

Germination and dormancy-breaking of *Daphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae) seeds from northwestern China

Germinación y ruptura de latencia en semillas de *Daphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae) provenientes del noroeste de China

Yan Fang^{1,2}; Zhang Enhe^{1*}; Wang Qinli²; Mao Zhuhong³.

¹Gansu Agricultural University, College of Agronomy. Lanzhou 730070, China.

Correo-e: lgod_forever@163.com Tel.: +861-383-065-4789

(*Autor para correspondencia).

²Hexi University, China Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization. ZhangYe, 734000, China.

³Gansu Taikang Pharmaceutical Company. Wuwei, 733000, China.

Abstract

D*aphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae) is a perennial evergreen shrub that is widely used in the ornamental plant and pharmaceutical industries in China. It exhibits dormancy, which delays and reduces germination. This study determined the effects of chemical treatment, stratification and burial treatment for overcoming the seed dormancy of *D. giraldii*. Results showed that chemical pre-treatment was less effective in breaking dormancy. The best germination percentage (G_p) was 52.33 %, a germination rate (G_r) of 1.19 only observed after 70 d of seed stratification at 5 °C treatment, indicating that the germination behavior of *D. giraldii* was not significantly affected by stratification. The physiological dormancy of *D. giraldii* seeds was alleviated during burial. Seeds buried at 100 cm depth for 170 days showed the highest germination success with G_p of 86.5 % and G_r of 10.11, which was the most effective treatment to alleviate seed dormancy. This information may be useful to restore and conserve other shrubs grown in Northwestern China and elucidate their survival under similar extreme environments.

Keywords: Stratification, gibberellic acid, 6-benzyladenine, burial, germination capacity

Resumen

D*aphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae) es un arbusto de hoja perenne utilizado ampliamente como planta ornamental y en la industria farmacéutica de China. La planta exhibe latencia que retrasa y reduce la germinación. Este estudio determinó los efectos del tratamiento químico, la estratificación y el tratamiento de siembra de semillas para interrumpir la latencia de *D. giraldii*. Los resultados mostraron que el pretratamiento químico fue el menos eficaz. El mejor porcentaje de germinación (G_p) fue 52.33 % y solamente se observó una tasa de germinación (G_r) de 1.19 después de 70 días de la estratificación de semillas a una temperatura de 5 °C. Esto indica que el comportamiento de la germinación de *D. giraldii* no se vio afectado significativamente por la estratificación. La latencia fisiológica de semillas de *D. giraldii* se mitigó durante la siembra de semillas. Las semillas enterradas a 100 cm de profundidad por 170 días germinaron exitosamente con 86.5 % e índice de germinación de 10.11, por lo que fue el tratamiento más eficaz para mitigar la latencia de las semillas. Esta información puede ser útil para restaurar y conservar otros arbustos que crecen en el noroeste de China y dilucidar su supervivencia en condiciones extremas similares.

Palabras clave: Estratificación, ácido giberélico, 6-benciladenina, siembra de semilla, capacidad de germinación

Introduction

The genus *Daphne* includes 44 species of evergreen shrubs distributed in Northwestern China, ranging from Sichuan and Shanxi to Gansu provinces. *Daphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae) is a slow-growing shrub with a maximum height of 2 m and has flexible and brown stems. It often grows in virgin land on hillsides and occasionally in ravines, grassland, forest edges and thickets at elevations of 2,400 m to 2,500 m in the Qilian Mountains of China (Zhao, 2007). *Daphne giraldii* has great ornamental value because of its beautiful yellow flowers, dark green leaflets and red ball-shaped fruits with shells. The plant is cold tolerant and alkali-resistant and shows great adaptation to the environments in Northwestern China and it is used for landscape design. Furthermore, the dried stem and root bark of *D. giraldii* are known as “ZuShima” (Zhao, Jin, & Zhang, 2012), which are commonly used in traditional Chinese medicine for the treatment of aches and rheumatism, particularly for rheumatoid arthritis (Li, Wu, & Yin, 2002). Because of the increasing consumption of *D. giraldii*, it is necessary to produce this evergreen shrub by developing methods for its propagation. *Daphne giraldii* propagation is mainly done by cuttings and seeds, but cuttings have lower survival and seeds are submitted to dormancy (Wang, Yan, & Mao, 2012), which is commercially efficient and therefore not recommended for large-scale propagation. Seeds of many shrub species cannot germinate even if we have optimal moisture, oxygen, and soil conditions (Mark, Tony, & Andrew, 2012). This phenomenon is called dormancy, which is quite important in the wild and it is an adaptive mechanism that ensures the survival of some species through periods of environmental stress (Baskin & Baskin, 2004; Gusano, Gomez, & Dicenta, 2004; Kermodé, 2005); however, dormant seeds require treatment prior to planting; pre-sowing treatments such as cold stratifications and seed burial (Merritt, Turne, Clarke, & Dixon, 2007; Travlos, Economou, & Karamanos, 2007) have been used to reduce seed hardness and to improve germination and emergence rate. Chemical plant growth regulators such as 6-benzyladenine (6-BA) and exogenous gibberellic acid (GA_3) play an important role in dormancy release and in the promotion of germination by increasing the growth potential of the embryo (Kucera, Cohn, & Leubner, 2005; Siddiqui, Mujib, & Maqsood, 2011). Chemical plant growth regulator, stratifications temperature and seed burial are three factors that can potentially affect seed dormancy and germination. Many researchers studied the influence of these factors and found that *Diren* (*Melastoma dodecandrum* Lour) seeds soaked in 250-1000 mg·L⁻¹ GA_3 or 50-200 mg·L⁻¹ 6-BA for 24 h can significantly increase its germination percentage and germination index (Tang, Wei, Yang, Liang, & Wei, 2012). Different seed species need different stratification temperature (-5~10 °C) and time (30-150 d) for dormancy breaking

Introducción

El género *Daphne* incluye 44 especies de arbustos de hoja perenne distribuidos en el noroeste de China, desde Sichuan y Shanxi hasta las provincias de Gansu. *Daphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae) es un arbusto de color café, de crecimiento lento, con una altura máxima de 2 m y tallos flexibles. La planta a menudo crece en tierras vírgenes en laderas, en ocasiones en barrancos, pastizales, lindes del bosque y matorrales en elevaciones de 2,400 m a 2,500 m en las montañas de Qilian en China (Zhao, 2007). *Daphne giraldii* tiene un gran valor ornamental debido a sus hermosas flores amarillas, folíolos de color verde oscuro y frutos rojos, redondos y con cáscara. La planta resiste el frío, los álcalis, y muestra una gran adaptación a los entornos en el noroeste de China; también se utiliza para el diseño de paisajes. El tallo y la corteza seca de la raíz de *D. giraldii* son conocidos como “ZuShima” (Zhao, Jin, & Zhang, 2012), los cuales se emplean comúnmente en la medicina tradicional china para el tratamiento de dolores y reumatismo, particularmente para artritis reumatoide (Li, Wu, & Yin, 2002). Debido al creciente consumo de *D. giraldii*, como planta ornamental y medicinal, es necesaria la producción mediante el desarrollo de métodos para su propagación. La propagación de *D. giraldii* se hace principalmente mediante esquejes y semillas; sin embargo, los esquejes tienen menor supervivencia y las semillas son sometidas a latencia (Wang, Yan, & Mao, 2012), lo cual no es comercialmente eficiente y por lo tanto, no se recomiendan para la propagación a gran escala. Las semillas de muchas especies de arbustos no pueden germinar, incluso si se siembran en condiciones con buena humedad, oxígeno y suelo (Mark, Tony, & Andrew, 2012). Este fenómeno se conoce como latencia, el cual es muy importante en la naturaleza y es un mecanismo adaptativo que garantiza la supervivencia de algunas especies a través de periodos de estrés ambiental (Baskin & Baskin, 2004; Gusano, Gomez, & Dicenta, 2004; Kermodé, 2005); sin embargo, las semillas latentes requieren tratamiento antes de que se siembren. Los tratamientos de presembrado como la estratificación por frío y la siembra de semillas (Merritt, Turne, Clarke, & Dixon, 2007; Travlos, Economou, & Karamanos, 2007) se han utilizado para reducir la dureza de semillas, y mejorar la germinación y tasa de emergencia. Los reguladores químicos de crecimiento tales como 6-benciladenina (6-BA) y ácido giberélico exógeno (GA_3) juegan un papel importante en la liberación de la latencia y en la promoción de la germinación al aumentar el potencial de crecimiento del embrión (Kucera, Cohn, & Leubner, 2005; Siddiqui, Mujib, & Maqsood, 2011). El regulador de crecimiento, la temperatura de la estratificación y la siembra de semillas son tres factores que pueden afectar potencialmente la latencia y la germinación. Muchos investigadores estudiaron la influencia de

(Walck & Hidayati, 2004; Walck, Hidayati, & Okagami, 2002; Tang et al., 2012); *Artemisia ordosica* Krasch. and *Ceratocarpus arenarius* L. seeds buried at a depth of 2-12 cm in sand or peat soil could effectively improve the seed germination percentages (Liu, Zhang, Yin, & Zhang, 2013; Wolfgang, 2002). Seedling emergence and successful establishment of a plant population are mainly regulated by dormancy breaking. Seed dormancy could therefore be an important limiting factor for *D. giraldii* propagation, since a successful method and technique to overcome seed dormancy in *D. giraldii* has not been reported. The aims of this study were to improve seed germination in nursery production of *D. giraldii* seedlings or in seeds sown in the field for large-scale use and to find the most efficient method to break the seed dormancy in order to accelerate its seed germination. Specifically, we studied the effects of various dormancy-breaking treatments (submersion in GA₃, 6-BA, cold stratification and burial seed) on seed germination performance of *D. giraldii*.

