

ニンポウキンカン種子へのコルヒチンおよびオリザリン処理が  
四倍体植物誘導に及ぼす影響

八幡昌紀<sup>1</sup>・柏原夕希子<sup>1</sup>・黒木宏憲<sup>2</sup>・國武久登<sup>2</sup>・小松春喜<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>九州東海大学農学部 869-1404 熊本県阿蘇郡長陽村河陽

<sup>2</sup>宮崎大学農学部 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1

**Effect of Colchicine and Oryzalin Treatments on Tetraploid Production of Nucellar Embryos  
in Meiwa Kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle).**

Masaki Yahata<sup>1</sup>, Yukiko Kashihara<sup>1</sup>, Hironori Kurogi<sup>2</sup>, Hisato Kunitake<sup>2</sup> and Haruki Komatsu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*School of Agriculture, Kyusyu Tokai University, Choyo, Aso, Kumamoto 869-1404*

<sup>2</sup>*Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Gakuenkibanadai, Miyazaki 889-2192*

園芸学研究 第3巻 第1号 別刷

園学研. (Hort. Res. (Japan)) 3 (1) : 11-16. 2004.

## ニンポウキンカン種子へのコルヒチンおよびオリザリン処理が 四倍体植物誘導に及ぼす影響

八幡昌紀<sup>1</sup>・柏原夕希子<sup>1</sup>・黒木宏憲<sup>2</sup>・國武久登<sup>2</sup>・小松春喜<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>九州東海大学農学部 869-1404 熊本県阿蘇郡長陽村河陽

<sup>2</sup>宮崎大学農学部 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1

### Effect of Colchicine and Oryzalin Treatments on Tetraploid Production of Nucellar Embryos in Meiwa Kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle).

Masaki Yahata<sup>1</sup>, Yukiko Kashiara<sup>1</sup>, Hironori Kurogi<sup>2</sup>, Hisato Kunitake<sup>2</sup> and Haruki Komatsu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Agriculture, Kyusyu Tokai University, Choyo, Aso, Kumamoto 869-1404

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Gakuenkibanadai, Miyazaki 889-2192

#### Summary

*In vitro* chromosome doubling of nucellar embryos was investigated in Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle). Nucellar embryos were aseptically treated with two antimitotic agents, colchicine and oryzalin at different concentrations and times. After these treatments, nucellar embryos were successively cultured on MT medium containing 500 mg/liter<sup>-1</sup> malt extract. Ploidy levels of seedlings were evaluated by both flow cytometry and chromosome counting of root tips. Frequency of tetraploid production depended on the kind of antimitotic agents as well as on the concentration and time of treatment. Among the treatment conditions tested, colchicine gave better results than oryzalin on inducing chromosome doubling. Tetraploid plants were obtained from approximately 50% of the nucellar seedlings treated with colchicine at 0.05% for 48 hours. These tetraploids showed poor growth during the early stage after acclimatization, but grew as vigorously as the diploid plants when grafted onto 3-year-old seedlings of trifoliolate orange. These results showed that colchicine treatment combined with embryo culture is particularly efficient to induce chromosome doubling of nucellar embryos in Meiwa kumquat.

キーワード : 倍数性育種, コルヒチン, カンキツ, ニンポウキンカン, オリザリン

#### 緒言

カンキツ類の三倍体は無核性の他に豊産性や耐寒性などを有し、優れた特徴が期待される (Soost・Cameron, 1980; 1985). 一般的に、三倍体は二倍体と四倍体間の交雑によって得られるため、四倍体は非常に重要な育種素材となる (Longley, 1926; Esen・Soost, 1972; 金好ら, 1997). カンキツ類には、同一種子に受精胚とともに種子親の珠心組織から無性的に発生したいくつかの珠心胚を含む、いわゆる多胚現象を示す品種が多数存在する (Frost, 1925; Cameron・Frost, 1968; 奥代ら, 1981). さらに、多胚現象を示す品種では、二倍体の珠心胚由来の実生中から同質四倍体が偶発的に出現することが明らかにされている (Frost, 1925; Luss, 1935; Lapin, 1937; 古

