

## ニンポウキンカンにおける同質四倍体の選抜とその特性

河瀬憲次<sup>1\*</sup>・八幡昌紀<sup>2</sup>・中川匠子<sup>3</sup>・原口加奈<sup>3</sup>・國武久登<sup>3</sup>

<sup>1</sup>河瀬技術士事務所 889-2154 宮崎県宮崎市学園木花台桜1-3-10

<sup>2</sup>鹿児島大学大学院連合農学研究科 890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元1-21-24

<sup>3</sup>宮崎大学農学部 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1

### Selection of Autotetraploid and its Morphological Characteristics in Meiwa Kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle)

Kenji Kawase<sup>1\*</sup>, Masaki Yahata<sup>2</sup>, Syoko Nakagawa<sup>3</sup>, Kana Haraguchi<sup>3</sup> and Hisato Kunitake<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kawase Technical Consulting Office, Gakuenkibanadai-sakura, Miyazaki 889-2154

<sup>2</sup>The United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065

<sup>3</sup>Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki 889-2192

#### Summary

A tetraploid of Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) was selected from nucellar seedlings using root morphology, and its morphological characteristics were investigated.

One seedling with thick short rootlets was obtained from 457 seedlings. Flow cytometry and chromosome observation demonstrated that the seedling was tetraploid ( $2n=4X=36$ ). This tetraploid was presumed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis to have derived from nucellar embryos. The tetraploid showed similar morphology to other *Citrus* tetraploids such as thick, round leaves and larger stomata, flowers, and pollen grains compared with the original diploid. The tetraploid fruit was almost equal in weight and size to that of the diploid, but had a thicker peel and smaller number of developed seeds than the diploid fruit. In the future, the tetraploid obtained in the present study will be important material as a new cultivar and a parent of triploid breeding.

キーワード： 倍数性育種, カンキツ, ニンポウキンカン, 珠心胚, 四倍体

#### 緒 言

キンカンは、果実を丸ごと食することのできる唯一のカンキツ類であり、生食用として消費されるほか、一部は甘露煮、ジャムおよびマーマレードなどの加工用として利用されている。果実にはビタミンCが豊富で、古くから風邪の予防に利用されてきた。また、果皮には発ガン抑制効果のあるとされるβ-クリプトキサンチンが多く含まれており(根角ら, 1998)、健康機能性を多く有する果樹のひとつである。我が国におけるキンカンの主要な栽培地域は宮崎県や鹿児島県などの九州南部地域であり、その生産量は全体の90%を占めており、この地域の重要な特産果樹となっている。しかしながら、経済栽培され

ているキンカンは、ニンポウキンカン(ネイハキンカン・メイワキンカン)(*Fortunella crassifolia* Swingle)のみであり、種子が多いため、食べにくく、加工作業時に種子を取り除くのに手間がかかるところが大きな欠点である。そのため、キンカンにおける無核性品種の作出が望まれている。

無核性品種の育成方法の一つとして三倍体育種があげられる(Soost・Cameron, 1980; 1985)。一般的に、カンキツ類の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(Esen・Soost, 1972; 生山, 1992; 金好ら, 1997; 八幡ら, 2003)。従来、カンキツ類の四倍体は珠心胚由来の実生から選抜され、カンキツ属植物とカラタチ(*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)においてこれまで多くの同質四倍体が獲得されている(Frost, 1925; Luss, 1935; Lapin, 1937; 古里, 1952)。一方、キンカン属植物では、珠心胚からの四倍体の出現についてこれまでのところ全く報告されて

2004年7月9日 受付, 2004年12月13日 受理。

\* Corresponding author. E-mail: kawase@crux.ocn.ne.jp

本研究の一部は日本学術振興会から交付された科学研究補助金(基盤研究C2課題番号14560025)により行った。

いない。また、キンカン属植物の四倍体に関する報告も、Longley (1925) によって発見されたマメキンカン (*F. hindsii* Swingle) と八幡ら (2004) が珠心胚へのコルヒチン処理によって誘導したニンポウキンカンの2例のみである。そのため、キンカン属植物における四倍体についての詳細な調査は行われておらず、その形態的特徴に関する報告はほとんどない。

