中華農業研究 28(2):101~107 (1979)

柑橘多胚性之研究—珠心胚苗之分離[1]

徐 信 次[2]

摘要：柑橘珠心胚苗與受精胚苗之分離可利用枳殼三葉顯性遺傳之特性。取枳殼爲花粉親分別雜交葡萄柚、桶柑、椪柑及苦柚。其雜交種子播種後，萌生三葉實生苗者爲受精胚苗，與單葉之珠心胚苗其分別甚爲顯著。據調查： Marsh 葡萄柚之珠心胚苗率達 51.5 %， Ruby 葡萄柚 57.8%，桶柑 78 %，椪柑 100 %。苦柚僅萌生受精胚苗。受精胚苗之初期生長具顯著之雜種優勢。

柑橘之種子爲多胚性 (Polyembryony) 。 1719 年 Leuwenhook 氏發現柑橘種子內有一個以上的胚。1878 年德國著名植物學家 Storsburges 氏即對柑橘多胚性亦曾作詳細之說明。其後，美國之柑橘育種專家 H. B. Frost 等亦擴大研究並加以實際利用。

依柑橘每粒種子內胚性及胚數的不同，可將柑橘分爲單胚類及多胚類。柚類、檸檬之某些品種及甜橙與寬皮桔之一些雜種等，均不產生珠心胚，爲單胚類。但大部份柑橘多屬於多胚類。多胚性之柑橘種子均可產生兩種實生苗 。 一種由雌雄細胞經授粉受精作用結合而產生之受精胚苗 ， 或稱有性苗 (Sexual seedling) 。另一種則不經兩性結合而完全由母體之珠心組織分化發育而成，稱之爲珠心胚苗 (Nucellar seedling)。亦稱爲無性苗 (Asexual seedling)。珠心胚苗間之生長樹勢甚爲整齊一致，其遺傳特性幾乎與其母體完全一致。在遺傳理論上而言，與自母體採穗繁殖者亦完全一致。且具有一條主根，並且不帶病毒而生長强健之優點。故已感染病毒之老品種者可經由珠心胚苗之途徑育成强健無病毒之珠心胚系苗木。此爲珠心胚苗利用之主要目的。

珠心胚苗之利用，我國早已應用在商業性栽培。例如四川省之江津、金堂、南充之甜橙 (黃果) ，以及福建省福州椪柑和福橘之栽培均有實例 [2] 。歐美柑橘生產國家對柑橘珠心胚系之研究及利用已有二、三十年歷史。且巴西 [12] 、美國 [3·4] 的試驗結果均顯示樹形整齊， 健康而無缺株現象。尤其後期產量高之特性更爲可取之優點。據王氏調查臺灣 [1] 珠心胚系 (實生系) 椪柑與普通椪柑產量比較，亦顯示珠心胚系之果數與產量亦較老品系爲高，且生長强健，樹命亦長。由於以上之事實，故利用珠心胚苗繁殖苗木爲刻不容緩之工作。

但柑橘之多胚性在實際應用上，首先遭遇之困難爲如何確定受精胚苗和珠心胚苗之問題。種子發育過程中有性胚和珠心胚間有競爭現象，使每粒成熟種子並不完全萌發兩種胚性之實生苗。除非兩者外表型有顯著之差異可資區別，否則分離兩者之實生苗甚感困難。 雖今應用紅內線光譜法 [16] 、薄層色析法 [19] 、葉片抽出液呈色法 [13] 、新梢抽出液速測法 [6] 、酵素鑑別法 [10] 、花粉標誌法 [23] 等可以解決特殊情況之某些困難 ， 但在廣大之實際應用上仍受技術上之限制 。 有關柑桔葉片遺傳，曾發現 Meyer lemon (*C. limon*) 之紅褐色新梢，柚類 (*C. grandis* Osbrck) 及馬來酸橙 (*C. hystrix*

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 876 號。本研究承前中國農村復興聯合委員會補助經費 78 (ARDP) -5.1-A-363] ，蔣明南教授鼎力支持，嚴夢如主任指導及斧正，田間什交技術承嘉義農專呂明雄副教授協助，謹誌謝忱。