里, 1952). 従来、カンキツ類の同質四倍体は、このような偶発的に出現する珠心胚由来の四倍体から獲得されていたが、その頻度は非常に低く、効率的な方法とはいえない。

コルヒチンは、ユリ科植物イヌサフラン (*Colchicum autumnale* L.) の種子または鱗茎から抽出されるアルカロイドであり、分裂細胞の紡錘体の形成、動原体の分割、紡錘糸の発達を阻害し、染色体の異常短縮を誘導するが、染色体の縦裂にはほとんど影響を与えないために、人為的に倍数体植物を作出することができる (Blakeslee・Avery, 1937). コルヒチンは浸漬や寒天培地への添加などの方法により、これまで多くの植物で倍数体植物が作出されている (Notsukaら, 2000; Kadota・Niimi, 2002). 生山 (1992) はカンキツにおいて成長点へのコルヒチン処理と簡易茎頂接木との併用により、人為的に同質四倍体を獲得している。これは単胚性品種および多胚性品種のいずれにも用いることのできる非常に有効な方法である。しかしながら、かなりの熟練を要し、効率的

2003年8月11日 受付. 2003年10月31日 受理.

\*Corresponding author.

E-mail: hkomatsu@ktmail.ktokai-u.ac.jp

に同質四倍体を獲得できる方法とはいいい難い。

一方、ジニトロアニリン系除草剤として知られているオリザリンは、コルヒチンより低濃度で効果的に染色体を倍加させることが近年報告されている (Wan ら, 1989; Bouvier ら, 1994)。これまでに果樹では、オリザリン処理によりリンゴ (Bouvier ら, 1994)、ナシ (Bouvier ら, 2002)、キウイフルーツ (Chalak・Legave, 1996) およびバナナ (Van Duren ら, 1996) などで効率的に同質倍数体植物が獲得されている。

そこで本研究では、三倍体育種に必要となる四倍体を効率的に獲得することを目的として、多胚性を示すニンポウキンカンの種子へのコルヒチンおよびオリザリン処理が四倍体誘導に及ぼす影響について検討した。

### 材料および方法

材料には、ニンポウキンカン (*Fortunella crassifolia* Swingle) の完全種子を供試した。まず、外種皮および内種皮を剥皮後、1.0% アンチホルミン溶液で4分間滅菌した後、滅菌水で3回水洗いを行い、アンチホルミンを洗浄した。次に、フィルター滅菌したコルヒチン溶液またはオリザリン溶液にこれらの種子を浸漬し、滅菌水で洗浄後、500 mg・liter<sup>-1</sup> 麦芽抽出物を添加した MT 培地 (Murashige・Tucker, 1969) 上に置床し培養した。培養は、いずれも 25℃、40 μM・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>、連続照明条件下で行った。コルヒチンの処理濃度試験は、処理時間をすべて 48 時間とし、0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 および 2.0% の 7 処理区、コルヒチン処理時間試験では、コルヒチンの濃度をすべて 0.05% とし、0, 24, 48, 96, 168, 480 および 720 時間の 7 処理区とした。また、オリザリンの処理時間試験は、オリザリンの濃度をすべて 0.005% とし、0, 24, 48, 72, 96, 168, 240 および 360 時間の 8 処理区を設けた。各処理区の処理種子数は、いずれも 30 粒とした。

