護、重金屬解毒、緩解乾旱逆境與協助光的穿透(Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2003)等，根據前人的研究，許多成熟種子內皆有結晶體(Webb and Arnott, 1982)，此外，發育中的種子亦可能暫時產生結晶體，如大豆種子(Ilarslan et al., 2001)，而此結晶體的功能可能為鈣離子的儲存來源，而在桉樹屬植物種子的研究中(White and Lott, 1983)，成熟種子子葉內的晶簇狀結晶出現在蛋白質儲存液胞中，且在發芽與苗木生長早期並不會消失，因此作者推論其功能較可能為保護植物的機制，而非鈣離子的儲存來源，而在青楓種子中，發芽後展開綠化的子葉內亦可觀察到晶簇狀結晶的存在(圖 9)，因此我們推斷青楓種子子葉內的晶簇狀結晶的主要功能亦是作為保護植物的機制。

六、休眠解除過程中儲存物質的代謝與轉移

在低溫層積與 GA 處理的青楓種子子葉組織化學染色結果中(圖 12、14、15A-D)，液胞內皆可觀察到多醣類物質的存在，且皆要等到種子發芽後才無法被觀測到，顯示種子發芽後子葉內多醣類的物質顯著減少，但因組織化學染色並非定量分析，PAS 染色亦是對整體多醣類物質染色，因此本實驗的結果無法得知在低溫層積處理與 GA 處理後培養的過程中各種糖類的含量變化，只能確定種子發芽後子葉內多醣類的物質顯著減少。

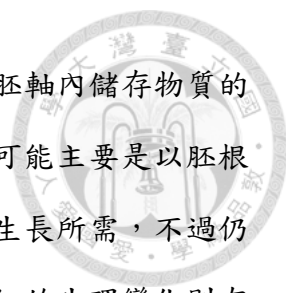
在蛋白質的部分，從組織化學的染色結果來看(圖 12、14、15E-H)，低溫層積處理與 GA 處理後之種子一直到發芽時，子葉葉肉細胞內的蛋白質儲存液胞內皆有明顯的染色反應，顯示子葉葉肉細胞直到發芽後蛋白質儲存液胞內仍有一定含量的蛋白質存在，但與多醣類的染色結果一樣，我們無法藉由蛋白質的組織化學染色來確定在此過程中儲存性蛋白質是否被水解並重新合成其他具生理功能之蛋白質。而在 TEM 的觀察結果上，我們可以發現低溫層積與 GA 處理後之種子子葉的蛋白質儲存液胞皆在發芽後電子緻密度降低(圖 13J、16M、17K)，根據前文對四氧化鐵的推論，此現象或許暗示了芳香族胺基酸含量的減少，顯示子葉內的



儲存性蛋白質要在發芽後才会有顯著的代謝與轉移。

在脂質的組織化學染色上(圖 12、14、15I-L)，低溫層積處理 8 週時脂質稍微減少，但以 TEM 觀察，層積 8 週的種子子葉葉肉細胞內的油粒體並沒有明顯變化(圖 13G)，要到種子發芽時油粒體才會開始減少且電子緻密度增加，同前所述，因組織化學染色並非定量分析，因此我們認為 TEM 的觀察結果應該較為準確。而 GA₃ 處理後的青楓種子子葉內的脂質在培養的過程中並沒有明顯變化，要到種子發芽後脂質才會開始減少，且在 TEM 的觀察下，油粒體的電子緻密度亦會在發芽時增加(圖 16M)。而 GA₄ 處理後的種子在培養 4 週時，組織化學染色與 TEM 觀察的結果皆顯示脂肪開始減少，且油粒體的電子緻密度亦增加(圖 17H)，顯示 GA₄ 處理較 GA₃ 處理可使青楓種子較早開始脂質的代謝，而前人對蘋果種子的研究顯示，GA₄ 可以使蘋果種子內酸性與鹼性脂質酶的活性增加，進而促使脂質分解，因此，推測 GA₄ 處理可能也是增加了青楓種子內脂質酶的活性，進而使青楓種子脂質的代謝較早開始。此外，此三種處理之種子子葉的油粒體在 TEM 觀察下，其電子緻密度皆在脂質開始代謝時增加，而根據前文的推論，顯示青楓種子子葉的油粒體在脂質開始代謝時內部的成分可能發生改變。

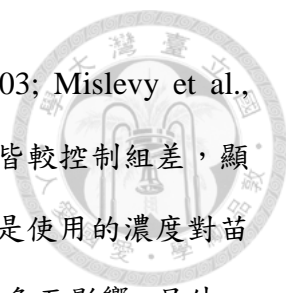
根據前人研究，雖然許多具休眠之種子在休眠解除過程中會伴隨著種子內儲存物質的代謝與轉移，但在休眠解除過程中子葉與胚軸內儲存物質的代謝與轉移並不同步，如蘋果種子在低溫層積處理過程中胚軸內脂質的代謝早於子葉(Dawidowicz-Grzegorzewska, 1989; Dawidowicz-Grzegorzewska and Zarska-Maciejewska, 1979)，且大部分種子內儲存物質的新陳代謝仍發生在發芽之後，並供應早期幼苗建立所需(Nonogaki, 2008)。綜合本實驗多醣類、蛋白質與脂質的組織化學染色與 TEM 觀察的結果來看，在低溫層積處理 8 週(圖 13H、I)以及 GA₃(圖 16K、L)或 GA₄(圖 17I、J)處理後培養 4 週時即可觀察到胚根的基本分生組織與原形成層之細胞內蛋白質儲存液胞開始聚集與油粒體開始減少，表示胚根細胞在種子發芽前即已開始細胞內儲存物質的代謝與轉移，而子葉內的儲



