

不同時期雪柑胚發育之調查¹

黃 阿 賢²

摘要：為了解多胚柑桔之珠心胚與有性胚發育的情況，以提高雜交育種的效率，以雪柑為母本，分別與枳殼、晚侖夏橙 (Valencia) 鳳梨橙 (Pineapple) 雜交。於授粉後 80、100、120及140天採收果實，於解剖顯微鏡下調查胚數；以枳殼授粉者並播種於 MS 培養基，以探討有性胚苗的獲得率。結果顯示，在調查的過程中，所增加的胚數甚少，尤其是晚侖夏橙與枳殼授粉者，且 Stage I 之小胚在授粉後第80至第100天明顯減少，顯示大部份的胚應同時發育，早期胚培養以取得有性胚的方法，在本試驗之什交組合中並不適用。以枳殼授粉者，什交苗的獲得率，隨種子之成熟而增加，因此以胚培養提高什交苗之獲得機會，應以種子即將成熟時較為容易。

甜橙類為多胚的柑桔，每粒種子中均有許多的胚，其中大部份都只有一個有性胚 (sexual embryo)，由受精卵發育而來，其餘為珠心胚 (nucellar embryo)，由珠心組織中的原始細胞 (Primordium cell) 發育，此種大核、濃細胞質的原始細胞只存在多胚的品種中⁽¹⁰⁾。據翁氏之調查⁽²⁾，成熟的種子中雪柑的平均胚數為4.74，而溫州蜜柑與桔橙類 (Tangelo) 之平均胚數有多達40至50個的品種⁽¹²⁾。

由於種皮的存在與有限的胚乳，衆多胚之發育所需的空間、養份均受到限制，因此多胚的品種，大多數的胚無法發育成熟。Watanabe 等⁽⁶¹⁾以放射線追蹤的結果，認為一個種子中應以第三及第四大胚為有性胚的機會最高，而採用傳統的播種方式，每粒種子所能萌發的幼苗多為1至2株，因而許多的有性胚不易成活^(1,3,5)，在雜交育種上為一大困擾。Rangan 等⁽¹³⁾發現酸橙授粉後120天，有性胚已達早期心臟形時，珠心胚尚未形成，因此有性胚發育較珠心胚早或胚珠發育初期，珠心胚數少時，培養此時的胚，將可得到高比率的雜交後代。

本試驗以晚侖夏、鳳梨橙及枳殼授粉於雪柑，探討不同時期之珠心胚與有性胚發育的情形。

材料與方法

- 一、雜交授粉 1984年三月，晚侖夏橙、鳳梨橙之花粉採自臺灣省農試所嘉義分所，枳殼花粉採自臺灣省農試所關西柑桔工作站。選擇即將開放的花朵，摘回實驗室，取下花藥，置於乾燥器內使其開裂，再授粉於苗栗大湖十餘年生之雪柑，並套以臘紙袋。一個月後，着果者掛上塑膠牌。
- 二、胚數調查 授粉後80天起，每隔20天，採取果實，共五次(如表1.)，每次均隨機取樣，採收後置於冰箱之冷藏室，儘速調查完畢。種子取出後於解剖顯微鏡 (Nikon, SMZ-1) 下依胚之形狀，大小記錄其發育情形，分為五個階段⁽⁸¹⁾：

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第 1372 號。本研究承行政院農委會之經費補助。

2. 本所嘉義農試分所園藝系助理。臺灣省 嘉義市。

Stage I 球形胚 (Globular-shaped embryo)

Stage II 早期心臟形胚 (Early heart-shaped embryo)

Stage III 中期心臟形胚 (Middle heart-shaped embryo)

Stage IV 晚期心臟形胚 (Late heart-shaped embryo)

Stage V 魚雷期胚 (Torpedo-shaped embryo)

三、有性胚之發育調查 以枳殼授粉的雪柑，除計算胚數外，並置於 MS 基本培養基⁽¹⁾中培養，添加 Difco Bactoagar 7.5g/l, Sucrose 20g/l。每粒種子依胚數之多寡分置二至四支試管，大小相近之胚，置於同一支試管以便移植。但10月15日採取者，胚已充滿種子中，為避免傷及胚，剝除內、外種皮後，每粒種子分別播種於同一試管中，不計算胚數。培養環境 27°C，每天光照 16小時，光照強度 1500lux。每隔一個月換一次培養基，待本葉長出後，以三出葉之有無判定為有性胚苗或珠心胚苗。調查至1985年四月。

結果與討論

所採取的果實與種子數如表 1，胚數與胚發育的程度如表 2。

表1. 不同時期所採取之果實數與種子數

Table 1. Number of fruits and seeds harvested

採收日期 Date of harvest	6月19日 June 19		7月9日 July 9			7月29日 July 29			8月18日 Aug. 18			9月7日 Sept. 7	10月15日 Oct. 15
授粉後日數 DAP ¹⁾	80		100			120			140			160	198
花粉親 ²⁾ Pollen parent	V	P	V	P	T	V	P	T	V	P	T	T	T
果實數 No. of fruits	5	4	5	3	5	3	3	4	4	4	4	4	1
平均種子數 No. of seeds per fruit	18.4	13.5	14.6	14.3	9.0	16.0	14.7	8.0	11.8	12.8	2.5	5.5	9.0

1) DAP: days after pollination.

