

种皮和环境温度对橡胶树种子萌发的影响

闫兴富^{1,2}, 曹敏^{1*}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 昆明 650223; 2. 北方民族大学生命科学与工程学院, 银川 750021)

摘要: 在人工气候箱控制的条件下, 研究了种皮和环境温度对橡胶树 *Hevea brasiliensis* 种子萌发的影响。结果表明, 种皮对橡胶树种子的吸水和萌发具有明显的机械限制作用; 去除种皮后种子萌发速率加快, 萌发指数增大, 但萌发率从 83.8% 下降到 47.8%, 幼苗活力指数从 332.3 下降到 187.9。15℃ 以下的温度明显推迟种子萌发, 且萌发率下降。去除种皮后的种仁萌发率、萌发指数和幼苗活力指数均随着温度的升高而增大; 有种皮种子的萌发率、萌发指数和幼苗活力指数分别在 20℃ (94.7%)、30℃ (1.86) 和 25℃ (374.4) 时最大, 而萌发速率系数随着温度的升高先增大后减小。在橡胶树栽培和胶园建设中, 可利用种皮对种仁水分散失的限制作用以及对低温的不敏感性, 有效延长橡胶树种子的贮藏时间, 提高萌发率和籽苗质量。

关键词: 种皮; 温度; 橡胶树; 顽拗性种子

中图分类号: Q945.34

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)06-0584-06

Effects of Seed Coat and Environmental Temperature on the Germination of *Hevea brasiliensis* Seeds

YAN Xing-fu^{1,2}, CAO Min^{1*}

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

2. College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Yinchuan 750021, China)

Abstract Under the artificial climate incubator, the effects of seed coat and temperature on the germination of *Hevea brasiliensis* seeds were studied. The results showed that seed coat had significant mechanical inhibition on the water absorption and the germination of *H. brasiliensis* seeds. The seed germination sped up and germination index increased when removed seed coat, but germination rate significantly decreased from 83.8% to 47.8%, and vigor index from 332.3 to 187.9, respectively. The seed germination delayed obviously and the germination rate reduced under below 15℃. The germination rate, germination index and vigor index of kernel all increased with the elevation of temperature while those of seeds were up to peak at 20℃ (94.7%), 30℃ (1.86), and 25℃ (374.4), respectively. The coefficient of germination rate increased first and then decreased. In the rubber cultivation and the construction of rubber plantation, the restrict effect of seed coat on water loss of kernel and non-sensitivity to lower temperature could be utilized to prolong seed storage period, increase germination rate and improve seedling quality.

Keywords Seed coat; Temperature; *Hevea brasiliensis*; Recalcitrant seed

热带地区木本植物的种子多是顽拗性种子, 它们没有休眠或具有胎萌现象, 这些种子从母体植株上散落时已开始萌发, 不需要外界环境水分的补

充; 西双版纳地区多数植物的种子在光照和黑暗下的萌发率都很高^[1-3]。大量研究表明, 植物种子萌发的适宜温度为 20~25℃^[4-7], 但也有一些植物种

子萌发的适宜温度范围较宽, 例如, 岷江柏 (*Cupressus chengiana*) 种子的适宜发芽温度为 10~25℃^[8]。温带地区旱生植物梭梭 (*Haloxylon ammodendron*) 种子的萌发最适温度为 10℃^[9], 而很多热带地区的顽拗性种子不能耐受 10~15℃ 的低温。种皮限制了植物种子的水分供给和种皮的透气性, 进而影响其萌发^[10-11], 人为破碎种皮^[12-13]或用浓硫酸处理可提高种子萌发率。另外, 合欢 (*Albizia julibrissin*)^[14]、黄芪 (*Astragalus membranaceus*)^[15]、板栗 (*Castanea mollissima*)^[16]等种子的种皮对萌发还具有明显的机械障碍作用。多数顽拗性种子无休眠现象, 但在温带^[17]和热带地区^[18]都有休眠的顽拗性种子, 其重要机制是具有坚硬种皮或果皮。西双版纳季节雨林的小叶藤黄 (*Garcinia coriacea*) 种子有休眠现象, 其具有坚硬种皮^[18]; 咖啡 (*Coffea arabica*)^[19]、荔枝 (*Litchi chinensis*) 和龙眼 (*Dimocarpus longan*)^[20]等能长期贮藏的顽拗性种子均具有坚硬的种皮, 可能都存在一定程度的休眠现象。

