

ニンポウキンカン ‘勇紅’ の倍数性周縁キメラの証明とその形態的特性

安田喜一¹・國武久登^{1*}・中川匠子¹・黒木宏憲¹・八幡昌紀²・
平田力也³・吉倉幸博³・川上郁夫³・杉本安寛¹

¹宮崎大学農学部 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

²静岡大学農学部附属地域フィールド科学教育研究センター 426-0001 静岡県藤枝市仮宿 63

³宮崎県総合農業試験場 880-1212 宮崎県佐土原町下那珂字峯前 5851

The Confirmation of Ploidy Periclinal Chimera and its Morphological Characteristics in Meiwa Kumquat ‘Yubeni’

Kiichi Yasuda¹, Hisato Kunitake^{1*}, Syoko Nakagawa¹, Hironori Kurogi¹, Masaki Yahata²,
Rikiya Hirata³, Yukihiko Yoshikura³, Ikuo Kawakami³ and Yasuhiro Sugimoto¹

¹Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki 889-2192

²Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Center for Education and Research of Field Sciences, 63 Kariyado, Fujieda-shi, Shizuoka 426-0001

³Miyazaki Agricultural Experiment Station, Sadowara, Miyazaki-gun, Miyazaki 880-0212

Abstract

The cultivar ‘Yubeni’ was discovered as a mutant of Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) in Kushima city, Miyazaki. According to the results of flow cytometry analysis and morphological investigation of several tissues and organs, ‘Yubeni’ was supposed to be a ploidy periclinal chimera with diploid ($2n = 2X = 18$) in the outermost layer (histogenic layer L-I) and tetraploid ($2n = 4X = 36$) inner layer (histogenic layer L-II and L-III) in the shoot apical meristem. Compared with the diploid line, it showed similar morphology to the tetraploid line such as larger leaves, flowers and pollen grains. The weight and size of the fruit were both greater than those of the diploid line. Furthermore, this cultivar has desirable traits for kumquat such as smaller number of developed seed and thicker pericarp.

Key Words : bud mutation, chromosome observation, flow cytometry, histogenic layer, polyploidy breeding

キーワード : 倍数性育種, 芽条変異, フローサイトメトリー, 染色体観察, 組織起源層

緒言

植物の茎頂分裂組織は3つの組織起源層からなる。これは、茎頂分裂組織の組織起源層が外衣である第I層 (L-I) と第II層 (L-II) および内体である第III層 (L-III) で構成されるという外衣内体説として知られている (Schmidts, 1924)。このような植物の組織学的研究は、様々なキメラの各組織と器官を解析することで発展した。倍数体の育成にコルヒチンが利用されるようになり、チョウセンアサガオ (Satina ら, 1940), ツルコケモモ (Derman, 1947), リンゴ (Derman, 1953a) およびモモ (Derman, 1953b) の倍数性細胞キメラが作出され、それらの茎頂分裂組織の組織起源層と各器官の組織分化との関係が明らかにされた。

近年、フローサイトメーターが植物の倍数性解析に広く利用されてきており (Arumuganathan・Earle, 1991; Costich ら, 1993; Tosca ら, 1995), カンキツ類の育種においては、三倍体の選抜 (徳永ら, 2005; 八幡ら, 2003), 染色体倍加



第1図 ニンポウキンカン変異体 ‘勇紅’ の原木 (Bar = 10 cm)

2006年10月25日 受付. 2007年10月9日 受理.