2. 本所園藝系技士。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

D. C.）之寬大翼葉，枳殼（*Poncirus trifoliata* Raf）之三葉均有顯性遺傳之特性[22]。而在實生苗上認爲長刺爲區別珠心胚苗和受精胚苗之遺傳標記[18]。

本研究之目的在利用枳殼屬（*Poncirus*）之三葉顯性遺傳分離椪柑（*C. reticulata* Blanco.）、桶柑（*C. tankan* Hayata.）及葡萄柚（*C. paradisi* Macf）之受精胚苗和珠心胚苗，以作爲培育及保存優良無病毒珠心胚系之利用，期能改進本省之柑橘事業。

材料及方法

一、選拔優良母樹：分別在嘉義縣中埔鄉濃水選拔園藝性狀優良，健康無病徵之葡萄柚母樹九株。其中 Ruby 四株，Marsh 五株；在臺中縣新社鄉崑山村選優良椪柑母樹十株。在臺北縣深坑鄉火燒樟選優良桶柑十一株。另在臺中市北屯區大坑選苦柚（*C. grandis* Osbeck）一株。

二、採集花粉：枳殼供試之花粉採自臺中縣后里鄉內埔。於 3 月中旬開始至 3 月下旬，共三次，分別在 3 月 17、22 及 24 日。花朵摘下後即裝入塑膠袋中。隨即携回逐朵取其花藥，裝入透氣之秤藥紙袋內。然後將花藥等放入裝有矽膠之玻璃瓶中，置常溫下任其乾燥。翌日取其散落之黃色花粉分裝於同質地之小紙袋內以供授粉。多餘之花粉仍存矽膠瓶中，密封貯藏於 5°C 之定溫箱備用。

三、授粉及套袋：授粉時選擇新梢上發育正常之花朵，以次日或當日可開花者爲對象。首先以鑷子除去花瓣及花藥，然後將枳殼花粉沾抹柱頭，嚴防滲雜其他花粉，隨即套上特製秤藥之紙袋以防止昆蟲進入。約兩週後，拆開紙袋，檢查著果情形，並在結果之枝條上端繫上紅色尼龍繩以資辨別。生理落果結束後，再用尼龍網袋將所結果實一一套上以防蟲害，並便將來採果。

四、播種及育苗：果實完全成熟後，按株別採果並編號。採回其果實先行殺菌劑洗滌涼乾，置室內貯存，葡萄柚之種子取出後清洗種皮上之黏質，再用萬力 T 處理。然後剝除內外種皮，以素燒盆盛蛭石爲介質播種。椪柑及桶柑之種子消毒陰乾後，分裝於玻璃瓶中，保持濕潤，貯存於 5°C 之定溫箱。桶柑之種子於 5 月下旬依相同方法播種於 5 吋素燒盆，每盆各播 4 粒。椪柑之種子則散播於大型樹脂纖維栽培盆。苦柚之種子取出後，亦曾殺菌及剝除種皮後即散播於樹脂纖維栽培盆。種子萌芽後，定時施用 1,000 倍之 Hyponex 水溶液，保持及促進幼苗之正常發育。

五、調查記錄：幼苗生長至出現三葉及單葉之兩種實生苗時，分別記錄其受精胚苗及珠心胚苗之數目。凡具單葉者即爲珠心胚苗，三葉者即爲受精胚苗。

結果

一、苦柚：共授粉 30 個紙袋，僅採得三個雜交果實。其中一個完全無子。其餘兩個分別取得雜交種子 48 及 30 粒。每粒種子萌生一株三葉之受精胚苗（見表 1）。

二、葡萄柚：Ruby 共授 102 朵花，收 9 個果實，37 粒健全種子，全部育得珠心胚苗 26 株，受精胚苗 19 株。Marsh 共授 106 朵花，收 7 個果實，34 粒健全種子，共育得珠心胚苗 34 株，受精胚苗 32 株（見表 1 及圖 1）。

三、桶柑：所結果實一部分在幼果時即採下供胚培養研究用，其餘之成熟果實取得之種子共播種 179 粒。就每粒種子萌生之受精胚苗及珠心胚苗個別調查記錄。共育得珠心胚苗 227 株，受精胚苗 64 株（見表 1、表 2，及圖 2、圖 3）。