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 为大戟科 (Euphorbiaceae) 多年生乔木, 是天然橡胶的主要来源和热带、亚热带地区重要的经济植物。橡胶树种子为顽拗性种子^[21-23], 对其种子的脱水耐性和致死含水量已有报道^[24]。为进一步揭示橡胶树种子的顽拗性本质, 温度, 尤其是低温对其萌发的影响, 以及种皮对种子萌发的限制作用及其在种子贮藏和苗木繁育等生产环节中的重要应用, 本研究以云南西双版纳地区的橡胶树种子为材料, 探讨温度和种皮的机械限制作用对种子吸水和萌发的影响, 为橡胶栽培中的种子贮藏和种苗繁育提供技术参考。

1 研究方法

1.1 种子的采集与处理

橡胶树种子于 2005 年 9 月 8 日采自中国科学院西双版纳热带植物园内的“胶茶混交林”。拣拾当天散落的种子, 选择大小均匀的种子, 用机械方法除去外种皮, 取出种仁, 种仁单粒 (3.36 ± 0.67) g, 含水量为 (53.2 ± 3.657) %。剥取足量种仁后立即开始实验。

1.2 种子吸水率测定

选取大小均匀一致无病虫害的种仁 180 粒置于 500 mL 烧杯内, 全部浸入水中, 分别在浸水后 0、1、2、4、8、12、24、48、72 和 96 h 取种仁 6 粒, 切

成厚约 1 mm 的薄片称重, 置 103℃ 烘箱中烘 17 h 再次称重, 计算种子含水量^[25], 重复 3 次。另取带壳外种皮种子 200 粒以上(除去部分空壳种子后, 保证浸水后足以剥取 180 粒种仁)置于塑料盆中浸水, 分别在相同浸水时间后取出种子, 剥取种仁, 用同样的方法测定含水量。

1.3 种子萌发实验

种子萌发实验分带壳种子和种仁 2 组处理, 分别设置 5℃、10℃、15℃、20℃、25℃ 和 30℃ 6 个温度梯度, 均在光周期 14 h/10 h, 光照强度 $137.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 相对湿度 72% 下进行, 每实验重复 3 次, 每重复用 30 粒种子。分别播种于内径为 14 cm 的内装约 1.2 cm 厚湿沙(用清水冲洗干净, 于 85℃ 烘箱中烘干 48 h)培养皿内, 种子侧放于湿沙表面, 轻压使其与湿沙充分接触, 以利种子吸水, 播种后将培养皿置于 MG C-350HP-2型智能型人工气候箱(上海一恒科技有限公司生产)中, 每 24 h 观测 1 次, 以胚根伸出种皮外 5 mm 为萌发标准^[18], 记录萌发的种子数和胚根长度 (mm), 及时清除已萌发的种子。实验至连续 2 周不再有种子萌发为止, 实验过程中适时浇水以保持培养基湿润。

1.4 萌发参数计算

用于评价种子萌发活力的参数包括种子萌发率 (germination rate)、萌发速率系数 (coefficient of germination rate, CGR)、萌发指数 (germination index, GI) 和幼苗活力指数 (vigor index, VI)

(1) 萌发率 = 萌发种子数 / 试验用种子总数 × 100%;

(2) $\text{CGR} = [\sum(t \times n) / \sum n] \times 100$, 式中 t 为自萌发实验开始的天数, n 为在 t 天内萌发的种子数^[26];

(3) $GI = MDG \times PV$, 式中 MDG 为平均每天种子萌发数, 即萌发实验结束时种子萌发数 / 萌发天数; PV (peak value) 为种子最大萌发数, 即萌发期间任何一天中达到的最大萌发数 / 达到最大值所需天数^[27];

(4) $VI = \text{萌发率} \times \text{幼苗根的长度} + \text{幼苗茎长度 (cm)}$ ^[27]。

1.4 数据的统计分析

用 2 因子方差分析法分析种皮和温度对种子活力的影响及二者对种子萌发活力的交互作用; 用单因子方差分析法进行差异性分析。所有实验数

据的统计分析用 SPSS 13.0 进行。

2 结果和分析

2.1 种子的吸水率

橡胶树种子自然成熟散落后种仁的含水量为 53.2%, 浸水 24 h 内种仁迅速吸水, 浸水 1、2、4、8、12 和 24 h 后的含水量分别为 55.8%、63.1%、64.2%、71.0%、78.8% 和 93.4%, 此后吸水缓慢, 浸水 48、72 和 96 h 的含水量达 96.7%、109.8% 和 111.8% (图 1)。种皮对橡胶树种子的吸水具有明显的限制作用, 带壳种子的整个吸水过程十分缓慢, 浸水 24 h 的种仁含水量仅有 65.1%, 浸水 96 h 的种仁含水量为 77.0%, 仅接近去除种皮浸水 12 h 的含水量水平 (图 1)。