本研究は科学研究補助金 (基盤研究C 課題番号17580031) と宮崎県地域結集型共同事業により行った。また、本研究の一部は園芸学会平成17年度秋季大会で発表した。

* Corresponding author. E-mail: hkuni@cc.miyazaki-u.ac.jp

の確認 (Wu・Mooney, 2002; Yahata ら, 2005b; Zeng ら, 2006) および体細胞雑種の選抜 (Kunitake ら, 2002; Miranda ら, 1997; Takami ら, 2005) などに応用されている。これによって三倍体や四倍体等の正倍数体の選抜が容易になり、その実用化の可能性が高まったものと思われる。

1997年、宮崎県串間市の金丸勇氏圃場において、果実が大きく、葉が厚いなどの特徴を示し、倍数性変異の可能性のあるニンポウキンカンの変異体が、一樹変異として発見され (第1図)、その特性が安定していることが確認され、‘勇紅’として品種登録された (金丸, 2006)。そこで本研究では、フローサイトメーターによる‘勇紅’の倍数性解析を行うとともに形態的特性を調査した。

材料および方法

植物材料

材料には、宮崎県総合農業試験場より譲渡され、宮崎大学圃場において14号ポットに植栽されている‘勇紅’ (接ぎ木10年生)、ニンポウキンカン (接ぎ木約10年生、以下は二倍体) および河瀬ら (2005) が育成したニンポウキンカンの同質四倍体 (接ぎ木約10年生、以下は四倍体) を供試した。

染色体観察

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‘勇紅’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時間浸漬し前処理した後、固定液 (エタノール : 酢酸 = 3 : 1) に10°C、12時間浸漬した。次に、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 (和光純薬工業)、0.3%ペクトリアーゼ Y-23 (協和化成) および200 mM EDTA を含む酵素液で解離 (37°C, 50分間)、その後、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。

フローサイトメトリー分析

‘勇紅’の葉、花および果実の各組織・器官における倍数性の解析は、フローサイトメーター (EPICS XL SYSTEM II, BECKMAN COULTER) により行った。フローサイトメーターによる解析は、Yahata ら (2005a) の方法に従い、試料として成葉、中肋、花弁、花糸、花柱、子房、砂じょう、珠心胚、珠心胚実生 (100個体)、アルベドおよびフラベドを用いた。採取した試料50 mgに2 mL核単離溶液 [25 mg・L⁻¹ propidium iodide (PI), 50 mM Na₂SO₃, 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・L⁻¹ 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。なお、珠心胚実生は、3.0%スクロース、0.5 g・L⁻¹ 麦芽抽出物および2.0 g・L⁻¹ ジェランガムを添加したMT培地 (Murashige・Tucker, 1969) 上で育成した。

形態的特徴

‘勇紅’、二倍体および四倍体における葉、花、花粉および果実の形態調査を行った。すなわち、葉は、葉身長、葉幅、単位面積あたりの葉重および気孔の縦径と横径の5項目、花は、花蕾の縦径と横径、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、雄ずい数の10項目、花粉は、乾燥花粉の縦径と横径、花粉稔性および発芽率の4項目、果実は、果実重、果実の直径と高さ、果皮の厚さ、室数、完全種子数および果皮と砂じょうの可溶性固形物含量の8項目について、それぞれ10試料ずつ調査した。

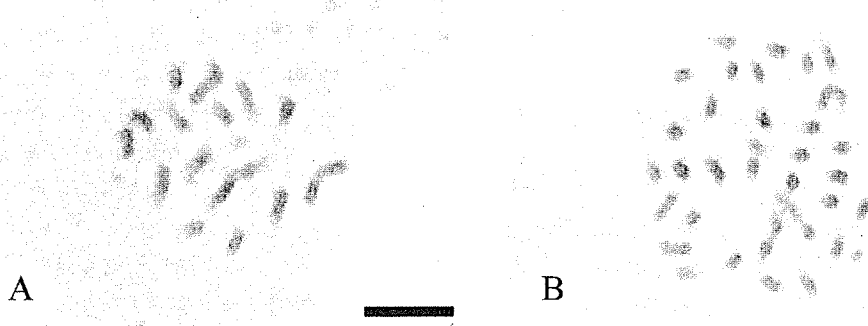
葉の調査は成熟した秋枝のもの、花と果実の調査は一番花のものを用いた。また、果実は一月下旬に成熟したものをを用いた。花粉稔性と発芽率は、それぞれ1%アセトカーミンによる染色と寒天培地上での発芽試験により評価した。発芽試験は、10%スクロースと1%寒天を添加した寒天培地を用い、25°C、10時間、暗黒条件下で行った。花粉稔性と発芽率の調査には1反復あたり503~511個の花粉を供し、5反復した。また、アセトカーミンで染色された稔性花粉100個の大きさを測定し、大きさ別の出現頻度を調査した。

