‘土佐文旦’ と ‘水晶文旦’ との交雑実生における染色体数の変異

楊 曉伶・北島 宣・別府まゆみ・長谷川耕二郎

高知大学農学部 783-8502 高知県南国市物部

Variation in Chromosome Number of Hybrid Seedlings between ‘Tosa-Buntan’ and ‘Suisho-Buntan’ Pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.)

Xiaoling Yang, Akira Kitajima, Mayumi Befu and Kojiro Hasegawa

Faculty of Agriculture, Kochi University, Kochi 783-8502

Summary

To breed pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.) varieties with a few seeds, a female parent ‘Tosa-Buntan’ and a male parent ‘Suisho-Buntan’ were crossed; the seed weight and the chromosome number of the progenies were determined from 1996 to 1998 inclusive. The weight of full developed seeds peaked between 301mg to 330mg. Those which weighed less than 30mg were considered to be unfertilized ovules. About 20% of partially developed seeds weighed between 31 to 180mg. Embryos rescued from seeds, weighing between 61 and 180mg, germinated better under embryo culture than when sown in plug trays. Hence, embryo culture is an effective means of obtaining seedlings from these poorly developed seeds. Furthermore, about 15% of them were not diploid. Chromosome counts of 128 embryo cultured seedlings derived from seeds weighing between 61 and 180 mg revealed that there were 109 diploids, eight triploids, three tetraploid, and eight aneuploids. The aneuploids had chromosome numbers of $2n = 17, 19$, and 28 .

Key Words: chromosome number, pummelo, seedling, seed weight.

緒 言

‘土佐文旦’は高知県特産のカンキツであるが、1果実あたり70個以上の種子が含まれており、無核あるいは種子の少ない品種の育成が望まれている。無核品種の育成には三倍体の作出が有効なことが知られ、カンキツでは四倍体×二倍体の交雑で多くの三倍体が出現することが認められている(Esen・Soost, 1972a; 1973; Esenら, 1978)。また、二倍体×四倍体の交雑でも三倍体を得られている(Oiyama・Kobayashi, 1990; Oiyamaら, 1991; 金好ら, 1997)。しかし、四倍体のカンキツ品種は少なく、育種素材として有効な四倍体の作出が望まれているが、その育成には長い年月を要する。

一方、カンキツでは二倍体間の交雑で得られた小粒種子から三倍体が出現することが認められており(Esen・Soost, 1971; Geraciら, 1975; 岩政・衛藤, 1976; 喜多ら, 1987; 生山・奥代, 1983; Toolapongら, 1996; 春崎ら, 1996)、三倍体品種の育成には小粒種子の利用が有効である。しかし、二倍体間の交雑による三倍体の出現率はカンキツの種類によって大きく異なっており、三倍体が出

現する小粒種子の程度も不明な点が多い。

異数体個体の胚発生に関しては、リングで二倍体に比べて異数体で多くの胚が退化することが認められ(Schneider, 1953)、カンキツでも異数体個体の作出によって種子数の少ない品種が育成される可能性が考えられる。カンキツにおいて、EsenとSoost(1972b)は二倍体と四倍体との交雑では多くの異数体が出現するが、二倍体間の交雑では異数体がほとんど出ないことを報告している。しかし、カンキツの二倍体間の交雑において、染色体数は特定されないものの、異数体の出現を認める報告(喜多ら, 1987; 趙ら, 1988)もみられている。二倍体間の交雑における異数体の出現率や出現範囲は明らかではない。

従来、カンキツの染色体数の調査には押しつぶし法(生山, 1981)が主に用いられてきたが、細胞質が残存するため、染色体の重なりが多く、染色体数の算定が困難である。最近、植物の染色体観察には酵素解離法が用いられ、カンキツでも酵素解離法が有効なことが認められている(北島ら, 1997a)。

一方、‘土佐文旦’は単胚性の二倍体品種であるが、自家不和合性であるため(岩川, 1986; 北島ら, 1997b)、種子形成には他家受粉が必要である。‘水晶文旦’は高知県

で育成された二倍体品種で、耐寒性が弱いものの品質は優れ、種子数は少なく(田中, 1980), '土佐文旦' との交雑和合性が高い(岩川, 1986)ので, '土佐文旦' と '水晶文旦' の交雑により品質の優れた種子の少ないブンタンの育成が期待される。