Materials and methods

D. giraldii seed collection and storage conditions

Freshly matured fruits consisting of a nutlet (hereafter called seeds) encapsulated by red flesh were collected on August 20, 2013. The fruits were obtained from the elevation (2,450 m) of Buer township in the Qilian Mountains with the following geographical coordinates: latitude 36° 43' North and longitude 97° 25' East with relatively warm summers and cold winters located in the Northwestern part of China. The seeds were separated from the fruit and dried after 6 days in the laboratory (20 °C to 22 °C). Then the seeds were cleaned and placed in paper bags at 25 ± 1 °C and were kept in the laboratory until use. The seeds used for chemical treatment and stratification treatment remain stored for about 8 d, the seeds used for different seed burial experiment remain stored for 35-75 d. The seeds of *D. giraldii* were 5 to 6 mm in diameter, ball-shaped and brown.

Effect of chemical treatment on dormancy of *D. giraldii*

Prior to experimental treatment, the collected seeds were examined to remove those that were stained, discolored, and damaged. All seeds were bathed in water, and floating seeds were removed from the water surface. Seeds were sterilized by immersion in 75 % alcohol for 30 min and rinsed three times using distilled water. Then the seed coats were removed by breaking the shell without damaging the endosperm and embryo. The experiment was therefore conducted as follows: (1) The seeds were immersed in 100, 150, 200 and 250 mg·L⁻¹ GA₃ solution for 8, 16 and 24 h, (2)

estos factores y encontraron que las semillas de *Diren* (*Melastoma dodecandrum* Lour) inmersas en 250 a 1,000 mg·L⁻¹ de GA₃ o 50 a 200 mg·L⁻¹ de 6-BA durante 24 h puede aumentar significativamente el porcentaje e índice de germinación (Tang, Wei, Yang, Liang, & Wei, 2012). Las semillas de diversas especies necesitan diferentes temperaturas de estratificación (-5 a 10 °C) y tiempos (30 a 150 días) para la ruptura de la latencia (Walck & Hidayati, 2004; Walck, Hidayati, & Okagami, 2002; Tang et al., 2012). Las semillas de *Artemisia ordosica* Krasch y *Ceratocarpus arenarius* L. enterradas a una profundidad de 2 a 12 cm en arena o suelo de turba pudieron mejorar la eficacia de los porcentajes de germinación de semillas (Liu, Zhang, Yin, & Zhang, 2013; Wolfgang, 2002). La emergencia de plántulas y el establecimiento exitoso de una población de plantas están regulados principalmente por la ruptura de la latencia. Por ello, la latencia de semillas podría ser un importante factor limitante para la propagación de *D. giraldii*, ya que no se ha reportado un método ni una técnica exitosa para superar la latencia de sus semillas. Los objetivos de este estudio fueron mejorar la germinación de semillas para la producción de plántulas de *D. giraldii* en viveros o en semillas sembradas en campo para uso a gran escala y encontrar el método más eficaz para la ruptura de la latencia de semillas con el fin de acelerar la germinación. Específicamente, se estudiaron los efectos de diversos tratamientos de ruptura de latencia (inmersión en GA₃, 6-BA, estratificación por frío y siembra de semillas) sobre el rendimiento de la germinación de semillas de *D. giraldii*.

Materiales y métodos

Recolección de semillas de *D. giraldii* y condiciones de almacenamiento

Frutas recién maduras, conformadas por una nuececilla (en lo sucesivo llamada semilla) cubierta por una cáscara roja, se recolectaron el 20 de agosto de 2013. Los frutos se obtuvieron a una altitud de 2,450 m, municipio de Buer en las montañas de Qilian con las siguientes coordenadas geográficas: 36° 43' LN y 97° 25' LE, con veranos relativamente cálidos e inviernos fríos en la parte noroeste de China. Las semillas se separaron de la fruta y se secaron después de pasar 6 días en el laboratorio (20 °C a 22 °C). Posteriormente, las semillas se limpiaron y colocaron en bolsas de papel a 25 ± 1 °C y se almacenaron en el laboratorio hasta su uso. Las semillas utilizadas para el tratamiento químico y tratamiento de estratificación se almacenaron durante aproximadamente 8 días, y las semillas utilizadas para los diferentes experimentos de siembra se almacenaron por 35 a 75 días. Las semillas de *D. giraldii* tienen un diámetro de 5 a 6 mm, son de forma redonda y de color café.

The seeds were soaked in 15, 30, 45 and 60 mg·L⁻¹ 6-BA solution for 8, 16 and 24 h, (3) The seeds were soaked for 8, 16 and 24 h using the following combinations: 100 mg·L⁻¹ GA₃ + 15 mg·L⁻¹ 6-BA, 150 mg·L⁻¹ GA₃ + 30 mg·L⁻¹ 6-BA, 200 mg·L⁻¹ GA₃ + 45 mg·L⁻¹ 6-BA, and 250 mg·L⁻¹ GA₃ + 60 mg·L⁻¹ 6-BA. Distilled water was used for the controls, three replications of 50 seeds were prepared for each treatment. After treatments, the seeds were placed in 9 cm-diameter Petri dishes with a filter paper moistened with 5 mL of distilled water at a day/night temperature of 25/22 °C in a 12-h photoperiod supplied by fluorescent lights (70-110 μmol·m⁻²·s⁻¹, 400-600 nm) and 50 % relative humidity. The Petri dishes were observed daily until the onset of germination. At the end of the experiment, the seeds were considered germinated if the radicle reached 1 mm in length. Germination was recorded daily until its cessation with a minimum of 10 d. Germination percentage (G_p) and rates of germination (G_R) were calculated according to the following formula (Olmez, Goktur, & Temel, 2007):

$$G_p = n/m * 100$$

where:

n = Number of germinated seeds
 m = Number of viable seeds initiated.

$$G_R = [(n_1 * v_1) + (n_2 * v_2) + (n_i * v_i)] / M$$

where:

n_i = Number of days for each counting
 v_i = Number of germinated seeds in each counting
 M = Total number of germinated seeds.

Effect of incremental stratification on dormancy of *D. giraldii*

D. giraldii seeds were placed into glass Petri dishes and mixed with moist sand (seeds:sand = 1:6, v/v). The moisture of the sand and seeds was examined continuously to avoid drying and poor aeration. Triplicate Petri dishes of 50 seeds were prepared and placed into an incubator in the dark at -5 °C, 0 °C, 5 °C and 10 °C for 30, 45, 60, 70 and 90 days. After stratifying the seeds for various durations at various temperatures, germination tests were conducted.

Effect of seed burial on dormancy of *D. giraldii*

On October 1 and 21, and on November 11, 2013, three packages of replicates of 50 seeds were placed separately into fine-mesh nylon bags. These seeds were buried in a sandy loam from the Hexi University, Zhangye with burial depth increments of 20, 40, 60, 80, 100 and 120 cm. No supplemental irrigation was provided. Treatment packages were recovered on April 10, 2014 (The seeds

Efecto del tratamiento químico en la latencia de *D. giraldii*

Antes del tratamiento experimental, las semillas recolectadas se examinaron para eliminar las que estuvieran manchadas, descoloridas y dañadas. Todas las semillas se lavaron y las semillas flotantes fueron retiradas de la superficie del agua. Las semillas se esterilizaron mediante inmersión en 75 % de alcohol durante 30 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada. Posteriormente, la cáscara de las semillas se retiró, rompiendo la cáscara sin dañar el endospermo y el embrión. En consecuencia, el experimento se realizó de la siguiente manera: (1) las semillas fueron inmersas en 100, 150, 200 y 250 mg·L⁻¹ de solución GA₃ por 8, 16 y 24 h; (2) las semillas fueron inmersas en 15, 30, 45 y 60 mg·L⁻¹ de solución 6-BA por 8, 16 y 24 h; (3) las semillas fueron inmersas durante 8, 16 y 24 h usando las siguientes combinaciones 100 mg·L⁻¹ GA₃ + 15 mg·L⁻¹ 6-BA, 150 mg·L⁻¹ GA₃ + 30 mg·L⁻¹ 6-BA, 200 mg·L⁻¹ GA₃ + 45 mg·L⁻¹ 6-BA, y 250 mg·L⁻¹ GA₃ + 60 mg·L⁻¹ 6-BA. Para cada tratamiento se prepararon tres réplicas de 50 semillas. Para el tratamiento testigo se utilizó agua destilada. Después de los tratamientos, las semillas se colocaron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con papel filtro humedecido en 5 mL de agua destilada a temperatura de día/noche de 25/22 °C en un fotoperiodo de 12 h proporcionado por luces fluorescentes (70 a 110 μmol·m⁻²·s⁻¹, 400-600 nm) y humedad relativa del 50 %. Las cajas de Petri fueron revisadas diariamente hasta iniciar la germinación. Al final del experimento, las semillas se consideraron germinadas si la radícula alcanzaba 1 mm de longitud. La germinación se registró diariamente hasta su cese con un mínimo de 10 días. El porcentaje (G_p) e índice de germinación (G_R) se calcularon de acuerdo con las siguientes fórmulas (Olmez, Goktur, & Temel, 2007):

$$G_p = n/m * 100$$

donde:

n = Número de semillas germinadas
 m = Número de semillas viables e iniciadas

$$G_R = [(n_1 * v_1) + (n_2 * v_2) + (n_i * v_i)] / M$$

donde:

n_i = Número de días para cada conteo
 v_i = Número de semillas germinada en cada conteo
 M = Número total de semillas germinadas.

