

## 研究報告

## 台灣油杉人工授粉對種子生產效應與葉綠體DNA遺傳

鍾振德<sup>1,3)</sup> 洪西洲<sup>2)</sup> 簡慶德<sup>1)</sup>

## 摘 要

台灣油杉僅分布於台灣本島之南北兩端，族群稀少，結實率低，已被列為積極保育之固有樹種。本研究於2002~2010年間，在7個地點共採集10株母樹之天然授粉毬果，包括人工栽植之台北植物園、台北麗水街、陽明山、羅東出水溪、福山植物園，及坪林金瓜寮與石槽等2處原生地。台北植物園飽滿種子率低於1%，而麗水街與陽明山兩地為獨立木，飽滿種子來自自花授粉，有效種子率0.03~3.4%，但在2004年兩株有效種子率卻分別為10.1與7.1%。2009年坪林金瓜寮與石槽，有效種子率分別為2.8與19.1%。台灣油杉豐歉年沒有一定規律性，一般3~5年1次豐年，豐年過後翌年是歉年，不同地點豐歉年的毬果數量差異很大。人工控制授粉試驗，以陽明山與台東達仁種源母樹為花粉源，自花授粉毬果之有效種子率為0.08%，異花授粉毬果之有效種子率為14.7~37.9%。採集自坪林與達仁母樹之新鮮花粉含水率約14.5%，花粉發芽率71~95%，經真空冷凍乾燥後之花粉發芽率53~96%。此乾燥之花粉儲藏在-20°C經5年後進行輔助授粉試驗，結果顯示每毬果的有效種子率可達5.0~48.2%，遠比天然授粉高。利用葉綠體DNA基因

關鍵詞：台灣油杉、天然授粉、控制授粉、輔助授粉、有效種子、葉綠體DNA。

鍾振德、洪西洲、簡慶德。2016。台灣油杉人工授粉對種子生產效應與葉綠體DNA遺傳。台灣林業科學31(3):181-97。

<sup>1)</sup> 林業試驗所育林組，10066台北市南海路53號 Division of Silviculture, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

<sup>2)</sup> 林務局羅東林區管理處台北工作站，10642台北市潮州街61號 Taipei Ranger Station, Luodong Forest District Office, Forestry Bureau, 61 Chaozhou St., Taipei 10642, Taiwan.

<sup>3)</sup> 通訊作者 Corresponding author, e-mail:chung@tfri.gov.tw

2015年7月送審 2015年9月通過 Received July 2015, Accepted September 2015.

Research paper

## Effects of Cross Pollination on Seed Production and the Inheritance of Chloroplast DNA in *Keteleeria davidiana* var. *formosana*

Jeng-Der Chung,<sup>1,3)</sup> Shi-Chou Hung,<sup>2)</sup> Ching-Te Chien<sup>1)</sup>

【 Summary 】

*Keteleeria davidiana* var. *formosana* is an indigenous tree native only to the northern Pinglin and southern Dawu areas of Taiwan. It is listed as a protected species by the Taiwanese government due to the scarcity of its populations and low seed production. Cones of 10 naturally pollinated *Keteleeria* mother trees were collected from the Taipei Botanical Garden, Taipei's Lishui Street, Yangmingshan, Chushui River nursery, Fushan Botanical Garden, Pinglin's Jinguaiiao River, and Pinglin's Shicao in 2002~2010. The number of filled seeds to total number (filled+empty) of seeds per cone was consistently < 1% in the Taipei Botanical Garden. Single mother trees at Lishui Street and Yangmingshan were naturally self-pollinated, and seed efficiency per cone ranged 0.03~3.4% during the study period, except for cones collected in 2004 for which seed efficiencies per cone were 10.1 and 7.1%, respectively. The mother trees at Pinglin's Jinguaiiao River and Pinglin's Shicao were located in natural populations, and seed efficiencies per cone, which were determined only in 2009, were 2.8 and 19.1%, respectively. Cone production was irregular, with good mastings every 3~5 yr. Cone production varied from 1 population to another during a good masting year, and it also differed within a population, i.e., some mother trees produced abundant cones but others did not. For controlled pollination, pollen of 1 genotype from Yangmingshan and 1 from southern Daren were used. Seed efficiencies per cone for both areas were 14.7~37.9% in controlled pollination compared to 0.08% for self-pollination. For supplemental mass pollination, dried pollen with 53~96% germination stored at -20°C for 5 yr was used. Seed efficiencies per cone ranged 5.0~48.2%, which were greater than that of natural pollination. *trnD-trnY* and *trnV* intron intergenic spacer analyses showed that chloroplast DNA is paternally inherited.

**Key words:** *Keteleeria davidiana* var. *formosana*, natural pollination, controlled pollination, supplemental mass pollination, seed efficiency, chloroplast DNA.

**Chung JD, Hung SC, Chien CT. 2016.** Effects of cross pollination on seed production and the inheritance of chloroplast DNA in *Keteleeria davidiana* var. *formosana*. *Taiwan J For Sci* 31(3):181-97.

### 緒言

台灣油杉(*Keteleeria davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.)為松科油杉屬，為我國文化

資產保存法定珍貴稀有樹種，於本島南北兩端呈不連續分布；北部產於姑婆寮溪與金瓜寮

溪之分水嶺、礁溪與石牌之分水嶺及坪林海拔300~600 m之處；南部族群見於枋寮山克拉油社附近海拔900 m，大武溪大武事業區第30林班海拔500 m之向陽地帶，其族群相當稀少，結實率低，是林務局積極保育的樹種(Liu 1966, Liu and Tang 1998)。

台灣油杉呈不連續分布有不同論述，Kanehira (1936)認為係因冰期時台灣與大陸相連之陸橋露出水面，油杉分布成輻射狀擴張，連續分布中斷。Liu (1966)支持其說法，認為台灣位置與福建相對，北端與浙江相接而南端與廣東相連，故坪林種源可能來自浙江及福建，而大武種源或由雲南經廣西、廣東而至台灣。Tsukada (1966)指出日月潭沉積物層發現台灣油杉花粉。因此，台灣油杉族群在冰期時，可能台灣中部亦有分布，而冰期過後族群消失至目前只有南北兩地。

由於台灣油杉族群隔離且株數少，族群內之單株遺傳相似度理論上應該很高，但Wang (1995)利用RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)分析南北兩個族群基因歧異度顯示，族群內單株遺傳相似度，北部坪林平均為0.83，大武30林班為0.80，大武41林班為0.86，相似度並沒有想像中的高，因為比較台灣固有針葉樹紅檜與扁柏，其遺傳相似度為0.995與0.996 (Lin et al. 1994)。另外，Wang (1995)認為台灣油杉單株間遺傳變異約20%，對針葉樹而言變異不算太小，而且族群間有明顯的遺傳區隔，因此建議每一株都具有代表性，應妥為保護。

台灣油杉葉線形螺旋狀著生，花雌雄同株，風媒花，花粉大小約60  $\mu\text{m}$ ，成熟時呈金黃色，花粉兩側具氣囊以協助傳粉，雌花綻放時珠孔常分泌授粉滴以接受花粉，授粉後珠孔閉合，形成倒生胚珠；毬果長約5~12 cm直立生長，種子11~12月成熟，長度約1 cm，具翅，倒生於種鱗內側，每1種鱗具2枚種子(Wang 1987, Chung and Hung 2011)。