そこで本研究では, '土佐文旦' を種子親とし, '水晶文旦' との交雑により生じた種子の種子重別出現分布と実生の染色体数を調査して, 三倍体, 四倍体および異数体の出現率を明らかにし, これらを効率良く獲得するための手法を検討した。

材料および方法

1996~1998年の3ヶ年にわたり, '土佐文旦' を種子親として '水晶文旦' の花粉を交配し, 11月に果実をそれぞれ22, 9, 19個採取した。果実からすべての種子または不受精胚珠を採取し, 種子重を30 mgごとに区別して出現率を調査した。充実した種子を完全種子とし, 完全種子に比べて厚さが薄く, 外種皮にしわがあるものや明らかに小さい種子を不完全種子として外観的に区別した。

1996年には, 種子の外種皮を剥皮してGA₃250ppm溶液に3時間浸漬した後プラグトレイに播種し, 昼温25℃, 夜温15℃のファイトトロンに搬入し, 90日後に発芽率を調査した。その後, 直径7.5 cmのプラスチック鉢に移植して無加温のガラス室で育成した。1997年には210 mg以下の種子を用い, 無菌的に胚を摘出してショ糖3%を添加したホルモンフリーのMurashige and Skoog (MS) (1962)培地に置床し, 25℃, 16時間日長, 3500 lxの条件下で培養し, 30日後に発芽率を調査した。1998年には, 180 mg以下の種子は1997年と同様に胚培養を行い, 181~240 mgの種子は1996年と同様に播種し, 発芽率を調査した。

染色体数の調査には, 播種した個体では幼葉を, 胚培養個体では根端を用いた。採取した試料は2 mMの8-オキシキノリンで3~5時間前処理後, メタノール:酢酸(3:1)の固定液で固定し, 染色体標本作製は北島ら(1997a)の方法に準じて行った。すなわち, 固定試料を蒸留水で洗浄後, 3%セルラーゼ 'オノヅカ' RS (ヤクルト) と1%ペクトリアーゼ Y-23 (キッコーマン) を含む酵素液(75 mM KCl + 7.5 mM Na₂ EDTA 溶液 : pH4.0 に溶解)の7/10倍または1/10倍を用い, 酵素処理を37℃で2~3時間行った。遠心分離により酵素液を除去し, 75 mM KCl + 7.5 mM Na₂ EDTA 溶液 (pH4.0 に溶解) を加えて60分間静置した。さらに, 遠心分離により溶液を除去した後, 固定液を加えて混和し, スライドガラスに1滴滴下して室温で一晩乾燥させ, 染色体プレパレートとした。作製したプレパレートは1.5%ギムザ液(メルク)で30分間染色し, 生物顕微鏡(オリンパス BX50)で染色体数を観察して前中期の染色体像を写真撮影した。染色体数の算定は写真を用いて行い, 実生1個体あたり2プレパレート, 1

プレパレートあたり5核板以上について調査して実生個体の染色体数を特定した。なお, ギムザ染色で異数体と算定された個体や染色体数の特定が困難な個体はCMA蛍光染色を行い, 染色体数を確認した。すなわち, プレパレートを70%のエタノールで脱染後, McIlvaine's緩衝液(pH7.0)で15分間, 0.2 mg・ml⁻¹ ディスタマイシンで10分間, 5.0 mM Mg²⁺ 緩衝液で10分間, 0.12 mg・ml⁻¹ クロモマイシン A₃ (CMA) で1時間処理を行った。McIlvaine's緩衝液(pH7.0)で洗浄後, 落射蛍光装置(オリンパス BX-FLA)を用いてBV励起で検鏡し, 写真撮影を行った。これらの結果をもとに, 種子重と染色体数との関連について検討を行った。

結 果

1. 種子重別の出現率

1996~1998年の3年間で, '水晶文旦' の花粉を受粉した '土佐文旦' 果実50個から6365個の種子または不受精胚珠が得られた。これらの種子重を30 mgごとに区分すると, 0~30 mgから451 mg以上まで16段階に区別することができた。出現率は0~30 mgが最も高く, 全体に占める割合は15.8~25.5%であり(第1図), これらのほとんどは20 mg以下のものであった。そこで, 0~30 mgのものを不受精胚珠とした。種子重211 mg以上の種子の多くは完全種子であるが, 種子重180 mg以下ではすべてが不完全種子であることが観察された。種子重31~180 mgの種子の出現率は18.5~20.9%であり, 不受精胚珠とみられる0~30 mgのものを除外して算出すると26.4~27.8%となった。'土佐文旦' に '水晶文旦' を交配して生じた種子は, 1/4以上が不完全種子であった。