Efecto de la estratificación en la latencia de *D. giraldii*

Las semillas de *D. giraldii* se colocaron en cajas de Petri de vidrio y se mezclaron con arena húmeda

for the former three burial treatment remain in the soil for about 190, 170 and 150 days, respectively), and the seeds were placed in 9-cm diameter Petri dishes with a filter paper moistened with distilled water. The control was the cleaned seeds stored in paper bags at 25 ± 1 °C in the laboratory. Germination tests were conducted as previously described.

Statistical analyses

ANOVA and Duncan's multiple range tests were carried out to analyze the data (Duncan, 1955) and the pre-treatment effects on G_p and G_R were determined using the SPSS 10.0 software package (Statistical Package for the Social Sciences [SPSS], 2000). G_p data were arcsine transformed before analysis. Tukey multiple comparison test (LSD test) was performed to determine the treatments with significant differences ($P = 0.05$). G_p and G_R obtained in tests on chemical treatment were analyzed by means of a three-factorial ANOVA, whereas the data obtained from the other treatment were analyzed by means of a two-factorial ANOVA. The figures were created with Origin 8.0 (OriginLab Corporation, 2007) when ANOVA indicated significant treatment effects ($P \leq 0.05$).

Results and discussion

Effect of chemical treatment on dormancy of *D. giraldii*

Figures 1 and 2 show G_p (over a 10 day period) and G_R of various chemically-treated seeds. The different chemical treatments were effective. G_p and G_R of fresh seeds were increased by GA_3 treatment (Figures 1 and 2). G_p of seeds treated with 100, 150, 200 and 250 $mg \cdot L^{-1}$ GA_3 for 16 h reached 17.3, 15.8, 15.1 and 14.7 %, respectively. Whereas the highest G_R of those seeds treated with the same solutions and hours (16 h) reached 0.61 (SD = 0.03). All treatments were significantly different from the control seeds treated with distilled water ($P < 0.05$). There is a similar trend of variation of G_p and G_R by GA_3 treatment for 8 h and 24 h. Statistical analyses showed that 6-BA treatment could also increase G_p and G_R significantly compared to the control ($P < 0.05$), those seeds soaked in 6-BA (30 $mg \cdot L^{-1}$) solutions for 16 h germinated to a maximum of 17.11 % (SD = 1.15, Figure 1), slightly lower than the maximum of GA_3 treatment (17.3 %, SD = 0.75, Figure 1), but there are no obvious difference between them ($P > 0.05$). Among all the chemical treatments, the highest G_p and G_R were 26.33 % (SD = 2.02) and 0.87 (SD = 0.06), respectively, which were obtained in the seeds submersed in 150 $mg \cdot L^{-1}$ GA_3 + 30 $mg \cdot L^{-1}$ 6-BA for 8 h under laboratory conditions (Figures 1 and 2). Statistical analyses also showed that G_p and G_R generally increased with the increase in GA_3 + 6-BA concentrations and then decreased

(semillas:arena = 1:6, v/v). La humedad de la arena y las semillas se examinaron continuamente para evitar el secado y la mala aireación. Las placas de Petri de 50 semillas se prepararon por triplicado y se colocaron en una incubadora en la oscuridad a -5 °C, 0 °C, 5 °C y 10 °C durante 30, 45, 60, 70 y 90 días. Las pruebas de germinación se realizaron después de estratificar las semillas por varios periodos a diversas temperaturas.

Efecto de la siembra de semilla en la latencia de *D. giraldii*

Las semillas fueron preparadas como se describió previamente, el 01 y el 21 de octubre y el 11 de noviembre de 2013, tres paquetes con 50 semillas se colocaron por separado en bolsas de nylon de malla fina. Estos paquetes se enterraron en suelo franco arenoso proveniente de la Universidad de Hexi en Zhangye a profundidades de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 cm. No se proporcionó riego suplementario. Los paquetes se recuperaron el 10 de abril de 2014 (las semillas permanecieron enterradas en el suelo durante 190, 170 y 150 días); posteriormente, las semillas se colocaron en cajas de Petri de 9 cm con papel filtro humedecido en agua destilada. El tratamiento testigo fueron semillas limpias colocadas en bolsas de papel y almacenadas en el laboratorio a 25 ± 1 °C. Se llevaron a cabo pruebas de germinación como se describió anteriormente.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con pruebas de ANOVA y rango múltiple de Duncan (Duncan, 1955) y se determinaron los efectos de cada pretratamiento sobre G_p y G_R con el paquete software SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences [SPSS], 2000). Los datos de G_p se transformaron con la función arcoseno antes del análisis. La prueba de comparación múltiple de Tukey (prueba DSH) se llevó a cabo para determinar los tratamientos con diferencias significativas ($P = 0.05$). Los datos de G_p y G_R obtenidos en pruebas sobre tratamiento químico se analizaron por medio de un ANOVA de tres factores, mientras que los datos obtenidos en los tratamientos de estratificación y siembra de semillas se analizaron por medio de un ANOVA de dos factores. Las figuras fueron creadas con Origin 8.0 (OriginLab Corporation, 2007) cuando el ANOVA mostró efectos significativos ($P \leq 0.05$).

Resultados y discusión

Efectos del tratamiento químico en la latencia de *D. giraldii*

En las Figuras 1 y 2 se muestra los G_p (en un periodo de 10 días) y G_R de las semillas tratadas químicamente. Los tratamientos químicos fueron eficaces; los valores de G_p y G_R de las semillas frescas aumentaron mediante

with the sustainable increase in these chemical solutions significantly ($P < 0.05$). From Table 1 shows the interaction between chemical type and duration time, chemical type and chemical concentration affected G_p and G_R ($P < 0.05$), whereas the interaction between duration time and chemical concentration had no effect on G_p and G_R ($P > 0.05$). Throughout the experiments, the mixed solution of GA_3 and 6-BA significantly enhanced the germination of *D. giraldii* seeds compared to the other treatments; however, this combination did not completely overcome the seed dormancy.

Effect of stratification on dormancy of *D. giraldii*

As shown in Figure 3, stratification obviously increased the total germination of *D. giraldii* seeds. When the duration of stratification was increased from 30 days to 70 days at 5 °C, both G_p and G_R significantly increased ($P < 0.05$), and then significantly decreased ($P < 0.05$) when stratified for 90 d, showing the same trend as that of 10 °C treatment. The seeds stratified for 30, 50, 70 and 90 d at 5 °C resulted in G_p of 12, 22, 52.33 and 44.67 %, respectively. The highest G_p and G_R were obtain from this treatment; the values were slightly higher than the 10 °C treatment. These results were significantly different from those of the treatment at -5 °C and 0 °C and those obtained from the non-stratified seeds

el tratamiento GA_3 (Figuras 1 y 2). El porcentaje de germinación de las semillas tratadas con 100, 150, 200 y 250 mg·L⁻¹ de GA_3 por 16 h fue de 17.3, 15.8, 15.1 y 14.7 %, respectivamente, mientras que la tasa de germinación más alta de las semillas tratadas con las mismas soluciones y las mismas horas (16) fue de 0.61 (DE = 0.03). Todos los tratamientos fueron significativamente diferentes del testigo tratado con agua destilada ($P < 0.05$). Existe una tendencia similar de variación de G_p y G_R mediante el tratamiento GA_3 durante 8 y 24 h. Los análisis estadísticos mostraron que el tratamiento 6-BA también pudo aumentar G_p y G_R significativamente en comparación con el testigo ($P < 0.05$). Las semillas remojadas en soluciones de 6-BA (30 mg·L⁻¹) durante 16 h germinaron a un máximo de 17.11 % (DE = 1.15, Figura 1), ligeramente inferior a la máxima del tratamiento GA_3 (17.3 %, DE = 0.75, Figura 1), pero no se observaron diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$). Entre todos los tratamientos químicos, los más altos G_p y G_R fueron 26.33 % (DE = 2.02) y 0.87 (DE = 0.06), respectivamente, que se obtuvieron en las semillas sumergidas en 150 mg·L⁻¹ GA_3 + 30 mg·L⁻¹ 6-BA durante 8 h en condiciones de laboratorio (Figuras 1 y 2). Los análisis estadísticos también mostraron que G_p y G_R aumentaron con el incremento en las concentraciones de GA_3 + 6-BA y posteriormente disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) con el aumento sostenido de estas soluciones químicas. En el Cuadro 1 se muestra