台灣油杉種子通常呈空粒現象，日治時期中央研究所林業部第7號報告，1925年在台北植物園採集台灣油杉100粒毬果，得到11,100粒

種子，只有22粒飽滿，比率為0.2% (Formosa Government Research Institute 1929)。台北植物園台灣油杉原有70餘株，1978年林試所採集其中9株的毬果，發現飽滿種子僅佔大粒種子數的3.5% (鍾永立，未發表資料)。Wang (1987)亦發現台北植物園台灣油杉種子85%為空粒，發芽率僅0.5%。Ho and Yang (1995)調查台北植物園台灣油杉種子的飽滿度，發現99%的大粒種子多屬空粒，顯示利用台灣油杉種子以獲得樹苗率相當低。Ho et al. (2000)於1995年採自坪林台灣油杉原生地13粒毬果，平均有效種子率約2%。日治時期在1925年於原生地枋寮山克拉油社，得到538粒種子，只有18粒飽滿，比率為3.34%；大武原生地得到1123粒種子，只有68粒飽滿，比率為6.06% (Formosa Government Research Institute 1929)。Owens et al. (1991)指出一般松類與異花授粉的顯花植物有效種子率為39%，因此台灣油杉在原生地的有效種子率偏低。一般針葉樹有明顯的豐歉年(Fowells and Schubert 1956)，而過去調查台灣油杉的有效種子率偏低現象，是否適逢歉年所致？

台灣油杉空粒種子形成原因，Ho et al. (2000) 1993~1998年間，探討台北植物園台灣油杉天然授粉毬果與種子的發育，結果有效種子率每年不到1%，探究原因發現大粒種子80%均有授精，且發育從多胚期到帶有子葉胚期，但到成熟胚階段卻完全敗育。Willson and Burley (1983)與Sedgley and Griffin (1989)指出，松柏類利用多胚期篩選出優勢胚，故受精前胚珠敗育少，但多胚期之後的敗育率高；而被子植物則發展不同的策略，利用花粉與珠心(柱頭)的親和反應，抑制近親花粉的發芽，故受精前胚珠的敗育率高。因此，台北植物園台灣油杉種子空粒形成的主要因子，為受精胚敗育。另外，造成現存台灣油杉林有效種子比率偏低的原因，推測是族群密度過稀、授粉不足所致(Ho et al. 2000)。本研究目標藉由天然授粉與人工授粉方法，瞭解受精胚敗育與授粉因子影響種子發育之程度。

Owens et al. (1991)指出多數松柏類自交均會產生嚴重的胚胎敗育率，尤其發生在分裂性

多胚期，可能是隱性致死基因的累積所致。Ho et al. (2000)證實80%台灣油杉大粒種子敗育導因於受精胚在多胚期之敗育，因此推測敗育原因可能來自近親交配所致。然而，花旗松(Orr-Ewing 1957, 1965)、赤松(Sarvas 1962)、大側柏(Owens et al. 1990)等自交胚仍有12~29%存活率，其中大側柏自交胚的敗育率甚至比異交胚還低。因此台灣油杉高胚胎敗育率，是否為近親交配所造成的，需利用同株與異株授粉來證實。

植物區外保育方法，包括設立種子庫、野外基因庫保存園、花粉庫與DNA資料庫等(Laliberté 1997)。台灣油杉已建立無性營養系之野外基因庫保存園(Chung and Hung 2011)，而台灣油杉種子屬於不耐儲藏之異儲型種子，無法進行種子長期儲藏，因此花粉庫為台灣油杉保存的另一個重要項目。針葉樹花粉之經營與管理，包括花粉採集、儲藏與活力檢測，再將花粉利用到種子園種子的生產(Bridgwater and Trew 1981, Jett et al. 1993)，這對稀少的台灣油杉族群來說格外重要。

將台灣油杉南北兩族群藉由控制授粉使其能夠交流，過去並沒有相關報告。台灣油杉天然族群由於受地理的區隔無法交流，族群日趨稀少，若能將這幾個族群藉由控制授粉，遺傳資源得以交流，其族群更能適應地區環境而加以擴大。本研究目標以台北植物園、台北麗水街、陽明山、羅東出水溪、福山植物園及原生地坪林金瓜寮與石槽等地栽植之台灣油杉為材料，取其各自花粉，然後與台東達仁地區花粉進行控制授粉實驗，以提高有效種子率和種子發芽率，並藉由葉綠體DNA標誌檢測後裔苗木，以瞭解台灣油杉葉綠體的遺傳性。

## 材料與方法

### 一、試驗母樹

台灣油杉母樹包括天然林與人工栽植(Table 1)，來自人工栽植之母樹，包括台北植物園(1株)、麗水街(1)、陽明山(1)、羅東出水溪苗圃(2)、福山植物園(3)與台北信賢苗圃(1)等6

處9株母樹。此9株母樹以Wang (1995)方法，檢測DNA證明皆為來自坪林地區之後裔。台北植物園(母樹編號T)與麗水街(L)栽植於日治時期，樹齡超過80年，兩者樹高分別為11與6.5 m，兩株皆栽植於建築物旁且曾經斷頂重萌。此台北植物園母樹周遭3~6 m處尚有8株台灣油杉，麗水街母樹則為獨立木(Table 1a)。陽明山(Y)與出水溪苗圃(C)母樹於1976年栽植，陽明山母樹為獨立木，胸徑已達32.2 cm，出水溪苗圃有兩株母樹，分別為C1與C2，兩者栽植相隔僅6 m，胸徑分別為34 與26 cm (Table 1a)。福山植物園(F)則為1988年栽植，母樹F1, F2與F3皆為台北植物園後裔，周遭共有6株母樹，已屆開花結實年齡(Table 1a)。信賢苗圃(H)為7年生種子苗，胸徑3 cm，試驗時尚未屆開花結實年齡，以激勃素GA<sub>4/7</sub>處理誘導產生雌花，進行控制授粉試驗(鍾振德，未發表資料)。

選自天然林母樹(Table 1b)，母樹D296與D298位於台東達仁，胸徑分別為35與85 cm，樹齡約在100~300年間，所處生育地有46株母樹，已屆開花結實年齡，2002年取其中15株母樹枝條，於台北溫室進行嫁接，砧木為4年生台灣油杉扦插苗，獲得嫁接苗於2006年開始開花結實，進行控制授粉試驗(鍾振德，未發表資料)；母樹PA05與PA14來自坪林金瓜寮，胸徑分別為52.6與50 cm，樹齡介於100~300年間，所處生育地附近有20株母樹，已屆開花結實年齡；母樹PC50來自坪林石槽，胸徑30.6 cm，樹齡介於100~300年間，所處生育地附近有42株母樹，已屆開花結實年齡。

### 二、花粉採集處理、儲藏與活力檢測

台灣油杉雄毬於每年2月底陸續綻放(Wang 1987)，依照不同母樹收集花粉，當雄毬近成熟但花粉尚未飛散時採取其枝條，將枝條切口處置入水中，約3~7天收集散落桌面的花粉。量測新鮮花粉含水率重複3次，秤取新鮮花粉約0.2 g，置入105°C烘箱內，烘乾24 h後量測乾重，由前後重量變化計算含水率，以花粉水分重量占花粉絕乾重量的百分比計算之。