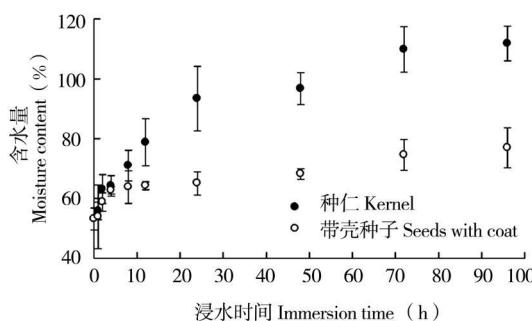


图 1 橡胶树种仁和带壳种子的吸水量变化

Fig. 1 Changes in water absorption of rubber tree kernels and seeds with coat of *Hevea brasiliensis*

2.2 种皮对种子萌发的影响

双因素方差分析表明, 种皮对种子萌发具有显著影响 ($P < 0.01$)。单因素方差分析显示, 所有萌发参数在不同种子间均差异显著 ($P < 0.05$, 图 2)。一方面, 橡胶树种子的种皮对萌发具有明显的机械障碍, 去除种皮后种子萌发速率加快 (萌发速率系数从 710.1 下降到 523.9), 尽管 2 组种子开始萌发的时间差别不大, 但萌发实验结束的时间相差很大, 有种皮的种子在播种后 35 d 结束萌发, 而去除种皮的种子在播种后 18 d 即结束萌发 (图 3)。去除种皮后, 萌发指数大幅度提高, 从 1.1 提高到 4.8; 另外, 去除种皮的种子萌发率和幼苗活力指数均比有种皮的种子显著降低 ($P < 0.01$)。萌发率从 83.8% 显著降低到 47.8% ($P < 0.01$), 幼苗活力指数从 332.3 显著降低到 187.9 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.3 温度对种子萌发的影响

双因素方差分析表明, 温度对橡胶树种子的萌发具有显著影响 ($P < 0.01$)。但温度和种皮对种子萌发无显著交互作用。相对低温不利于橡胶树种子的萌发, 15℃ 以下的温度明显推迟种子萌发进程, 且降低种子萌发率。去除种皮的种仁播种 3 d 后, 20℃、25℃ 和 30℃ 下的萌发率分别为 12.0%、26.7% 和 45.3%, 15℃ 以下的萌发率仅为 1.3%; 10℃ 和 5℃ 下, 播种后的第 8 天和第 7 天才开始萌

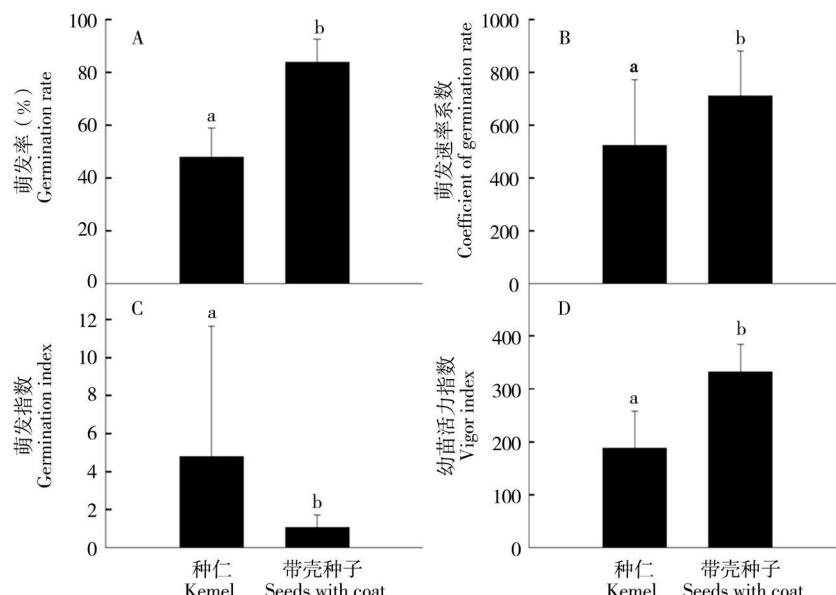


图 2 种皮对橡胶树种子萌发的影响

Fig. 2 Effect of seed coat on seed germination of *Hevea brasiliensis*

图中柱上不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Different letters on column present significant difference at $P < 0.05$ level. The same as following Figures.