四、椪柑：共授 280 朵花，收 32 個果實，315 粒種子。所播之種子僅萌生單葉之實生苗。顯然地，椪柑和枳殼雜交，其種子可育得全爲珠心胚苗之苗木而無三葉之受精胚苗。

表 1. 不同柑桔種類和枳殼什交種子之後代胚性調查

Table 1. The investigation of embryony of hybrid seeds of *Citrus spp.* crossed by *Poncirus trifoliata*

雜交組合 Cross combination	每果平均種子數 Average seeds per fruit	每粒種子平均實生苗數 Average seedling per seed		播種種子數 No. of seed sowed	珠心胚苗數 No.of nucellar sssdling	受精胚苗數 No.of zygotic seedling	珠心胚苗率% of nucellar seedling	受精胚苗率% of zygotic seedling
		總數 total	有性胚苗 zygotic					
苦柚×枳殼 *C, grandis* × *P. trifdiata*	39(30,48)	1	1	78	0	69	0	100
Marsh 葡萄柚×枳殼 *C, paradisi* × *P. trifoliata*	5.4 (2-11)	1.94	0.94	34	34	32	51.5	48.5
Ruby 葡萄柚×枳殼 *C, paradisi* × *P. trifoliata*	4.0 (1- 6)	1.23	0.51	37	26	19	57.8	42.2
桶柑×枳殼 *C, tankan* × *P. trifoliata*	4.7 (1- 8)	1.27	0.36	179	227	64	78.0	22.0
椪柑×枳殼 *C, reticulata* × *P. trifoliata*	9.8 (5-16)	—	0	150	全部	0	100	0

(1) 珠心胚苗數 (%of nucellar seedling) = $\frac{\text{珠心胚苗數 (No. of nucellar seedling)}}{\text{全部實生苗數 (No. of total seedling)}} \times 100\%$。

(2) 受精胚苗率 (%of zygotic seedling) = $\frac{\text{受精胚苗數 (No. of zygotic seedling)}}{\text{全部實生苗數 (No. of total seedling)}} \times 100\%$。

表 2. 桶柑×枳殼之什交種子，每粒成熟種子之珠心胚苗 (N. S.) /受精胚苗 (Z. S) 之分佈

Table 2. The distribution of nucellar seedling (N. S)/zygolic seedling (Z. S) of the tankan seeds crossed by. *Poncirus trifoliata.*

	珠心胚苗/受精胚苗 Nncellar seedling/zygotic seedling								合計 Total
	0/1	1/0	1/1	2/0	2/1	3/0	3/1	4/0	
種子數 No. of seeds	30	56	28	51	2	9	2	1	179
百分率% Percentage	16.8	31.3	15.6	28.5	1.1	5.0	1.1	0.6	100



圖 1. Marsh 葡萄柚×枳殼之珠心胚苗（左）及受精胚苗（右）。

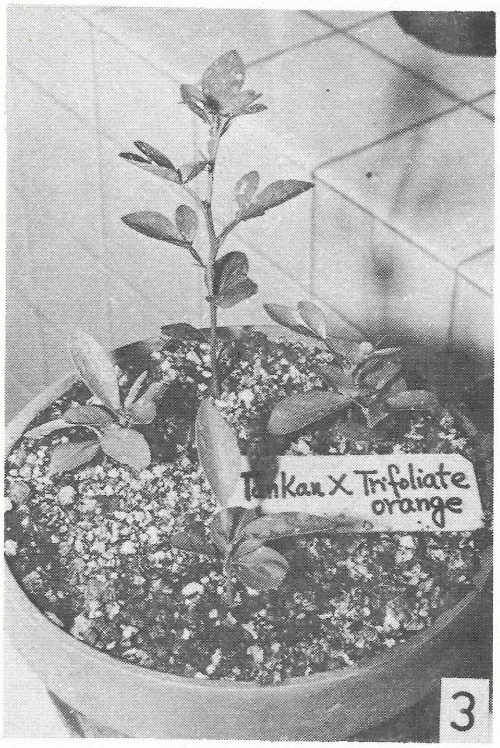
Fig. 1. The nucellar seedling (left) and zygotic seedling (right) germinated from the seed of marsh grapefruit crossed by trifoliate orange.