花粉乾燥儲藏採用Matthews and Kraus

**Table 1. Description of the experiment mother trees at different sites  
(a) man-made trees**

Mother tree code	T	L	Y	C1	C2
Location	Taipei Botanical Garden	Lishui Sreet	Yangmingshan	Chushui River nursery	Chushui River nursery
Latitude	25°02'	25°03'	25°09'	24°62'	24°62'
Longitude	121°30'	121°53'	121°37'	121°66'	121°66'
Elevation (m)	5	5	450	250	250
Mother trees	8	1	1	2	2
Year of establishment	1905~1925	1905~1925	1976	1976	1976
Age (yr)	> 80	> 80	27	27	27
Height (m)	11	6.5	10	13	12
DBH (cm)	31.5	52	32.2	34	26
Mother tree code	F1	F2	F3	H	
Location	Fushan Botanical Garden	Fushan Botanical Garden	Fushan Botanical Garden	Hsinsien nursery	
Latitude	N24°46'	N24°46'	N24°46'	24°50'	
Longitude	E121°43'	E121°43'	E121°43'	121°32'	
Elevation (m)	600	600	600	400	
Mother trees	6	6	6	30	
Year of establishment	1988	1988	1988	1997	
Age (yr)	16	16	16	7	
Height (m)	8	6	6	5	
DBH (cm)	22	14	15.5	3	

**(b) natural trees**

Mother tree code	D296	D298	PA05	PA14	PC50
Location	Daren	Daren	Pinglin	Pinglin	Pinglin
Latitude	22°23'	22°23'	24°54'	24°54'	24°53'
Longitude	120°51'	120°51'	121°40'	121°40'	121°41'
Elevation (m)	535	535	495	435	560
Mother trees	15	15	20	20	42
Age (yr)	100~300	100~300	100~300	100~300	100~300
Height (m)	16	24	9.9	9.8	12.7
DBH (cm)	35	85	52.6	50.0	30.6

DBH, diameter at breast height.

(1981)方法，將上述採集之新鮮花粉，先置於內含乾燥劑(silica gel)之密閉容器1個星期，使花粉含水率下降，之後裝入1 mL安瓶(ampule)，花粉填充量約為安瓶1/3左右，接著置於真空冷凍乾燥機(Labconco Freeze Dry System 6.0)，在溫度-40°C以下及真空度

133 × 10<sup>-3</sup> mBar以下冷凍乾燥，俟花粉含水率下降至3~4%，取部分花粉進行含水率與活力檢測，檢測重複3次，並將安瓶瓶口以高溫瓦斯槍封口，置於-20°C儲藏。

花粉活力檢測方法是將花粉置於培養基發芽，培養基為BK培養基(Brewbaker and Kwack

1963)，加3%蔗糖，以不加agar之液體懸滴培養花粉(Ho et al. 2000)；新鮮花粉直接均勻散播在培養基上，而乾燥後之花粉，須先進行回濕(rehydration)處理(Jett et al. 1993)，回濕方法為取花粉置於培養皿中央，培養皿四周滴數滴水，封蓋後於室溫下靜置約2 h，讓花粉含水量提高到新鮮花粉狀態，再取此花粉散播在前述培養基上，經48 h後，於倒立式顯微鏡(Axiover inverted microscopes, Carl Zeiss)下檢視計算花粉發芽率。花粉發芽率計算，以顯微鏡10倍的視野範圍下，逢機選取4個視野，每個視野觀測50~100個花粉粒數和發芽粒數，然後計算花粉發芽率，發芽數/花粉粒總數×100，最後以4個視野平均值定為花粉發芽率。

### 三、控制授粉(controlled pollination)與輔助授粉(supplemental mass pollination)

#### (一)控制授粉(controlled pollination)

選取健康枝條之雌毬花，於雌花綻放鱗片準備張開前進行套袋；紙袋長33 cm，寬15.8 cm，袋子中間有一長8.8 cm寬5.7 cm之塑膠透明片，可觀察雌毬鱗片張開與否；授粉時機選在雌毬鱗片張開分泌授粉滴(pollination drop)之際。選擇人工栽植之台北植物園T、台東達仁D296嫁接苗與信賢苗圃H等3株母樹為被授粉母樹。控制授粉組合如下：以台北植物園T母樹雌毬，花粉源包括自己T母樹、台東達仁D298、陽明山Y母樹等；台東達仁D296嫁接苗之花粉源為達仁D298；信賢苗圃H母樹僅有2個雌毬，授粉之花粉源僅有達仁D298。

控制授粉之花粉源皆為當年採集之新鮮花粉，授粉時間在3月初至下旬授粉2次，授粉時將套袋開1小孔，以授粉噴槍將花粉送至正在分泌授粉滴之雌毬上，再封住套袋開口。剛授粉時雌毬呈淺黃綠色，授粉後約1~3天雌毬鱗片關閉，雌毬果頂端漸變成紫色，授粉1個月後整個毬果呈現紫色，2個月後則呈現綠色，至11月時毬果頂端開始轉為褐色成熟，隨即採集毬果，進行毬果與飽滿種子數量調查，及飽滿種子發芽試驗。

#### (二)輔助授粉(supplemental mass pollination)

因不同母樹開花授粉時間不同，使用儲藏的花粉進行輔助授粉，輔助授粉不進行套袋處理，即選取生長於強壯枝條之雌毬花，於雌花綻放鱗片張開分泌授粉滴時進行授粉，選擇台北植物園T、出水溪苗圃C1與C2及麗水街L等4株為被授粉母樹(Table 1)，授粉之花粉源有當年採集坪林金瓜寮PA05 (Table 1)之新鮮花粉，以及經儲藏5年之台北植物園T、出水溪苗圃C1、麗水街L與台東達仁D298花粉。輔助授粉方法如同控制授粉，取出花粉須先經過回濕處理。同樣的，不套袋輔助授粉之毬果在11月成熟，然後依照下述進行毬果與飽滿種子數量調查，及種子發芽試驗。

### 四、毬果採集、飽滿種子數量調查與種子發芽

#### (一)不同年度各地母樹之毬果採集

於2002~2010年間採集7個地區10株母樹毬果，其中5個地區人工栽植包括台北植物園、麗水街、陽明山、羅東出水溪苗圃、福山植物園等8株母樹，以及2個地區金瓜寮與石槽天然生母樹各1株(Table 1)。毬果採集後量測長、寬，然後每粒毬果分別剝除鱗片，取出種子用手捏再分為硬實飽滿種子和空粒種子，種子長度大於8 mm者視為大粒種子(Ho et al. 2000)。有效種子率(seed efficiency, SEF)為飽滿種子數佔所有大粒種子數之百分率，即 $SEF = \text{飽滿種子數} / \text{大粒種子數} \times 100$ 。為防止種子乾燥影響發芽，當調查飽滿與空粒種子數量後，隨即混入濕水苔中。

#### (二)種子5°C低溫層積處理與發芽

台灣油杉種子為異儲型種子不耐乾藏，以低溫4°C層積處理可促進種子發芽(Yang et al. 2006)。本試驗所取得之飽滿種子，與洗淨之水苔，放入PE封口塑膠袋(4號袋：12×8.5 cm、厚度0.04 mm)內均勻混合，然後置於5°C層積處理，此時袋內仍保留約2/3的剩餘空間，以提供種子呼吸作用所需之氧氣，且於層積處理期間每隔1 mo補充適量水分並交換新鮮空氣1次(Lin

and Chen 1993)。低溫層積處理4 mo後取出進行發芽試驗，種子發芽在30/20°C變溫和8 h光照(50~80  $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ )條件下進行，並以胚根突出5 mm視為發芽，發芽期為3 wk。種子發芽率以計算每個毬果之飽滿種子可發芽的百分率，即種子發芽數/飽滿種子數 $\times 100$ 。

## 五、台灣油杉針葉DNA萃取與葉綠體DNA基因間區間定序

### (一)針葉DNA萃取與濃度測定

為了瞭解台灣油杉葉綠體DNA的遺傳性，本研究檢測母株和控制授粉所培育之後裔苗木葉綠體DNA，比較它們之間的差異。首先採取Table 1所有12株坪林種源母樹，以及包括Table 1在內的15株台東達仁種源母樹之嫁接苗，共計27株母株之針葉，之後再採取TxD298與HxD298之後裔苗木，分別有16與48株的針葉，進行DNA萃取與DNA濃度測定。