发(图3A),20℃、25℃和30℃下的萌发速率系数均显著低于15℃、10℃和5℃的($P < 0.05$)且25℃和30℃的萌发速率系数显著低于20℃的($P < 0.05$,图4A)。实验结束时,萌发率随着温度的升高而增大,分别为32.0%、41.3%、44.0%、49.3%、57.3%

和62.7%,其中15℃、10℃和5℃下的萌发率显著低于30℃($P < 0.05$)5℃的萌发率显著低于25℃($P < 0.05$),随着温度的升高萌发指数增大,从5℃下的最低值(0.12)增大到30℃的1.73(图4C)。同样,幼苗活力指数也随温度的升高逐渐增大(图4E)。

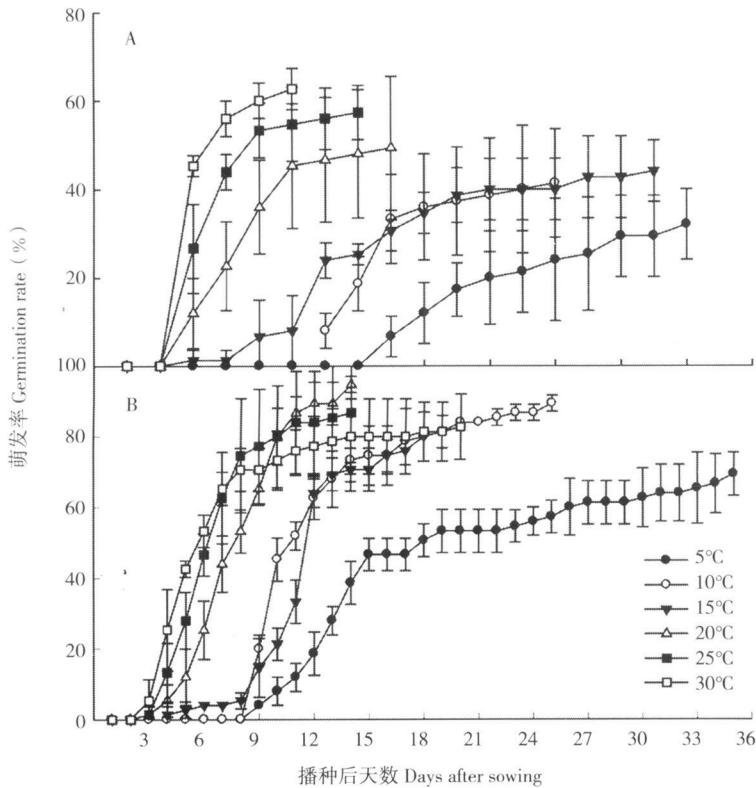


图3 温度对橡胶树种仁(A)和带壳种子(B)萌发率的影响

Fig. 3 Effects of temperatures on the germination rate of kernel (A) and seeds with coat (B) of *Hevea brasiliensis*

