檸檬之多胚性及雜交苗之鑑定[1]

黃　阿　賢[2]

摘要：在果實發育中期及成熟期分別調查 Eureka 及 Lisbon 檸檬種子之胚數，發現不同植株或不同花粉親授粉之種子，其平均胚數在2個以下，成熟種子之單胚比率達44%至68%。以糖橙（Sugar orange）、柳橙及枳殼分別授粉於檸檬，雜交苗與株心胚苗間以葉片形態鑑別之；枳殼授粉者，雜交苗率達73%，糖橙及柳橙授粉者，不同雜交組合之雜交苗率介於27%至56%間，此應與親本間之葉片形態差異程度有關。由不同時期之胚數及雜交苗率調查結果，檸檬可稱之爲少胚性的柑橘，可做爲雜交育種的母本。上述以葉片形態鑑定之雜交苗，於1990年2月至4月觀察新稍的顏色，大部份均爲與父本相同之綠色，新稍帶有檸檬之紫紅色或淡紫紅色者，以枳殼授粉者僅11%，甜橙授粉者介於22%至30%間，顯示除葉片形態外，以新稍顏色或上述二者同時鑑定檸檬與其他柑橘之雜交苗當較容易。

關鍵字：檸檬，多胚性，雜交苗，葉片形態，新稍顏色。

檸檬（*Citrus limon*〔L.〕Burm. f.）生長旺盛，具周年開花的特性，栽培檸檬是爲利用其酸味與香氣。檸檬開花後至果實成熟約需6至8個月，所需時間較其他柑橘品種少。檸檬與其他柑橘種類比較，不論植株之生長特性，果實的形態、風味、顏色均有甚大的差異。以檸檬爲雜交親本，可望後代有較大之變異。

柑橘類普遍具有多胚性[1,4,5,12,16]，胚數越多者，雜交胚之成活機會越低，甚至全無[5,6]。據記載[14]，檸檬爲一稍具多胚性（slightly polyembryony）之種類，而多胚柑橘之胚數，隨種子之發育而調查結果有差異[7]，一連續性之調查方可確定其產生胚數之多寡。

鑑定雜交苗爲多胚性柑橘雜交育種關鍵步驟之一，除葉片形態[1,6,7,13,19,24]外，爲育種或其他研究需要而發展出不同的鑑定方法[2,11,15,21,23]。在育種過程中，往往因苗木數量甚多，以幼苗之植物形態鑑別最簡便，其鑑定之雜交苗在某一比率以上時，即具實用價值。據 Spiegel-Roy 之報告[22]，檸檬以枳殼授粉，雜交苗在第四或第五節以上均有明顯的刺，珠心胚苗則無。北京檸檬（meyer lemon, *Citrus meyeri* Y. Tan.）新稍帶紫色，授粉於單胚之柚類，部份雜交苗新稍帶紫色[24]。本報告於果實發育過程中調查檸檬之胚數，並以甜橙及枳殼授粉，以葉片形態及新梢顏色鑑定雜交苗。

材料與方法

除枳殼花粉採自臺灣省農試所關西工作站外，其餘之材料均取自嘉義農業試驗分所。民國78年2月底至3月初，以糖橙（Sugar orange）、柳橙及枳殼花粉分別授粉於 Eureka 及Lisbon 兩檸檬品種。選擇即將開放的花朵，在實驗室內取下花藥，置於乾燥箱內，使其開裂，花粉收集後，授粉於去雄之檸檬，並套上紙袋，三至四週後除袋，並經常檢查結果枝，凡再開花者均予摘除，以免混淆。同

1. 臺灣省農試所研究報告第 1573 號。
2. 嘉義農業試驗分所園藝系助理研究員。臺灣省　嘉義市。

年6月5日及6月21日，調查自然授粉果實之胚數，每株隨機取樣四或五個果實，檢查全部種子之胚數，先剝除內外種皮後，以解剖顯微鏡儘速調查完畢。

雜交果於8月1日採收，取出成熟種子，剝除種皮後，置於墊濾紙之小試管內，一至二日後，胚易分開，再調查胚數。較大的胚逐一播種於育苗箱，翌年2月，調查葉片形態特徵，鑑定雜交苗，凡與母本形態不同者爲雜交苗，即枳殼授粉者爲三出葉；甜橙授粉者具明顯葉翼，或葉身較圓者。雜交苗移植於3公升盆後，調查幼稍之顏色，由2月至4月，每株至少觀察二次新稍生長。