結果および考察

‘勇紅’の幼葉の染色体数を調査した結果 (第2図)、1試料内に18本と36本の染色体数を有する細胞が確認され、二倍体と四倍体の倍数性細胞キメラであることが明らかとなった。

‘勇紅’におけるそれぞれの組織と器官の倍数性をフローサイトメーターで解析した結果 (第3図)、相対蛍光強度は成葉、花弁、花糸、花柱、子房およびフラベドでは二倍性と四倍性、砂じょうでは二倍性、そして中肋、珠心胚およびアルベドでは四倍性を示した。なお、‘勇紅’の種子から得られた珠心胚実生の倍数性は、100個体すべて四倍体であった。

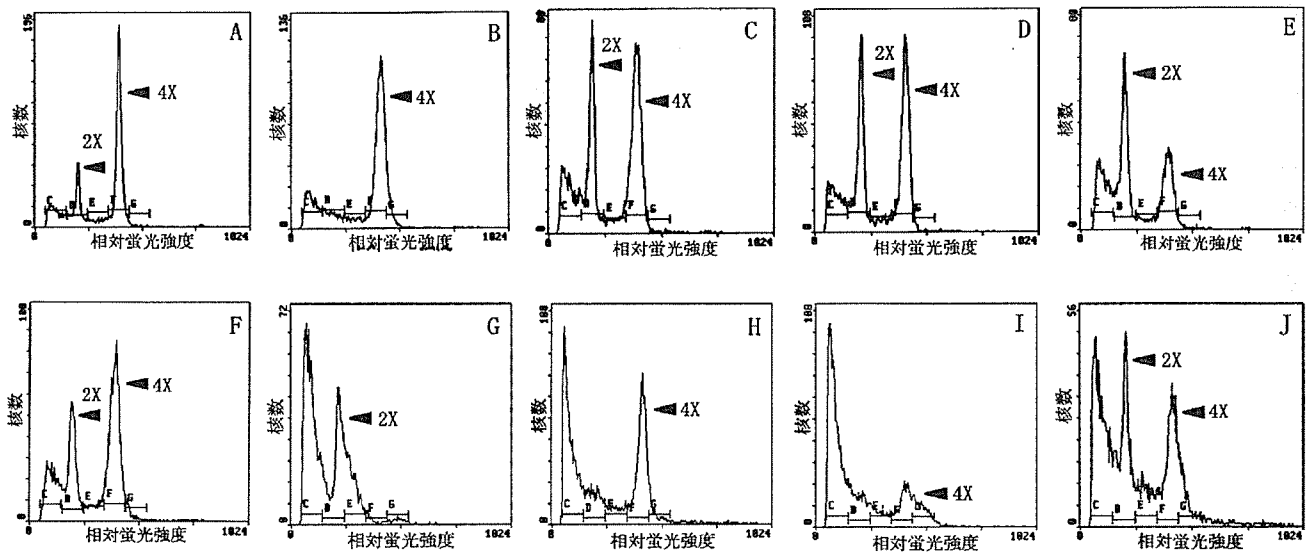
春崎ら (2000) は、ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marcow.) の茎、根、子葉、フラベド、アルベド、じょうのうおよび砂じょうにおいてフローサイトメトリー分析を行い、葉以外の各組織と器官においても倍数性解析が可能であることを報告した。本研究のフローサイトメトリー分析でも、ほとんどの組織と器官において明確な相対蛍光強度を示し、各組織起源層の倍数性を推察するための重要な情報を得ることができた。しかしながら、アルベドにおいては、単離された核の数が少なかったことと組織や細胞の残渣を多く含んだことから、二倍性の存在の有無を明確にすることは