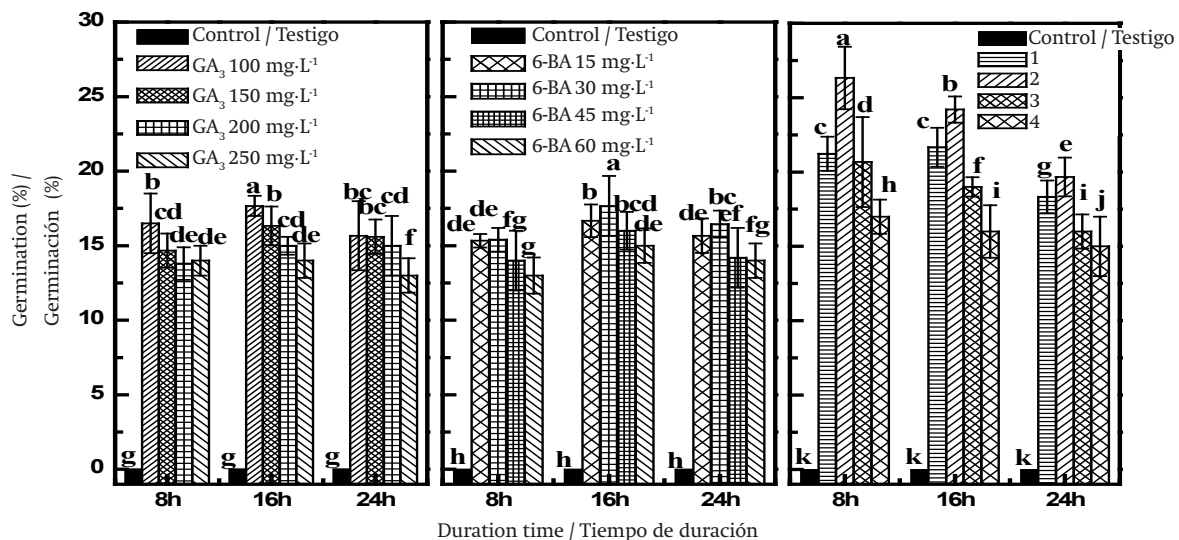


Figure 1. Cumulative germination percentage of the *Daphne giraldii* seeds germinated at various duration times. 6-BA: 6-benzyladenine; GA_3 : Gibberellic acid. Treatments: 1) 100 mg·L⁻¹ GA_3 + 15 mg·L⁻¹ 6-BA, 2) 150 mg·L⁻¹ GA_3 + 30 mg·L⁻¹ 6-BA, 3) 200 mg·L⁻¹ GA_3 + 45 mg·L⁻¹ 6-BA, 4) 250 mg·L⁻¹ GA_3 + 60 mg·L⁻¹ 6-BA. The values (mean \pm SE, n = 3) marked with the same letter (a-k) in the same frame are not significantly different by LSD test ($P \leq 0.05$).

Figura 1. Porcentaje de germinación acumulada de semillas de *Daphne giraldii* germinadas en diferentes tiempos. 6-BA: 6-benziladenina; GA_3 : Ácido giberélico. Tratamientos: 1) 100 mg·L⁻¹ GA_3 + 15 mg·L⁻¹ 6-BA, 2) 150 mg·L⁻¹ GA_3 + 30 mg·L⁻¹ 6-BA, 3) 200 mg·L⁻¹ GA_3 + 45 mg·L⁻¹ 6-BA, 4) 250 mg·L⁻¹ GA_3 + 60 mg·L⁻¹ 6-BA. Los valores (media \pm EE, n = 3) marcados con la misma letra (a-k) en el mismo cuadro no son significativamente diferentes mediante la diferencia mínima significativa de Tukey ($P \leq 0.05$).

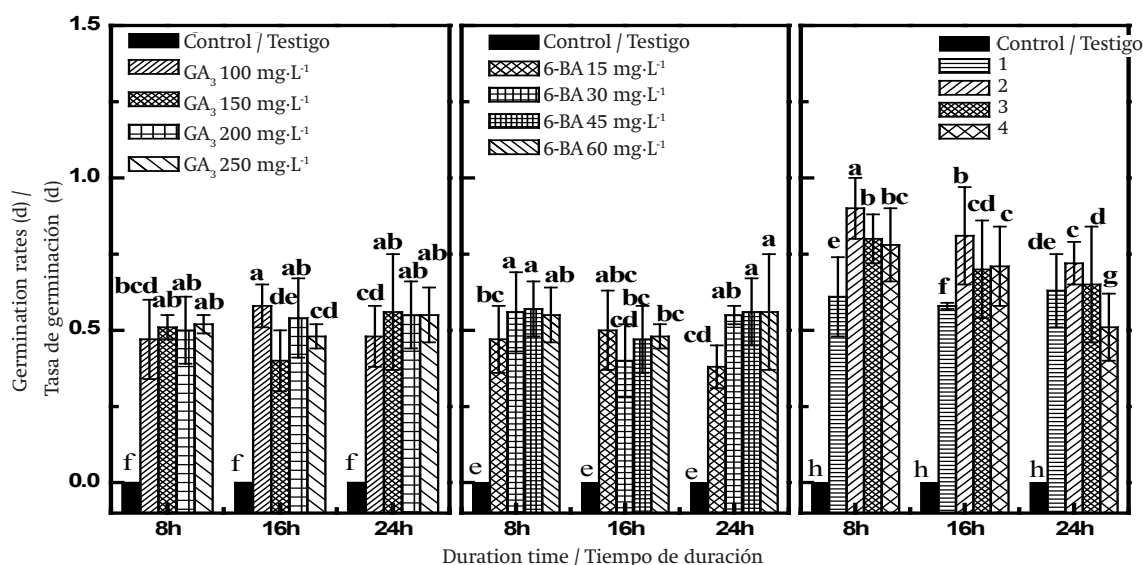


Figure 2. Cumulative germination index of the *Daphne giraldii* seeds germinated at various duration times. 6-BA: 6-benzyladenine; GA₃: Gibberellic acid. Treatments: 1) 100 mg·L⁻¹ GA₃ + 15 mg·L⁻¹ 6-BA, 2) 150 mg·L⁻¹ GA₃ + 30 mg·L⁻¹ 6-BA, 3) 200 mg·L⁻¹ GA₃ + 45 mg·L⁻¹ 6-BA, 4) 250 mg·L⁻¹ GA₃ + 60 mg·L⁻¹ 6-BA. The values (mean ± SE, n = 3) marked with the same letter (a-h) in the same frame are not significantly different by LSD test ($P \leq 0.05$).

Figura 2. Tasa de germinación acumulada de semillas de *Daphne giraldii* germinadas en diferentes tiempos. 6-BA: 6-benziladenina; GA₃: Ácido giberélico. Tratamientos: 1) 100 mg·L⁻¹ GA₃ + 15 mg·L⁻¹ 6-BA, 2) 150 mg·L⁻¹ GA₃ + 30 mg·L⁻¹ 6-BA, 3) 200 mg·L⁻¹ GA₃ + 45 mg·L⁻¹ 6-BA, 4) 250 mg·L⁻¹ GA₃ + 60 mg·L⁻¹ 6-BA. Los valores (media ± SE, n = 3) marcados con la misma letra (a-h) en el mismo cuadro no son significativamente diferentes mediante la diferencia mínima significativa de Tukey ($P \leq 0.05$).

Table 1. ANOVAs of individual effects and interactions of the types of treatments on the percentage and germination rate of *Daphne giraldii* seeds.

Cuadro 1. ANOVAs de efectos individuales e interacciones de los tipos de tratamientos sobre el porcentaje (G_p) y tasa (G_R) y tasa de germinación de las semillas de *Daphne giraldii*.

Variable	Source of variation / Fuente de variación	Df	F	P
G_p	Chemical type (CT)/Tipo de tratamiento químico (CT)	3	38.6	< 0.001
	Duration time (DT)/Tiempo de duración (TD)	3	45.3	< 0.001
	Chemical concentration (CC)/Concentración (CQ)	4	14.1	< 0.001
	CT × DT	9	32.6	< 0.001
	CT × CC	12	21.7	< 0.001
	DT × CC	12	0.8	0.538
G_R	Chemical type (CT)/Tipo de tratamiento químico (CT)	3	38.1	< 0.001
	Duration time (DT)/Tiempo de duración (TD)	3	12.3	0.002
	Chemical concentration (CC)/Concentración (CQ)	4	8.9	0.007
	CT × DT	9	7.5	0.006
	CT × CC	12	10.1	0.003
	DT × CC	12	1.1	0.467

(control). At the temperature 0 °C, seeds stratification for 50 d had a low G_p but also significantly different from the 30 d duration which did not germinated ($P < 0.05$), however, there were no significantly difference with the increase of the duration time (70-90 d) ($P > 0.05$). These results were the same as those of G_R . Moreover, the significant variation confirmed in our study can be attributed to the treatment of the seeds stratified for 70 d at 5 °C, 0 °C, and 10 °C treatments, where G_p and G_R increased, whereas the seeds at -5 °C did not germinated at any stratification period.

que la interacción entre el tratamiento químico y el tiempo de duración, el tratamiento químico y concentración química afectaron G_p y G_R ($P < 0.05$) significativamente, mientras que la interacción entre tiempo de duración y concentración química no tuvo efecto en G_p y G_R ($P > 0.05$). A lo largo de los experimentos, la solución mixta de GA_3 y 6-BA mejoró de forma significativa la germinación de semillas de *D. giraldii* en comparación con los otros tratamientos; sin embargo, esta combinación no superó por completo la latencia de las semillas.