根據Doyle and Doyle (1987)的CTAB方法進行DNA萃取，取新鮮針葉100 mg，混合海砂與液態氮研磨成粉末，加入5 mL萃取液(2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2 M EDTA, Tris HCl (pH 8.0) 100 mM, 1% SDS, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol)萃取DNA，再以酒精沉澱，再以70%酒精清洗後，最後將DNA溶於200  $\mu\text{L}$  TE buffer (pH 8.0)，以核酸計算儀測量DNA濃度。

### (二)葉綠體DNA基因間區間序列擴增、純化與定序

本試驗用上述針葉DNA進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction; PCR)，所使用的引子共有4對：第1對引子*TrnD-*TrnY**序列為5'-TGACAGGGCGGTACTCTAAC-3'和5'-CGATGCCCGAGTGGTTAATG-3'；第2對引子*TrnV intron1-*TrnV intron2**序列為5'-GCTATACGGGCTCGAACC-3'和5'-TACCTACTATTGGATTTGAACC-3'；第3對引子*petG-trnP*序列為5'-GGTCTAATTCCTATAACTTTGGC-3'和5'-GGGATGTGGCGCAGCTTGG-3'；

第4對引子*trnF-trnL*序列為5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'和5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3' (Hwang et al. 2003)。

PCR反應條件及步驟：PCR反應液含有以下各成分：總體積50  $\mu\text{L}$ 內含25~171 ng的DNA模板，0.4  $\mu\text{M}$ 核酸引子(各含0.2  $\mu\text{M}$ )、2 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.4 mM dNTPs(包含dATP、dTTP、dCTP、dGTP)及0.025U之Taq DNA polymerase (Ampliquon)。PCR反應器(Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700)採用之溫度週期及流程如下：(1)先以94°C處理5 min，使雙股DNA變性。(2)再以94°C(變性溫度)30 s，60°C(鏈合溫度)30 s，72°C(延展溫度)30 s，進行39次的擴增循環。(3)最後保持72°C處理10 min。(4)反應物溫度降至室溫。先取出5  $\mu\text{L}$ 之PCR產物進行確認，剩餘PCR產物則以ABI 3100自動定序儀進行定序。葉綠體DNA定序資料分析結果先以Bioedit軟體進行排序(multiple sequence alignment)，再將已完成的序列，進行兩兩比較，檢查序列間差異。

## 結果

### 一、天然授粉之毬果與種子

調查2002~2010年間10株母樹毬果及種子，數量以出水溪苗圃C1最完整，共有8年(2002~2009)採集調查記錄，其它母樹則在2002~2010年間有不同年度的採集記錄(Table 1)。不同母樹各年間，採集的毬果數量多少，反應當年豐歉年狀況，如出水溪苗圃C1於2006年與2009年分別採得199與319個毬果，顯示當年為豐年，而2002~2005年採得毬果數量低於10粒，顯示當年為歉年(Table 2)。不同地區的母樹豐歉年並不相同，如2002年麗水街L採得255粒毬果，為本母樹之豐年，但相同年度之台北植物園T、陽明山Y、出水溪苗圃C1與C2所採得的毬果量很低，屬於歉年(Table 2)。豐歉年沒有一定週期性，如出水溪苗圃C1約3~5年有1次豐年，且各地毬果的採集數量，確定豐年過後的翌年必定是歉年。個體母樹毬果不會因獨立木而產量

**Table 2. Cone and seed production in 7 natural stands in 2002~2010**

Mother tree code	Year	No. of Cones	Cone length (cm)	Cone width (cm)	No. of empty seeds/cone	No. of filled seeds/cone	Seed efficiency <sup>1)</sup> (%)	Seed germination <sup>2)</sup> (%)
T	2002	12	6.8±1.0 <sup>3)</sup>	2.7±0.1	61.8±18.4	0	0	-
	2003	11	7.3±0.9	2.8±0.3	62.0±14.7	0	0	-
	2004	24	8.3±0.5	2.5±0.1	101.6±5.6	0.7±0.8	0.6±0.8	0
	2008	96	9.2±0.8	2.7±0.2	108.1±11.7	0.03±0.2	0.0003	100
L	2002	255	8.4±0.7	2.9±0.4	89.6±13.8	0.03±0.2	0.04±0.2	0
	2003	0	-	-	-	-	-	-
	2004	10	9.0±0.7	2.5±0.1	94.8±10.2	10.5±2.3	10.1±2.4	78.2±15.9
	2008	2	8.7±0.9	2.5±0.1	107.0±28.3	3.5±0.7	3.4±1.5	57±53
Y	2002	20	9.3±2.2	-	125.5±39.2	0.2±0.4	0.2±0.4	100
	2003	12	12.9±1.2	3.0±0.4	187.0±16.5	2.7±2.4	1.4±1.2	69.4±38.4
	2004	19	11.4±0.9	3.1±0.3	132.7±24.1	10.1±5.9	7.1±4.1	75.1±24.8
	2008	47	8.1±2.1	2.8±0.3	106.7±37.2	2.1±3.4	1.8±2.6	2±3
C1	2002	4	7.6±0.6	2.8±0	104.5±10.0	1.8±1.7	1.6±1.4	58.3±52.0
	2003	9	11.8±1.2	2.8±0.1	127.6±24.2	12.6±4.4	9.1±3.5	85.5±12.3
	2004	4	13.8±0.8	3.2±0.1	159.0±14.5	0.3±0.5	0.2±0.3	100
	2005	7	10.3±1.8	2.9±0.1	105.7±18.5	3.4±2.7	3.0±2.1	n.d.
	2006	199	7.3±1.3	2.5±0.2	88.4±20.7	13.6±6.8	14.1±6.2	84.0±17.3
	2007	9	8.5±1.5	3.4±0.2	113.3±31.4	0	0	-
	2008	82	8.9±1.0	2.8±0.2	106.3±24.4	9.9±11.3	8.6±10.0	3±9
	2009	319	9.7±1.5	2.7±0.5	100.3±21.4	8.2±5.7	7.6±5.2	91±16.9
C2	2002	0	-	-	-	-	-	-
	2003	0	-	-	-	-	-	-
	2004	6	9.0±2.3	2.9±0.1	103.2±35.3	0	0	-
	2005	5	9.3±0.4	2.8±0.1	111.2±3.3	0	0	-
	2009	400	8.5±1.0	3.0±0.3	106.7±18.7	3.7±4.3	3.4±4.2	78.1±33
F1	2010	3	10.1±1.0	5.4±0.3	45.7±11.0	3.7±2.5	6.8±3.6	58.3±52.0
F2	2004	65	12.1±1.1	3.2±0.2	62.3±23.3	55.1±19.7	47.5±18.3	67.0±8.8
F3	2010	86	6.4±1.0	2.6±0.3	54.5±12.2	15.9±11.2	12.8±8.3	80.4±25.7
PA14	2009	6	8.6±0.5	2.5±0	91.8±5.5	2.7±2.0	2.8±2.0	96.7±8.2
PC50	2009	29	n.d.	n.d.	102.6±39.3	14.8±9.0	19.1±20.9	95.9±5.5

<sup>1)</sup> Seed efficiency (%) = [filled seeds / (filled + empty seeds)] x 100.

<sup>2)</sup> Seed germination (%) = (No. of germinating seeds / No. of filled seeds) x 100.

<sup>3)</sup> mean ± std.dev.