第2図 ‘勇紅’における葉の染色体 (Bars = 10 μm)

A : 2n = 2X = 18

B : 2n = 4X = 36



第3図 ‘勇紅’における葉, 花および果実の各組織と器官のフローサイトメトリー分析

A : 成葉, B : 中肋, C : 花弁, D : 花糸, E : 花柱, F : 子房, G : 砂じょう, H : 珠心胚, I : アルベド, J : フラベド

第1表 二倍体, 四倍体および‘勇紅’における葉の形態的特徴

系統	葉身長 (mm)	葉幅 (mm)	葉形指数 ^γ	葉重 (mg · cm ⁻²)	気孔長 (μm)	
					縦径	横径
二倍体	84.8 b ²	31.7 b	2.7 a	25.2 b	24.6 b	21.1 b
四倍体	89.8 ab	40.9 a	2.2 b	38.5 a	31.1 a	25.3 a
‘勇紅’	91.5 a	43.6 a	2.1 b	35.7 a	24.9 b	20.1 b

²Tukeyの多重検定法により, 異なる英文字間に有意差 (1%) があることを示す (n=10)

^γ葉身長/葉幅

できなかった。今後, このような残渣の除去や核単離の効率の向上が必要であると考えられる。

次に, ‘勇紅’, 二倍体および四倍体の葉の形態を比較した結果 (第1表), ‘勇紅’ と四倍体の葉幅は二倍体より有意に大きく, 二倍体の葉と比較して葉形指数が小さく, 丸くなっていた。単位面積あたりの葉重は, 二倍体が 25.2 mg · cm⁻²であったのに対し, ‘勇紅’ と四倍体はそれぞれ 35.7 mg ·

cm⁻² と 38.5 mg · cm⁻² であり, 二倍体と比べ, 葉は有意に重く, 厚くなっていた。一方, 気孔の大きさは, ‘勇紅’ の縦径, 横径ともに四倍体より有意に小さく, 二倍体とほぼ同じであった。

さらに, 花の形態を調査した結果 (第2表), 花蕾の縦径には有意な差は認められなかったが, 横径は二倍体が 5.8 mm であったのに対し, ‘勇紅’ と四倍体はともに 7.5 mm

第2表 二倍体, 四倍体および‘勇紅’における花の形態的特徴

系統	花蕾の大きさ (mm)		花弁数	花弁の大きさ (mm)		雌ずい数	雌ずい長 (mm)	子房の大きさ (mm)		雄ずい数
	縦径	横径		縦径	横径			縦径	横径	
二倍体	10.1 a ^z	5.8 b	5.0 a	12.2 ab	5.0 b	1.0 a	6.7 a	3.0 a	2.4 b	17.7 a
四倍体	9.7 a	7.5 a	5.0 a	11.4 b	6.5 a	1.0 a	6.4 a	3.1 a	2.8 a	14.8 b
‘勇紅’	10.2 a	7.5 a	5.0 a	12.6 a	6.8 a	1.0 a	6.5 a	3.2 a	2.6 a	17.4 a