そこで本研究では、ニンポウキンカンの四倍体を獲得するために、珠心胚実生を育成し、根の形態による同質四倍体の選抜を試みた。また、倍数性育種を進めていく上で必要となる四倍体の基礎的情報を得るために、その形態調査を行い、二倍体との比較を行った。

### 材料および方法

#### 四倍体の選抜

材料には、農林省園芸試験場久留米支場(現:農業・生物系特定産業技術研究機構九州沖縄農業研究センター野菜花き研究部)栽植のニンポウキンカン (*Fortunella crassifolia* Swingle) を用いた。1971年3月にニンポウキンカンの完全種子500粒を播種し、実生を育成した。四倍体の選抜方法は、発芽6か月後の実生を丁寧に掘上げ、細根が明らかに太く、少ないものを選抜した。

#### 倍数性解析

選抜実生の倍数性の解析は、フローサイトメーター (EPICS XL SYSTEM II, BECKMAN COULTER) による方法と酵素解離法による染色体観察を行った。フローサイトメーターによる解析は、春崎ら (2000) の方法に従い、試料として幼葉を用いた。採取した試料50 mgに2 ml核単離溶液 (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核単離溶液と混合し、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、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選抜実生の幼葉の染色体数を調査した。すなわち、幼葉の先端0.5 cmを採取し、2 mM 8-ヒドロキシキノリンで10°C、10時間前処理後、固定液 (エタノール:酢酸 = 3:1) で10°C、12時間固定した。固定後、幼葉を蒸留水で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 (協和化成) および200 mM EDTAを含む酵素液を用い、37°C、50分間解離した。解離後、スライドガラス上で幼葉の細胞を展開し、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。

#### 発生起源の解析

選抜実生の発生起源を推測するために、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選抜個体の幼葉を用いた。それぞれの幼葉100 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、10 merのランダムプライマー (Operon) 40種類 (OPA-1~20, OPC-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 Taq DNA polymerase および10 ng DNAとした。DNAの増幅には、PCR Thermal Cycler MP TP-3000 (TaKaRa) を使用し、前処理94°C・30秒間、熱変性94°C・30秒間、アニーリング37°C・2分間、伸長反応72°C・3分間で35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1.5%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。

#### 形態的特徴

材料には、14号ポットに栽植した接ぎ木7年生の選抜系統を用い、接ぎ木5年生のニンポウキンカンを対照区とした。葉、花および果実について形態調査を行った。すなわち、葉は、葉身長、葉幅、葉形指数、翼葉長、翼葉幅、単位面積あたりの葉重および気孔の縦径と横径の8項目、花は、全幅、花弁数、花弁の縦径と横径、雌ずい数、雌ずい長、子房の縦径と横径、雄ずい数、染色と発芽による花粉粘性および花粉粒径の12項目、果実は、果実重、果実の横径と縦径、果形指数、室数、果皮の厚さと割合、完全種子数および果皮と果肉の糖度の10項目について調査し、それぞれ10反復ずつ行い、花と果実の調査は1番花のものを用いた。また、花粉粘性は、1%アセトカーミンによる染色と寒天培地上での発芽試験により評価した。発芽試験は、10%スクロースと1%寒天を添加した寒天培地を用い、25°C、10時間培養、暗黒の条件下で評価した。それぞれ3反復行い、1反復あたり500個以上の花粉を調査した。

### 結果および考察

ニンポウキンカンの完全種子500粒から、457本の実生が得られた。それらの実生について、細根が他の実生よりも明らかに太くて短い形態を示すものを2個体選抜した (第1図)。これらは根の形態以外に節間が短く、葉が厚くて濃緑色の形態を示した。両系統とも初期成長が劣り、1個体は育成過程で枯死した。