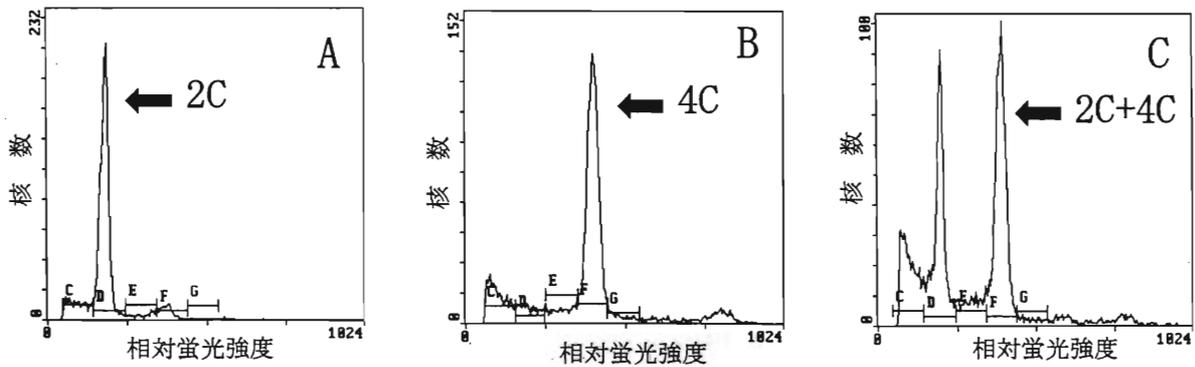
培養約 2 か月後に発芽した実生の倍数性の解析を行った。倍数性の解析には、フローサイトメーター (EPICS XL SYSTEM II, BECKMAN COULTER) を用い、春崎ら (2000) の方法を用いた。すなわち、採取した試料 50 mg に 2 ml chopping buffer [25 mg・liter<sup>-1</sup> propidium iodide (PI), 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 140 mM 2-メルカプトエタノール, 1.0% Triton X-100, 50 mM トリス塩酸, pH 7.5] を加え、シャーレ上において約 5 分間細かく刻み、ミラクロス (Calbiochem, Co. Ltd.) でろ過した。ろ液を遠心分離 (12,000 rpm, 3 分間) し、上清を除去した後、沈殿物を 550 μl chopping buffer と混合し、よく懸濁した。さらに、測定直前に 50 μl の 500 mg・liter<sup>-1</sup> PI 溶液を加えて混合した後、フローサイトメーターで 10,000 個の核の蛍光強度により倍数性の判定を行った。また、いくつかの実生については一部修正した Fukui (1996) の酵素解離による染色体観察法を適用して染色体数を調査した。

すなわち、1.5~2.0 cm に伸長した幼根の先端 0.5 cm を採取し、2 mM 8-ヒドロキシキノリンで 4℃、15 時間前処理後、固定液 (エタノール:酢酸 = 3:1) で 4℃、3 時間固定した。固定後、根端を蒸留水で 1 時間水洗し、固定液を取り除き、2% セルラーゼ “オノズカ” RS (ヤクルト)、1% マセロザイム R-200 (ヤクルト)、0.3% ペクトリアーゼ Y-23 (キッコマン) および 200 mM EDTA を含む酵素液を用い、37℃、10 分間解離した。解離後、根端をスライドグラス上に移し、固定液を加え細胞を展開し、室温で乾燥させた後、2% ギムザ液で 30 分間染色、水洗後、乾燥させて染色体標本を作成した。これらの染色体標本について光学顕微鏡を用いて染色体数を観察した。