較少，2002年麗水街L獨立木採得255粒毬果，還遠高於其它群聚之母樹。陽明山Y毬果產量普遍較少，在2008年也採得47粒毬果(Table 2)。

台灣油杉毬果大小，同一株母樹於不同年度之毬果長度有所不同，出水溪苗圃C1其2002

年毬果平均長度7.6 cm，寬度2.8 cm，但2004年毬果較大，長度13.8 cm，寬度3.2 cm (Table 2)。豐年採收之毬果，2002年麗水街L毬果長8.4 cm，寬度2.9 cm，2006與2009年出水溪苗圃C1的毬果長分別為7.3與9.7 cm，寬度2.5與



2.7 cm, 2009年出水溪苗圃C2的毬果長為8.5 cm, 寬度3.0 cm, 這些毬果在豐年期的長寬差異不大, 都在一個範圍內(Table 2)。

每粒毬果的種子數量, 各地區母樹毬果之空粒種子普遍高於100粒, 台北植物園T在2002~2004年與2008年, 這4年平均每粒毬果的飽滿種子數量不到1粒, 其中2002與2003兩年都是空粒, 有效種子率為0~0.6%, 且2004年飽滿種子都無法發芽, 但2008年之3粒種子全部發芽(Table 2)。福山植物園的F1, F2與F3為台北植物園台灣油杉之後裔, 其飽滿種子數在2004與2010年, 分別有3.7, 55.1與15.9粒, 有效種子率6.8~47.5%, 飽滿種子的發芽率則有58.3~80.4%。

2002年麗水街L獨立木採得255粒毬果, 但平均每粒毬果的飽滿種子為0.03粒, 有效種子率為0.04%, 且飽滿種子都無法發芽(Table 2)。獨立木因為周遭沒有其他母樹, 因此所得種子都來自於自交。獨立木所產生之自交種子是否都比較差, 其實不然, 如2004年麗水街L與陽明山Y所採得自交毬果, 平均每粒毬果的飽滿種子分別有10.5與10.1粒, 有效種子率分別為10.1與7.1%, 飽滿種子發芽率分別有78.2與75.1%(Table 2)。

同一株母樹不同年度的平均飽滿種子數量會有差異, 出水溪苗圃C1在2002~2009這8

年間, 於2007年完全沒有飽滿種子, 但2003、2006、2008與2009這4年所採得毬果, 飽滿種子有8.2~13.6粒, 有效種子率分別為7.6~14.1%, 飽滿種子發芽率分別有84.0~91.0% (Table 2), 但位於C1旁之C2其在2002~2005年, 卻都沒有獲得飽滿種子, 在2009年採得之毬果, 飽滿種子3.7粒, 有效種子率為3.4%, 飽滿種子發芽率78.1% (Table 2)。

原生地的母樹飽滿種子數量較多, 且大部分具有發芽能力, 如原生地坪林金瓜寮PA14與石槽PC50, 於2009年所採得毬果, 飽滿種子數分別有2.7與14.8粒, 有效種子率分別為2.8與19.1%, 飽滿種子發芽率分別有96.7與95.9% (Table 2)。

## 二、控制授粉之毬果與種子

控制授粉所得毬果的大小, 毬果長約5.2~8.6 cm, 寬約2.4~2.9 cm, 控制授粉之毬果長度, 除了台北植物園母樹接受陽明山花粉, 和台北植物園自交所得毬果較小外, 無論異花受粉或自花受粉差異不大(Table 3)。台北植物園T母樹控制授粉自交結果, 自花授粉每粒毬果平均飽滿種子0.08粒, 但飽滿種子100%可以發芽, 顯示控制自交授粉的有效種子仍低。然異花控制授粉下, 台北植物園T母樹所採得毬果飽滿種子數分別為10.2~14.0粒, 有效種子率為

**Table 3. Average length and width per seed cone, number of empty seeds per cone, number of filled seeds per cone, seed efficiency, and seed germination with controlled pollination**

Female x Male (pollen)	No. of Cones	Cone length (cm)	Cone width (cm)	No. of empty seeds/cone	No. of filled seeds/cone	Seed efficiency <sup>1)</sup> (%)	Seed germination <sup>2)</sup> (%)
T x T	13	6.8 ± 1.0 <sup>bc3)</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	85.8 ± 17.1 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.3 <sup>c</sup>	0.08 ± 0.2 <sup>c</sup>	100
x D298	15	7.1 ± 1.3 <sup>ab</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	50.6 ± 16.0 <sup>b</sup>	10.2 ± 11.4 <sup>c</sup>	14.7 ± 10.5 <sup>bc</sup>	77.0 ± 21.3
x Y	18	5.4 ± 1.6 <sup>c</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	20.7 ± 14.7 <sup>c</sup>	14.0 ± 20.4 <sup>bc</sup>	21.6 ± 23.9 <sup>ab</sup>	72.6 ± 19.8
x * <sup>4)</sup>	20	5.2 ± 2.3 <sup>c</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	38.3 ± 31.4 <sup>bc</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	-
D296 x D298	22	8.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	47.1 ± 16.6 <sup>b</sup>	29.1 ± 20.7 <sup>ab</sup>	35.9 ± 20.4 <sup>a</sup>	28.6 ± 20.2
H x D298	2	7.7 ± 1.5 <sup>ab</sup>	2.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	48.5 ± 17.7 <sup>b</sup>	31.0 ± 24.0 <sup>a</sup>	37.9 ± 27.2 <sup>a</sup>	96.4 ± 5.1

<sup>1)</sup> Seed efficiency (%) = [filled seeds / (filled + empty seeds)] x 100.

<sup>2)</sup> Seed germination (%) = (No. of germinating seeds / No. of filled seeds) x 100.

<sup>3)</sup> mean ± std. dev., values with the same letter do not significantly differ at  $p = 0.05$  by Tukey's test.

<sup>4)</sup> control treatment, no pollen.

14.7~21.6%；台東達仁D296母樹所採得毬果飽滿種子數分別為29.1粒，有效種子率為35.9%；信賢H母樹所採得毬果飽滿種子數分別為31.0粒，有效種子率為37.9%，本研究數據統計分析顯示，異花授粉飽滿種子數與有效種子率皆顯著高於自花授粉(Table 3)。沒有授粉的對照組，則沒有任何飽滿種子。

### 三、花粉冷凍乾燥儲藏與活力檢測

新鮮台灣油杉花粉含水率為14.5%，利用真空冷凍乾燥機乾燥30 min後，花粉含水率降至1.6%。新鮮的台灣油杉花粉發芽率，70.6~94.4%，而冷凍乾燥後之花粉發芽率

70.0~96.3%，即冷凍乾燥後之花粉發芽率，部分母樹下降10~25%，部分母樹上升5~7% (Table 4)。

### 四、輔助授粉之毬果及種子

台灣油杉新鮮花粉之發芽率70.6~94.4%，花粉經冷凍乾燥後，花粉發芽率52.8~96.3% (Table 4)。以台北植物園T、出水溪苗圃C1與C2及麗水街L等4株母樹，接受坪林PA05乾燥冷凍之花粉，結果每粒毬果飽滿種子數為5.0~48.5粒，有效種子率為5.0~48.2% (Table 5)。以出水溪苗圃C1為母樹，接受台東達仁D298和坪林PA05花粉，結果每粒毬果的飽滿種子數分別為

**Table 4. Germination percentage of fresh pollen and freeze-dried pollen**

Parent tree	Fresh pollen germination (%)	Freeze-dried pollens germination (%)
C1	94.4 ± 5.2 <sup>1)</sup>	70.0 ± 3.8
PA05	78.1 ± 8.4	52.8 ± 19.3
L	72.8 ± 11.8	60.0 ± 10.6
Y	88.6 ± 8.0	96.3 ± 4.4
T	70.6 ± 11.4	58.1 ± 11.1
D298	85.7 ± 8.7	90.1 ± 2.2

<sup>1)</sup> mean ± std. dev.