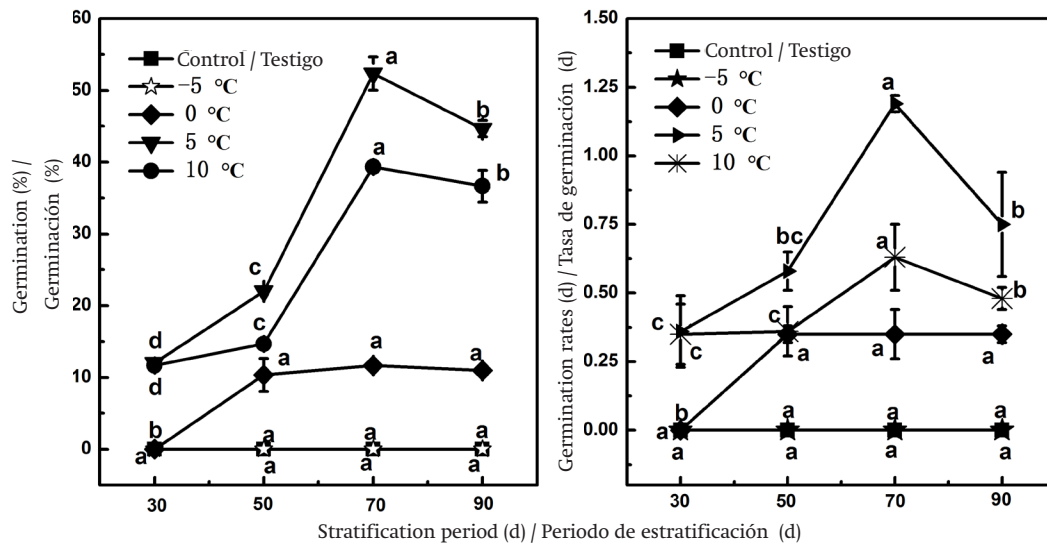


FIGURE 3. Effects of stratification on the germination of *Daphne giraldii* seeds. The values (mean \pm SE, $n = 3$) marked with the same letter (a-d) in the same line are not significantly different by LSD test ($P \leq 0.05$). Control was the fresh seeds.

FIGURA 3. Efectos de estratificación en la germinación de semillas de *Daphne giraldii*. Los valores (media \pm EE, $n = 3$) marcados con la misma letra (a-d) en el mismo cuadro no son significativamente diferentes mediante la diferencia mínima significativa de Tukey ($P \leq 0.05$). El testigo fue semillas frescas.

Effect of seed burial on dormancy of *D. giraldii*

The effects of sowing depth and duration of seed burial on G_p and G_R are summarized in Figure 4 and Table 2. The seeds buried at 20 cm for 190 d had 11.3 % germination, whereas those buried at 100 cm for 170 d 86.5 % germination. *D. giraldii* seeds buried at 100 cm depth at 100 cm for 170 d exceeded 80 %, in which germination was rapid and the majority of seeds germinated within one week. In the remaining depths, G_p decreased for all treatments and the control (obtained from the laboratory at 25 ± 1 °C) did not germinated; these results were the same as those of G_R . However, the seeds buried at 20 cm depth had a low G_p and G_R . Table 2 show that the effects of burial time, burial depth and the interaction between burial time and burial depth significantly affected ($P < 0.05$) G_p and G_R of *D. giraldii* seeds. A significantly

Efecto de la estratificación sobre la latencia de *D. giraldii*

Como se muestra en la Figura 3, la estratificación, obviamente, aumentó la germinación total de semillas de *D. giraldii*. Cuando la duración de la estratificación se incrementó de 30 días a 70 días a 5 °C, tanto G_p y G_R aumentaron significativamente ($P < 0.05$), y disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) cuando se estratificó por 90 días, lo que muestra la misma tendencia en comparación con el tratamiento a 10 °C. Las semillas estratificadas por 30, 50, 70 y 90 días a 5 °C obtuvieron un G_p de 12, 22, 52.33 y 44.67 %, respectivamente. El G_p y G_R más altos se obtuvieron con este tratamiento; los valores fueron un poco más altos que los valores obtenidos a 10 °C. Estos resultados fueron significativamente diferentes de los resultados del tratamiento a -5 °C y 0 °C y de los obtenidos de semillas

interaction effect between burial time and burial depth was apparently caused by a gradual increase over depth of the burial at suitable burial time (Figure 4; Table 2).

Less than 1 % of the buried seeds were considered dead in the seed lots exhumed on April 10, 2014. Daily average temperatures at the burial site were between -20 °C and 9 °C from October 2013 to early April 2014 and slightly increased in March. This finding indicates that the dormancy level increased in response to this temperature range outside.

Seed problems related to seed dormancy often limit the use of some species for the production of seedlings.

no estratificadas (tratamiento testigo). Las semillas con el tratamiento de estratificación por 50 días a 0 °C tuvieron un porcentaje de germinación bajo y significativamente diferente en comparación con las semillas estratificadas por 30 días a 0 °C, ya que las primeras no germinaron ($P < 0.05$); sin embargo, no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) con el aumento del tiempo (70 a 90 días). Estos resultados mostraron la misma tendencia que los de G_R . Por otra parte, la variación significativa confirmada en este estudio se puede atribuir al tratamiento de semillas estratificadas por 70 días a 5 °C, 0 °C y 10 °C, donde los valores de G_p y G_R aumentaron, mientras que las semillas a -5 °C no germinaron en ningún periodo de estratificación.

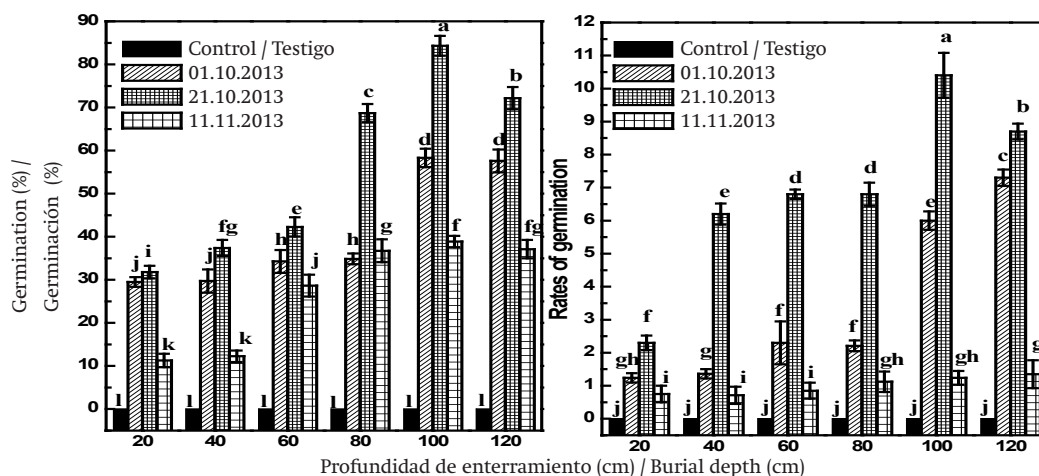


Figure 4. G_p and G_R of *Daphne giraldii* for various periods. The values (mean \pm SE, $n = 3$) marked with the same letter (a-l) in the same frame are not significantly different by LSD of Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Figura 4. Porcentaje y tasa de germinación de semillas de *Daphne giraldii* durante diversos periodos. Los valores (media \pm EE, $n = 3$) marcados con la misma letra (a-l) en el mismo marco no son significativamente diferentes mediante la diferencia mínima significativa de Tukey ($P \leq 0.05$).

Table 2. ANOVA of the germination percentage (G_p) and germination rate (G_R) of *Daphne giraldii* seeds as result of varying depth and time of burial carried out in 2013 in an open field (split-plot ANOVA).

Cuadro 2. ANOVA del porcentaje (G_p) e índice (G_R) de germinación de semillas de *Daphne giraldii* como resultado de la variación de profundidad y tiempo de siembra realizado en 2013 en campo abierto (split-plot ANOVA).

Variable	Source of variation / Fuente de variación	Df	F	P
G_p	Burial time / Tiempo de siembra	3	24.08	< 0.001
	Burial depth / Profundidad de siembra	5	0.53	< 0.001
	Burial time \times burial depth / Tiempo de siembra \times profundidad de siembra	15	0.48	< 0.001
G_R	Burial time / Tiempo de siembra	3	22.76	< 0.001
	Burial depth / Profundidad de siembra	5	0.31	< 0.001
	Burial time \times burial depth / Tiempo de siembra \times profundidad de siembra	15	0.56	< 0.001

Different plant species have different seed dormancy classes, which can be divided into morphological, morphophysiological, physiological, physical and combinational groups (Baskin & Baskin, 2004; Gerhard, 2005; Geissler & Gzik, 2010). Xing, Guo, and Wang (2003) reported that the plant *Stellera chamaejasme* L. which belonged to Thymelaeaceae has the physical and physiological dormancy, and the highest germination was less than 50 % under various pre-sowing treatment. Our experiments show that the seeds of *D. giraldii* belong to the physiological class according to the Baskin seed dormancy classification system (Baskin & Baskin, 2004). These findings support the conclusion of Wang (Wang et al., 2012) that fresh *D. giraldii* seeds have this type of dormancy.