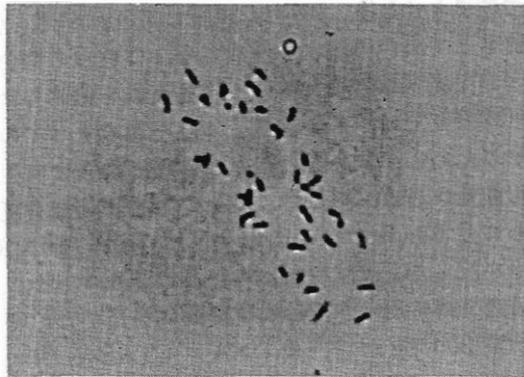
本研究では、多胚性種子に存在するすべての胚を培養するために、珠心胚とともに雑種胚由来の実生が混じる可能性がある。そこで、実生の珠心胚起源を証明するために、Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 分析を行った。供試材料には、ニンポウキンカンおよび本研究で得られた四倍体実生の幼葉を用いた。それぞれの幼葉 200 mg から、全 DNA を CTAB 法 (Rogers・Bendich, 1985) により抽出した。プライマーには、10mer のランダムプライマー (Operon) 40 種類 (OPA-1~20, OPB-1~20) を使用した。Polymerase chain reaction (PCR) の反応液 (25 μl) の組成は、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、80 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、100 μM dNTPs、0.3 μM プライマー、2.5U Tth DNA polymerase および 10 ng DNA とした。DNA の増幅には、PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-700 (ASTEC) を使用し、前処理 94℃・30 秒間、熱変性 94℃・30 秒間、アニーリング 37℃・2 分間、伸長反応 72℃・3 分間で 45 サイクルとした。それぞれのサンプルは、0.5 μg・ml<sup>-1</sup> Ethidium bromide を含む 1.3% アガロースゲルで電気泳動後、紫外線照射下でバンドパターンを観察した。

### 結果および考察

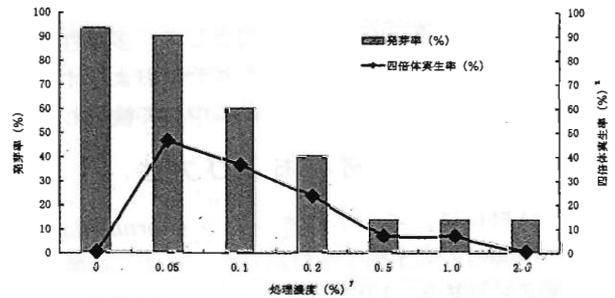
コルヒチンまたはオリザリンの処理区は、無処理区と比較して発芽、発根が遅く、その傾向は処理濃度が高くあるいは処理時間が長くなるにつれて、さらに強くなった。しかしながら、培養 2 か月後にはそれぞれの処理区で獲得個体数の差異があるものの、多くの実生を得ることができた。これらの実生のほとんどは、正常に成長したが、一部には、発芽あるいは発根だけする個体、節間が非常に短い個体、葉が奇形になる個体なども観察された。次に、得られた実生の倍数性をフローサイトメーターで解析した結果 (第 1 図)、二倍体、四倍体および二倍体と四倍体の細胞キメラ個体を確認することができた。また、無作為に選抜した数個体の四倍体実生の染色体数を調査した結果 (第 2 図)、36 本の染色体数を有しており、四倍体であることが確認され、フローサイトメーターによる倍数性解析とすべて一致した。これらの四倍体は、二倍



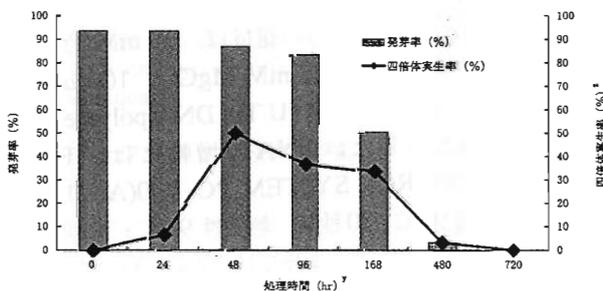
第1図 コルヒチンおよびオリザリン処理から得られた実生のフローサイトメーターによる倍数性解析  
A, 二倍体; B, 四倍体; C, 二倍体と四倍体の細胞キメラ個体



第2図 コルヒチン処理から得られた四倍体実生の根端の染色体 (2n=4X=36)



第3図 ニンポウキンカンにおける種子の発芽率と四倍体実生率に及ぼすコルヒチン処理濃度の影響  
 $^2$ (四倍体数/供試数)  $\times 100^y$  コルヒチン処理時間はすべて48時間とした