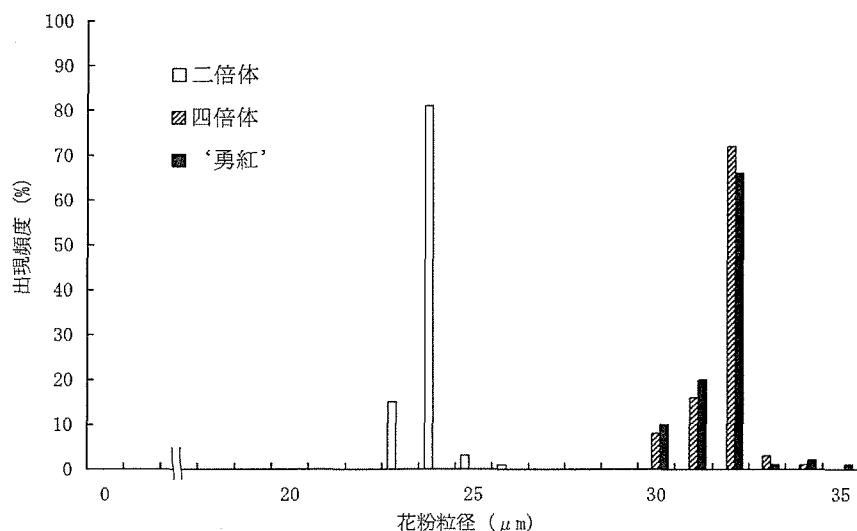
^zTukeyの多重検定法により, 異なる英文字間に有意差 (1%) があることを示す (n = 10)

第3表 二倍体, 四倍体および‘勇紅’における花粉の形態的特徴

系統	乾燥花粉の大きさ (μm)		花粉形指数 ^y	花粉稔性 (%)	発芽率 (%)
	縦径	横径			
二倍体	30.3 b ^z	19.3 b	1.6 a	98.7 a	84.7 a
四倍体	36.2 a	26.4 a	1.4 b	93.0 b	39.8 b
‘勇紅’	36.1 a	24.7 a	1.5 b	92.1 b	34.1 b

^zTukeyの多重検定法により, 異なる英文字間に有意差 (1%) があることを示す (花粉稔性と発芽率は n = 5, その他の項目は n = 10)

^y縦径/横径



第4図 アセトカーミン染色による二倍体, 四倍体および‘勇紅’における稔性花粉の大きさ別出現頻度の比較

であり, 二倍体より有意に大きかった. さらに, 花弁と子房の横径も二倍体と比べ有意に大きかった. 一方, 花粉稔性, 発芽率および花粉の形態について調査した結果 (第3表), 二倍体の花粉稔性が98.7%であったのに対し, ‘勇紅’と四倍体のそれはそれぞれ92.1%と93.0%であり, 有意に低かった. 発芽率でも同様に, 二倍体が84.7%であったのに対し, ‘勇紅’と四倍体のそれは34.1%と39.8%であり, 有意に低かった. 乾燥花粉の大きさは, 二倍体の縦径と横径がそれぞれ30.3 μmと19.3 μmであったのに対し, ‘勇紅’はそれぞれ36.1 μmと24.7 μm, 四倍体はそれぞれ36.2 μmと26.4 μmであり, 二倍体より有意に大きかった. さらに, ‘勇紅’と四倍体の花粉は二倍体より丸みを帯びており, 花粉形指数にも有意な差があった. また, アセトカーミン染色による稔性花粉の大きさ別の出現頻度を調査した結果

(第4図), ‘勇紅’と四倍体の花粉粒径はほぼ等しく, 二倍体より大きかった.

最後に, ‘勇紅’の果実の形態を調査した (第5図, 第4表). その結果, 果実重は二倍体が15.8 g, 四倍体が19.7 gであったのに対し, ‘勇紅’は25.0 gであり有意に重かった. 果実の大きさも, ‘勇紅’は二倍体より有意に大きく, 有意ではないものの四倍体よりも大きかった. 果形指数からみると, ‘勇紅’は二倍体より丸くなっており, 四倍体に近い形質を示した. 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は, ‘勇紅’が二倍体および四倍体と比較して有意に厚くなっており, 果皮が占める割合も最も高かった. 1果実あたりの完全種子数は二倍体が6.6個であったのに対し, ‘勇紅’は4.0個, 四倍体は4.5個であり有意に低かった. また, ‘勇紅’の果皮と砂じょうの可溶