圖 2. 桶柑×枳殼之珠心胚苗及受精胚苗（三葉）四粒種子中有兩粒同時萌生珠心胚苗和受精胚苗。兩粒僅萌生珠心胚苗。

Fig. 2. The nucellar seedlings (monofoliate) and zygotic seedlings (trifoliate) germinated from the seeds of tankan crossed by trifoliate orange. Notice the right and left seeds which produced both the nucellar and zygotic seedlings and the front and back ones which produced the nucellar seedlings only.

圖 3. 桶柑×枳殼之雜交苗（三葉）初期生長具顯著之雜種優勢。

Fig. 3. There was a conspicuous heterosis of the hybrid of tankan x trifoliate orange in its initial growth.



討　論

柑橘類多胚現象之發生有兩種方式：一種是母體之珠心組織分化形成珠心胚，加上兩性配子結合形成之受精胚[7]。另一種是結合子（zygote）分裂增殖[5,7,14]或由初生胚（Primary embryo）的芽體增殖（Budding）[5]形成兩個或兩個以上的受精胚。多胚性柑橘類之受精對珠心胚的誘發並非絕必要。但授粉的刺激則是必要的刺激[7]。同一胚珠內，珠心胚和受精胚間競爭營養和生存空間之結果，應視珠心胚數之多寡，開始競爭之時間，發生競爭的部位及兩種胚間之相對遺傳勢(Genetic vigor)而定。如果受精卵細胞的分裂較珠心胚的分化爲遲，或幼小胚因養分的輸導及在胚囊中所佔的部位較珠心胚不利時，遺傳勢又較弱，其發育受珠心胚之抑制，或遭珠心胚之排擠。如此狀況柑橘的一粒成熟種子所產生的實生苗可能完全是珠心胚苗。本研究之椪柑即發生這種現象[7,11]。

柑橘後代雜種之百分率主要視品種母本而異。但利用枳殼之花粉測定其百分率甚爲正確[18]。Toxopeus 研究柑橘屬（*Citrus*）和枳殼屬（*Poncirus*）之葉片遺傳，曾假設枳殼的葉片受兩對顯性同質之互補基因 CCDD 之控制而表現三小葉之複葉表現型[22]。如果以枳殼的花粉跟單葉柑橘屬之所有品種雜交，其後代均具三小葉複葉。Furusato 等氏之研究亦指出，芸香料血緣最近之三個屬，柑橘屬（*Citrus*），金柑屬（*Fortunella*）和枳殼屬（*Poncirus*），只有枳殼屬有三小葉的特性。取枳殼之花粉授在其他單葉種的柱頭上，培育所得之三葉實生苗是雜種[9]。

據目前研究所知，柚類是單胚性，不產生珠心胚苗[8,20,21]。即每粒種子僅能萌生一株，二株或三株的受精胚苗[5,14,15]。本研究以枳殼雜交苦柚，每粒種子只萌生一株三葉的有性實生苗，此現象與 Toxopeus 氏的試驗及假設甚相吻合。但並未發現有雙生或三生的雜種[5,13]。桶柑及葡萄柚的雜交種子，兼有單葉及三葉之實生苗出現（見圖1，2，3）。此結果與 Toxopeus 氏及 Furusato 氏的試驗結果及顯性遺傳因子的假設亦甚相同。

Wright, Shamel, Scott 及 Pormeroy 等氏之調查發現 Marsh 葡萄柚之每個果實平均有 2-2.5 粒種子[7]。根據本研究之結果（見表1），嘉義栽培之 Marsh 葡萄柚若授枳殼花粉，每個果實最多有 11 粒種子，最少有2粒，平均有 5.4 粒。Ruby 葡萄柚之每果平均種子數爲4.0。另以晚白柚爲花粉親，Ruby 每果平均有 4.9 粒種子。由此事實可知，種子數之多寡不因屬間和種間雜交而異。根據表1，Marsh 葡萄柚之受精胚苗率爲 48.5 %，Ruby 則爲 42.2 %。平均每粒種子出現 0.94 株及 0.51 株的受精胚苗。足見葡萄柚雜交枳殼其受精胚的競爭及生存力甚强。但是，Frost 和 Soost 二氏以六種不同的花粉親調查 Marsh 葡萄柚之每粒成熟種子萌生受精胚苗率僅爲5 %。珠心胚苗率却高達 96 %。此差異之現象雖在於花粉親不同產生，但以枳殼爲父本，利用遺傳上之特性以區別受精胚苗和珠心胚苗爲最正確之途徑[8]。