2. 交雑個体の発芽率

1996年に, 播種した種子の発芽率は180~210 mgで23.8%であり, 種子重が軽くなるにしたがって発芽率は低下した(第1表)。1998年に播種した種子の発芽率は180~210 mgで67.8%であった。1997年と1998年に胚培養を行ったところ, 210 mg以下の種子はいずれも発芽率が90%以上と高かった。180 mg以下の種子では, 子葉の一部が奇形なもの, 子葉がほとんど形成されていないもの, 胚が小さく魚雷状や球状のものなどがみられ, 60 mg以下の種子では胚が確認できないものが多かった(第2図)。このように, 61~180 mgの種子では胚の形態は奇形を呈しているが, 胚培養を行うことにより発芽率が高まることが認められた。

3. 染色体数の変異

染色体数の調査にあたり, 染色体長の比較的長い核板では染色体数の算定が困難となる(北島ら, 1997b)ため, 本実験では染色体長の比較的短い核板を選び, 実生個体の染色体数を特定した。ギムザ染色で染色体数が19本や20本と算定された染色体像をCMA染色で観察すると, それらの多くは2n=18の二倍体であることが確認され,

Fig. 1. Weight distribution of seeds derived from a cross between 'Tosa-Buntan' and 'Suisho-Buntan' pummelo.

Table 1. Viability of hybrid seeds from 'Tosa-Buntan' × 'Suisho-Buntan' pummelo sown in plug trays and in vitro cultured embryos.

Year and culture method	Seeds weight (mg)	Viability of seedling (%)	No. of seed tested
1996	31~120	3.7	54
	121~150	10.6	85
	151~180	19.6	138
	181~210	23.8	168
	211~451	57.4	1400
1997	61~ 90	100.0	5
	91~120	100.0	19
	121~150	91.7	12
	151~180	94.4	18
	181~210	97.1	69
1998	61~ 90	90.0	20
	91~120	95.8	24
	121~150	90.9	22
	151~180	95.0	20
	181~210	67.8	84
	211~240	88.8	72

CMA 染色によると正確な異数体の識別が可能であった。その結果、1996年と1998年に調査した種子重が211~240 mgの完全種子実生の78個体は、すべて二倍体であることが認められた(第2表)。また、241~450 mgの種子について30 mgごとに10個体ずつ調査した結果、すべて二倍体であった。種子重が61~180 mgの不完全種子実生

個体では、3年間で調査した128個体のうち、二倍体以外が19個体あり、出現率は約15%と高かった。しかし、不完全種子実生の範囲内では、二倍体以外の出現率と種子重との間に一定の傾向はみられなかった。

実生個体の染色体数の変異では、 $2n = 18$ の二倍体、 $2n = 27$ の三倍体、 $2n = 36$ の四倍体および $2n = 17$, 19,

Fig. 2. Photograph of normal (above) and malformed embryos (below) from seeds derived from 'Tosa-Buntan' x 'Suisho-Buntan' pummelo.

28の異数体がみられた(第2表, 第3図). 不完全種子実生個体では, 3年間で調査した128個体のうち三倍体が6.3%, 四倍体が2.3%, 異数体が6.3%出現した(第2表). また, 不完全種子実生個体では, 三倍体や四倍体の出現と種子重との間に一定の傾向はみられなかった. 3年間で調査した総種子数(不受精胚珠を含む)に対する31~180 mgの不完全種子の出現率は19.9%であり, 総種子数に対する三倍体, 四倍体, 異数体の出現率は, それぞれ1.24%, 0.46%, 1.24%と算定された.

考 察

種子重の分布に関して, 若菜ら(1981)は数種類のカンキツについて調査し, '晩白柚'では350~410 mgに出現

のピークがみられ, 3倍性胚を持つと推定される220 mg以下の種子の出現が少ないことを示した. また, '河内晩柑'では240~290 mgにピークがみられている. 本実験において, '水晶文旦'を交配した'土佐文旦'の完全種子の出現率は301~330 mgにピークがみられ, '土佐文旦'の完全種子の大きさは'晩白柚'より小さく, '河内晩柑'よりやや大きかった.