Some researchers (Airi, Bhatt, Bhatt, Rawal, & Dhar, 2009; Azad, Rahman, & Matin, 2011) have studied different pre-sowing treatments for seed germination to break seed dormancy and thereby enhance the rate of germination and accelerate the germination process. Seed dormancy may be overcome by chemical treatments, incremental stratification and seed burial (Ooim, Auld, & Whelan 2006; Travlos et al., 2007; Merritt et al., 2007). The results of this study provided several previously unreported insights into the dormancy and germination of *D. giraldii* seeds. The dormancy level of a seed batch cannot be directly assessed, but can be indirectly measured using germination tests. The findings of the present study showed that the G_p and G_R of *D. giraldii* seeds significantly increased ($P < 0.05$) under different pre-treatments compared with the control. Pre-treatments exhibited that chemical treatment was not very effective in breaking the dormancy (Figures 1 and 2). GA_3 and 6-BA can increase and synchronize the seed germination of many plants (Nadjafi, Bannayan, Tabrizi, & Rastgoo, 2006; Chisha, Woodward, & Price, 2007). Tang et al. (2012) and Yang, Ye, Wang, and Yin (2009) reported soaking for 24 h in 250 mg·L⁻¹ GA_3 or 50 mg·L⁻¹ 6-BA could reach significantly G_p (40~80 %) for *M. dodecandrum* and *Ardisia crenata* Sims. seeds. However, our data showed that the seed germination in the mixed liquor of GA_3 and 6-BA solutions at various times shows significant differences with the control (fresh seeds) and higher germination than obtained with other single chemical treatments. The best germination condition of chemically-treated seeds had low G_p (less than 30 %) and G_R (less than 1.5). The fresh seeds of *D. giraldii* without pretreatment did not germinate, but the chemical pretreatments slightly improved the germination, which revealed that the embryo exhibited some degree of dormancy that was overcome by chemical treatments partially. Chemical treatments were not completely effective in breaking the dormancy, which could be attributed to the basic differences in the mechanisms that impose dormancy with other species. Baskin and Baskin (2001) indicated that the dormancy of Plumbaginaceae and Juncaginaceae is physiological in nature and can

Efecto de la siembra de semilla sobre la latencia de *D. giraldii*

Los efectos de profundidad de siembra y duración de siembra de semillas sobre los valores de G_p y G_R se resumen en la Figura 4 y Cuadro 2. Las semillas enterradas a 20 cm por 190 días tuvieron una germinación de 11.3 %, mientras que las semillas enterradas a 100 cm por 170 días tuvieron una germinación de 86.5 %. Las semillas de *D. giraldii* enterradas a 100 cm de profundidad por 170 días sobrepasaron el 80 % de germinación; la mayoría de las semillas germinaron rápidamente en aproximadamente una semana. En las profundidades restantes, G_p disminuyó en el caso de todos los tratamientos y las semillas del tratamiento testigo (obtenidas del laboratorio a 25 ± 1 °C) no germinaron; estos resultados fueron similares que los de G_R . Las semillas enterradas a 20 cm de profundidad tuvieron un G_p and G_R bajo. En el Cuadro 2 se muestra que los efectos del tiempo y profundidad de siembra y la interacción entre estos factores afectaron significativamente ($P < 0.05$) el G_p y G_R de semillas de *D. giraldii*. Un efecto significativo de la interacción entre el tiempo y la profundidad de siembra fue causado aparentemente por un aumento gradual en la profundidad de siembra en el momento adecuado (Figura 4 Cuadro 2).

Menos del 1 % de las semillas enterradas fueron consideradas muertas dentro de los lotes de semillas exhumadas el 10 de abril de 2014. Las temperaturas medias diarias en el lugar de siembra de octubre de 2013 hasta principios de abril de 2014 fueron de entre -20 °C y 9 °C y aumentaron ligeramente en marzo. Este hallazgo indica que el nivel de latencia aumentó en respuesta a este intervalo de temperatura exterior.

Los problemas relacionados con la latencia de semillas a menudo limitan el uso de algunas especies en la producción de plántulas. Diversas especies de plantas tienen diferentes clases de latencia de semillas, y éstas se pueden dividir en grupos morfológicos, morfofisiológicos, fisiológicos, físicos y combinatorios (Baskin & Baskin, 2004; Gerhard, 2005; Geissler & Gzik, 2010). Xing, Guo, y Wang (2003) reportaron que la planta *Stellera chamaejasme* L., que pertenece a la familia Thymelaeaceae, tiene la latencia física y fisiológica, que la germinación más alta fue menor de 50 % en virtud de diversos tratamientos de presembrado. Nuestros experimentos muestran que las semillas de *D. giraldii* pertenecen a la clase fisiológica de acuerdo con el sistema de clasificación de latencia de semillas de Baskin (Baskin & Baskin, 2004). Estos resultados apoyan la conclusión de Wang et al. (2012) de que las semillas frescas de *D. giraldii* tienen este tipo de latencia.

Algunos investigadores (Airi, Bhatt, Bhatt, Rawal, & Dhar, 2009; Azad, Rahman, & Matin, 2011) han

be broken by cold stratification. Stratification is widely used to break physiological dormancy and enhance the germination of seeds in numerous species (Baker, Steadman, Plummer, & Dixon, 2005; Farshad, Hojat, & Mahmood, 2012). In the present study, the seeds of *D. giraldii* stratified for a period of time responded favorably to chemical treatments. The seeds stratified for 70 d at 5 °C increased G_p (52.33 %) and G_R (1.19), whereas the lowest germination (0 %) was found in the stratification treatment at -5 °C for 90 d, and 0 °C for 30 d; similar results were reported by Sechenbater and Am (2002). GA₃ and 6-BA promotes seed germination and stratification breaks dormancy at a higher degree, thus *D. giraldii* seeds are classified as having physiological dormancy (Baskin & Baskin, 2004; Nikolaeva, 1977). Recent physiological studies have shown that physiological dormancy includes an embryo and coat component, and their sum and interaction determine the degree of whole seed physiological dormancy (Chen, Kuo, & Chien, 2008). In our study, cold stratification had better effects than chemical treatment on relieving dormancy and the higher G_p had been attained in pretreatments of *D. giraldii* seeds by prolonged cold stratification at 5 °C for 70 d, which was better than 10 °C treatment, this can be explained by this condition where it may be beneficial for softening the seed coat in moist sand and eliminating germination inhibitors under a suitable temperature (5 °C) (Packa, Kwiatkowski, & Graban, 2014).

Our results showed that the physiological dormancy of *D. giraldii* seeds was effectively alleviated during burial. The Hexi university is located in the temperate desert and the edge of Qilian Mountains, the soil composition in this area were clay loam, silt loam soil and sandy loam soil 0~150 cm below the surface (Li, Qi, Zhao, & Zhang, 1999), burial treatments alleviated seed dormancy and thus increased the G_p and G_R of *D. giraldii* in this area. The seeds buried on October 21, 2013 at 100 cm depth and recovered on April 10, 2014 (seeds remain in soil for 170 d) showed the highest germination success with G_p of 86.5 % and G_R of 10.11. This treatment was also the most effective in alleviating seed dormancy, demonstrating that the period between October 21, 2013 and April 10, 2014 is likely to be a predominant period and appropriate burial time (170 d) for releasing seed dormancy of *D. giraldii* seeds in this area. Among those burial treatments, increasing the burial depth up to 100 cm significantly enhanced G_p and G_R , and the seeds buried at 100 cm depth had higher G_p and G_R than those buried at soil depths of 20, 40, 60, 80 and 120 cm. G_p and G_R slightly decreased when soil depths continuously increased (120 cm), This is perhaps as a result of the low oxygen level at greater soil depths, a very low oxygen levels at a certain soil depth may lead to induction of secondary dormancy (Malik & Vanden, 1988; Poinar & Columbus, 1992). The buried seeds of *D. giraldii* could be in a hypoxic environment, and seed germination may be affected by the variation in soil oxygen availability

estudiado distintos tratamientos de presiembr para la germinación de semillas para la ruptura de la latencia y, por consiguiente, mejorar el índice de germinación y acelerar el proceso de germinación. La latencia de semillas puede ser interrumpida mediante tratamientos químicos, estratificación gradual y siembra de semillas (Merritt et al., 2007; Ooim, Auld, & Whelan 2006; Travlos et al., 2007). Los resultados de este estudio proporcionan varios puntos de vista no reportados sobre la latencia y germinación de semillas de *D. giraldii*. El nivel de latencia de un lote de semillas no puede evaluarse directamente, pero se puede medir indirectamente mediante las pruebas de germinación. Los resultados del presente estudio muestran que los G_p y G_R de semillas de *D. giraldii* aumentaron significativamente ($P < 0.05$) en los diferentes pretratamientos en comparación con testigo. Los pretratamientos mostraron que el tratamiento químico no fue muy eficaz para la ruptura de la latencia (Figuras 1 y 2), aunque GA₃ y 6-BA pueden aumentar y sincronizar la germinación de semillas de muchas plantas (Chisha, Woodward, & Price, 2007; Nadjafi, Bannayan, Tabrizi, & Rastgoo, 2006). Tang et al. (2012) y Yang, Ye, Wang, y Yin (2009) reportaron que con la inmersión de semillas de *M. dodecandrum* y *Ardisia crenata* Sims durante 24 h en 250 mg·L⁻¹ de GA₃ o 50 mg·L⁻¹ de 6-BA se podría alcanzar significativamente de 40 a 80 % de germinación. Sin embargo, los datos de este estudio mostraron que la germinación de semillas tratadas con soluciones de mezcla de GA₃ y 6-BA en distintos momentos tiene diferencias significativas en comparación con el tratamiento testigo (semillas frescas) y mayor germinación que la obtenida con otros tratamientos químicos individuales. La mejor condición de germinación de semillas tratadas con químicos tuvo un porcentaje de germinación bajo (menos de 30 %) así como el índice de germinación (menos de 1.5). Las semillas frescas de *D. giraldii* sin tratamiento previo no germinaron, pero los pretratamientos químicos mejoraron ligeramente la germinación, la cual reveló que el embrión mostró algún grado de latencia que fue interrumpido parcialmente por dichos tratamientos. Los tratamientos químicos no fueron completamente eficaces para la ruptura de la latencia, lo que podría atribuirse a las diferencias en los mecanismos que imponen la latencia con otras especies. Baskin y Baskin (2001) indicaron que la latencia de Plumbaginaceae y Juncaginaceae es fisiológica y puede romperse mediante estratificación por frío. La estratificación es utilizada ampliamente para la ruptura de la latencia fisiológica y mejorar la germinación de semillas de numerosas especies (Baker, Steadman, Plummer, & Dixon, 2005; Farshad, Hojat, & Mahmood, 2012). En el presente estudio, las semillas de *D. giraldii* estratificadas por periodos respondieron favorablemente a los tratamientos químicos. Las semillas estratificadas por 70 días a 5 °C aumentaron el porcentaje de germinación (52.33 %) e índice de germinación (1.19),