**Table 5. Average length and width per seed cone, number of empty seeds per cone, number of filled seeds per cone, seed efficiency, and seed germination with supplemental mass pollination**

Female x Male (pollen)	No. of Cones	Cone length (cm)	Cone width (cm)	No. of empty seeds/cone	No. of filled seeds/cone	Seed efficiency <sup>1)</sup> (%)	Seed germination <sup>2)</sup> (%)
T x PA05	16	9.1 ± 1.3 <sup>3)</sup>	2.6 ± 0.2	75.2 ± 26.1	27.1 ± 14.5	27.8 ± 13.8	80.0 ± 14.8
C1 x D298	11	11.5 ± 1.1	2.9 ± 0.2	109.6 ± 23.0	24.6 ± 19.5	18.3 ± 14.3	92.3 ± 8.1
x T	11	11.4 ± 1.3	2.8 ± 0.2	112.5 ± 19.2	29.0 ± 9.1	20.5 ± 6.1	93.5 ± 6.4
x L	122	9.8 ± 1.2	2.7 ± 0.3	98.0 ± 18.1	9.8 ± 5.5	9.0 ± 4.5	97.4 ± 12.2
x PA05	10	12.6 ± 0.9	3.0 ± 0.1	87.4 ± 24.0	48.5 ± 28.5	35.1 ± 19.3	90.0 ± 9.0
C2 x L	70	8.2 ± 1.1	2.8 ± 0.4	88.9 ± 16.5	8.1 ± 6.9	7.9 ± 6.1	84.5 ± 23.1
x PA05	3	8.6 ± 0.6	2.8 ± 0.1	98.0 ± 7.8	5.0 ± 4.4	5.0 ± 4.5	54.4 ± 39.5
L x T	34	8.9 ± 0.7	2.5 ± 0.1	96.7 ± 12.6	10.4 ± 5.9	9.9 ± 5.7	81.4 ± 17.9
x C1	13	8.9 ± 0.3	2.5 ± 0.1	102.2 ± 6.8	6.1 ± 3.0	5.6 ± 2.8	88.1 ± 12.1
x PA05	10	8.9 ± 0.5	2.8 ± 0.1	47.8 ± 13.5	45.1 ± 14.2	48.2 ± 9.2	72.3 ± 15.6

<sup>1)</sup> Seed efficiency (%) = [filled seeds / (filled + empty seeds)] x 100.

<sup>2)</sup> Seed germination (%) = (No. of germinating seeds / No. of filled seeds) x 100.

<sup>3)</sup> mean ± std. dev.



其序列長度為834 bp，共有2種型式，type D在761位置與type E相較有一個鹼基差異( Fig. 2)。台東達仁母樹為type D，坪林母樹則為type E。

利用台東達仁D298在葉綠體DNA基因 *trnD-trnY*與*trnV intron1-trnV intron2*區間，具有與坪林種源不同鹼基之特性，檢視控制授粉之後裔遺傳性，台北植物園T與台東達仁D298控制授粉後裔苗木有百株以上，逢機選取16株，信賢苗圃H與台東達仁D298有後裔苗木48株全部選取，共計64株後裔苗木。利用葉綠體DNA基因*trnD-trnY*與*trnV intron1-trnV intron2*區間序列定序分析，分析結果顯示所有64株後裔具有與D298相同之鹼基序列，台灣油杉葉綠體百分之百屬於父系遺傳(complete paternal inheritance)。

## 討論

### 一、台灣油杉毬果產量與豐歉年

本研究台北植物園台灣油杉有效種子率最高僅0.6%，但栽植於其它地方的台灣油杉並非如此，如2006年出水溪苗圃C1毬果飽滿種子數13.6粒，有效種子率14.1%，台北植物園後裔福山F2母樹，2004年毬果飽滿種子數55.1粒，有效種子率47.5%。因此，許多有關台灣油杉的研究，都提出台灣油杉飽滿種子數偏低的結果(Wang 1987, Ho et al. 2000, Chen and Wang 2001)，但這些結果可能侷限在台北植物園這個區域，可能與棲息環境有關，如鄰近建築物或大樹多光線不足等因素。

台灣油杉豐歉年明顯，2002年麗水街L為豐年，接著2003~2004兩年歉年，出水溪苗圃C1於2006與2009這2年為豐年，其豐歉年的週期至少2年以上(Table 2)。Fowells and Schubert (1956)調查1933~1953年間美國加州ponderosa pine, sugar pine, white pine等3樹種結實週期，結實週期有連續2年豐年，也有5年才1次豐年。Pukkala et al. (2010)預測芬蘭Norway spruce與Scots pine結實，認為結實週期與其前1年夏天的溫度與雨量狀況有強烈相關。台灣油杉每年

7、8月間生殖芽開始分化(Wang 1987)，此時正值台灣盛夏，其花芽分化的好壞影響其隔年毬果的生產量和種子品質。

原生地坪林金瓜寮PA14與石槽PC50，於2009年所採之毬果，有效種子率分別為2.8與19.1% (Table 2)。Ho et al. (2000)於1995年坪林原生母樹有效種子率約2.0%，與本試驗PA14相當，但PC50卻高於5倍多。許多有關台灣油杉的研究，都提出台灣油杉飽滿種子數偏低的結果(Wang 1987, Ho et al. 2000, Chen and Wang 2001)，但這些結果可能侷限在台北植物園這個區域，或者因調查年度不夠長，因此，導致大家認為台灣油杉一直存在飽滿種子數偏低的現象。本研究證實台灣油杉毬果產量在豐年期並未偏低，只有在豐歉年有產量多寡的差異。

### 二、自花授粉與異花授粉對台灣油杉結實之影響

本研究台北植物園控制授粉試驗結果，自花授粉每粒毬果飽滿種子數為0.08粒，有效種子率為0.08% (Table 3)，與台北植物園T母樹2002~4與2008天然授粉結果相當(Table 2)。因此，台北植物園台灣油杉飽滿種子偏低原因是自花授粉所造成，且授粉後之授精胚無法繼續發育形成種子(Ho et al. 2000)。

自花授粉現象存在於許多針葉樹種，Stoehr et al. (1998)利用葉綠體DNA標誌，調查花旗松種子園自交率0~19%，平均約6%。台灣油杉飽滿種子可經由自交獲得，控制授粉結果證實自交率可能甚低，但麗水街L與陽明山Y兩獨立木，2004年天然自花授粉獲得之飽滿種子10粒以上，有效種子率7.1%以上，遠高於同年度採集自台北植物園T與出水溪苗圃之C1與C2母樹(Table 2)。然天然授粉自交結果並非年年如此，也非發生在豐年時期，台灣油杉自交率高的原因不明，但可能受到母樹本身與環境等因子所影響。

控制授粉之對照組有效種子率為0%，因為沒有花粉源。造成台灣油杉種子空粒的原因，除了缺乏花粉源外，雄毬敗育花粉不佳是主要原因(Lin and Kuo 2004)。本研究2007年觀察台