結果與討論

一、胚數調查

檸檬具週年開花的生性，二月至三月間開花者，果實於七至八月間成熟。柑橘品種，當種子胚數甚多時，在其發育後期，胚間相互擠壓變形而不易辨認，調查結果胚數反而減少[7]。本研究分別於6月5日，6月21日採取自然授粉果實，8月1日採取雜交果，調查胚數，雖然種子數在植株間有甚大之差異（表一），但種子中胚數之平均值低於2（表一及表二），不同雜交組合間，單胚種子之比率達40.0%至67.9%，所有451個雜交種子中，胚數最多者亦僅6個（表二），這與甜橙、寬皮柑等[7,18]之平均胚數達二十餘個，乃至四、五十個之情形相差甚大，顯示檸檬雖具多胚性，但胚數甚少，可稱之爲少胚性的柑橘類。

檸檬種子（胚珠）之生長速度甚快，6月上旬調查時胚的發育已接近至最大的程度，但由於胚少，尙容易計算胚數，因此本研究之三個時期之調查結果，與前人[4]調查之結果相當接近。

據 Kobayashi[16]觀察，多胚性之柑橘，其珠心胚係由珠心組織中，細胞質濃，核較大的初生細胞（primordium cells）分化、發育而來。是否檸檬之珠心組織中，初生細胞較少，或抑制珠心胚發育的物質較多，或其他因素，造成胚數較少，尙待探討。

表1. 不同生育時期檸檬品種之胚數*

Table 1. Fruit size and mean number of embryos of lemon harvested at different growing stages.

品種 Cultivar	株號 Tree no.	果實 Fruit (mm) 縱徑 length	果實 Fruit (mm) 橫徑 diameter	平均種子數 Seeds/fruit	平均胚數 Embryos/seed
		果實於1989年6月5日採收 (fruits havested on Jun 5, 1989)			
Lisbon		46.6±3.8	32.2±3.4	9.2± 2.8	1.7±1.0
Eureka	1	41.1±2.4	32.4±2.0	11.6±10.2	1.6±1.0
Eureka	2	45.4±2.7	32.7±1.2	8.4± 2.9	1.5±0.7
Eureka	3	43.9±3.1	33.3±1.6	16.8±10.0	1.4±0.8
		果實於1989年6月21日採收 (fruits havested on Jun 21, 1989)			
Lisbon		54.4±2.0	43.0±1.0	12.3±3.0	1.3±0.5
Eureka	1	50.3±3.9	42.0±2.0	10.0±2.6	1.3±0.6
Eureka	2	53.4±2.1	42.7±1.4	15.0±4.3	1.3±0.5
Eureka	3	50.8±3.5	40.2±1.2	25.6±3.4	1.4±0.7

* 每株採取果實數，6月5日4個，6月21日5個，平均值±標準偏差。
Four fruits and five fruits were harvested on Jun. 5 and on Jun. 21 respectively. Mean ± SD.

本研究結果，檸檬之平均胚數均少於二個，較桶柑[7]、四季柑[6]少，後二者做爲雜交育種的母本，均有相當數量之雜交苗成活[6,7]。因此，以檸檬爲母本，似可獲得相當比率雜交苗。

表2. 以枳殼及甜橙授粉之檸檬雜交種子胚數*

Table 2. Number of embryos produced per seed of lemon pollinated by trifoliate and sweet oranges.