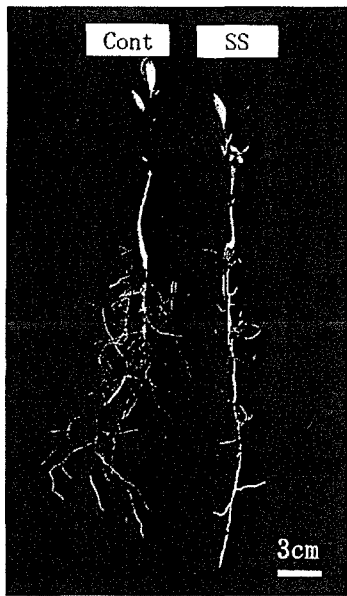
次に、選抜系統の倍数性をフローサイトメーターで解析した結果 (第2-A図)、相対蛍光強度が四倍性を示し

た。また、幼葉の染色体数を観察したところ(第2-B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た。さらに、選抜系統の発生起源を解析するためにRAPD分析を行った結果(第3図)、選抜個体のバンドパターンはニンポ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。

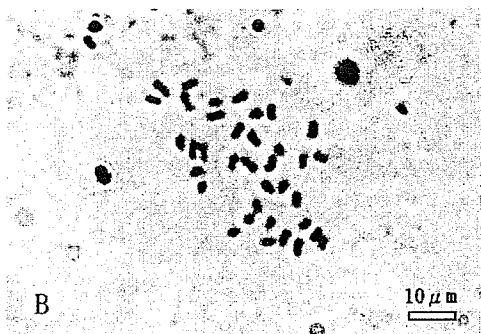
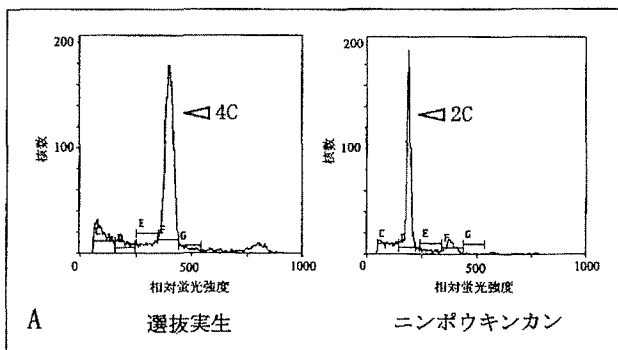
カンキツ類では、これまで多くの研究で珠心胚から偶発

的に出現する同質四倍体について報告されている(Frost, 1925; Luss, 1935; Lapin, 1937; 古里, 1952)。四倍体の選抜方法は、葉形指数や葉の厚さ、気孔の大きさや数など葉の形態的特徴、トゲの発生度合い、成長の程度などが主な指標とされてきた(Barrett・Hutchison, 1978; Lee, 1988; 生山, 1992)。一方、根の形態的特徴を利用した四倍体の選抜はこれまで報告されていない。カンキツ類における四倍体の根の形態は、二倍体と比較して、細根が粗大で短く、その発生数が少なく、さらに、根の成長が劣っていることが報告されている(岩崎・西浦, 1963; Barrett・Hutchison, 1978; Lee, 1988)。本研究では、根の形態を選抜指標として四倍体の選抜を行ったところ、効率は低いものの、1個体の同質四倍体を獲得することができた。