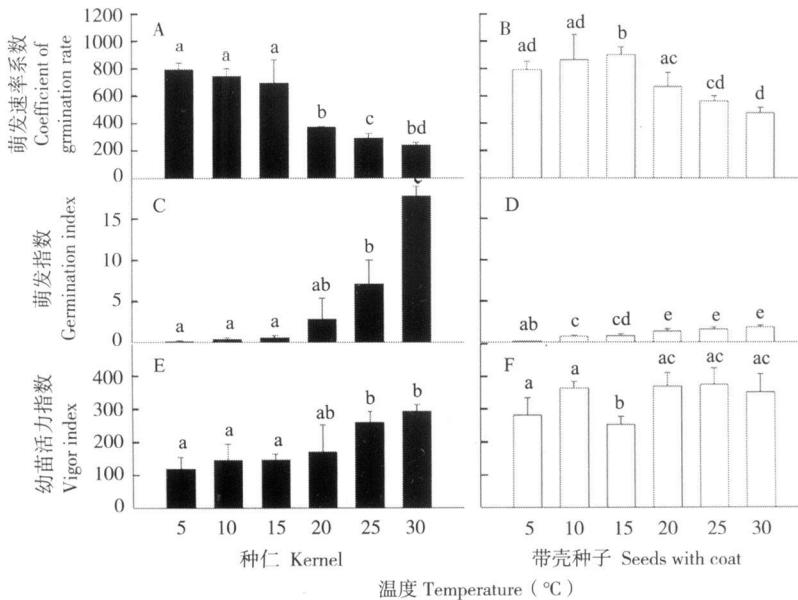


图4 温度对橡胶树种仁和带壳种子的萌发速率系数、萌发指数和活力指数的影响

Fig. 4 Effects of temperature on coefficient of germination rate, germination index and vigor index of kernel and seeds with coat of *Hevea brasiliensis* © 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

温度对有种皮的种子萌发的影响与去除种皮的种仁的基本相似, 萌发率随温度的升高而增大, 20℃的最大(94.7%)显著高于15℃、10℃和5℃的($P < 0.05$)但高于20℃的萌发率又下降, 25℃和30℃下的萌发率分别为86.7%和82.7%图3B); 萌发速率系数也有同样变化, 15℃最大(901.1), 30℃最小(475.1)图4B); 萌发指数随着温度的升高而增大, 5℃的最小(0.12), 30℃的最大(1.86)(图4D); 幼苗活力指数在15℃最小(252.1), 5℃次之(281.4), 25℃最大(374.4)图4F)。

3 讨论

3.1 种皮对种子吸水和萌发的影响

种皮对种子吸胀具有明显的机械障碍作用, 种皮理化性质的差异可导致对水分、气体或溶质的透性改变。因种皮透水性差引起种子休眠的现象十分常见^[11, 13, 15], 种皮的机械障碍对种子萌发的影响已有报道^[16, 28], 损伤种皮可促进萌发^[12-13]。Sari等^[12]认为, *Laurus nobilis* 种子的休眠除种皮因素外, 还可能存在胚和胚乳休眠。一些热带地区的顽拗性种子也存在着一定程度的休眠^[18], 橡胶树种子成熟后, 其种子外被一层坚硬的木质化外壳, 对种子吸水具有明显的机械障碍作用, 去除坚硬外种皮后种子吸水加快。坚硬种皮避免了种子在不良环境条件下水分的快速丢失, 对提高种子萌发率和幼苗质量是有利的, Hu等^[13]报道, 虽然种皮引起了*Hedysarum scoparium* 种子一定程度的休眠, 但种皮同时也限制了种子水分的丢失, 从而提高了萌发后幼苗的存活率。橡胶树种子坚硬种皮的机械限制作用虽引起种子一定程度的休眠, 也可能是有效防止种子水分丢失的一种保护性机制。种皮还可有效降低病原菌对种子的危害, 去除种皮的种仁多数因霉菌感染而不能萌发, 带壳种子没有霉菌感染现象。

3.2 温度对种子萌发的影响

分布于热带地区的顽拗性种子不仅对脱水敏感, 而且对低于15℃的低温敏感, 分布于温带地区的顽拗性种子仅对脱水敏感, 对低温不敏感。一些顽拗性种子的低温敏感性可能与不同的地理来源有关^[29]。*Quercus robur* 种子对脱水敏感, 却可耐受-2℃的低温贮藏^[30]。15℃以下的温度明显推迟橡胶树种子的萌发, 而且萌发率降低, 但种皮的存在降低了橡胶树种子对低温的敏感性, 这可能与种

皮缓解了种子水分丢失有关, 因为种子对低温的敏感性与种子的含水量密切相关^[31]。Berjak等^[32]认为, 尽管顽拗性种子在贮藏期间仅保持基本代谢以阻止萌发, 从而延长种子寿命, 但种子含水量的降低对种子质量仍是有害的。低温延迟了未去除种皮的橡胶树种子的萌发进程, 但萌发率大大提高, 表明刚刚散落不久的橡胶树种子可能仍在继续发育, 在低温条件下的萌发延迟期间, 种子发育过程的完成、种皮吸水软化或抑制萌发的化学物质分解等休眠机制的解除均有利于种子的萌发。