雜交組合 Combinations	果實數 No. of fruits	平均種子數 Seeds/fruit	胚數 No. of embryos			單胚率 % of mono-embryo seeds
			平均 mean	最高 highest	最低 lowest	
檸檬×糖橙 Lisbon×Sugar orange	5	9.6±2.9	1.4±0.7	4	1	64.6
檸檬×柳橙 Eureka×Liu-cheng	15	17.5±8.0	1.5±0.8	6	1	64.9
檸檬×枳殼 Eureka×trifoliate	8	13.6±5.0	1.4±0.8	4	1	67.9
檸檬×糖橙 Eureka×Sugar orange	4	8.0±1.9	1.9±1.0	5	1	44.0

* 果實於1898年8月1日採收，平均值±標準偏差。
Fruits were harvested on Aug. 1, 1989. Mean±SD

二、雜交苗之鑑定

㈠葉片形態

以枳殼授粉於柑橘屬（*Citrus* spp.）之雜交苗均爲帶翼葉之三小葉，珠心胚苗爲單身複葉（Unifoliate compound），二者極易區別，此一方法常做爲鑑定珠心胚苗與雜交苗及估算雜交苗率[5,7,9,10,18,19,24]。其他柑橘屬之種間[1,6,7]乃至品種間[7,13]之雜交後代亦可以葉片形態區別之。本報告，以枳殼授粉於 Eureka 檸檬，雜交苗率達73%（表三）。

表3. 檸檬以枳殼及甜橙授粉之雜交率[1]

Table 3. Percentage of zygotic seedlings of lemon pollinated by trifoliate and sweet oranges.

雜交組合 Combintions	果實數 No. of fruit	種子數 No. of seed	實生苗數 Seedlings		
			合計 total	雜交 zygotic	(%)[2]
檸檬×糖橙 Lisbon×Sugar orange	4	32	—	12	(38)
檸檬×柳橙 Eureka×Liu-cheng	15	260	—	69	(27)
檸檬×枳殼 Eureka×trifoliate	7	82	97	60	(73)
檸檬×糖橙 Eureka×Sugar orange	5	48	—	27	(56)

1. 雜交以葉片形態鑑定之。
Zyogtic seedlings were identified by leaf morphology.
2. 雜交苗率＝雜交苗數／種子數。
% of zygotic seedlings=No. of zygotic seedlings/No. of seeds.

檸檬葉片之形態特徵爲較寬之披針形（lanceolate），幾無葉翼[14]，甜橙之葉片爲卵形（Ovate），有明顯之葉翼。甜橙授粉於檸檬，與珠心胚苗比較，雜交苗之主要特徵依次爲：葉翼較明顯、葉身較圓或呈卵形，或葉片較狹長或較小（圖一）。可以上述一種或多種形態上的差異鑑定雜交苗與珠心胚苗。甜橙品種中，柳橙之葉翼稍小，葉寬稍窄，形態上與檸檬較接近，雜交後代不易鑑定，以葉片形態鑑定之，雜交苗率爲27%，爲四個雜交組合最低者（表三）。檸檬的雜交苗率在三花粉親間比較，枳殼授粉者最高，達73%，其中有部份矮小發育甚差之植株，仍可由三小葉辨認。枳殼爲父本與柑橘屬之品種雜交，雜交苗率通常高於以柑橘屬之品種爲父本者[7,8,12,17]，這主要因葉片形態差異大，雜交苗容易鑑定，但枳殼與親和力較差之柑橘品種雜交時，雜交苗率亦可能偏低[7]。

㈡刺

各柑橘品種之枝條均有不同程度的刺，刺爲發育不完全的枝[10]，實生苗的刺特別明顯，此爲幼年期的特徵之一，隨著植株之成長，逐漸變小或無[10]。據 Spiegel-Roy[22]報告，Eureka 檸檬以枳殼授粉之雜交幼苗，在第四節或第五節以上均有明顯的刺，而珠心胚苗則無，可據以區分該二類苗；但不同雜交組合間，有不同比率之無刺後代。本研究中，枳殼授粉之雜交苗在第四或第五節，甚至更低的位置，均有明顯的刺，而珠心胚苗或甜橙的雜交通常自莖部第9至第11節以上才有刺，若僅觀察小植株，即以爲無刺，如前人之結果[22]。所以，檸檬之珠心胚苗並非無刺，但枳殼授粉者，雜交苗與珠心胚苗，仍易以刺之開始著生位置區別之。糖橙及柳橙授粉者，播種後一年生之雜交苗，108株中，12株完全無刺，其餘帶有長短不等的刺。刺爲親本的遺傳特性，但其長短依植株之生長狀況而有不同，以刺鑑定雜交苗，應是有刺的母本，產生無刺的後代最爲可靠。