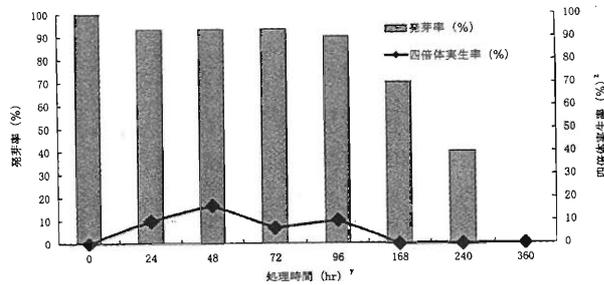
第4図 ニンポウキンカンにおける種子の発芽率と四倍体実生率に及ぼすコルヒチン処理時間の影響  
 $^2$ (四倍体数/供試数)  $\times 100^y$  コルヒチン濃度ははすべて0.05%とした

体と比較して、節間が短く、葉が厚くて濃緑色の形態的特徴を示した。また、細胞キメラは奇形の葉を有しているものが多かった。

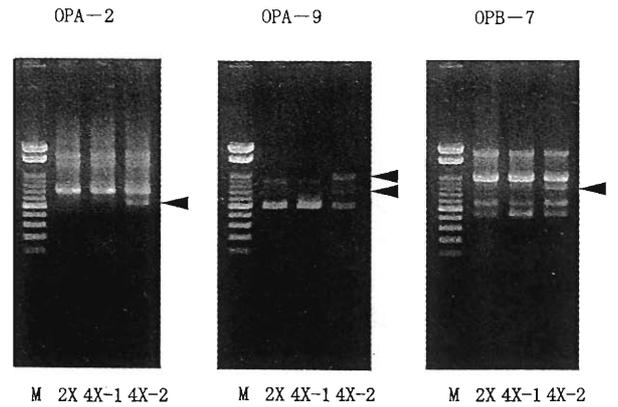
次に、コルヒチン処理濃度について検討した結果(第3図), 発芽率では無処理区が93.3%であったのに対し, 0.05, 0.1, 0.2%の処理区では, それぞれ90.0, 60.0, 40.0%となり, 濃度が高くなるにつれて発芽率が低下し, 2.0%の処理区ではわずか3.3%の発芽率であった。四倍体実生率では, 0.05%の処理区が46.7%と最も高く, 0.1, 0.2%の処理区では, それぞれ36.7, 23.3%となり, 発芽率が低下するとともに四倍体実生率も低下し, 2.0%の処理区では全く四倍体が得られなかった。次に、コル

ヒチン処理時間について検討した結果(第4図), 発芽率では無処理区が93.3%であったのに対し, 48, 96, 168時間の処理区では, それぞれ86.7, 83.3, 50.0%と低下し, 480時間の処理区はわずか3.3%, 720時間の処理区では全く発芽がみられなかった。四倍体実生率では, 24時間の処理区では6.7%と低く, 48時間の処理区で50.0%と最も高かった。96, 168, 480時間の処理区では, それぞれ36.7, 33.3, 3.3%となり, 48時間以上の処理では処理濃度と同様に発芽率の低下に伴い四倍体実生率が低下した。なお, Sanford (1983)は, コルヒチン処理において濃度が高くなる程, あるいは処理時間が長くなる程, 処理された部位は枯死しやすくなると報告しているが, 本研究においても高濃度または長時間のコルヒチン処理により発芽率の低下や奇形の発生が観察された。