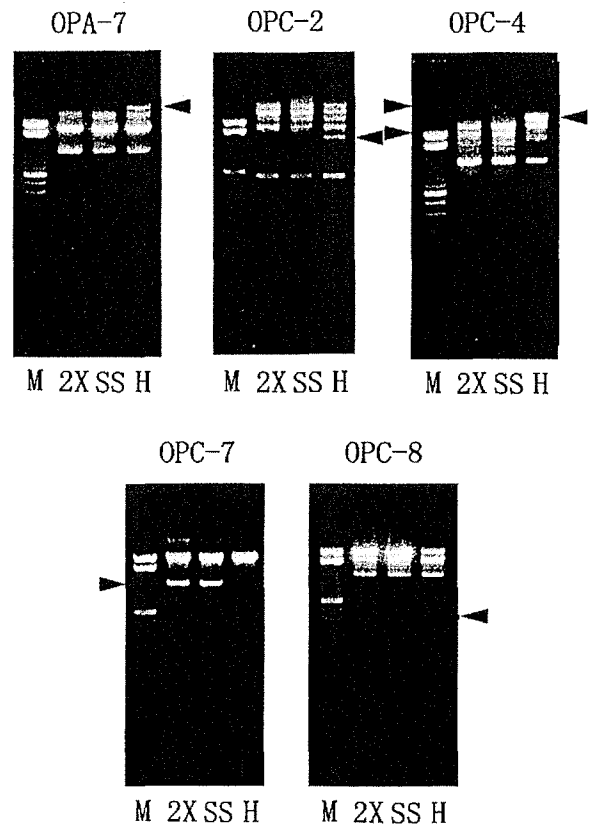
珠心胚実生から偶発的に出現する四倍体の出現頻度についてはいくつかの報告がある。Lapin(1937)はいくつかのカンキツ属植物とカラタチの実生について四倍体の出現頻度を調査したところ、カンキツ属植物では最も高いもので5.6%、カラタチでは3.7%の頻度で四倍体が出現したことを報告している。また、古里(1952)は、ウンシュウミカン、ナツダイダイおよびダイダイにおける四倍体の出現頻度がそれぞれ0.4、0.2および0.1%であったことを報告している。本研究では、ニンポウキンカン



第1図 ニンポウキンカンから得られた実生の根の形態比較  
Cont: 対照, SS: 選抜実生



第2図 フローサイトメーターと染色体観察による選抜実生の倍  
数生解析  
A: フローサイトメーターによる倍數性解析  
B: 染色体観察 (2n=4X=36)



第3図 RAPD分析による選抜実生の発生起源の解析  
M: 100b ラダーマーカー, 2X: ニンポウキンカン, SS: 選  
抜実生, H: 有性胚由来の実生  
図中の矢印は各個体に特異的なバンドを示す

第1表 ニンポウキンカンの二倍体と四倍体における葉の形態的特徴

| 系統  | 葉身長<br>(mm)      | 葉幅<br>(mm) | 葉形指数 <sup>1)</sup> | 翼葉長<br>(mm) | 翼葉幅<br>(mm) | 葉重<br>(mg/cm <sup>2</sup> ) | 気孔長 (μm) |       |
|-----|------------------|------------|--------------------|-------------|-------------|-----------------------------|----------|-------|
|     |                  |            |                    |             |             |                             | 縦径       | 横径    |
| 四倍体 | 68.6             | 36.4       | 1.9                | 4.2         | 2.7         | 37.9                        | 28.9a    | 23.1a |
| 二倍体 | 70.8             | 30.4       | 2.3                | 7.7         | 3.9         | 31.1                        | 23.0b    | 19.3b |
|     | NS <sup>2)</sup> | **         | *                  | **          | **          | *                           | **       | **    |