㈢新稍的顏色

柑橘的葉片，一般均爲淡綠色至深綠色，而生長中之檸檬幼稍及幼葉帶紫紅色[3,4]，隨著其發育而逐漸成爲綠色。本研究中，檸檬以枳殼授粉之珠心胚苗，幼稍均帶有紫紅色，成活之雜交苗移植於3公升盆後，38株中有34株（89%）新稍爲綠色或淡綠色，其餘4株（11%）帶有不同程度的紫色（表四）。糖橙及柳橙授粉者，雜交苗新稍帶紫色者爲22%至30%（表四），其餘爲綠色；紫色出現在嫩稍之葉片及葉腋處（圖二），以新稍之顏色來辨別檸檬雜交苗，可達葉片形態鑑定數之70%以上。

表4. 檸檬雜交苗綠色及紫色新稍植株之比率*

Table 4. Frequency between purplish and green young shoots of lemon hybrids identified by leaf morphology.

雜交組合 Combinations	雜交苗數 No. of zygotic seedlings	嫩稍顏色 Colour of young shoot	
		帶紫色 purplish (%)	綠色 green (%)
檸檬×糖橙 Lisbon×Sugar orange	12	25	75
檸檬×柳橙 Eureka×Liu-cheng	69	30	70
檸檬×枳殼 Eureka×trifoliate	38	11	89
檸檬×糖橙 Eureka×Sugar orange	27	22	78

* 新稍之顏色觀察由1990年2月至4月。
The color of young shoots were observed form February through March in 1990.

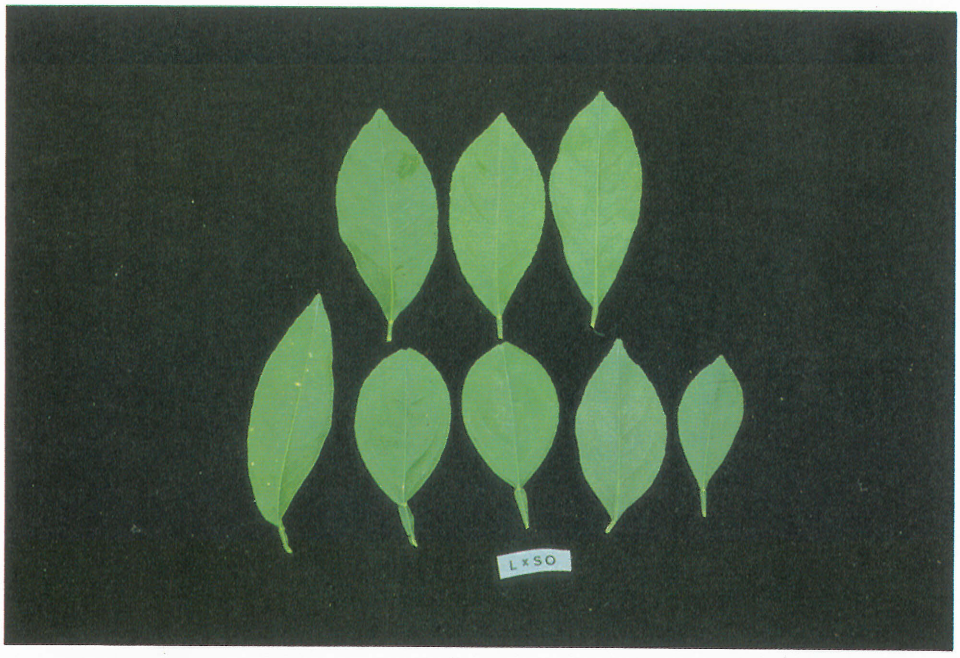


圖 1　檸檬以糖橙授粉，雜交苗（下列）與珠心胚苗（上列）不同植株之葉片形態。與珠心胚苗比較雜交苗之主要特徵依次爲：葉翼較明顯，葉身較圓或卵形，葉片較狹長或較小。

Fig 1. Leaf morphology of zygotic (lower row) and nucellar (upper row) seedlings of lemon pollinated by Sugar orange.
The zygotic seedlings were identified by one or more of the following leaf morphological characteristics, including winged petioles ; rounded or ovate blade ; more slender or smaller leaves.