第4表 二倍体, 四倍体および‘勇紅’における果実の形態的特徴

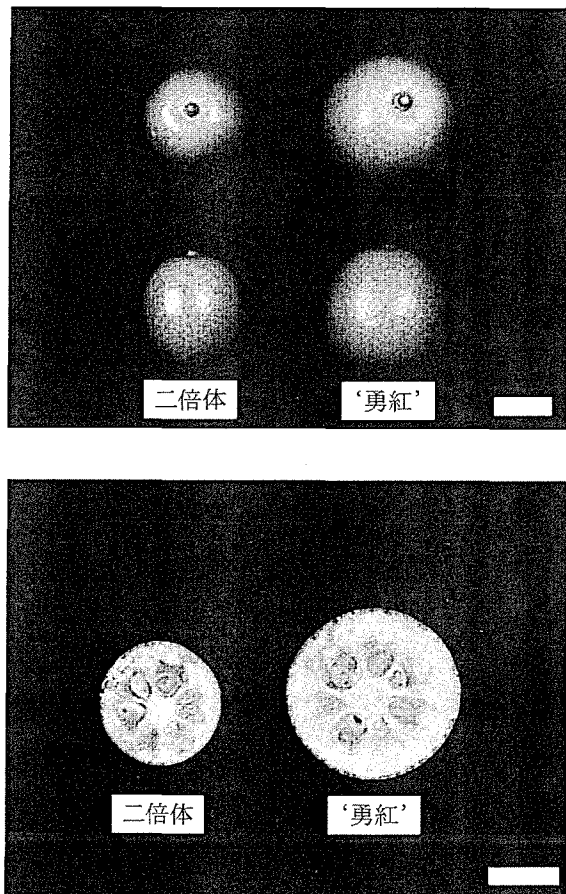
系統	果実重 (g)	果実の大きさ (mm)		果形指数 ^y	果皮の厚さ (mm)	果皮の割合 (%) ^x	室数	1果実あたりの 完全種子数	可溶性固形物含量 (Brix) ^w	
		直径	高さ						果皮	果肉
二倍体	15.8 b ^z	29.0 b	31.5 b	92.1 b	5.0 c	33.7 b	6.2 a	6.6 a	18.4 b	13.8 b
四倍体	19.7 b	33.6 a	35.0 ab	96.1 a	5.9 b	37.2 ab	6.3 a	4.5 b	21.5 a	17.7 a
‘勇紅’	25.0 a	35.1 a	36.9 a	95.1 a	6.7 a	39.3 a	6.5 a	4.0 b	21.6 a	17.5 a

^zTukeyの多重検定法により, 異なる英文字間に有意差 (1%) があることを示す (n=10)

^y(果実の直径/果実の高さ) × 100

^x(果皮の厚さ/果実の半径) × 100

^w屈折糖度計により測定



第5図 二倍体と‘勇紅’における果実の形態比較 (Bars = 1 cm)

性固形物は, 二倍体と比べ有意に高く, 四倍体とほぼ等しかった。

カンキツ類の組織起源層において, 第I層からは表皮系, 第II層からは表皮系以外の葉の大部分, 花粉, 珠心, 胚のうちおよび茎の皮層, 第III層からは茎の形成層とずいが分化するとされている (Frost・Krug, 1942)。このカンキツにおける組織分化の基礎的知見に基づいて, 最近の研究報告および本研究の結果から‘勇紅’の各組織起源層の倍数性を推察した。表皮系に分化する第I層は, 砂じょうが二倍性を示したことでと気孔の大きさが二倍体と類似したことから, 二倍体であると考えられた。Yamashita (1983) は, コ