存物質的顯著減少則皆發生在發芽之後，顯示青楓種子子葉與胚軸內儲存物質的代謝與轉移並不同步，休眠解除與發芽早期所需的能量與養分可能主要是以胚根的儲存物質供給，而子葉內的儲存物質則主要供應發芽後苗木生長所需，不過仍不能排除休眠解除過程中子葉內儲存物質調動的可能性，但詳細的生理變化則有待更進一步的研究。此外，根據前人研究，許多含油種子在休眠解除與發芽早期時，子葉內的部分脂質會轉換成以澱粉為主的多醣類物質作為「二次儲存物質」，這類物質的代謝路徑較脂質短，能快速提供生長所需(Lewak, 2011)，如歐洲榛種子在低溫層積的過程中脂質便可能轉變成澱粉儲存在胚軸中(Li and Ross, 1990b)，此一現象也在青楓種子中被觀察到，低溫層積 12 週(圖 13K)與 GA₃ 或 GA₄ 處理後培養 4 週(圖 16K、17I)的種子之胚根細胞內皆可觀察到澱粉粒的存在，顯示種子內的儲物物質的確經代謝與合成重新轉換成澱粉的形式儲存，但不同處理對於澱粉粒的形成與多寡是否有影響則須更進一步的研究探討。

七、低溫層積與 GAs 處理對溫室苗木生長的影響


如前言所述，種子經 GA 或低溫層積處理對種子發芽後苗木生長之後續影響的相關研究較少，且整理數篇前人研究的結果顯示其影響在不同物種間並沒有一致性，因此，本研究希望能藉由調查數種苗木形質生長之參數，進一步協助我們判斷何種種子休眠解除方式的應用性較佳。實驗結果顯示，經低溫層積處理與 GA₄ 處理後之種子發芽後三個月的平均苗木高度顯著高於對照組之苗木，而經 GA₃ 處理則無顯著差異(圖 18A)。在地際直徑的部分，則是控制組的苗木最寬，低溫層積處理次之，但與控制組無顯著差異，兩種 GA 處理的苗木最窄，且兩者間亦無顯著差異(圖 18B)。根據前人研究，GA 可能藉由影響植物的細胞分裂與細胞延長來使植株的節間與下胚軸較長(Arteca, 1996)，但也會降低薄壁細胞的大小與維管束的細胞層數進而使植株的直徑較窄(El-Fouly et al., 1988)，而這或許可以解釋 GA₄ 處理的結果，但亦有前人研究認為 GA 可以明顯增加下胚軸與第一節間的長度，



但對其餘節間的影響則不大(Bensen et al., 1990; Leite et al., 2003; Mislevy et al., 1989)。有趣的是，GA₃處理後的苗木不論在苗高或地際直徑上皆較控制組差，顯示 GA₃處理對青楓生長的負面影響，但原因則較難推斷，或許是使用的濃度對苗木生長所需而言過高，進而破壞了植株內部的荷爾蒙平衡而產生負面影響，另外，有前人研究認為外加的 GA₃可能會使葉片的水分減少並降低抗乾旱逆境的能力，進而使葉片面積降低(Silva Garza et al., 2001)，雖然本實驗並未測量葉片面積，但或許葉片水分的減少與面積的降低致使光合作用產物減少而影響植株生長亦是可能的原因之一。低溫層積處理對苗木生長的影響則較為正面，不僅植株生長較高，地際直徑與控制組亦沒有顯著差異，而這或許是因為低溫層積處理較類似植物在野外環境的自然狀況，也進一步暗示了外加的化學物質可能會破壞植株本身的荷爾蒙平衡，進而產生負面影響。

雖然苗高與地際直徑對於評估苗木品質有一定用處，但亦有前人研究認為，同時考量苗高、地際直徑與生物量等參數且兼顧苗木型態與結構狀況的品質指數較適合用來預測苗木品質與是否適合出栽造林(Dickson et al., 1960; Roller, 1976)，而本實驗為了計算品質指數，在實驗結束時亦分別測量了四組苗木的地上部與地下部乾重(表 3)。從品質指數來看，低溫層積處理的品質指數最高，未經處理的控制組次之，GA₄處理與 GA₃處理則分別為次低與最低，雖然品質指數應達何種範圍才具品質指標之功能需要更進一步的林地實驗來判斷，但在三斗石櫟的前人研究中(陳 1997)，品質指數與苗木出栽後之生長呈正相關，而這可能暗示在青楓苗木中，低溫層積處理之苗木出栽後成活生長情形較 GA 處理之苗木為好。

另外，從溫室苗木的存活率來看，低溫層積與 GA₃處理的苗木存活率最高，控制組次之，GA₄處理再次之(圖 18C)。值得注意的是，GA₃處理雖然對苗木的生長表現有負面影響，但苗木的存活率卻與低溫層積處理一樣為最高，而可能的推論與熱逆境的耐受有關。本實驗於 2015 年的 5 月到 7 約間進行，雖沒有實際測量實驗進行之溫室的溫度，但從此批種子之原生育地附近的氣候資料來判斷(圖



22)，此一期間可能使苗木處在熱逆境之環境下，而前人對大麥的研究顯示，GA 含量的下降可使大麥對熱逆境的抵抗能力提升，而這可能是因為 GA 含量的下降改變了植株內 GA 與 ABA 的平衡，使 ABA 的含量提升，而 ABA 則被認為是植物的逆境荷爾蒙，調控植物對逆境的耐受能力(Vettakkorumakankav et al., 1999)。因此，從前段的推測來看，GA₃ 處理可能破壞了青楓植株內部的荷爾蒙平衡，進而提升了植株對熱逆境的耐受力。