圖 2　檸檬以甜橙授粉所產生之綠色（上行）及紫色（下行）新稍雜交苗。紫色者除嫩葉外，新稍之葉腋處亦帶紫色。

Fig 2. Green (upper row) and purplish (lower row) young shoot hybrids of lemon pollinated by sweet oranges. The purplish colour appears on both young leaves and leaf axils.

上述之顏色觀察是在二月至四月間進行，但新稍之顏色易受外在環境的影響[2]，五至八月間長出的幼稍，不論珠心胚苗或雜交苗，其紫紅色變得極淡，甚至全無，而爲綠色。由於植株之管理均相同，顏色的變化，主要應是氣候的影響。

檸檬以甜橙授粉，以葉片形態鑑定之雜交後代中，新稍顏色帶紫紅色或淡紫紅色者，其葉片形態多介於兩親間，然也有極少數植株之葉片具大型之葉翼或葉身爲卵形，其形態類似甜橙，而其新稍之紫色甚至較檸檬之珠心胚苗深。葉片形態與新稍顏色間似無明顯的相關。

由民國79年檸檬以甜橙授粉所選拔之250株雜交苗中，3株之葉片形態與檸檬相同，而由新稍顏色判定爲雜交苗，檸檬與甜橙之雜交後代，以葉片形態鑑定，一次即可篩選大多數之雜交苗，然而柑橘幼苗生長之強弱常會影響其葉片之大小乃至形態，且當葉片形態與檸檬相近，不易以此一特徵鑑定時，佐以新梢顏色較爲準確。

參考文獻

1. 呂明雄 1980 柑橘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. 吳明哲、卓俊銘 1986 柑橘葉片同功異構酶之研究。Ⅰ.本省重要柑橘葉片之電泳分析與葉齡對分析結果的影響，中華農業研究35(4)：484—494。
3. 林樸 1966 柑橘・農家要覽第八輯園藝作物果樹篇第二章。75—144。 臺灣省政府農林廳編印。
4. 翁仁祿 1974 本省柑橘類胚色及胚數之調查。臺灣省農試所六十二牛年年報。P.62—63。
5. 徐信次 1979 柑橘多胚性之研究—珠心胚苗之分離。中華農業研究28 (2) ：101—108。
6. 黃阿賢、林瓊玖 1985 利用花粉遺傳標誌區別柑橘有胚性。中國園藝32(2)：103—108。
7. 黃阿賢、岳慶熙 1989 多胚性與橙類雜交育種效率改進之研究・柑橘試驗研究所成果專題研討會專集。P. 28—38。臺灣省農試所特刊第12號。
8. Button. J. and J. Kochba. 1977 Tissue culture in citrus industry. P.70—92.In : J. Reinert and Y. P. S. Bajaj. Plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag Heidelberg New York.
9. Cameron, J. W. and M. J. Garber 1968 Identical twin hybrids of Citrus×Poncirus from strictly sexual seed parents. Amer. J. Bot. 55 (2) 199—205.
10. Comeron, J. W. and H. B. Frost 1968 Genetics, breeding and nucellar embryony. Chap. 5, In : The Citrus Industry, Vol. II, revised edition, Reuther, W., L. D. Batchelor, and H. J. webber, eds. Univ. Calif., Division of Agr. Berkeley.
11. Esen, A., R. W. Scora and R. K. Soost 1975. A simple and rapid screening procedure for identification of zygotic citrus seedlings among crosses of certain taxa. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100 (5) : 558—561.
12. Frost, H. B. and R. K. Soost 1968. Seed production : development of gamete and embryos. P.296—324. In : W. Reuther, L. D. Batchelor and H. J. Webbers (eds.) The Citrus Industry, Vol. 2, rev. ed. Berkley : Div. Agri. Univ. Calif.
13. Hearn, C. J. 1977 Recognition of zygotic seedlings in certain orange crosses by vegetaeive characters. Proc. Int. Soc. Citriculture. 2 : 611—614.
14. Hodgson, R. W. 1967 Horticultral varieties of citrus. chap 4 In : The Citrus Industry, Vol. I, revised edition. Reuther, W., L. D. Batchelor, and H. J. Webber, eds. Univ. Calif. Division of Agri. Berkeley.
15. Iglesias, L., H. Lima and J. P. Simon 1974 Isozyme identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus. J. Hered. 65 : 81—84.
16. Kobayashi, S., I. Ikeda and M. Nakatani. 1979 Studies on nucellar embryogenesis in citrus. J. Japan Soc. Hort. Sci. 48 (2) : 179—185.
17. Nishiura, M. and T. Iwasaki 1964 Studies on citrus breeding II. Number of seedlings per seed and