<sup>1)</sup>NS: 有意差なし, \*, \*\*: t検定によりそれぞれ5%と1%水準で有意差があることを示す

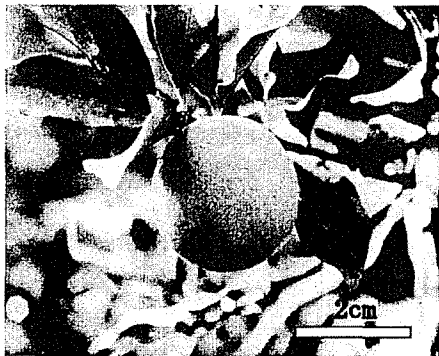
<sup>2)</sup>葉身長/葉幅

第2表 ニンポウキンカンの二倍体と四倍体における花と花粉の形態的特徴

| 系統名 | 花の全幅<br>(mm)     | 花卉数 | 花卉長 (mm) |     | 雌ずい数 | 雌ずい長<br>(mm) | 子房長 (mm) |     | 雌ずい数 | 花粉稔性 (%) |      | 花粉粒径<br>(μm) <sup>3)</sup> |
|-----|------------------|-----|----------|-----|------|--------------|----------|-----|------|----------|------|----------------------------|
|     |                  |     | 縦径       | 横径  |      |              | 縦径       | 横径  |      | 染色       | 発芽   |                            |
| 四倍体 | 24.1             | 5.2 | 11.6     | 5.0 | 1.0  | 5.2          | 2.8      | 2.1 | 15.4 | 67.9     | 7.4  | 36.5                       |
| 二倍体 | 16.6             | 5.2 | 8.8      | 3.7 | 1.0  | 4.2          | 1.9      | 1.6 | 17.8 | 95.0     | 33.9 | 28.6                       |
|     | ** <sup>2)</sup> | NS  | *        | *   | NS   | NS           | *        | NS  | NS   | **       | *    | **                         |

<sup>1)</sup>NS: 有意差なし, \*, \*\*: t検定によりそれぞれ5%と1%水準で有意差があることを示す

<sup>3)</sup>酢酸カーミンによって染色された花粉



第4図 ニンポウキンカン四倍体の果実の形態

から得られた実生 457 個体から 1 個体の四倍体を獲得することができ、その出現頻度は 0.2% であり、古里 (1952) の報告と同程度の出現頻度であった。本研究では、ニンポウキンカンにおいても低頻度ではあるが、珠心胚から四倍体が偶発的に出現することを明らかにすることができた。

次に、四倍体と二倍体の葉の形態を比較した結果 (第 1 表)、四倍体の葉身長は、二倍体と比較して差はほとんど認められなかったが、葉幅は有意に大きくなり、葉形指数より、四倍体の葉は二倍体と比較して、丸くなっていた。単位面積あたりの葉重は、二倍体が 31.1 mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、四倍体は 37.9 mg/cm<sup>2</sup> であり、二倍体と比較し、四倍体の葉は有意に重く、すなわち厚くなっていた。四倍体の気孔の大きさは、縦径、横径ともに二倍体と比較して有意に大きかった。次に花の形態を調査した結果 (第 2 表)、完全に開花したときの大きさを表す全幅では、二倍体が 16.6 mm であったのに対し、四倍体が 24.1 mm であり、四倍体の花は二倍体と比べ有意に大きかった。花卉と子房の縦径も二倍体と比べ、有意に大きかった。しかしながら、花卉数、雌ずい数および雄ず

い数については二倍体と四倍体間で差は認められなかった。花粉稔性は、二倍体の染色および発芽稔性がそれぞれ 95.0% と 33.9% であったのに対し、四倍体はそれぞれ 67.9% と 7.4% であり、有意に減少した。また、アセトカーミンによる染色後の二倍体と四倍体の花粉の大きさを比較したところ、二倍体と四倍体はそれぞれ 28.6 μm と 36.5 μm であり、四倍体の方が有意に大きかった。これまでにカンキツ属植物とカラタチにおける四倍体植物の葉と花の形態的特徴についていくつか報告されている (岩崎・西浦, 1963; Lee, 1988; 生山, 1992)。生山 (1992) は、ヒュウガナツ、ハッサクおよびクレメンティンの四倍体の葉と花における形態的特徴として、二倍体と比べ、葉が厚くなること、丸みを帯びること、花卉や子房、花粉が大きくなることおよび花粉稔性が低下することなどを述べている。本研究でも、ニンポウキンカンの四倍体には同様の特徴が示された。