不完全種子からの実生個体の獲得には胚培養が有効なことが認められている. Oiyamaら(1991)は, 二倍体x四倍体で生じた不完全種子の胚培養により, 95.5%の実生個体が得られることを示している. 本実験では, 11月採取の不完全種子には胚培養が有効なことが認められた.

'土佐文旦'の不完全種子に関しては, 北島ら(1997b)は種子重0~20 mgの出現率が顕著に高いことを示し, これらを受精胚珠と推定しており, 本実験における30 mg以下のものを不受精胚珠とみなすのは妥当と考えられた. 本実験では, 完全種子に比べて厚さが薄く, 外種皮にシワがあるものや胚が奇形のもの, 明らかに小さい種子を不完全種子とし, 種子を完全種子, 不完全種子, 不受精胚珠に区分した. 単胚性品種を種子親とした二倍体間の交雑における不完全種子の出現率は, '紀州'の27.5%(春崎ら, 1996)と'スゲガ'の23.19%(EsenとSoost, 1971)を除いてはほぼ10%以下と報告されている(Esen・Soost, 1971; Toolapongら, 1996; 岩政・衛藤, 1976; 喜多ら, 1987; 春崎ら, 1996)が, 本実験における'水晶文旦'

Table 2. Frequency distribution of seedlings by seed weight and chromosome number from 'Tosa-Buntan' x 'Suisho-Buntan' pummelo.

Year and culture method	% of 31~180mg seeds	Seed weight (mg)	No. of chromosome (2n)						No. of seedling observed	% of non-diploid
			17	18	19	27	28	36		
1996 sowing ^z	18.5	121~150	1	8	1	1			11	27.3
		151~180		19		1	1	2	23	17.4
		181~210		36					36	0.0
		211~240		49					49	0.0
1997 Embryo culture ^y	20.5	91~120		14	1	2			17	17.6
		121~150		6					6	0.0
		151~180	1	13	1	3			18	27.8
		181~210		17					17	0.0
1998 Embryo culture sowing	20.9	61~90		9	1				10	10.0
		91~120		10		1			11	9.1
		121~150		19				1	20	5.0
		151~180		11	1				12	8.3
		181~210		26				1	27	3.7
		211~240		29					29	0.0
Total	19.9		2	266	5	8	1	4	286	7.0
			(2) ^x	(109)	(5)	(8)	(1)	(3)	(128)	(14.8)

^z Using young leaves for chromosome number count.

^y Using root tips for chromosome number count.

^x Total of 61~180mg seeds.

Fig. 3. Photographs of chromosome from seedlings of 'Tosa-Buntan' × 'Suisho-Buntan' pummelo. A: $2n=17$, B: $2n=18$, C and D: $2n=19$, E: $2n=27$, F: $2n=36$. A, B, C, E and F are Giemsa staining and D is CMA staining. The large and the small arrows in D indicate 2 sections of type A and type B chromosome, respectively.

を交配した「土佐文旦」の不完全種子の出現率は19.9%であった。「土佐文旦」の不完全種子の出現率に関しては、春崎ら(1996)は自然受粉で3.0%, 趙ら(1988)は異なる花粉親を用いて5.5~8.8%, 北島ら(1997b)はヒュウガナツを用いて8.8%であるとしている。本実験では3年間の調査で18.5~20.9%と安定しており、花粉親である「水晶文旦」が「土佐文旦」の不完全種子の出現率に影響を及ぼした可能性が示唆された。

単胚性の種子親を用いた二倍体間の交雑に関する日本における報告では、三倍体の出現率は「晚白柚」(Toolapong ら, 1996)と「紀州」(春崎ら, 1996)を除くとほぼ1%以下である(岩政・衛藤, 1976; 喜多ら, 1987; 春崎ら, 1996)。本実験の「水晶文旦」を交雑した「土佐文旦」からの三倍体の出現率は1.24%であり、やや高い出現率と考えられた。Esen らは一連の報告(Esen・Soost, 1972a; Esen・Soost, 1973; Esen ら, 1978)から、二倍体