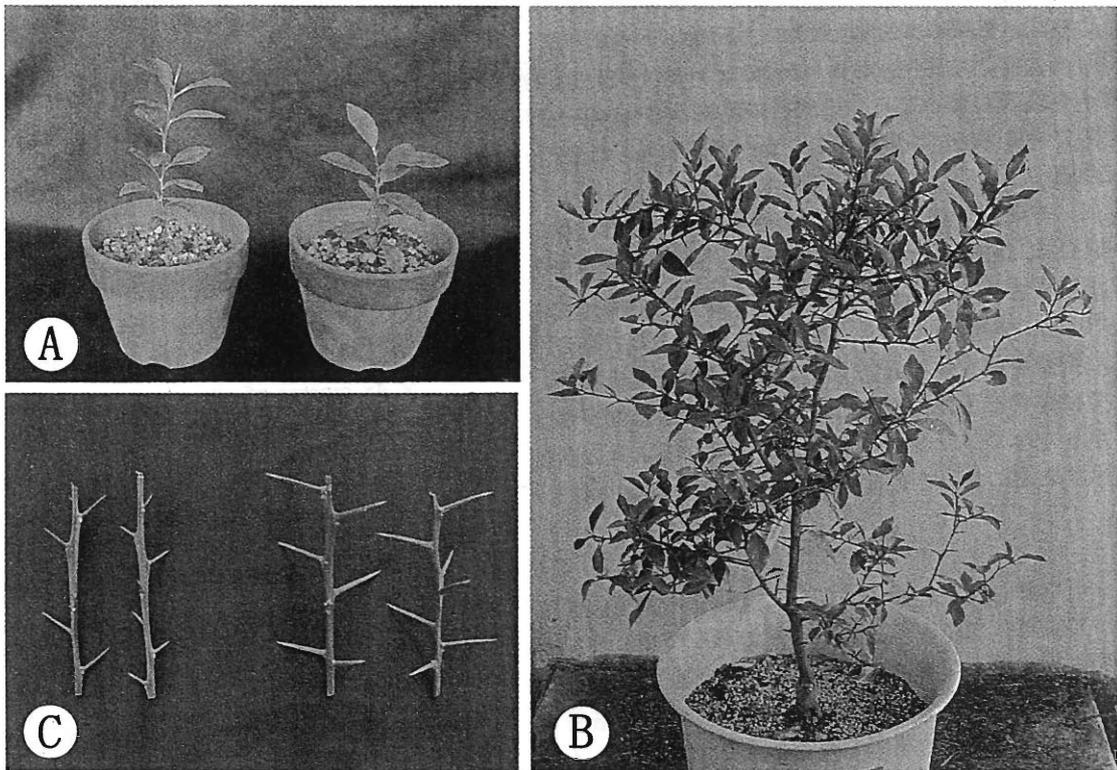
次に、オリザリンの処理時間について検討した結果(第5図), 発芽率では無処理区が100%, 24~72時間の処理区がいずれも93.3%であったのに対し, 96, 168, 240時間の処理区では, それぞれ90.0, 70.0, 40.0%と漸次発芽率が低下し, 360時間の処理区では全く発芽がみられなかったことから, オリザリンについてもコルヒチンと同様に処理時間が長くなると種子の発芽を抑制するものと思われた。四倍体実生率は, 0.005%, 48時間の処理区で16.7%と最も高かったが, 本処理条件の範囲ではコルヒチン処理と比較して四倍体実生率が低かった。



第5図 ニンボウキンカンにおける種子の発芽率と四倍体実生率に及ぼすオリザリン処理時間の影響  
 $\% = (\text{四倍体数} / \text{供試数}) \times 100$  オリザリン濃度ははすべて0.005%とした



第6図 RAPD分析による四倍体実生の発生起源の解析  
 図中の矢印は異質四倍体に特異的なバンドを示す  
 M, 100b ラダーマーカー 2X, ニンボウキンカン 4X-1, 同質四倍体 4X-2, 異質四倍体



第7図 コルヒチン処理から得られた四倍体ニンボウキンカン植物の形態  
 A, 初期成長の比較 (左, 二倍体; 右, 四倍体)  
 B, 接木2年後の四倍体の樹形 C, トゲの比較 (左, 二倍体; 右, 四倍体)

Van Durenら (1996) は, バナナの培養したシュートにコルヒチンとオリザリンを処理し, コルヒチン処理 (0.2%, 48時間) の四倍体実生率が最高 23.1%であったのに対し, オリザリン処理 (0.01%, 7日間) のそれは最高 29.1%で, オリザリン処理の方が四倍体実生率が高かったとしている. リンゴ (Bouvierら, 1994) やキウイフルーツ (Chalak・Legave, 1996) でもバナナと同様コルヒチン処理に比べてオリザリン処理で四倍体の誘導率が高いことが報告されている. しかし, 本研究のオリザリンの濃度では, コルヒチン処理の四倍体実生率と比較してオリザリン処理

のそれは約 1/3 程度と低かったことから, オリザリンの処理濃度や時間などの条件については, さらに検討を行う必要があると考えられた.