パヤシミカン [ナツダイダイ (*C. natsudaidai* Hayata) + ウンシュウミカン (*C. unshiu* Marcow.)] における各組織と器官のアイソザイム分析を行い, 砂じょうのパーオキシダーゼアイソザイムパターンがウンシュウミカンのそれと類似したため, 第I層がウンシュウミカン因子であることを推察している。また, 気孔の大きさは倍数性変異を確認する指標として用いられている (生山, 1992; Tamura, 1996)。生殖器官に分化する第II層は, 珠心胚と珠心胚実生が四倍性を示したことで, 花粉の大きさ, 稔性および発芽率が四倍体に類似したことから, 四倍体であると考えられた。Sugawaraら (2002) は, 4つの系統の合成周縁キメラを用いた各組織と器官のRAPD分析を行い, 珠心胚のバンドパターンが果肉のバンドパターンと類似したことを報告しており, 本研究の結果と同様であった。形成層とずいに分化する第III層は, 中肋が四倍性を示したことから, 四倍体であると考えられた。これらのことから, ‘勇紅’は, 第I層—第II層—第III層が二倍体—四倍体—四倍体の組織起源層を有する倍数性周縁キメラであることが推察された。近年, 砂じょうの組織分化に関しては, 新たな知見が報告されている。Sugawaraら (2002) は, 砂じょうが第I層のみではなく, 第I層より内側の組織起源層, 少なくとも第II層から分化した細胞を含むことを証明している。しかしながら, 本研究のフローサイトメーター分析では, 砂じょうに四倍性の細胞がほとんど確認できなかった。このことから, ‘勇紅’における砂じょうの起源は, 第I層が中心であると考えられた。

次に, ‘勇紅’における形態的特性を評価したところ, ‘勇紅’の葉, 花および果実の大部分は, 二倍体より四倍体に類似していた。これは, 表皮系へ分化する第I層が二倍体であるにも関わらず, それ以外の組織や器官形成に参与している第II層と第III層がともに四倍体であったことが, 強く影響していると考えられる。特に果実特性に関しては, 四倍体より同等もしくは大きく, 果皮の割合は二倍体より有意に高かった。Cameron・Frost (1968) は, カンキツにおける四倍体の特徴として, 果皮が厚くなることと油胞が大きくなることを報告している。一般的に果皮を剥くカンキツにとって, これは望ましくない形質である。しかし, 主な可食部を果皮とするキンカンにとってはその特徴は望

ましい形質である。このように、第II層と第III層が四倍体に変異した倍数性周縁キメラ化は、1果実あたりの完全種子数を減少させ、果皮を厚くしたことから、ニンポウキンカンの果実特性を向上させたと言える。

以上の結果から、各組織と器官における倍数性の解析により、宮崎県串間市で発見されたニンポウキンカンの突然変異体‘勇紅’は、第I層—第II層—第III層が二倍体—四倍体—四倍体の組織起源層を有する倍数性周縁キメラであると推察された。また、その果実特性は、キンカンとして優れたものであることが明らかとなった。

摘 要

宮崎県串間市でニンポウキンカンの変異体として発見された登録品種‘勇紅’（登録番号第14416号）について、倍数性解析ならびに形態的特性について検討した。‘勇紅’の倍数性を調査した結果、18本と36本の染色体を有しており、二倍体と四倍体の倍数性細胞キメラであることが確認された。また、フローサイトメーターによる解析と形態的特性から、‘勇紅’は組織起源層の第I層が二倍体、第II層と第III層が四倍体である倍数性周縁キメラであることが推察された。‘勇紅’は二倍体と比較して丸く、厚い葉をもち、花および花粉は四倍体と同程度に大きく、果実は四倍体より大きかった。さらに、それらの果実特性に加え、‘勇紅’は種子が少なく、厚皮であり、キンカンにとって望ましい形質を有していた。