桶柑爲東方品質特優之柑桔品種，一般認爲它是甜橙和寬皮桔的天然雜種。本研究共播 179 粒雜交種子，育得 291 株實生苗。其中受精胚苗64株，珠心胚苗 227 株。珠心胚苗率爲 78 %（見表1）。據表2調查結果可知，每粒成熟種子僅萌生受精胚苗者有 30 粒，佔 16.8 %，只萌生珠心胚苗者有 117 粒，佔 65.4 %。兩者兼生者有 32 粒，佔 17.9 %。即 179 粒雜交種子中有 34.7 %萌生受精胚苗。此數字指出，桶柑和枳殼的受精胚在生存空間和營養的競爭，以及遺傳勢等三者間之優勢均高。但與 Marsh 葡萄柚之 94% 及 Ruly 葡萄柚之 51 %比較，葡萄柚之受精胚之優勢更强。桶柑及葡萄柚雜種之初期生長亦顯示雜種優勢（見圖3）。桶柑之種間或種內雜交，或天然雜交，其受精胚如同樣發生競爭優勢而萌生高比率之受精胚苗，則辨別受精胚苗和珠心胚苗之工作更爲不易。目前雖有物理及化學的鑑別方法[5,6,10,13,16,19,23]，除非能利用物理方法或化學物質誘殺珠心胚或受精胚。否則，利用枳殼之葉片特性鑑別不同胚性乃是最可靠之方法。

根據 Frost 及 Soost 二氏的調查，以一種非枳殼之花粉親跟椪柑雜交，其所有成熟種子的珠心胚苗率高達 98%[8]。本研究以枳殼爲花粉親，獲得 100 %之珠心胚苗率（見表1）。由此可見，椪柑之受精胚苗不易產生。此現象之眞正原因迄今尚未獲知。如果取椪柑×枳殼之未成熟種子，以早期胚培養，或能瞭解前述三種競爭關係之原因，以及導致受精胚受排擠或受抑制而不能發育或發育不良之現象。故感有繼續研究之必要。

本研究之事實證明，利用枳殼葉片顯性遺傳之特性獲得柑橘優良母樹珠心胚苗之方法最爲可靠。如果再配合胚培養之技術，不僅可瞭解受精胚和珠心胚初期發育的競爭現象，亦可將一個胚珠內分化之大多數珠心胚培育成苗，如是，不僅縮短育苗的期間，並可增加種子之珠心胚苗數。