次に, コルヒチンおよびオリザリン処理から得られた 25 個体の四倍体の発生起源を解析するために RAPD 分析を行った結果 (第 6 図), 1 個体はニンボウキンカンと異なったバンドパターンを示し, 雑種胚由来であると考えられた. 一方, 残りの個体はすべてニンボウキンカンのバンドパターンと一致しており, 珠心胚由来であることが推察された. カンキツ類では珠心胚実生から偶発的に

四倍体が出現することが知られている (Frost, 1925; Luss, 1935; Lapin, 1937; 古里, 1952). 本研究では, コルヒチンおよびオリザリンの無処理区から得られた実生の中に四倍体はみられなかったが, Lapin(1937)は多胚性のカンキツ属 8種とカラタチの実生について四倍体出現頻度を調査し, カンキツ属 8種では 1%以下から最高 5.6%, カラタチでは 3.7%であったことを報告している. 古里(1952)は, ウンシュウミカン, ナツダイダイおよびダイダイにおける四倍体の出現頻度が, それぞれ 0.4, 0.2 および 0.1%であったことを報告している. これらの報告からみると, 本研究で用いたコルヒチンおよびオリザリン処理と胚培養を組合せた手法は, 珠心胚由来の偶発的に発生する四倍体実生の出現頻度よりはるかに高率で四倍体を誘導できたことになる. いずれにしても, ニンボウキンカンの種子へのコルヒチン処理では, 0.05%の濃度で 48時間浸漬処理することで最も効率的に四倍体が誘導できたことから, 本処理条件がカンキツの四倍体育成のための種子へのコルヒチン処理として適していると思われた. 実際に, 本処理条件で‘不知火’, ‘津之香’, ‘早香’および‘太田ポンカン’などのカンキツ多胚性品種の種子を処理したところ, いずれの品種からも 40~50%の頻度で同質四倍体を獲得することが可能であった(データ未掲載).

なお, 本研究で得られたニンボウキンカンの四倍体の初期成長は二倍体と比べ劣っていたが, 3年生のカラタチ台に高接ぎすると旺盛に成長し, 太く長いトゲの発生がみられ, 強い樹勢を示した(第7図). 今後, これらの四倍体の特徴を調査するとともに, 三倍体育種への利用について検討する予定である. さらに, 本手法はカンキツ類ばかりでなく, マンゴーやマンゴスチンのような多胚性を示す果樹においても有効な手法であると考えられる.

### 摘 要

ニンボウキンカンの種子を用いた試験管内染色体倍加について検討した. 有糸分裂阻害剤であるコルヒチンとオリザリンを様々な濃度や時間で種子に処理し, その後 500 mg・liter<sup>-1</sup> 麦芽抽出物を添加した MT 培地で培養した. 処理 2 か月後, 発芽率を調査し, フローサイトメーターと根端の染色体観察により得られた実生の倍数性を解析した. 四倍体実生率は有糸分裂阻害剤の種類, 処理濃度および時間に依存しており, 本処理条件内では, コルヒチンの方がオリザリンより染色体倍加の効果が高かった. 0.05%, 48時間コルヒチン処理を行った時, 約 50%と最も高い頻度で四倍体を獲得することができた. これらの四倍体の初期成長は貧弱であったが, 3年生のカラタチ台に接ぎ木すると二倍体と同様に旺盛な成長を示した. 以上のように, 胚培養を組合せた種子へのコルヒチン処理は, ニンボウキンカンの四倍体を効率的に誘導できることが明らかとなった.