引用文献

- Arumuganathan, K. and E. D. Earle. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 229–233.
- Cameron, J. W. and H. B. Frost. 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. p. 325–370. In: W. Reuther, L. D. Batchelor and H. J. Webber (eds), *The Citrus industry*, vol. II, University of California, Division of Agricultural Sciences, California.
- Costich, D. E., R. Ortiz, T. R. Meagher, L. P. Bruederle and N. Vorsa. 1993. Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blue berry by flow cytometry. *Theor. Appl. Genet.* 86: 1001–1006.
- Derman, H. 1947. Periclinal cytochimeras and histogenesis in cranberry. *Amer. J. Bot.* 34: 32–43.
- Derman, H. 1953a. Pattern of tetraploidy in the flower and fruit of a cytochimeral apple. *J. Hered.* 44: 30–39.
- Derman, H. 1953b. Periclinal cytochimeras and origin of tissues in stem and leaf of peach. *Amer. J. Bot.* 40: 154–168.
- Frost, H. B. and C. A. Krug. 1942. Diploid-tetraploid periclinal chimeras as bud-variants in citrus. *Genetics* 27: 619–634.
- Fukui, K. 1996. Plant chromosome at mitosis. p. 1–17. In: K. Fukui and S. Nakayama (eds.), *Plant Chromosome. Laboratory Methods*. CRC Press, Florida.
- 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.
- 金丸 勇. 2006. 勇紅. 品種登録 14416.
- 河瀬憲次・八幡昌紀・中川匠子・原口加奈・國武久登. 2005. 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. *園学研*. 4: 141–146.
- Kunitake, H., K. Nagasawa, K. Takami and H. Komatsu. 2002. Molecular and cytogenetic characterization of triploid somatic hybrids between ‘Shogun’ mandarin and grapefruit. *Plant Biotech.* 19: 345–352.
- Miranda, M., T. Motomura, F. Ikeda, T. Ohgawara, W. Saito, T. Endo, M. Omura and T. Moriguchi. 1997. Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. *Plant Cell Rep.* 16: 401–405.
- 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.
- 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: 1–68.
- Satina, S., A. F. Blakeslee and A. G. Avery. 1940. Demonstration of the three germ layer in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Amer. J. Bot.* 27: 895–905.
- Schmidt, A. 1924. Histologische studien an phanerogamen vegetationspunkten. *Bot. Arch.* 8: 345–404.
- Sugawara, K., T. Wakizuka, A. Oowada, T. Moriguchi and M. Omura. 2002. Histogenic identification by RAPD analysis of leaves and fruit of newly synthesized chimeric *Citrus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 104–107.
- Takami, K., A. Matsumaru, M. Yahata, H. Kunitake and H. Komatsu. 2005. Utilization of intergeneric somatic hybrids as an index discriminating taxa in the genus *Citrus* and its related species. *Sex. Plant Reprod.* 18: 21–28.
- Tamura, M., R. Tao and A. Sugiura. 1996. Production of dodecaploid plants of Japanese persimmon (*Dyospyros kaki* L.) by colchicine treatment of protoplasts. *Plant Cell Rep.* 15: 470–473.
- 徳永忠士・新居美香・津村哲宏・山尾正実. 2005. スダチにおける四倍体と二倍体との交雑による三倍体雑種の作出および無核品種‘徳島 3X1号’の育成. *園学研*. 4: 11–15.
- Tosca, A., R. Pandolfi, S. Citterio, A. Fasoli and S. Sgorbati. 1995. Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic

- haploid of Gerbera. Plant Cell Rep. 14: 455–458.
- Wu, J. and P. Mooney. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 70: 99–104.
- 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.
- Yahata, M., S. Harusaki, H. Komatsu, K. Takami, H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita and P. Toolapong. 2005a. Morphological characterization and molecular verification of a fertile haploid pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130: 34–40.
- Yahata, M., H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita, Y. Kashiwara and H. Komatsu. 2005b. Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicines treatment of axillary shoot buds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130: 899–903.
- Yamashita, K. 1983. Chimerism of Kobayashi-mikan (*Citrus natsudaidai* × *unshiu*) judged from isozyme patterns in organs and tissues. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 52: 223–230.
- Zeng, S., C. Chen, L. Houng, J. Lin and X. Deng. 2006. In vitro induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 87: 85–93.