Type D 1 ACCTTCTCGGTAGAACAGATCAAAATCTTATTATCAAAATAATTGAGC  
Type E 1 .....  
51 TGTTCCAAAGAACCCAACATGCATTTTCTTGCATTGGGCTCTTTCATTAAC  
51 .....  
101 TGATGAAAGATCGGTTAGTCTGCCATTCTCCTCTTCCAGGAAGATACT  
101 .....  
151 AATATGGCTCCGTGTGCTCCAAATTATTACCCCTCGGAAGCAATCCAAA  
151 .....  
201 GTTATTCAAAAGGTTTCCTTGACGTAGGTCTGCCTTGCTCGGGCATAGAT  
201 .....  
251 TGA CTCAAATAGAGTCTCCTCTATCGCTCCAAAAGTAAAATATGACACTT  
251 .....  
301 CATAACCTAAAAGTTCATAGAGCGAAAAGAATCTATTTGAGGTCCCCG  
301 .....  
351 TATTATACTCATTATGCCTGGCATTGAACGGAGCTGGGATTGACCATATC  
351 .....  
401 AATTAGATTCGTAATTCGAATCGGATCGAACTTAATCTTTGTGCATGCTAT  
401 .....  
451 TGTTC C CAGAGAAACAAATTGATAGAGTAAGACTATTTACATAGAATC  
451 .....  
501 TATTCG TGGATCGGACGAATCGATAAACTCTCTCGAAAACCATTTGGCGC  
501 .....  
551 ACGTGTAACGAGGTGCTCTACCTTGCTGAGCTATAGCCCTTCCTTGCCA  
551 .....  
601 ATCTTGATGATACATTACTATACTAACCAGATGGATCACTTTCTGTCAAG  
601 .....  
651 GTAGATATTCATGATCCGATACTATGATCCAATACGTTCTAATAAGTTC  
651 .....  
701 GATCAGTGCCAGGACACATTGTCTATACGTTCAATTCGATTTAGAATCG  
701 .....  
751 TTTATAAG TTTAACTCTACCTATGAGAATAAATGACCCACTTAACTCAGT  
751 .....A.....  
801 GGTTAGAGTATCGCTTTCATACGGCGAGAGTCAT  
801 .....

**Fig. 2. Sequences of the chloroplast intergenic spacer region between the *TrnV* intron1 and *TrnV* intron2 genes. Dots indicate positions where type E has the same nucleotides as type D.**

北植物園冬天突然的高溫，會影響台灣油杉雄毬花發育不良，導致花粉不佳。

比較台灣油杉南北族群花粉授粉結果，在飽滿種子數與有效種子率沒有顯著差異(Table 3)。自花與異花授粉的飽滿種子發芽率，除了台東達仁D296×D298較低之外，其餘皆高72.6~100%。Mergen et al. (1965)比較雲杉屬 *Picea glauca* 自花授粉、異花授粉與天然授粉的種子發芽率，三者並沒有顯著差異。Libby et al. (1981)探討世界爺(*Sequoia sempervirens*)近親授粉苗木存活率遠比異花授粉低，且育苗時自花授粉的高生長僅為異花授粉65~80%，14年生樹木的自花授粉高生長僅為異花授粉的42%，自花授粉直徑為異花授粉的29%。另外，本研究觀察台灣油杉自花授粉苗木有白化苗出現，因此，以異花授粉所獲得的苗木表現最佳。

### 三、花粉儲藏輔助授粉

台灣油杉種子屬於不耐儲藏之異儲型，4°C濕藏無法超過1年，且種子含水率下降至26%以下，種子開始陸續死亡(Yang et al. 2006)。花粉庫(pollen bank)可以提供花粉源，一般針葉樹花粉儲藏可以超過5年以上，提供人工授粉用(Mercier 1995)。因此，建立台灣油杉花粉儲藏庫，可以保存一半的遺傳資源，當遇到不適合之氣候條件，可利用儲藏的花粉，經由人工授粉將遺傳性狀傳遞到後裔。

花粉儲藏依植物花粉特性分為短期與長期，長期儲藏是將安瓶放入-20°C儲藏，可維持花粉活力數年不變(Matthews and Kraus 1981)。台灣油杉花粉可長期儲藏，將含水率1~2%乾燥花粉置於安瓶儲存-20°C，5年後的花粉活力仍維持一定，並沒有下降。

輔助授粉可增加飽滿種子數量、遺傳收益及大量生產異花授粉之後裔(Bridgwater and Trew 1981)。El-Kassaby and Reynolds (1990)發現北美雲杉(*Picea sitchensis*)營養系種子園，生產的種子有八成來自其中20%的營養系，後裔遺傳基礎沒有來自所有營養系，呈現親本不夠均衡現象。輔助授粉可減少近親交配，提高異交比率，解決親本過於集中幾個親本

(El-Kassaby and Ritland 1986, El-Kassaby and Reynolds 1990)。本研究採集原生地坪林金瓜寮溪PA05花粉，授粉到台北植物園T、出水溪苗圃C1與C2及麗水街L等4株母樹，結果每粒毬果之有效種子率5.0~48.2%，遠高於天然授粉之0~47.5% (Tables 2, 5)。Stoehr et al. (2006)利用葉綠體DNA標誌，比較lodgepole pine種子園輔助授粉與天然授粉，結果輔助授粉比天然授粉有效種子率提高16%。輔助授粉可以使花粉均衡分配到雌毬，但施放時必須考量雌毬的綻放時機(Erickson and Adams 1989, Stoehr et al. 2006)。Wang (1987)調查台灣油杉雌毬綻放時間在4月上旬，但事實上，不同地區母樹雌毬授粉時機差異很大，台北植物園T於4月初，出水溪在3月上旬，麗水街則在3月中旬左右。在天然林裡台灣油杉族群數量稀少情況下，花粉與雌毬綻放時機相配合，常常需要數年的時間。因此，藉由利用儲藏花粉輔助授粉方式，可以有效解決台灣油杉飽滿種子偏低之情形。

### 四、葉綠體DNA父系遺傳

針葉樹許多樹種葉綠體DNA為父系遺傳，包括松科之花旗松(*Pseudotsuga menziesii*) (Neale et al. 1986)與火炬松(*Pinus taeda*) (Neale and Sederoff 1989)、杉科之長葉世界爺(*Sequoia sempervirens*) (Neale et al. 1989)與柏科之美國肖楠(*Calocedrus decurrens*) (Neale et al. 1991)等等。但Shiraishi et al. (2001)認為柏科之日本扁柏(*Chamaecyparis obtusa*)並非完全是父系遺傳(incomplete paternal inheritance)。利用葉綠體DNA標誌與父系遺傳特性，能有效地評估花旗松種子園母樹間之交配狀態(Stoehr et al. 1998)，也有利用此探討花旗松種子園花粉的傳播距離(Erickson and Adams 1989)。

本研究利用葉綠體DNA基因

卵細胞與精細胞結成合子時，來自於卵細胞之質體(plastid)被排出於合子之外，僅留下精細胞之質體。

## 謝誌

本研究承行政院國家科學委員會計畫(NSC91-2313-B-054-018, NSC92-2313-B-054-006與NSC93-2313-B-054-006)補助經費，林世鴻、吳濟琛、蘇力禾、吳立德、林怡芳、魏濟均與葉翠華等人協助毬果採集調查與葉綠體DNA分析，謹此致謝。