伍、結論

本論文之宗旨為探討低溫層積與外加 GA 處理對青楓種子休眠解除與後續苗木生長的影響及休眠解除過程中種子生理與解剖上的變化，實驗結果歸納如表 5，並據此結果得出以下幾點結論：(1) 青楓種子具有發育完整的胚，種皮不影響水分的滲透，且低溫層積可促進種子發芽，顯示青楓種子的休眠種類為生理休眠。(2) 雖然低溫層積處理過程需要耗費一定時間，然其促進種子發芽的效果較好，且考量到種子發芽的整齊度與對後續苗木生長的影響，我們認為低溫層積處理的應用性較佳。(3) 種子內 ABA 與 GA 的含量多寡並非其調控休眠與發芽的主要因素，而較可能是種子對兩者之敏感性與新陳代謝能力的改變，而這也是低溫層積與 GA 處理在促進種子發芽的效果上有所差異的可能原因。(4) 青楓種子以蛋白質與脂質為其儲藏性養分，但在不同部位的含量多寡與組成成分有所差異，其代謝與轉移的時機亦不同步，胚根內在種子發芽前即已開始，子葉內則主要發生在種子發芽後，以供應後續苗木生長所需。(5) 外源性 GA₃ 和 GA₄ 在促進發芽所需濃度、對脂質代謝的調控以及對苗木生長的影響上皆不相同，顯示不同 GA 在青楓生長發育的過程中的主要功能有所差異，而 GA₄ 在發芽上扮演了較關鍵的角色。

雖然本研究對青楓種子從休眠、發芽到幼苗生長的整個過程皆有探討，且對此過程中荷爾蒙與儲存物質等內部生理生化的變化及交互作用有進一步了解，但仍有需多問題有待釐清，包括：(1) 雖然果皮與種皮不影響水分的通透，但仍需藉由將之剝除後進行發芽試驗來了解其機械性阻力是否會阻礙種子發芽。(2) 進一步分析不同處理後水溶液或水苔內 ABA 的含量以及種子內 ABA 代謝產物如 PA (phaseic acid)、DPA (dihydrophaseic acid) 等含量變化，以了解 ABA 的實際代謝狀況。(3) 以 Fluridone 和 Paclobutrazol 等 ABA 與 GA 的生合成抑制藥劑處理種子來進一步了解兩者調控青楓種子休眠與發芽的機制。(4) 藉由儲存物質的化學定量分析來全面了解種子休眠解除與發芽過程中儲存物質的調動。(5) 從蛋白

質體學來探討青楓種子休眠解除與發芽的蛋白質變化與消長，並研究相關酵素的活性變化，以期對休眠解除與發芽的機制有更進一步了解。



表 4. 青楓種子經不同處理後結果之比較。


		Cold stratification	GA ₃ treatment	GA ₄ treatment
Germination test		rate ↑ final percentage ↑ (12 weeks only)	final percentage ↑ (non-significant)	final percentage ↑ (non-significant)
	Hormone content			
	ABA	↓ (4 weeks)	↓ (1 day)	↓ (1 day)
	GAs	no significant change	no significant change	no significant change
Seed reserve	Cotyledon	PSV aggregate when 8 weeks	PSV aggregate when germination	PSV aggregate when 4 weeks
		LB decrease when germination	LB decrease when germination	LB decrease when 4 weeks
	Radicle	PSV aggregate when 8 weeks	PSV aggregate when 4 weeks	PSV aggregate when 4 weeks
		LB decrease when 8 weeks	LB decrease when 4 weeks	LB decrease when 4 weeks
Seedling growth	quality index - survival rate ↑	quality index ↓ survival rate ↑	quality index ↓ survival rate ↓	




陸、參考文獻

- 郭華仁。2015。種子學。臺大出版中心。
- 陳家全、李家維、楊瑞森。1991。生物電子顯微鏡學。行政院國家科學委員會精密儀器發展中心。
- 陳舜英。1997。光度及氮肥對三斗石櫟苗木形質生長暨林地表現之影響。國立臺灣大學森林學研究所造林組碩士論文。
- 陳舜英、簡慶德、陳昱成、張萬龍。1999。珊瑚樹種子之休眠和發芽促進。植物種苗 1 (2) : 101-110。
- 陳舜英、李玟諭、韓明琦、王義仲、簡慶德。2005。離層酸與激勃素對布氏稠李種子休眠與發芽的影響。臺灣林業科學 20 (3) : 227-237。
- 許弘諭。2010。華山松種子發芽與不同階段之低溫層積處理改變華山松種子胚部激勃素和離層酸濃度之研究。國立臺灣大學森林環境暨資源學系研究所碩士論文。
- 許圳塗、馬溯軒、蔡幸鈴、李阿嬌。1999。流蘇胚發育期胚芽與胚根之不同步休眠。植物種苗 1 (1) : 19-34。
- 許碧如、簡慶德、陳昱成。2000。山櫻花種子的發芽促進和儲藏。中華林學季刊 33 (2) : 283-289。
- 彭上豪。2011。層積與激勃素處理對霧社櫻、阿里山櫻種子休眠解除及發芽之效應。國立宜蘭大學森林暨自然資源學系碩士論文。
- 楊正釗、林讚標。1999。五種槭樹之種子儲藏性質。臺灣林業科學 14(4) : 479-92。
- 簡慶德、楊佳如、鍾永立、林讚標。1995。暖溫和低溫之組合層積促進臺灣紅豆杉種子的發芽。林業試驗所研究報告季刊 10 (3) : 331-336。
- 簡慶德、洪昆源、林素惠。1998。層積處理對杜英和繁花薯豆種子休眠和發芽之影響。臺灣林業科學 13 (3) : 219-224。
- 簡慶德、陳昱成、陳舜英、洪昆源。2000。楊梅屬種子的休眠解除策略。臺灣林業科學 15 (4) : 473-481。
- Adams, C., Y. Abdulla, and O. Bayliss. 1967. Osmium tetroxide as a histochemical and histological reagent. *Histochemie*. 9:68-77.
- Ali-Rachedi, S., D. Bouinot, M.-H. Wagner, M. Bonnet, B. Sotta, P. Grappin, and M.