associated with different burial depths (Yan, Liu, Li, & Ma, 2007). However, some study work is needed to explore the oxygen levels in various burial depth of this area further. The results of our study differ from the findings reported by other authors in recent years. In a China study the germination of northwest shrub seeds *A. ordosica* was enhanced by burial at 5 cm depth for six months (Liu et al., 2013), whereas another Turkey study reveals that the greater depths (> 20 cm) would possibly induce seeds into secondary dormancy (Mennan, 2003). The above discrepancies could result from genetic variations in the studied populations, environment conditions and soil composition and treatment applied before germination. During winter, the surface of the land in the experimental area is frozen because the temperature falls to -20°C outside (Li, Gao, Wang, & Wang, 2013). In early spring, the temperature increases from 5°C to 9°C , and the soil becomes wet because of melting ice and snow. Thus, the cold winter season is likely to be a predominant period for releasing seed dormancy in *D. giraldii*, and the 170 d burial period effectively affected and enhanced germination. The physiological nature of the embryo dormancy in *D. giraldii* is not yet clearly elucidated but a possible explanation is given by Walker (1971), who showed that dormancy is controlled to some extent by some inhibitors in the seed. These inhibitors are possibly formed at an early stage in the development of the seed to prevent the germination process. In this study, the response may be due to the better degradation of germination inhibitors in the embryo over the 170 d burial time in this area under appropriate depth of soil. Thus, we recommend using a more appropriate burial treatment to break dormancy in future germination studies on *D. giraldii*. This information may be useful to cultivate and conserve other shrubs grown in the Qilian Mountains in China and elucidate their survival under similar extreme environments.

Conclusions

From this research, it can be concluded that the very poor natural regeneration of *D. giraldii* is mostly attributed to physiological dormancy. This study indicated that seed stratification at 5°C for 70 days appeared to be a more effective method to break seed dormancy of *D. giraldii* than chemical treatment. However, seeds were buried in sandy loam at 100 cm depth for 170 days to offer the most convenient and effective dormancy breaking method for *D. giraldii*. These findings make a significant contribution to the conservation efforts for this endemic species grown in Northwestern China.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial assistance from the Gansu Province Natural Science Fund Project (Grant No. 1506RJZG052, No. 1308RJZG156) and Hexi

mientras que la germinación más baja (0 %) se encontró en el tratamiento de estratificación a -5°C durante 90 días y a 0°C durante 30 días; Sechenbater y Am (2002) reportaron un resultado similar. GA_3 y 6-BA promueven la germinación de semillas, y la estratificación, la ruptura de la latencia a un nivel mayor, de este modo, las semillas de *D. giraldii* se clasifican por tener latencia fisiológica (Baskin & Baskin, 2004; Nikolaeva, 1977). Estudios fisiológicos recientes han demostrado que la latencia fisiológica incluye un embrión y un recubrimiento, y su suma e interacción determinan el grado de toda la latencia fisiológica de la semilla (Chen, Kuo, & Chien, 2008). En este estudio, la estratificación por frío tiene mejores efectos que el tratamiento químico en la ruptura de la latencia. Un porcentaje de germinación mayor fue alcanzado en pretratamientos de semillas de *D. giraldii* mediante la estratificación por frío a 5°C durante 70 días, que fue mejor en comparación con el tratamiento a 10°C . Esto puede explicar que tal condición puede ser beneficiosa para ablandar el recubrimiento de la semilla en arena húmeda y eliminar los inhibidores de germinación a una temperatura adecuada (5°C) (Packa, Kwiatkowski, & Graban, 2014).

Los resultados de este estudio mostraron que la latencia fisiológica de semillas de *D. giraldii* fue mitigada de manera efectiva durante la siembra. La Universidad de Hexi se ubica en el desierto templado y las montañas Qilian; los tipos de suelo en esta zona son franco arcilloso, franco limoso y franco arenoso con 0 a 150 cm debajo de la superficie (Li, Qi, Zhao, & Zhang, 1999). Los tratamientos de siembra mitigaron la latencia de las semillas y, por lo tanto, incrementaron el G_p y G_r de *D. giraldii* en dicha área. Las semillas enterradas el 21 de octubre de 2013 a 100 cm de profundidad y que se extrajeron el 10 de abril 2014 (las semillas permanecieron en el suelo durante 170 días) tuvieron la germinación más alta con G_p de 86.5 % y G_r de 10.11. Este tratamiento también fue el más eficaz en el alivio de latencia de las semillas, lo que demuestra que es probable que el periodo comprendido entre 21 de octubre de 2013 y 10 de abril de 2014 sea un periodo predominante, y momento adecuado para la siembra (170 días) y para la liberación de latencia de las semillas de *D. giraldii* en dicha área. La profundidad de siembra hasta 100 cm mejoró significativamente el porcentaje e índice de germinación; las semillas enterradas a 100 cm de profundidad tuvieron mayor porcentaje e índice de germinación en comparación con aquellas enterradas a 20, 40, 60, 80 y 120 cm. El porcentaje e índice de germinación disminuyeron ligeramente cuando se aumentó de forma continua la profundidad del suelo (120 cm). Esto tal vez sea resultado del bajo nivel de oxígeno a mayores profundidades del suelo; niveles muy bajos de oxígeno a cierta profundidad pueden llevar a la inducción de la latencia secundaria (Malik & Vanden, 1988; Poinar & Columbus, 1992). Las semillas enterradas de *D. giraldii* podrían estar en un ambiente

University Headmaster fund (XZ2013-03). We are extremely grateful to Pr. Enhe Zhang and Qinlin Wang for their technical assistance.

End of English version

References / Referencias

- Airi, S., Bhatt, I. D., Bhatt, A., Rawal, R. S., & Dhar, U. (2009). Variations in seed germination of *Hippophae salicifolia* with different presoaking treatments. *Journal of Forest Research*, 20, 27–30. doi: 10.1007/s11676-009-0005-3
- Azad, M. S., Rahman, M. T., & Matin, M. A. (2011). Seed germination techniques of *Phoenix dactylifera*: A new experience from Bangladesh. *Frontiers of Agriculture in China*, 5, 241–246. doi: 10.1007/s11703-011-1086-2
- Baker, K. S., Steadman, K. J., Plummer, J. A., & Dixon, K. W. (2005). Seed dormancy and germination responses of nine Australian fire ephemerals. *Plant and Soil*, 277, 345–348. doi: 10.1007/S11104-005-7971-9
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14, 1–16. doi: 10.1079/SSR2003150
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2001). Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. *Plant Ecology*, 152, 204–205. doi: 10.1023/A:1011465920842
- Chen, S. Y., Kuo, S. R., & Chien, C. T. (2008). Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds. *Tree Physiology*, 28, 1431–1439. Obtenido de <http://treephys.oxfordjournals.org/content/28/9/1431.full.pdf>
- Chisha, K. E., Woodward, S., & Price, A. (2007). Comparison of the effect of mechanical scarification and gibberellic acid treatments on seed germination in *Pterocarpus angolensis*. *Southern Hemisphere Forestry Journal*, 69, 63–70. doi:10.2989/SHFJ.2007.69.1.9.171
- Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11, 1–42. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/3001478>
- Farshad, D., Hojat, G. M., & Mahmood E. A. (2012). Overcoming seed dormancy of mooseer (*Allium hirtifolium*) through cold stratification, gibberellic acid, and acid scarification. *Journal of Forestry Research*, 23(4), 707–710. doi: 10.1007/s11676-012-0314-9
- Geissler, K., & Gzik, A. (2010). Germination ecology of three endangered river corridor plants in relation to their preferred occurrence. *Flora*, 205(9), 590–598. doi:10.1016/j.flora.2010.04.008
- Gerhard, L.G. (2005). 3-Glucanase gene expression in low hydrated seeds as a mechanisms for dormancy release during tobacco after-ripening. *The Plant Journal*, 41, 133–145. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02284.x
- Gusano, M. G., Gomez, P. M., & Dicenta, F. (2004). Breaking seed dormancy in almond (*Prunus dulcis* Mill.) D. A. hipóxico y la germinación de las semillas se vería afectada por la variación en la disponibilidad de oxígeno del suelo relacionado con diferentes profundidades de enterramiento (Yan, Liu, Li, & Ma, 2007). Sin embargo, se requiere más estudio para explorar los niveles de oxígeno en diversas profundidades de enterramiento de esta zona. Los resultados de este estudio son diferentes de los resultados reportados por otros autores en los últimos años. En un estudio del noreste de China, la germinación de semillas de arbustos de *A. ordosica* mejoró mediante la siembra a 5 cm de profundidad durante seis meses (Liu et al., 2013), mientras que otro estudio en Turquía reveló que las mayores profundidades (> 20 cm) podrían inducir semillas a una latencia secundaria (Mennan, 2003). Las discrepancias anteriores podrían ser el resultado de las variaciones genéticas en las poblaciones estudiadas, las condiciones ambientales, la composición del suelo y los tratamientos aplicados antes de la germinación. Durante el invierno, la superficie de la tierra en el área experimental está congelada porque la temperatura baja a -20 ° C en el exterior (Li, Gao, Wang, & Wang, 2013). A principios de la primavera, la temperatura aumenta de 5 ° C a 9 ° C y el suelo se moja debido a que el hielo y la nieve se derriten. Así, es probable que la temporada de invierno sea un periodo predominante para la liberación de latencia de las semillas de *D. giraldii* y la siembra por 170 días afecta y mejora la germinación. La naturaleza fisiológica de la latencia del embrión en *D. giraldii* aún no está aclarada, pero una posible explicación es dada por Walker (1971), quien indica que la latencia es controlada en cierta medida por algunos inhibidores en la semilla. Estos inhibidores se forman posiblemente en una etapa temprana en el desarrollo de la semilla para evitar el proceso de germinación. En este estudio, la respuesta puede deberse a la mejor degradación de los inhibidores de la germinación en el embrión durante 170 días de siembra en esta área bajo una profundidad adecuada del suelo. Por lo tanto, se recomienda utilizar un tratamiento de enterramiento apropiado para la ruptura de la latencia en futuros estudios de germinación de *D. giraldii*. Esta información puede ser útil para cultivar y conservar otros arbustos que crecen en las montañas de Qilian en China y dilucidar su supervivencia en condiciones extremas similares.