## 引用文獻

- Bramlett DL, O'Gwynn CH. 1981.** Controlled pollination. In: Franklin EC, editor. Pollen management handbook. Agricultural Handbook 587. Washington DC: USDA Forest Service. p 44-51.
- Brewbaker JL, Kwack BH. 1963.** The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am J Bot* 50:859-65.
- Bridgwater FE, Trew IF. 1981.** Supplemental mass pollination. In: Franklin EC, editor. Pollen management handbook. Agricultural Handbook 587. Washington DC: USDA Forest Service. p 52-7.
- Chen TY, Wang CH. 2001.** A vegetation monitory of Pinglin Taiwan *Keteleeria* Nature Reserver. Taipei: Taiwan Forestry Bureau Research Ser no. 89-194 p.
- Chung JD, Hung SC. 2011.** The restoration of *Keteleeria davidiana* var. *formosana* Hayata. Taipei: Taiwan Forest Research Institute Extension Folder no. 72. [in Chinese].
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-4.
- El-Kassaby YA, Reynolds S. 1990.** Reproductive phenology, parental balance, and supplemental mass pollination in a Sitka spruce seed orchard. *For Ecol Manage* 31: 45-54.
- El-Kassaby YA, Ritland K. 1986.** The relation of outcrossing and contamination to reproductive phenology and supplemental mass pollination in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet* 35(5-6):240-4.
- Erickson VJ, Adams WT. 1989.** Mating success in a coastal Douglas-fir seed orchard as affected by distance and floral phenology. *Can J For Res* 19:1248-55.
- Formosa Government Research Institute. 1929.** Research report of forest tree seed. Taipei: Formosa Government Research Institute, Department of Forestry, Report no. 712-29. [in Japanese].
- Fowells HA, Schubert GH. 1956.** Seed crops of forest trees in the pine region of California. Washington DC: USDA Technical Bulletin, no. 1150:48 p.
- Ho CK, Chang SH, Tsai JY. 2000.** Investigation of the formation of empty seeds in *Keteleeria davidiana* (Franchet) Beissner var. *formosana* Hayata. *Taiwan J For Sci* 15(2):209-27.
- Ho CK, Yang JC. 1995.** Investigation of empty seed formation and somatic embryo induction of *Keteleeria davidiana* (Franchet) Beissner var. *formosana*. *News1 Taiwan For Res Inst* 2(2):9-10. [in Chinese].
- Hwang SY, Lin TP, Ma CS, Lin CL, Chung JD, Yang JC. 2003.** Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Mol Ecol* 12:2689-95.
- Jett JB, Bramlett DL, Webber JE, Eriksson U. 1993.** Pollen collection, storage, and testing. In: Bramlett DL, Askew GR, Blush TD, Bridgwater FE, Jett JB, editors. Advances in pollen management handbook. Agricultural Handbook 698. Washington DC: USDA Forest Service. p 41-6.
- Kanehira R. 1936.** Formosan trees indigenous

- to the island (revised). Taihoku, Formosa [Taiwan]: Department of Forestry, Government Research Institute. 754 p.
- Laliberté B. 1997.** Botanic garden seed banks/genebanks worldwide, their facilities, collections and network. *Bot Gard Conserv News* 2(9):18-23.
- Libby WJ, McCutchan BG, Millar CI. 1981.** Inbreeding depression in selfs of redwood. *Silvae Gent* 30(1):15-25.
- Lin TP, Lee TY, Yang LF, Chung YL, Yang JC. 1994.** Comparison of the allozyme diversity in several populations of *Chamaecyparis formosensis* and *Chamaecyparis taiwanensis*. *Can J For Res* 24:2128-34.
- Lin ST, Kuo SR. 2004.** The reasons for the failure of seed production of *Taiwania cryptomerioides* Hay. at Yeou-Shoei-Keng clonal orchard. *Q J Chin For* 37(2):135-46.
- Lin TP, Chen MC. 1993.** Desiccation intolerance in seeds of *Machilus kusanoi* Hay. *Taiwan For Res Inst New Ser* 8(2):143-7. [in Chinese with English summary].
- Liu SC, Tang LC. 1998.** Fauna and flora inventory of Jiau-Shi *Keteleeria* Nature Reserve. Taipei: Taiwan Forestry Bureau Research Ser no. 87-352 p.
- Liu T. 1966.** Study on the phytogeography of the conifers and taxads of Taiwan. *Bull Taiwan For Res Inst No.* 122. 33 p.
- Matthews FR, Kraus JF. 1981.** Pollen storage. In: Franklin EC, editor. *Pollen management handbook*. Agricultural Handbook 587. Washington DC: USDA Forest Service. p 37-9.
- Mercier S. 1995.** The role of a pollen bank in the tree genetic improvement program in Quebec (Canada). *Grana* 34:367-70.
- Mergen F, Burley J, Furnival GM. 1965.** Embryo and seedling development in *Picea glauca* (Moench) Voss, after self-, cross-, and wind-pollination. *Silvae Genet* 14:188-94.
- Neale DB, Marshall KA, Harry DE. 1991.** Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*). *Can J For Res* 21(5):717-20.
- Neale DB, Marshall KA, Sederoff RR. 1989.** Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* D. Don. *Endl. Proc Natl Acad Sci USA* 86:9347-9.
- Neale DB, Sederoff RR. 1989.** Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theor Appl Genet* 76:841-5.
- Neale DB, Wheeler NC, Allard RW. 1986.** Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas-fir. *Can J For Res* 16:1152-4.
- Orr-Ewing AL. 1957.** Further inbreeding studies with Douglas fir. *For Chron* 33:18-32.
- Orr-Ewing AL. 1965.** Inbreeding and single crossing in Douglas fir. *For Sci* 11:279-90.
- Owens JN. 1991.** Flowering and seed set. In: Raghavendra AS, editor. *Physiology of trees*. New York: Wiley. p 247-71.
- Owens JN, Colangeli AM, Morris SJ. 1990.** The effect of self, cross, and no pollination on ovule, embryo, seed, and cone development in western red cedar (*Thuja plicata* Donn). *Can J For Res* 20:66-75.
- Pukkala T, Hokkanen T, Nikkanen T. 2010.** Prediction models for the annual seed crop of Norway spruce and Scots pine in Finland. *Silva Fenn* 44(4):629-42.
- Sarvas R. 1962.** Investigations on the flowering and seed crop of *Pinus sylvestris*. *Inst For Fenn* 53:1-198.
- Sedgley M, Griffin AR. 1989** Sexual reproduction of tree crops. London: Academic Press. 378 p.
- Shiraishi S, Maeda H, Toda T, Seido K, Sasaki Y. 2001.** Incomplete paternal inheritance of chloroplast DNA recognized in *Chamaecyparis obtusa* using an intraspecific poly-



morphism of the *trnD-trnY* intergenic spacer region. *Theor Appl Genet* 102:935-41.

**Stoehr MU, Mehl H, Nicholson G, Pieper G, Newton CH. 2006.** Evaluating supplemental mass pollination efficacy in a lodgepole pine orchard in British Columbia using chloroplast DNA markers. *New For* 31(1):83-90.

**Stoehr MU, Orvar BL, Vo TM, Gawley JR, Webber JE, Newton CH. 1998.** Application of a chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Can J For Res* 28(2):187-95.

**Tsukada M. 1966.** Late Pleistocene vegetation and climate in Taiwan (Formosa). *Proc Natl Acad Sci USA* 55:543-8.

**Wang YN. 1987.** Reproductive cycle and some anatomical studies on *Keteleeria formosana* Hay. [PhD thesis]. National Taiwan Univ. 98 p. [in Chinese with English summary].

**Wang WY. 1995.** Application of biotechnological techniques on the study of the genetic variations of special and rare species in Taiwan. *Nat Conserv Q* 11:10-13. [in Chinese].

**Willson MF, Burley N. 1983.** Mate choice in plants. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press. 245 p.

**Yang JC, Lin TP, Kuo SR. 2006.** Seed storage behavior of Taiwan cow-tail fir (*Keteleeria davidiana* (Franchet) Beissner var. *formosana* Hayata). *Taiwan J For Sci* 21:179-89.