number of gametic and nucellar seedling from satsuma mandarin by cross pollination. Bull. Hort. Res. Stn. B (3) : 1—10.

18. Okudai, N., I. Oiyama and T. Takahara 1981 Studies on the improvement of zygotic seedling yield of the polyembryonic citus. Bull. Fruit Tree Res. Sta. D (3) :9—22.
19. Ozsan, M. and J. W. Cameron 1963 Artifical culture of small citrus embryos and evidance against nucellar embryony in highly zygotic varieties. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 82 : 210—216.
20. Pieringer, A. P. and G. T. Edwards. 1964. Identification and zygotic seedlings by infrared spectroscopy. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 86 : 226—234.
21. Soost, R. K. and T. E. Williams 1980 Identification of nucellar and zygotic seedlings of citrus with leaf isozymes. HortScience 15 (6) :728—729.
22. Spiegel-Roy and A. H. Teich 1972 Thorn as a possible genetic marker to distinguish zygotic from nucellar seedlings in Citrus. Euphytica 21 :534—537.
23. Tatum, J. H., R. E. Berry and C. J. Hearn. 1974 Characterization of citrus cultivars and seperation of nucellar and zygotic seedlings by thin layer chromatography. Proc. Fla. State Hort. Soc. 87 : 75—81.
24. Toxopeus, H. J. 1962 Notes on the genetics of a few leaf characters in the genus citrus. Euphytica 11 : 19—25.

The Polyembryony and Identification of Zygotic Seedlings of Lemon (*Citrus limon* [L.] Burm. f.)[1]

A-Shiang[2] Hwang

Summary

The number of embryos of Eureka and Lisbon lemon was investigated during the development of the fruits. Open-pollinated fruits were harvested on June 5 and on June 21, and hybrid fruits were harvested in early August. All the mean number of embryos per seeds were less then 2. 0, and 40 % to 68 % monoembryo seeds of hybrid fruits were found. These indicated that lemon contain low degree of polyembryony. Zygotic seedlings of hybrid fruits were identified by leaf morphology, and seventy-three per cent zygotic seedlings of Eureka lemon crossed by trifoliate orange and 38 % to 56 % zygotic seedlings of lemon crossed by sweet orange were obtained. This variation might be influenced by the difference of leaf morphology among the pollen parents. The colours of growing shoot of these zygotic seedlings was observed from February through March in 1990, eighty nine to seventy per cent of the zygotic seedlings were green, and the others were purplish as the seed parent. The results showed that both the leaf morphology and the colour of young shoot could be used to distinguish the zygotic from nucellar seedings of lemon crossed by other citrus species.

Key Words : lemon, polyembryony, zygotic seedling, leaf morphology, color of young shoot.

1. Contribution No. 1573 From the Taiwan Agriultural Research Institute.
2. Assistant Horticulturist, Dept. of Horticulture, Chia-Yi Agricultural Experiment Station. TARI. Chia-Yi, Taiwan.