- 
- Jullien. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 219:479-488.
- Allen, E., A. Moing, T.M. Ebbels, M. Maucourt, A.D. Tomos, D. Rolin, and M.A. Hooks. 2010. Correlation Network Analysis reveals a sequential reorganization of metabolic and transcriptional states during germination and gene-metabolite relationships in developing seedlings of *Arabidopsis*. *BMC systems biology*. 4:62.
- Amen, R.D. 1968. A model of seed dormancy. *The Botanical Review*. 34:1-31.
- Angelovici, R., A. Fait, A.R. Fernie, and G. Galili. 2011. A seed high-lysine trait is negatively associated with the TCA cycle and slows down *Arabidopsis* seed germination. *New Phytologist*. 189:148-159.
- APG II . 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141:399-436.
- Arteca, R.N. 1996. *Plant Growth Substances: Principles and Applications*. Springer, Berlin.
- Ashford, A., W. Barclay, C. Weaver, T. Giddings, and S. Zeller. 2000. Electron microscopy may reveal structure of docosahexaenoic acid-rich oil within *Schizochytrium* sp. *Lipids*. 35:1377-1387.
- Bachelard, E. 1968. Effects of seed treatments with gibberellic acid on subsequent growth of some eucalypt seedlings. *New Phytologist*. 67:595-604.
- Balachandran, C., C. Arumughan, and A. Mathew. 1985. Distribution of major chemical constituents and fatty acids in different regions of coconut endosperm. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 62:1583-1586.
- Balaguera-Lopez, H., J. Cardenas-Hernandez, and J. Alvarez-Herrera. 2008. Effect of gibberellic acid (GA3) on seed germination and growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *In International Symposium on Tomato in the Tropics* 821. 141-148.
- Baskin, C.C., and J.M. Baskin. 2014. *Seed: Ecology, Biogeography, Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego.
- Baskin, J.M., and C.C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14:1-16.
- Bennet-Clark, T., and N. Kefford. 1953. Chromatography of the growth substances in plant extracts. *Nature*. 171:645-647.
- Bensen, R.J., F.D. Beall, J.E. Mullet, and P.W. Morgan. 1990. Detection of endogenous gibberellins and their relationship to hypocotyl elongation in soybean seedlings. *Plant physiology*. 94:77-84.
- Bewley, J.D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*. 9:1055-1066.


- 
- Bewley, J.D. 2001. Seed Germination and Reserve Mobilization. *eLS*.
- Bewley, J.D., and M. Black. 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination. Plenum Press, New York.
- Bewley, J.D., K.J. Bradford, H.W. Hilhorst, and H. Nonogaki. 2012. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. Springer-Verlag, New York.
- Bozzola, J.J., and L.D. Russell. 1999. Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury.
- Brenner, M.L., and N. Cheikh. 1995. The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. *In Plant hormones*. Springer. 649-670.
- Bronner, R. 1975. Simultaneous Demonstration of Lipids and Starch in Plant Tissues. *Stain Technology*. 50:1-4.
- Cadman, C.S., P.E. Toorop, H.W. Hilhorst, and W.E. Finch-Savage. 2006. Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *The Plant Journal*. 46:805-822.
- Chen, S.-Y., C.-T. Chien, J.M. Baskin, and C.C. Baskin. 2010. Storage behavior and changes in concentrations of abscisic acid and gibberellins during dormancy break and germination in seeds of *Phellodendron amurense* var. *wilsonii* (Rutaceae). *Tree physiology*. 30:275-284.
- Chen, S.-Y., C.-T. Chien, J.-D. Chung, Y.-S. Yang, and S.-R. Kuo. 2007. Dormancy-break and germination in seeds of *Prunus campanulata* (Rosaceae): role of covering layers and changes in concentration of abscisic acid and gibberellins. *Seed Science Research*. 17:21-32.
- Chen, S.-Y., S.-H. Chou, C.-C. Tsai, W.-Y. Hsu, C.C. Baskin, J.M. Baskin, C.-T. Chien, and L.-L. Kuo-Huang. 2015. Effects of moist cold stratification on germination, plant growth regulators, metabolites and embryo ultrastructure in seeds of *Acer morrisonense* (Sapindaceae). *Plant Physiology and Biochemistry*. 94:165-173.
- Chen, S.-Y., S.-R. Kuo, and C.-T. Chien. 2008. Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds. *Tree Physiology*. 28:1431-1439.
- Cheng, F.-y., and X.-j. Du. 2008. Effects of Chilling and Gibberellic Acid on the Seed Germination and Seedling Growth in *Paeonia ostii* Feng Dan¹. *Acta Horticulturae Sinica*. 35:553.
- Chien, C.-T., L.-L. Kuo-Huang, and T.-P. Lin. 1998. Changes in Ultrastructure and Abscisic Acid Level, and Response to Applied Gibberellins in *Taxus mairei* Seeds Treated With Warm and Cold Stratification. *Annals of Botany*. 81:41-47.
- Chien, C.-T., L.-L. Kuo-Huang, Y.-C. Shen, R. Zhang, S.-Y. Chen, J.-C. Yang, and R.P. Pharis. 2004. Storage Behavior of *Chionanthus retusus* Seed and Asynchronous Development of the Radicle and Shoot Apex during Germination in Relation to