謝 辞 本論文をまとめるにあたり千葉大学園芸学部 三位正洋教授にご指導をいただいた. ここに記して感謝の意を表する.

### 引用文献

- Blakeslee, A. F. and A. G. Avery. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *J. Hered.* 28: 393-411.
- Bouvier, L., F. R. Fillon and Y. Lespinasse. 1994. Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots *in vitro*. *Plant Breed.* 113: 343-346.
- Bouvier, L., P. Guerif, M. Djulbic, C. Durel, E. Chevreau and Y. Lespinasse. 2002. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. *Euphytica* 123: 255-262.
- Cameron, J. W. and H. B. Frost. 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. 325-370. In: *The Citrus Industry*, vol. II, Reuther, W., L. D. Batchelor and Webber, H. J. (eds.), University of California, Division of Agricultural Sciences, California.
- Chalak, L. and J. M. Legave. 1996. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. *Plant Cell Rep.* 16: 97-100.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1972. Tetraploid progenies from 2x × 4x crosses of citrus and their origin. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 410-414.
- Frost, H. B. 1925. Tetraploidy in Citrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 11: 535-537.
- Fukui, K. 1996. Plant chromosome at mitosis. p. 1-17. In: K. Fukui and S. Nakayama (eds.). *Plant Chromosome. Laboratory Methods*. CRC Press, Florida.
- 古里和夫. 1952. 柑橘における倍数体. *遺伝学雑誌*. 27:206.
- 春崎聖一・國料大輔・國武久登・小松春喜. 2000. フローサイトメトリーによるカンキツ類の倍数性の判定. *九州東海大農紀要*. 19: 45-52.
- Kadota, M. and Y. Niimi. 2002. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Rep.* 21: 282-286.
- 金好純子・加納徹治・桑田祐二・平尾晃・中谷宗一・小林省蔵. 1997. カンキツ類の三倍体品種の育成(第1報) ウンシュウミカンと四倍体ポンカンの交雑による雑種三倍体の作出. *園学雑*. 66: 9-14.
- Lapin, W. K. 1937. Investigations on polyploidy in Citrus. *U. S. S. R. All-union Sci. Res. Int. Humid Subtropics Works.* 1: 1-68.

- Longley, A. E. 1926. Triploid citrus. Washington Acad. Sci. 16: 543-545.
- Luss, A. I. 1935. Citrus introduction and selection in the U. S. S. R. Sovetsk, Subtrop. 11: 17-27.
- Murashige, T. and D. P. H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. p. 1155-1161. In: H.D. Chapman (ed.). Proc. First Int. Citrus Symp. Vol. 3. University of California, Riverside.
- Notsuka, K., T. Tsuru and M. Shiraishi. 2000. Induced polyploid grapes via in vitro chromosome doubling. J. Japan Soc. Hort. Sci. 69: 543-551.
- 生山 巖. 1992. カンキツ類の倍数性育種に関する研究 — 主として四倍体育種素材の作出について. 果樹試報. 特報 3: 41-48.
- 奥代直巳・生山 巖・高原利雄. 1981. 多胚性カンキツ類における雑種実生獲得率の向上に関する研究. I 品種, 系統間の胚数及び雑種実生獲得率の差異について. 果樹試報 D3: 24-34.
- Rogers, S. O. and A. J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. 5: 69-76.
- Sanford, J. C. 1983. Ploidy manipulations. 100-123. In : Methods in Fruit Breeding. Moore, J. N. and Janick, J. (eds.). Purdue University Press, Indiana.
- Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1980. 'Oroblanco', a triploid pommelo-grapefruit hybrid. HortScience 15: 667-669.
- Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1985. 'Melogold', a triploid pommelo-grapefruit hybrid. HortScience 20: 1134-1135.
- Van Duren, M., R. Morpurgo, J. Dolezel and R. Afra. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. Euphytica 88: 25-34.
- Wan, Y., J. F. Petolino and J. M. Widholm. 1989. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. Theor. Appl. Genet. 77: 889-892.