3.3 顽拗性种子的贮藏与橡胶树栽培

橡胶树种子在成熟散落时的含水量很高, 随着含水量的降低, 种子活力迅速下降^[24]。实际上, 适度脱水可促进顽拗性种子的萌发, 但适度脱水使萌发过程过早启动, 使种子对脱水更为敏感。因此, 顽拗性种子贮藏的有效方法是在维持其散落时的含水量和不产生低温伤害的前提下, 尽量降低贮藏的温度^[32]。橡胶树种子的坚硬种皮不仅阻止了种子水分的丢失, 而且降低了种子对低温的敏感性, 较低的温度可以延长橡胶树种子的贮藏期, 而且可提高种子的萌发率和幼苗质量^[13]。因此, 在橡胶种子贮藏期间, 要尽量降低贮藏温度, 避免种子贮藏过程中的脱水和抑制种子萌发。

参考文献

- [1] 杨期和, 杨威, 李秀荣. 热带植物种子萌发影响因素初探 [J]. 种子, 2001(5): 45-48.
- [2] Wen B (文彬), Yin S H (殷寿华), Lan Q Y (兰芹英), et al. Ecological characteristics of seed germination of *Pometia tomentosa* [J]. Guizhou Botany (广西植物), 2002, 22(5): 408-412 (in Chinese).
- [3] Yan X F (闫兴富), Cao M (曹敏). Influence of light and temperature on the germination of *Shorea antianshuea* (Dipterocarpaceae) seeds [J]. Chin Bull Bot (植物学通报), 2006, 23(6): 642-650 (in Chinese).
- [4] Zhang G F (张光飞), Su W H (苏文华), Yan H Z (闫海忠). Influence of light and temperature on the seed germination of *L. ulicina* [J]. Subtrop Plant Sci (亚热带植物科学), 2003, 32(1): 14-16 (in Chinese).
- [5] Wu Y (吴彦), Liu K (刘庆), He H (何海), et al. Effects of light and temperature on seed germination of *Picea asperata* and *Betula albosinensis* [J]. Chin J Appl Ecol (应用生态学报), 2004, 15(12): 2229-2232 (in Chinese).
- [6] Li Y Z (李有志), Huang J S (黄继山), Zhu J H (朱杰辉). Effects of light and temperature on seed germination and seedling growth of *Dendropanax angustifolia* [J]. Hunan Agric Univ (湖南农业大学学报), 2007, 33(2): 187-190 (in Chinese).
- [7] Xue Y (薛焱), Wang Y C (王迎春). Influence of light, temperature and humidity on seed germination of *Shorea multiflora* [J]. Chin J Appl Ecol (应用生态学报), 2004, 15(12): 2229-2232 (in Chinese).