- Germination Inhibitors, Including Abscisic Acid and Four Phenolic Glucosides. *Plant and Cell Physiology*. 45:1158-1167.
- Chien, C., S. Chen, S. Chang, and J. Chung. 2006. Dormancy and germination in seeds of the medicinal Asian tree species *Phellodendron amurense* var. *wilsonii* (Rutaceae). *Seed Science and Technology*. 34:561-571.
- Corbineau, F., J. Bianco, G. Garelo, and D. Côme. 2002. Breakage of *Pseudotsuga menziesii* seed dormancy by cold treatment as related to changes in seed ABA sensitivity and ABA levels. *Physiologia Plantarum*. 114:313-319.
- Cornforth, J., B. Milborrow, and G. Ryback. 1965. Synthesis of (+/-)-Abscisin II. *Nature*. 206:715.
- Cutler, A.J., and J.E. Krochko. 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends in plant science*. 4:472-478.
- Dawidowicz-Grzegorzewska, A. 1989. Degradation of protein and lipid bodies during dormancy removal in apple seeds. *Journal of plant physiology*. 135:43-51.
- Dawidowicz-Grzegorzewska, A., and B. Zarska-Maciejewska. 1979. Anatomy, histochemistry and cytology of dormant and stratified apple embryos. II. Storage protein degradation and correlated nucleoli development. *New Phytologist*:385-393.
- Debeaujon, I., and M. Koornneef. 2000. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant physiology*. 122:415-424.
- Dekkers, B.J., and S. Smeekens. 2007. Sugar and abscisic acid regulation of germination and transition to seedling growth. *Annual Plant Reviews Volume 27: Seed Development, Dormancy and Germination*:305-327.
- Deng, Z.J., X.F. Hu, X.R. Ai, L. Yao, S.M. Deng, X. Pu, and S.Q. Song. 2015. Dormancy release of *Cotinus coggygia* seeds under a pre-cold moist stratification: an endogenous abscisic acid/gibberellic acid and comparative proteomic analysis. *New Forests*:1-14.
- Depuydt, S., and C.S. Hardtke. 2011. Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current Biology*. 21:R365-R373.
- Derkx, M., and C. Karssen. 1993a. Effects of light and temperature on seed dormancy and gibberellin-stimulated germination in *Arabidopsis thaliana*: studies with gibberellin-deficient and-insensitive mutants. *Physiologia Plantarum*. 89:360-368.
- Derkx, M., and C. Karssen. 1993b. Variability in light-, gibberellin-and nitrate requirement of *Arabidopsis thaliana* seeds due to harvest time and conditions of dry storage. *Journal of Plant Physiology*. 141:574-582.
- Dickson, A., A.L. Leaf, and J.F. Hosner. 1960. Quality appraisal of white spruce and white

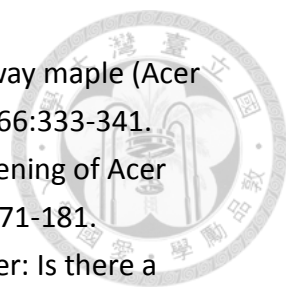
- 
- pine seedling stock in nurseries. *The Forestry Chronicle*. 36:10-13.
- Durbak, A., H. Yao, and P. McSteen. 2012. Hormone signaling in plant development. *Current opinion in plant biology*. 15:92-96.
- Dure, L., and L. Waters. 1965. Long-lived messenger RNA: evidence from cotton seed germination. *Science*. 147:410-412.
- Eastmond, P.J., and I.A. Graham. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in plant science*. 6:72-78.
- Eira, M.T., and L.S. Caldas. 2000. Seed dormancy and germination as concurrent processes. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12:85-104.
- El-Fouly, M., R. Sakr, M. Fouad, A. Zaher, and A. Fawzi. 1988. Effect of GA, CCC and B-9 on Morphophysiological Characters and Yield of Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*. 160:94-101.
- Enu-Kwesi, L., and E. Dumbroff. 1978. Changes in abscisic acid in the embryo and covering structures of *Acer saccharum* during stratification. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 86:371-377.
- Fait, A., R. Angelovici, H. Less, I. Ohad, E. Urbanczyk-Wochniak, A.R. Fernie, and G. Galili. 2006. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant physiology*. 142:839-854.
- Fedeli, E., G. Favini, F. Camurati, and G. Jacini. 1968. Regional differences of lipid composition in morphologically distinct fatty tissues: III. Peanut seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 45:676-679.
- Fernández, H., P. Dumas, and M. Bonnet-Masimbert. 1997. Quantification of GA1, GA3, GA4, GA7, GA8, GA9, GA19 and GA20; and GA20 metabolism in dormant and non-dormant beechnuts. *Plant growth regulation*. 22:29-35.
- Feurtado, J.A., S.J. Ambrose, A.J. Cutler, A.R. Ross, S.R. Abrams, and A.R. Kermode. 2004. Dormancy termination of western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds is associated with changes in abscisic acid metabolism. *Planta*. 218:630-639.
- Finch-Savage, W.E., and G. Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*. 171:501-523.
- Finkelstein, R., W. Reeves, T. Ariizumi, and C. Steber. 2008. Molecular Aspects of Seed Dormancy*. *Plant Biology*. 59:387.
- Finley, D.S. 1999. Patterns of calcium oxalate crystals in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. *Revista de biología tropical*. 47:27-31.
- Franceschi, V.R., and P.A. Nakata. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:41-71.
- Fu, X., H. Liu, J. Xu, J. Tang, and X. Shang. 2014. Primary metabolite mobilization and