2) V: Valencia, P: Pineapple, T: Trifoliate.

表2. 不同時期雪柑雜交種子之平均胚數

Table 2. Average number of embryos of hybrid Shueh-ken seeds at different growing stage

花 粉 親 Pollen parent	晚 倫 夏 橙 Valencia				鳳 梨 橙 Pineapple				枳 殼 Trifoliate		
DAP ¹⁾	80	100	120	140	80	100	120	140	100	120	140
Stage I	6.8	2.0	0	0	6.9	0.5	0.8	0	2.8	0.8	0
Stage II	1.6	4.2	2.7	1.6	1.5	5.9	5.4	2.7	2.3	1.4	1.4
Stage III	0.1	0.5	0.6	0.2	0.2	1.5	0.6	0.5	1.0	0.6	1.4
Stage IV	0.1	0.9	0.8	0.9	0.1	1.6	1.1	1.5	0.5	0.9	0.9
Stage V	0	0.7	5.7	7.3	0.1	2.1	6.2	8.3	1.6	4.4	5.5
總 計 Total	8.8	8.3	9.8	10.0	8.8	11.6	14.1	13.0	8.2	8.1	9.2

1) DAP授粉後日數。DAP: days after pollination.

授粉80天後，以晚命夏、鳳梨橙授粉者，平均胚數分別為8.6與8.8，枳殼授粉者100天為8.2，甚為接近，絕大部份為 Stage I 之小胚，此後 Stage I 之小胚逐漸減少至 0，減少最明顯的時期為授粉後 80至100天，大胚則逐漸增加。但從小胚並不增加及胚數易受植株間、着果方位、調查年代及營養的影響^(7,12,14) 等情況判斷，胚數應不受到花粉親的影響，且絕大部份珠心胚的形成 (nucellar embryogenesis) 應同時產生。Furusato⁽⁶⁾ 亦認為花粉親並不影響胚數。本試驗結果，無論那一時期所調查者，其胚數均較前人⁽²⁾ 所調查之4.74高出甚多，其差異除前述環境因子的影響外，部份小胚在種子完全成熟時受到大胚的擠壓變形，而不易辨認。因此不同的調查方法與時期，將可影響其結果。

據 Yang 之切片觀察⁽¹⁷⁾，夏橙 (Natsudaidai) 與溫州蜜柑之受精卵與珠心細胞均在授粉後50天才開始分裂。Esen 等⁽⁴⁾ 發現絕大部份極柑的珠心胚在授粉後47天，仍為一個細胞，此後受精卵與珠心細胞 (nucellar cell) 的發育速度大致相同。但多胚的酸橙，在授粉後100天至120天，受精胚已成長至早期心臟形時，尚無珠心胚的產生，培養此種胚，即可得到雜交苗⁽¹³⁾。本調查結果，在授粉後80天，大部份的胚仍屬球形胚 (表 2) 直徑約為 0.1mm 左右，均在珠孔附近，無法辨別何者為有性胚，且此種小胚培養的成活率低⁽⁸⁾，而種子發育的過程中，胚數相差不大 (表 2)。因此為得到有性胚苗而採用胚培養，應在胚發育較成熟時，較為容易。

不同時期有性胚萌發的情形如表 3，其中 8 月 18 日採收者並無受精胚苗的產生，可能種子數少，(4 個果實僅 10 個種子)，較易產生誤差。其餘 7 月 29 日、9 月 7 日、10 月 15 日之有性胚萌發率分別為 27.6%、38.9%、45.5%，隨胚之逐漸成熟而增加。Horiuchi⁽⁸⁾ 以 MS 培養基或添加胡瓜汁 (cucumber juice) 培養溫州蜜柑與枳殼之什交種子，有性苗絕大部份來自較大的胚，然亦有部份為小胚所成長者。較早採收者 (7 月 29 日)，因小胚不易培養成活，因而有性胚的萌發率較低。由有性胚萌發率的逐漸增加顯示，部份的有性胚在發育的早期即受到珠心胚的排擠而發育受到阻礙，早期競爭力強者，後期則不易受到珠心胚的影響。

表3. 不同時期有性胚之萌發率¹⁾

Table 3. Percentage of zygotic seedlings germinated from Shueh-ken seeds crossed by trifoliate orange at differengt growing stage¹⁾

授粉後日數 DAP ²⁾	果實數 No. of fruits	培養之種子數 ³⁾ No. of seeds cultuerd ³⁾	平均胚數 Avg. No. fo embryos	什交苗數 No. of zygotic seedlings	什交苗率 ⁴⁾ % of zygotic seedlings ⁴⁾
120	4	19	8.1	8	27.6
140	4	10	9.2	0	0
160	4	18	5.9	7	38.9
198	11	77	—	35	45.5

1) 胚以 MS 基本培養基培養 Embryos were cultured on MS medium.

2) DAP: days after pollination.

3) 污染之種子不列入計算 Contaminated seeds were excluded from calculation.