最後に、四倍体の果実の形態を調査した (第 4 図、第 3 表)。果実の重さや大きさでは二倍体と四倍体間で有意な差は認められなかった。しかしながら、四倍体の果形指数 (横径/縦径×100) は 97.9、二倍体は 91.1 であり、四倍体の果実は二倍体より丸くなっていた。キンカンの可食部であるアルベドとフラベドからなる果皮の厚さにおいて、四倍体のそれは二倍体と比べ有意に厚くなり、果皮の厚さは果実半径の約 50% を占めていた。1 果実あたりの完全種子数は、二倍体が 5 個であったのに対し、四倍体は 2.3 個であり、有意に減少していた。また、四倍体の果皮と果肉の糖度は、二倍体と比べ有意な差は認められず、同等の形質を示した。これまで、カンキツ類の四倍体、特に細胞融合により育成された異質四倍体の果実形質については、いくつかの報告がある (Lee, 1988; Ohgawaraら, 1991; Kobayashiら, 1995)。Kobayashiら

第3表 ニンポウキンカンの二倍体と四倍体における果実の形態的特徴<sup>2</sup>

| 倍数性 | 果実重<br>(g)      | 果実の大きさ (mm) |      | 果形指数 <sup>3</sup> | 室数  | 果皮の厚さ<br>(mm) | 果皮の割合<br>(%) <sup>4</sup> | 1果実あたり<br>の完全種子数 | 糖度 (Brix) |      |
|-----|-----------------|-------------|------|-------------------|-----|---------------|---------------------------|------------------|-----------|------|
|     |                 | 横径          | 縦径   |                   |     |               |                           |                  | 果肉        | 果皮   |
| 四倍体 | 13.6            | 28.6        | 29.2 | 97.9              | 6.0 | 6.8           | 47.6                      | 2.3              | 12.0      | 15.1 |
| 二倍体 | 14.7            | 28.6        | 31.4 | 91.1              | 6.0 | 4.3           | 30.1                      | 5.0              | 11.4      | 15.0 |
|     | NS <sup>1</sup> | NS          | NS   | **                | NS  | **            | **                        | *                | NS        | NS   |

<sup>2</sup> 2003年1月25日に収穫した果実を供試

<sup>1</sup> NS: 有意差なし, \*, \*\*: t検定によりそれぞれ5%と1%水準で有意差があることを示す

<sup>3</sup> (横径/縦径) × 100

<sup>4</sup> (果皮の厚さ/果実の半径) × 100

(1995)は、体細胞雑種4品種における果実の形態的特徴について調査したところ、二倍体の融合親と比較して果皮が厚くなっていたことを報告している。本研究で得られたニンポウキンカンの四倍体は、これまで報告されている異質四倍体と同様に果皮が厚くなっていた。カンキツ属植物とは異なり、キンカン属植物の主な可食部は果皮であるため、果皮が厚くなることは可食部が増加することであり、このような形質になることは逆に望ましい。本研究で得られたニンポウキンカンの四倍体は、二倍体と比較して、ほとんどの果実品質は同等であり、果皮が厚く、1果実あたりの種子数が減少していたことから、直接的に栽培品種として用いることが可能であると考えられる。今後、露地や近年増加しつつある施設などでの本格的な栽培試験を行い、四倍体の経済栽培について検討する必要があると考えられる。