- 
- hormonal regulation during seed dormancy release in *Cornus japonica* var. *chinensis*. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 29:542-551.
- Gadek, P.A., E.S. Fernando, C.J. Quinn, S.B. Hoot, T. Terrazas, M.C. Sheahan, and M.W. Chase. 1996. Sapindales: molecular delimitation and infraordinal groups. *American Journal of Botany*:802-811.
- Gahan, P.B. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. Academic Press, New York.
- Gallardo, K., C. Job, S.P. Groot, M. Puype, H. Demol, J. Vandekerckhove, and D. Job. 2002. Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiology*. 129:823-837.
- Gianinetti, A., and P. Vernieri. 2007. On the role of abscisic acid in seed dormancy of red rice. *Journal of experimental botany*. 58:3449-3462.
- Gibon, Y., B. Usadel, O.E. Blaesing, B. Kamlage, M. Hoehne, R. Trethewey, and M. Stitt. 2006. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. *Genome biology*. 7:R76.
- Goggin, D.E., K.J. Steadman, R.N. Emery, S.C. Farrow, R.L. Benech-Arnold, and S.B. Powles. 2009. ABA inhibits germination but not dormancy release in mature imbibed seeds of *Lolium rigidum* Gaud. *Journal of experimental botany*. 60:3387-3396.
- Grimm, G., T. Denk, and V. Hemleben. 2007. Evolutionary history and systematics of Acer section Acer—a case study of low-level phylogenetics. *Plant Systematics and Evolution*. 267:215-253.
- Groot, S.P., B. Kieliszewska-Rokicka, E. Vermeer, and C.M. Karssen. 1988. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*. 174:500-504.
- Hance, B.A., and J.M. Bevington. 1992. Changes in protein synthesis during stratification and dormancy release in embryos of sugar maple (*Acer saccharum*). *Physiologia Plantarum*. 86:365-371.
- Harrington, M.G., K.J. Edwards, S.A. Johnson, M.W. Chase, and P.A. Gadek. 2005. Phylogenetic inference in Sapindaceae sensu lato using plastid matK and rbcL DNA sequences. *Systematic Botany*:366-382.
- He, D., C. Han, J. Yao, S. Shen, and P. Yang. 2011. Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics*. 11:2693-2713.
- Hedden, P., and S.G. Thomas. 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*. 444:11-25.
- Hidayati, S.N., J.M. Baskin, and C.C. Baskin. 2000. Morphophysiological dormancy in seeds of two North American and one Eurasian species of *Sambucus*

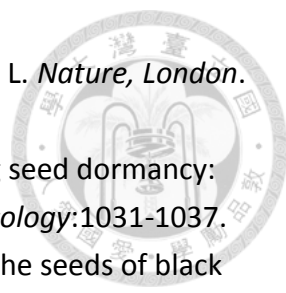
- (Caprifoliaceae) with underdeveloped spatulate embryos. *American Journal of Botany*. 87:1669-1678.
- Hilhorst, H., and C. Karszen. 1992. Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant growth regulation*. 11:225-238.
- Huang, S.-F., R.E. Ricklefs, and P.H. Raven. 2002. Phylogeny and Historical Biogeography of Acer I- Study History of the Infrageneric Classification. *TAIWANIA*. 47:203-218.
- Ilarslan, H., R. Palmer, and H. Horner. 2001. Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. *Annals of Botany*. 88:243-257.
- Jacobsen, J.V., D.W. Pearce, A.T. Poole, R.P. Pharis, and L.N. Mander. 2002. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiologia Plantarum*. 115:428-441.
- Jawad, J.T., A.V. Lombana, K.A. Moore, J.M. Rhode, and H. Woods. 2000. A review of issues in seagrass seed dormancy and germination: implications for conservation and restoration. *Mar Ecol Prog Ser*. 200:277-288.
- Joosen, R.V.L., D. Arends, Y. Li, L.A. Willems, J.J. Keurentjes, W. Ligterink, R.C. Jansen, and H.W. Hilhorst. 2013. Identifying genotype-by-environment interactions in the metabolism of germinating arabidopsis seeds using generalized genetical genomics. *Plant physiology*. 162:553-566.
- Karszen, C., D. Brinkhorst-Van der Swan, A. Breekland, and M. Koornneef. 1983. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*. 157:158-165.
- Karszen, C., and E. Lacka. 1986. A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. In *Plant Growth Substances 1985*. Springer. 315-323.
- Karszen, C., S. Zagorski, J. Kepczynski, and S. Groot. 1989. Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany*. 63:71-80.
- Kaye, T.N., A. Liston, R. Love, D. Luoma, R. Meinke, and M. Wilson. 1997. Seed dormancy in high elevation plants: implications for ecology and restoration. *Kaye, TN, et al*:115-120.
- Kepinski, S. 2006. Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Current opinion in plant biology*. 9:28-34.
- Kermode, A.R. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*. 24:319-344.
- Khan, A.A. 1975. Primary, preventive and permissive roles of hormones in plant systems. *The Botanical Review*. 41:391-420.