- and salinity on seed germination of *Reaumuria trigyna* Maxim [J] *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯) 2007, 43(4): 708–710. (in Chinese)
- [8] Xu L (徐亮), Bao W K (包维楷), Pang X Y (庞学勇). Seed germination of *Cupressus duenggiana* in Jinchuan County of Sichuan Province at different temperatures [J] *Acta Bot Boreal-Occid Sin* (西北植物学报) 2005, 25(4): 733–739. (in Chinese)
- [9] Huang Z Y (黄振英), Zhang X S (张新时), Gutteman Y. Influence of light, temperature and salinity on the seed germination of *Haloxylon ammodendron* [J] *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报) 2001, 27(3): 275–280. (in Chinese)
- [10] Zhou Y (周元). Seed germination of *Cyclobalanopsis glauca* [J] *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯) 2003, 39(4): 325–326. (in Chinese)
- [11] Zhang X N (张香凝), Sun X Y (孙向阳), Geng Y Q (耿玉清), et al. Germination characteristics of *Larea tridentata* seeds [J] *J NE For Univ* (东北林业大学学报) 2006, 34(2): 8–10. (in Chinese)
- [12] Sarı A O, Oğuz B, Bilek A. Breaking seed dormancy of laurel (*Laurus nobilis* L.) [J] *New For* 2006, 31: 403–408.
- [13] Hu X W, Wang Y R, Wu Y P. Effects of the pericarp on imbibition, seed germination, and seedling establishment in seeds of *Hedysarum scoparium* Fisch. et Mey [J] *Ecol Res* 2009, 24(3): 559–564.
- [14] Guo X M (郭学民), Xu X Y (徐兴友), Meng X D (孟宪东), et al. Bourgeon characteristics of hardseed of *Albizia julibrissin* Durazz and its testamicromorphology and structure [J] *J Inner Mongolia Agric Univ* (Nat Sci) (内蒙古农业大学学报·自然科学版) 2006, 27(3): 13–18. (in Chinese)
- [15] Duan Q M (段琦梅), Liang Z S (梁宗锁), Mu X Q (慕小倩), et al. Germination characteristics of *Astragalus membranaceus* seeds [J] *Acta Bot Boreal-Occid Sin* (西北植物学报) 2005, 25(6): 1246–1249. (in Chinese)
- [16] Bai K J (白柯君), Guo S J (郭素娟), Shi Q L (石青莲). Establishment of regeneration system from hypocotyls of *Castanea mollissima* 'Yanshanghong' [J] *JSW For Coll* (西南林学院学报) 2005, 25(4): 106–109. (in Chinese)
- [17] Gleiser G, Picher M C, Véintimilla P, et al. Seed dormancy in relation to seed storage behaviour in *Acacia* [J] *Bot J Linn Soc* 2004, 145: 203–208.
- [18] Liu Y, Qiu Y P, Zhang L, et al. Dormancy breaking and storage behaviour of *Garcinia coracaria* Roxb. (*Guttiferae*) seeds: Implications for ecological function and germplasm conservation [J] *J Integr Plant Biol* 2005, 47: 38–49.
- [19] Vossen H M. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage [J] *Seed Sci Technol* 1979, 7: 65–74.
- [20] Xia Q H, Chen R Z, Fu J R. Moist storage of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) and longan (*Euphorbia longan* Steud.) seeds [J] *Seed Sci Technol* 1992, 20: 269–279.
- [21] Fu J R (傅家瑞). Recalcitrant seed [J] *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯) 1991, 27(6): 402–406. (in Chinese)
- [22] Tang A J (唐安军), Long C L (龙春林), Dao Z L (刀志灵). Molecular mechanism and storage technology of recalcitrant seeds [J] *Acta Bot Boreal-Occid Sin* (西北植物学报) 2004, 24(11): 2170–2176. (in Chinese)
- [23] Yang Q H (杨期和), Yin X J (尹小娟), Ye W H (叶万辉), et al. Biological characteristics of recalcitrant type seeds and evolution of seed recalcitrance [J] *Chin JEcol* (生态学杂志) 2006, 25(1): 79–86. (in Chinese)
- [24] Yan X F (闫兴富), Cao M (曹敏). Sensitivity of *Hovea brasiliensis* seed to different desiccation [J] *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯) 2008, 44(2): 243–246. (in Chinese)
- [25] ISTA. International rules for seed testing: Rules 1999 [J] *Seed Sci Technol*, 1999, 27(suppl): 201–244.
- [26] Bosagli A, Sette B. Seed germination enhancement in *Satureja montana* L. ssp. *montana* [J] *Seed Sci Technol*, 2001, 29: 347–355.
- [27] Abdulkadi A A, Anderson JD. Relationship between decarboxylation of glutamic acid and vigor in soybean seed [J] *Crop Sci* 1973, 13: 227–232.
- [28] Liu Y Q (刘幼琪), Hong Y Y (洪艳艳), Luo Y (罗颖), et al. Study on conditions of seed germination of *Staphylea bumalda* DC [J] *JHubei Univ* (Nat Sci) (湖北大学学报·自然科学版) 1999, 21(1): 81–83. (in Chinese)
- [29] Bharathi V, Berjak P, Pammenter N W, et al. Responses to chilling of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis* from different provenances. Abstracts from the 5th International workshop on desiccation tolerance and sensitivity of seeds and vegetative plant tissues [J] *S Afr J Bot* 2007, 73: 498.
- [30] Theilade I, Petri L. Conservation of tropical trees *ex situ* through storage and use [R] // Guidelines and Technical Notes No. 65. Humlebaek, Denmark: Danish Forest Seed Centre, 2003: 3.
- [31] Wen B (文彬). On the compound quantitative characteristic trait of seed recalcitrance [J] *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究) 2008, 30(1): 76–88. (in Chinese)
- [32] Berjak P, Pammenter N W. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed recalcitrance in perspective [J] *Annu Bot* 2008, 101: 213–228.