Conclusiones

A partir de esta investigación se puede concluir que la mala regeneración natural de *D. giraldii* se atribuye principalmente a la latencia fisiológica. Este estudio indicó que la estratificación de semillas a 5 ° C durante 170 días parece ser un método más eficaz para la ruptura de la latencia de semillas de *D. giraldii* en comparación con el tratamiento químico. Por lo anterior, las semillas fueron enterradas en suelo franco arenoso a 100 cm de profundidad por 170 días para ofrecer el método de ruptura de latencia más conveniente y eficaz para *D. giraldii*. Estos hallazgos aportan una contribución

- Webb. *Scientia Horticulturae*, 99, 363–370. doi: 10.1016/j.scienta.2003.07.001
- Kermode, A. R. (2005). Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24, 319–344. doi: 10.1007/s00344-005-0110-2
- Kucera, B., Cohn, M. A., & Leubner, M. G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15, 281–307. doi: 10.1079/SSR2005218
- Li, S. H., Wu, L. J., & Yin, H. Y. (2002). Chemical and pharmacological advances of the study on Zushim. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 27(6), 401–402.
- Li, F. X., Qi, S. Z., Zhao, F. H., & Zhang, Y. D. (1999). Soil basic classification of Linze like area in Hexi Corridor. *Chinese Journal of Soil Science*, 30, 13–17. Obtenido de <http://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotal-TRTB1999S1003.htm>
- Liu, H. L., Zhang, L. W., Yin, L. K., & Zhang, D. Y. (2013). Effects of temperature, dry storage, and burial on dormancy and germination of seeds of 13 desert plant species from sand dunes in the Gurbantunggut Desert, Northwest China. *Arid Land Research and Management*, 27, 65–78. doi: 10.1080/15324982.2012.719569
- Li, H. Y., Gao, Z. R., Wang, S., & Wang, H. Y. (2013). Extreme temperature variation of Hexi Corridor in recent 60 years. *Arid Land Geography*, 38, 1–5. doi: 10.13826/j.cnki.cn65-1103/x.2013.01.001
- Malik, N., & Vanden, B. W. H. (1988). The biology of Canadian weeds *Galium aparine* L. and *Galium spurium* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 68, 481–499. doi: 10.4141/cjps88-059
- Mark, K. J., Tony, D. A., & Andrew, J. D. (2012). Projected soil temperature increase and seed dormancy response along an altitudinal gradient: Implications for seed bank persistence under climate change. *Plant and Soil*, 353, 289–303. doi: 10.1007/s11104-011-1032-3
- Merritt, D. J., Turne, S. R., Clarke, S., & Dixon, K. W. (2007). Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. *Australian Journal of Botany*, 55, 336–344. doi: 10.1071/BT06106
- Mennan, H. (2003). The effects of depth and duration of burial on seasonal germination, dormancy and viability of *Galium aparine* and *Bifora radians* seeds. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 189(5), 304–309. doi: 10.1046/j.1439-037X.2003.00048.x
- Nadjafi, F., Bannayan, M., Tabrizi, L., & Rastgoo, M. (2006). Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *Journal of Arid Environments*, 64, 542–547. doi: 10.1016/j.jaridenv.2005.06.009
- Nikolaeva, M. G. (1977). Factors controlling the seed dormancy pattern. In A. A. Khan (Ed.), *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination* (pp. 51-74). USA: Elsevier/North-Holland.
- Olmez, Z., Gokturk, A., & Temel, F. (2007). Effect of cold stratification, sulfuric acid, submersion in hot and top water pretreatment on germination of blad-der-senna (*Coleutea armena* Boiss. & Huet.) seeds. *Seed Science and Technology*, 35, 266–271. doi: 10.15258/sst.2007.35.2.02
- Ooim, K. J., Auld, T. D., & Whelan, R. J. (2006). Dormancy and the fire-centric focus: Germination of three *Leucopogon* species (Ericaceae) from south-eastern Australia. *Annals of Botany*, 98, 421–430. doi: 10.1093/aob/mcl118
- OriginLab Corporation. (2007). Origin 8.0 software. Northampton, MA, USA: Author.
- Packa, D., Kwiatkowski, L., & Graban, W. (2014). Germination and dormancy of sida hermaphrodita seeds. *Seed science and technology*, 42, 1–15. doi: 10.15258/sst.2014.42.1.01
- Poinar, G. O., & Columbus, J. T. (1992). The induction of secondary seed dormancy by oxygen deficiency in a barnyard grass *Echinochloa crus-galli*. *Experientia*, 48, 904–906. doi: 10.1007/BF02118432
- Sechenbater, M. L., & Am, L. (2002). Effect of plant hormones on seed germination of *Prunus mongolica* Maxim. *Journal of Inner Mongolia Normal University (Nature Science)*, 31, 384–387. doi: 10.3969/j.issn.1001-8735.2002.04.017
- Siddiqui, Z., Mujib, A., & Maqsood, M. (2011). Liquid overlaying improves somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 104, 247–256. doi: 10.1007/s11240-010-9828-z
- Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). (2000). SPSS 10.0 software. Chicago, IL, USA: Author.
- Tang, H., Wei, J. Q., Yang, Q. H., Liang, H. L., & Wei, X. (2012). Germination and dormancy-breaking of *Diren* (*Melastoma dodecandrum*) seeds. *Seed Science and Technology*, 40, 1–10. doi: 10.15258/sst.2012.40.1.01
- Travlos, I. S., Economou, G., & Karamanos, A. I. (2007). Germination and emergence of the hard seed coated *Tylosema esculentum* (Burch) A. Schreib in response to different pre-sowing seed treatments. *Journal of Arid Environments*, 68, 501–507. doi: 10.1016/j.jaridenv.2006.07.001
- Wang, Q. L., Yan, F., & Mao, Z. H. (2012). Studies on dormancy of *Daphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae) seeds. *Chinese Horticulture Abstracts*, 12, 9–13. Obtenido de <http://www>.

Fin de la versión en español

- cnki.com.cn/Article/CJFDTOTAL-YUWZ201212008.htm
- Walker, M. G. (1971). Changes in germination promotion and inhibition in seed extracts of sub-terranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) related to dormancy and germination. *Australian Journal of Biology Science*, 24, 897–903. doi: 10.1071/B19710897
- Walck, J. L., & Hidayati, S. N. (2004). Germination ecophysiology of the western North American species *Osmorhiza depauperata* (Apiaceae): Implications of preadaptation and phylogenetic niche conservatism in seed dormancy evolution. *Seed Science Research*, 14, 387–394. doi: 10.1079/SSR2004184
- Walck, J. L., Hidayati, S. N., & Okagami, N. (2002). Seed germination ecophysiology of the Asian species *Osmorhiza aristata* (Apiaceae): Comparison with its North American congeners and implications for evolution of types of dormancy. *American Journal of Botany*, 89, 829–835. doi: 10.3732/ajb.89.5.829
- Wolfgang, S., & Gerhard, R. (2003). Variation in seed dormancy of the wetland sedge, *Carex elongata*, between populations and individuals in two consecutive years. *Seed Science Research*, 13, 315–322. doi: 10.1079/SSR2003148
- Xing, F., Guo, J. X., & Wang, Y. H. (2003). Seed germination characteristics and regeneration mechanism of *Stellera chamaejasme* population. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 14, 1851–1854. doi:10.13287/j.1001-9332.2003.0409
- Yan, Q. L., Liu, Z. M., Li, X. H., & Ma, J. L. (2007). Effects of burial on seed germination characteristics of 65 plant species on Horqin semi-arid steppe. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18, 777–782. doi:10.13287/j.1001-9332.2007.0131
- Yang, Q. H., Ye, W. H., Wang, Z. M., & Yin, X. J. (2009). Seed germination physiology of *Ardisia crenata* var. *bicolor*. *Seed Science and Technology*, 37, 291–302. doi: 10.15258/sst.2009.37.2.04
- Zhao, R. N. (2007). Resources of Chinese traditional and herbal drugs in Gansu. Lanzhou, China: Gansu Science and Technology Press.
- Zhao, J., Jin, X. J., & Zhang, H. J. (2012). Research progress of *Daphne giraldii*. *Chinese Wild Plant Resources*, 31, 12–14. doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2012.06.003