- 
- Koornneef, M., L. Bentsink, and H. Hilhorst. 2002. Seed dormancy and germination. *Current opinion in plant biology*. 5:33-36.
- Kucera, B., M.A. Cohn, and G. Leubner-Metzger. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*. 15:281-307.
- Kurosawa, E. 1926. Experimental studies on the nature of the substance secreted by the "bakanae" fungus. *Nat. Hist. Soc. Formosa*. 16:213-227.
- Leite, V.M., C.A. Rosolem, and J.D. Rodrigues. 2003. Gibberellin and cytokinin effects on soybean growth. *Scientia Agricola*. 60:537-541.
- Leubner-Metzger, G. 2003. Functions and regulation of β -1, 3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Science Research*. 13:17-34.
- Lewak, S. 2011. Metabolic control of embryonic dormancy in apple seed: seven decades of research. *Acta physiologiae plantarum*. 33:1-24.
- Leymarie, J., G. Vitkauskaité, H.H. Hoang, E. Gendreau, V. Chazoule, P. Meimoun, F. Corbineau, H. El-Maarouf-Bouteau, and C. Bailly. 2012. Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. *Plant and Cell Physiology*. 53:96-106.
- Li, H.-L., and H.-C. Lo. 1993. Aceraceae. Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Taipei.
- Li, J., J. Yue, and S. Shoup. 2006. Phylogenetics of Acer (Aceroidae, Sapindaceae) based on nucleotide sequences of two chloroplast non-coding regions. *Harvard Papers in Botany*:101-115.
- Li, L., and J.D. Ross. 1990a. Lipid mobilization during dormancy breakage in oilseed of *Corylus avellana*. *Annals of Botany*. 66:501-505.
- Li, L., and J.D. Ross. 1990b. Starch synthesis during dormancy breakage in oilseed of *Corylus avellana*. *Annals of Botany*. 66:507-512.
- Logan, D.C., A.H. Millar, L.J. Sweetlove, S.A. Hill, and C.J. Leaver. 2001. Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiology*. 125:662-672.
- Luckwill, L. 1952. Growth-inhibiting and growth-promoting substances in relation to the dormancy and after-ripening of apple seeds. *Journal of Horticultural Science*. 27:53-67.
- Müntz, K., M. Belozersky, Y. Dunaevsky, A. Schlereth, and J. Tiedemann. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*. 52:1741-1752.
- MacMillan, J., and N. Takahashi. 1968. Proposed procedure for the allocation of trivial

- names to the gibberellins.
- Malinowski, T., and Z. Szczotka. 2014. Qualitative changes in the proteins of cotyledons during cold and warm stratification of *Acer platanoides* seeds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 70:17-23.
- Mehanna, H.T., G.C. Martin, and C. Nishijima. 1985. Effects of temperature, chemical treatments and endogenous hormone content on peach seed germination and subsequent seedling growth. *Scientia Horticulturae*. 27:63-73.
- Metzger, J.D. 1995. Hormones and reproductive development. *In Plant hormones*. Springer. 617-648.
- Mislevy, P., K. Boote, and F. Martin. 1989. Soybean response to gibberellic acid treatments. *Journal of plant growth regulation*. 8:11-18.
- Nakata, P.A. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science*. 164:901-909.
- Naylor, R. 1981. An evaluation of various germination indices for predicting differences in seed vigour in Italian ryegrass. *Seed Science and Technology (Netherlands)*. 9:593-600.
- Nezamdoost, T., F. Tamaskani, A. Abdolzadeh, and H.R. Sadeghipour. 2009. Lipid mobilization, gluconeogenesis and ageing-related processes in dormant walnut kernels during moist chilling and warm incubation. *Seed Science Research*. 19:91-101.
- Nicolás, C., G. Nicolás, and D. Rodríguez. 1996. Antagonistic effects of abscisic acid and gibberellic acid on the breaking of dormancy of *Fagus sylvatica* seeds. *Physiologia Plantarum*. 96:244-250.
- Nikolaeva, M. 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. *Physiology and Biochemistry of Seed dormancy and Germination*.
- Nikolaeva, M.G. 1969. Physiology of deep dormancy in seeds.
- Nonogaki, H. 2006. Seed germination-The biochemical and molecular mechanisms. *Breeding Science*. 56:93-105.
- Nonogaki, H. 2008. Seed germination and reserve mobilization. *eLS*.
- Ohkuma, K., J. Lyon, F. Addicott, and O. Smith. 1963. Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science*. 142:1592-1593.
- Olszewski, N., T.-p. Sun, and F. Gubler. 2002. Gibberellin signaling biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell*. 14:S61-S80.
- Pandey, V.C., K. Singh, J.S. Singh, A. Kumar, B. Singh, and R.P. Singh. 2012. *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16:2870-2883.
- Pawłowski, T., Z. Szczotka, and K. Krawiarz. 2014. Qualitative changes and dynamics of

- 
- protein synthesis during cold and warm stratification of Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 66:333-341.
- Pinfield, N., and H. Davies. 1978. Hormonal changes during after-ripening of *Acer platanoides* L. seeds. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 90:171-181.
- Pinfield, N., P. Stutchbury, and S. Bazaid. 1987. Seed dormancy in *Acer*: Is there a common mechanism for all *Acer* species and what part is played in it by abscisic acid? *Physiologia Plantarum*. 71:365-371.
- Pinfield, N., P. Stutchbury, S. Bazaid, and V. Gwarazimba. 1990. Abscisic acid and the regulation of embryo dormancy in the genus *Acer*. *Tree physiology*. 6:79-85.
- Powell, L.E. 1987. The hormonal control of bud and seed dormancy in woody plants. In *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Springer. 539-552.
- Rajjou, L., M. Duval, K. Gallardo, J. Catusse, J. Bally, C. Job, and D. Job. 2012. Seed germination and vigor. *Annual review of plant biology*. 63:507-533.
- Ray, D.K., N. Ramankutty, N.D. Mueller, P.C. West, and J.A. Foley. 2012. Recent patterns of crop yield growth and stagnation. *Nature communications*. 3:1293.
- Reid, B., and S.H. Howell. 1995. The functioning of hormones in plant growth and development. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands:4848-4485.
- Ritchie, S., and S. Gilroy. 1998. Gibberellins: regulating genes and germination. *New phytologist*. 140:363-383.
- Rock, C.D., and R.S. Quatrano. 1995. The role of hormones during seed development. In *Plant hormones*. Springer. 671-697.
- Roller, K.J. 1976. Field performance of container-grown Norway and black spruce seedlings. *Can. For. Serv. Dept. Environ. Inf. Rep. M-X-64*.
- Rosental, L., H. Nonogaki, and A. Fait. 2014. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*. 24:1-15.
- Ruzin, S.E. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, Oxford.
- Sánchez-Rodríguez, C., I. Rubio-Somoza, R. Sibout, and S. Persson. 2010. Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends in plant science*. 15:291-301.
- Schmitz, N., S.R. Abrams, and A.R. Kermode. 2000. Changes in abscisic acid content and embryo sensitivity to (+)-abscisic acid during the termination of dormancy of yellow cedar seeds. *Journal of Experimental Botany*. 51:1159-1162.
- Schmitz, N., S.R. Abrams, and A.R. Kermode. 2002. Changes in ABA turnover and sensitivity that accompany dormancy termination of yellow-cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*) seeds. *Journal of Experimental Botany*.