參 考 文 獻

1. 王兆金・1965・臺灣椪柑及其珠心系苗之調查。中國園藝 11(1、2) : 31-34。
2. 林樸・1973・臺灣柑桔品種應如何改良。臺灣農業研究中心柑桔產銷講習會專刊 : 1-13。
3. Bridges, G. D. and C. O. Youtsey. 1974. Yield variations among citrus nucellar seedling clones at the Florida State budwood foundation grove. Fla. State Hort. Soc. 87 : 85-87.
4. Cameron, J. W. and R. K. Soost. 1952. Size, yield and fruit characters of orchard trees of citrus propagated from young nucellar seedling lines and parental old lines. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 60 : 255-264.
5. Cameron, J. W. and M. J. Gerber. 1968. Identical-twin hybrids of *Citrus X Poncirus* from strictly sexual seed parents. Amer. Jor. Bot. 55 (2) : 199-205.
6. 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. Jour. Amer. Soc. Hort. Sci. 100 (5) : 558-561.
7. Frost, H. B. 1948. Seed reproduction : development of gametes and embryos. Chapt. 8 *in* H. J. Webber and L. D. Batchelor ed. The Citrus Industry : I : 767-815. Univ. Calif. Press., Berkley and Los Angels.
8. Frost, H. B. and R. K. Soost. 1968. Seed reproduction : development of gametes and embryos. Chapt. 4 *in* W. Reuther., L. D. Batchelor and H. J. Webber (eds). The Citrus Industry, 2 : 290—324. rev. ed. Berkley : Div. Agri. Sci. Univ. Calif.
9. Furusato, K., Y. Ohta and K. Ishibashi. 1957. Trifoliate seedlings in Citrus. Seiken Ziho 8 : 98—100.
10. Iglesias, L., H. Lima and J. P. Simon. 1974. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus. Jour. Heredity. 65 : 81-84.
11. Maheshwari, P. and N. S. Ranga Swamy. 1959. Polyembryony and in vitro culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. Indian Jour. Hort. 15 : 275-282.
12. Moreira, S. and A. A. Salibe. 1965. Nucellar lines in the State of Sao Paulo, Brazil. Proc. of the 3rd. Confer. IOCV. : 309-313. edi. by W. C. Price.
13. Nishiura, M., J. Matsushima and N. Okudai. 1957. Studies on the identification of citrus species and the discrimination of hyhrids from nucellar seedlings. I. Color reaction method with leaf extracts. Hort. Div. Nat. Tôkai-kinki Agric. Expt. Stat. Bull. 4 : 19-26.
14. Ozsan, M. and J. W. Cameron. 1963. Artificial culture of small citrus embryos, and evidence against nucellar embryony in highly zygiotc varieties. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 82 : 210-216.
15. Parlevliet, J. E. and J. W. Cameron. 1959. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in citrus. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 74 : 252-260.
16. Pieringer, A. P. and G. T. Edwards. 1964. Identification of nucellar and zygotic citrus seedlings by infrared spectroscopy. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 86 : 226-234.
17. Soost, K. R. and J. W. Cameron. 1954. Production of hybrids by the use of stored trifoliate orange pollen. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 63 : 234-237.
18. Spiegel-Roy, P. and A. H. Teich. 1972. Thorn as a possible genetic marker to distinguish zygotic from nucellar seedlings in citrus. Euphytica 21 : 534-537.
19. Tatum, H . J. and R. E. Berry. 1974. Characterization of citrus cultivars and separation of nucellar and zygotic seedlings by thin layer chromatogrphy. Fla. State Hort. Soc. 87 : 75-81.
20. Torres, J. P. 1936. Polyembryony in citrus and study of hybrid seedlings. Phillipine Jour. Agri. 7 : 37-58.

21. Toxopeus, H. J. 1930 De polyembryonic van citrus en haar betoklnis voor de cultuur. Korte Mededelingen Alg. Proefst. Landb. Burtenzorg. 8 : 1-15.

22. Toxopeus, H. J. 1962. Notes on the genetics of a few leaf characters in the genus citrus. Euphytica 11 : 19-25.

23. Watanabe, H., H. Yamagata and K. Syakudo. 1970. Studies on the citrus genetic polyembryony in relation to breeding. II. Discrimination of the embryo fertilized by ^{3}H-labeled pollen grains. Japan Jour. Breeding. 20 (3) : 141-145.

Studies on the polyembryony of *Citrus* spp. — Discrimination of nucellar seedlings from zygotic seedlings [1]

Hsin-tszu Hsu [2]

Summary

The nucellar seedlings and zygotic seedlings of citrus can be accurately discriminated from leaves by using the dominant inherited character of trifoliate orange. Marsh grapefruit, ruby grapefruit, tankan, ponkan and one variety of shadock were crossed with trifoliate orange pollens. The collected hybrid seeds were sowed and two different types of seedlings were observed and then, separated. The zygotic seedlings are trifoliate in leaf character which is inherited from the pollen parent and the nucellar seedlings are monofoliate. The number of nucellar seedlings was recorded with a percentage as follows : marsh grapefruit 51.5%, ruby grapefruit 57.8%, tankan 78%, ponkan 100%and shadock 0%. It was found that there was a significant heterosis of zygotic seedlings in their initial growth.

1. Contribution No. 876 from the Taiwan Agricultural Research Institute. This study was financially supported by the JCRR.

2. Horticulturist of the Department of Horticulture, TARI. Wufeng, Taichung, Hsien Taiwan 431, ROC.