前述したように一般的にカンキツ類の四倍体は、経済栽培品種としてではなく、三倍体育種のための育種母本としての利用が提唱されている (Soost・Cameron, 1980; 1985)。実際に本研究で得られた四倍体ニンポウキンカン花粉親として用い、ナガキンカンとの交雑によって、三倍体キンカン品種‘ぶちまる’が育成されている (吉田ら, 2003)。「ぶちまる」は片親が観賞樹として用いられているナガキンカンであるにもかかわらず、ニンポウキンカンより良好な果実品質を示すことが報告されている。今後、より優れたキンカン品種の育成のためには、本研究で得られたニンポウキンカンの四倍体と二倍体間で交雑を行い、三倍体のニンポウキンカンを獲得する必要があると考えられる。このように、本研究で得られたニンポウキンカンの四倍体は我が国のキンカン産業に大きく貢献するものと期待される。

### 摘 要

実生の根の形態を指標としてニンポウキンカンの珠心胚実生から四倍体を選抜し、その形態調査を行った。

ニンポウキンカンの完全種子を播種して得られた457本の実生から、太くて短い細根を有する1個体を見出した。この実生の倍数性を調査した結果、36本の染色体を有しており、四倍体であることが明らかとなった。また、RAPD分析により、この四倍体はニンポウキンカンの珠

心胚由来であることが推察された。この四倍体の形態について調査したところ、二倍体と比べ、葉は丸くて厚く、気孔、花および花粉は大きくなっており、四倍体特有の形態を示した。四倍体の果実は、果実の重さや大きさにおいて二倍体と同等の形質を示した。さらに、可食部である果皮が厚くなり、完全種子数が少なくなっていた。将来、本研究で得られたニンポウキンカンの四倍体は直接的な品種としての利用や三倍体育種の親として重要な素材となるであろう。

### 引用文献

- Barrett, H. C. and D. J. Hutchison. 1978. Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of citrus. *Econo. Bot.* 32: 27-45.
- 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.
- 岩崎藤助・西浦昌男. 1963. 4倍体, 大葉系および小葉系カラタチについて(第2報)実生の発育と台木としての価値. *園試報.* B2: 15-24.
- 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.
- Kobayashi, S., T. Ohgawara, W. Saito, Y. Nakamura and J. Shimizu. 1995. Fruit characteristics and pollen fertility of citrus somatic hybrids. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64: 283-289.
- Lapin, W. K. 1937. Investigations on polyploidy in Citrus. U.

- S. S. R. All-union Sci. Res. Int. Humid Subtropics Works. 1: 1-68.
- Lee, L. 1988. Citrus polyploidy-Origins and potential for cultivar improvement. Aust. J. Agric. Res. 39: 735-747.
- Longley, A. E. 1925. Polycary, polyspory and polyploidy in citrus and citrus relatives. J. Wash. Acad. Sci. 15: 347-351.
- Luss, A. I. 1935. Citrus introduction and selection in the U. S. S. R. Sovetsk, Subtrop. 11: 17-27.
- 根角博久・中野睦子・吉田俊雄. 1998. カンキツのフラベドおよび果汁に含まれる $\beta$ -クリプトキサンチン含量の品種間差異. 園学雑. 66(別1): 108-109.
- Ohgawara, T., S. Kobayashi, S. Ishii, K. Yoshinaga and I. Oiyama. 1991. Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization: navel orange (*Citrus sinensis*) and Troyer citrange (*C. sinensis*  $\times$  *Poncirus trifoliata*). Theor. Appl. Genet. 81: 141-143.
- 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: 13-20.
- 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.
- 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.
- 八幡昌紀・岡 信孝・國武久登・山口清二・小松春喜. 2003. '晩白柚'と四倍体の正逆交雑から得られた種子の重さと倍数性との関係. 園学研. 2: 247-252.
- 八幡昌紀・柏原夕希子・黒木宏憲・國武久登・小松春喜. 2004. ニンボ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. 園学研. 3: 11-16.
- 吉田俊雄・根角博久・吉岡照高・家城洋之・伊藤祐司・中野睦子・上野 勇・山田彬雄・村瀬昭治・瀧下文孝. 2003. キンカン新品種'ぶちまる'. 果樹研報. 2: 9-16.