- 53:89-101.
- Schopmeyer, C.S. 1974. Seeds of woody plants in the United States. *Agriculture Handbook, US Department of Agriculture*.
- Seo, M., and T. Koshiba. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in plant science*. 7:41-48.
- Shani, E., O. Yanai, and N. Ori. 2006. The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current opinion in plant biology*. 9:484-489.
- Sheoran, I.S., D.J. Olson, A.R. Ross, and V.K. Sawhney. 2005. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. *Proteomics*. 5:3752-3764.
- Silva Garza, M., H. Gámez González, F. Zavala García, B. Cuevas Hernández, and M. Rojas Garcidueñas. 2001. Efecto de cuatro fitorreguladores comerciales en el desarrollo y rendimiento del girasol. *Ciencia UANL*. 4:69-75.
- Singh, D.P., A.M. Jermakow, and S.M. Swain. 2002. Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 14:3133-3147.
- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*. 26:31-43.
- Sreenivasulu, N., B. Usadel, A. Winter, V. Radchuk, U. Scholz, N. Stein, W. Weschke, M. Strickert, T.J. Close, and M. Stitt. 2008. Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant physiology*. 146:1738-1758.
- Sun, T.-p., and F. Gubler. 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:197-223.
- Taylor, J., and P. Wareing. 1979. The effect of stratification on the endogenous levels of gibberellins and cytokinins in seeds of douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) and sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.). *Plant, Cell & Environment*. 2:165-171.
- Thomas, S.G., I. Rieu, and C.M. Steber. 2005. Gibberellin metabolism and signaling. *Vitamins & Hormones*. 72:289-338.
- Tillberg, E. 1983. Levels of endogenous abscisic acid in achenes of *Rosa rugosa* during dormancy release and germination. *Physiologia Plantarum*. 58:243-248.
- Van Staden, J., D. Webb, and P. Wareing. 1972. The effect of stratification on endogenous cytokinin levels in seeds of *Acer saccharum*. *Planta*. 104:110-114.
- Vettakkorumakankav, N.N., D. Falk, P. Saxena, and R.A. Fletcher. 1999. A crucial role for gibberellins in stress protection of plants. *Plant and cell physiology*. 40:542-548.
- Villiers, T., and P. Wareing. 1960. Interaction of growth inhibitor and a natural

- 
- germination stimulator in the dormancy of *Fraxinus excelsior* L. *Nature, London*. 185:112-114.
- Vleeshouwers, L., H. Bouwmeester, and C. Karszen. 1995. Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology*:1031-1037.
- Wang, B., and P. Berjak. 2000. Beneficial effects of moist chilling on the seeds of black spruce (*Picea mariana* [Mill.] BSP). *Annals of Botany*. 86:29-36.
- Webb, D., and E. Dumbroff. 1969. Factors influencing the stratification process in seeds of *Acer saccharum*. *Canadian Journal of Botany*. 47:1555-1563.
- Webb, D., J. Van Staden, and P. Wareing. 1973. Seed dormancy in *Acer*: Changes in endogenous cytokinins, gibberellins and germination inhibitors during the breaking of dormancy in *Acer saccharum* Marsh. *Journal of experimental botany*. 24:105-116.
- Webb, M., and H. Arnott. 1982. A survey of calcium oxalate crystals and other mineral inclusions in seeds. *Scanning Electron Microscopy*. 3:1109-1131.
- Weitbrecht, K., K. Müller, and G. Leubner-Metzger. 2011. First off the mark: early seed germination. *Journal of experimental botany*. 62:3289-3309.
- White, M.J., and J.N. Lott. 1983. Protein body inclusions in seeds of *Eucalyptus maculata* and *Eucalyptus erythrocorys*. *Canadian Journal of Botany*. 61:1911-1918.
- Yabuta, T. 1938. On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*. 14:1526.
- Yang, P., X. Li, X. Wang, H. Chen, F. Chen, and S. Shen. 2007. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. *Proteomics*. 7:3358-3368.
- Yen, S., and O. Carter. 1972. The effect of seed pretreatment with gibberellic acid on germination and early establishment of grain sorghum. *Animal Production Science*. 12:653-661.
- Yomo, H., and J. Varner. 1973. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. *Plant physiology*. 51:708-713.
- Zeevaart, J., and R. Creelman. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 39:439-473.
- Zhang, Z., C. Li, and J. Li. 2010. Conflicting phylogenies of section *Macrantha* (*Acer*, *Aceroidae*, *Sapindaceae*) based on chloroplast and nuclear DNA. *Systematic botany*. 35:801-810.