4) 什交苗率=什交苗數/培養之種子數 % of zygotic seedlings=No. of zygotic seedlings/No. of seeds cultured.

Okudai 等⁽¹²⁾ 以枳殼粉於不同品系的溫州蜜柑，果實成熟後，分離胚，再播種，有性胚苗佔全部苗數的 0%至45%間。柑桔種子直接播種於培養土，所得到的實苗生平均在 1 至 2 株間^(1,3,5)，而 Wanatabe 等⁽¹⁶⁾ 以放射線追蹤的結果，認為有性胚多屬第三及第四大的胚，這些較小的胚因發育未完全而不能發芽，因此某些胚數甚多的品種，播種於土壤中，其什交苗率甚低，如極柑與柳橙^(1,3)

，因此胚培養將可提什交苗的獲得機會，除非有性胚在早期就停止發育。根據本研究結果，胚培養的時機應為種子即將成熟時，且依胚的位置^(9,16)、胚色^(6,12)等有條件的選取胚，將可提高育種效率。

引用文獻

1. 呂明雄 1980. 柑桔胚性及花粉親對珠心胚苗培育之研究. 嘉義農專園藝學報. 10: 19—26
2. 翁仁祿 1974. 本省柑桔類胚色及胚數之調查. 臺灣省農試所六十三年年報. P. 62—63.
3. 徐信次 1979. 柑桔多胚性之研究——珠心胚苗之分離. 中華農業研究23(2): 101—108.
4. Esen, A. and R. K. Soost. 1977. Adventive embryogenesis in citrus and its relation to pollination and fertilization. Amer. J. Bot. 64(6):607-614.
5. Frost, H. B. and R. K. Soost. 1968. Seed production: development of gamete and embryos. Chap. 4 in: W. Reuther, L. D. Batchelor, L. D. Batachelor and H. J. Webbers (eds) The Citrus Industry. 2: 290-324. rev. ed. Berkley: Div. Agri. Univ. Calif.
6. Furusato, K. 1951. Studies on polyembryony in citrus. Jap. Jour. Gent. 26: 223-224.
7. Furusato, K., Y. Ohta and K. Ishibashi. 1957. Studies on polyembryony in citrus. Seiken Ziho 8: 40-48.
8. Horiuchi, S. E. Yuda and S. Nakagawa. 1976. In vitro culture of young embryo in polyembryonic citrus. J. Japaan Soc. Hort. Sci. 45(3): 253-260.
9. Iwamasa, M., I. Ueno and M. Nishiura. 1970. Location of zygotic embryo in polyembryonic citrus seed. Bull. Hort. Res. Sta. Japan, Ser. B, 10: 7-14.
10. Kobayashi, S., I. Ikeda and M. Nakatani. 1979. Studies on nucellar embryogenesis in-citrus. J. Japan Soc. Hort. Sci. 48(2): 179-185.
11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
12. Okudai, N., I. Oiyama and T. Takahara. 1981. Studies on the improvement of zygotic seedling yield of the polyembryonic citrus. Bull. Fruit Tree Res. Sta, Ser. D, 3: 9-22.
13. Rangan, T. S., T. Murashige and W. P. Bitters. 1969. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. Proc. 1st Intern. Citrus Symp. Vol. 1: 225-229.
14. Traub, H. P. 1936. Artificial controll of nucellar embryony in citrus. Science. 14: 165-166.
15. Ueno, I. and M. Hirai. 1983. Identification of zygotic embryo in polyembryonic citrus seed by the cotyledon colour. Bull. Fruit Tree Res. Sta. Japan, Ser. B, (10): 35-50.
16. Watanabe, H. Yamagata and K. Syakudo. 1970. Studies on the citrus genetic polyembryony in relation to breeding. II. Discrimination of the embryo fertilized by ³H-labeled pollen grains. Japan J. Breeding. Vol. 20(3): 141-145.
17. Yang, H. J. 1968. Fertilization and development of embryo on satsuma orange and natsudaidai. J. Japan Soc. Hort. Sci. 37(2): 8-13.

Embryos Development of Shueh-ken Orange at Different Growing Stages¹

A-shiang Hwang²

Summary

'Shueh-ken' orange (*C. sinensis* Osbeck.) was pollinated with 'Valencia', 'Pineapple' and trifoliolate oranges. Fruits were harvested 80, 100, 120 and 140 days after pollination, numbers of embryos were counted with dissecting microscope, and the embryos of hybrid seeds crossed by trifoliolate orange were cultured on MS medium supplemented with 7.5g/l agar and 20g/l sucrose.

Average number of embryos increased slightly throughout the growing stages and that of the smallest embryos (stage I) decreased significantly from 80 to 100 days after pollination, which implied that most embryos began to develop at the same time. The percentage of zygotic seedlings crossed by trifoliolate increased as seeds were more mature, so it was recommended that seeds about to mature were preferred if embryos were induced to germinate with the help of embryo culture.

1. Contribution No, 1372 from Taiwan Agricultural Research InsTiTuTe.

2. Research Assistant, Chia-yi Agricultural Experiment Station, TARI, Chia-yi, Tawan, 60014, R. O. C.