間の交雑による三倍体の出現は非還元雌性配偶子に起因するとしている。しかし、生山・奥代(1983)はスイートオレンジを種子親とする二倍体間交雑で、三倍体の出現率が花粉親によって大きく異なることを認めている。また、春崎ら(1996)は‘土佐文旦’の自然受粉では三倍体の出現率が0.1%と本実験結果より低い値を示しており、花粉親の違いに起因している可能性も考えられる。このように、二倍体間の交雑による三倍体の出現には、非還元雄性配偶子が関与する可能性も捨てきれない。一方、本実験における三倍体は種子重91~180 mgの種子から出現しており、Toolapongら(1996)の‘晚白柚’の結果とはほぼ一致した。春崎ら(1996)の報告では、自然受粉による‘土佐文旦’から得られた三倍体は種子重30~59 mgで出現しているが、本実験では種子重60 mg以下の胚培養は困難であった。

カンキツでは、二倍体から生じる四倍体実生は珠心胚由来と考えられており、珠心胚実生から約2.5%の四倍体が出現することが知られている(Cameron・Frost, 1968)。しかし、本実験の単胚性二倍体間の交雑において、四倍体の出現率は0.46%であった。この四倍体は、何に起因して生じたかは不明であるが、三倍体の無核ブタン育成に有効な育種素材として有望である。

カンキツの異数体に関しては、Esen・Soost(1972b)は二倍体×四倍体の交雑では約11%が異数体であり、二倍体間の交雑では667個体中 $2n=19$ がわずかに1個体であったことを認め、二倍体では異数性の接合子が生じないか、異数性の接合子に生存能力がないものと推察している。しかし、本実験における二倍体間の交雑では不完全種子の6.3%は異数体であり、総種子数に対する出現率は1.24%であった。出現した異数体は $2n-1$, $2n+1$, $3n+1$ であり、 $n-1$ や $n+1$ の配偶子や接合子には受精能力や生存能力があるものと考えられた。

本実験でギムザ染色により異数体と算定された核板についてCMA染色を行い、A型染色体(染色体の両腕の端部と動原体付近にCMA(+)領域をもつ)やB型染色体(一方の端部と動原体付近にCMA(+)領域をもつ)に注目したところ、染色体数を誤認している場合も多くみられた。異数体の染色体数の算定にはCMA染色との併用が不可欠と考えられた。

本実験では、二倍体間の交雑で種子重180 mg以下の不完全種子が多数形成され、そのうち85.2%は $2n=18$ の二倍体であり、二倍体の出現と種子重との間に一定の傾向はみられなかった。二倍体間の交雑で生じる不完全種子には、二倍体が多く含まれることはよく知られている(岩政・衛藤, 1976; 喜多ら, 1987; 生山・奥代, 1983; 趙ら, 1988; Toolapongら, 1996; 春崎ら, 1996)。このことは、不完全種子の形成が胚と胚乳の染色体数の比に起因するというEsenら(Esen・Soost, 1972a; Esen・Soost, 1973; Esenら, 1978)の考えにはあてはまらないようである。

Johnstonら(1980)はEBN(Endosperm Balance Number)仮説を提唱し、胚乳における雌性ゲノムのEBNと雄性ゲノムのEBNの比が2:1のときに胚乳は正常に発育するとしている。Ehlenfeldt・Hanneman(1988)は、*Solanum*属における1EBNの二倍体と2EBNの二倍体との種間交雑を行うと種子の発育は制限され、わずかに生じた二倍体の F_1 (11/2EBN)を両親に戻し交雑すると種子発育が制限される割合が異なることを認めている。このように、カンキツの二倍体間交雑においても種子発育が制限される二倍体が生じるのは、EBNが関与しているのかもしれない。

本実験の結果から、二倍体間の交雑による‘土佐文旦’種子から三倍体や異数体を獲得するには、31~180 mgの種子を用いるのが効率的であり、このような個体育成には胚培養が有効であることが認められた。

摘 要

種子数の少ないブタンを育成するため、‘土佐文旦’を種子親として‘水晶文旦’を花粉親とし、1996~1998年の3年間交配を行い、種子重別の出現率や交雑個体の染色体数を調査した。

完全種子の出現率のピークは種子重301~330 mgにみられ、30 mg以下のものは不受精胚珠と考えられた。31~180 mgの種子はすべて不完全種子であり、不完全種子の出現率は約20%と高かった。

61~180 mgの種子では、プラグトレイを用いた播種に比べ、胚培養を行うと発芽率が高くなり、実生個体の獲得における胚培養の有効性が認められた。

種子重が61~180 mgの実生個体では、二倍体以外の出現率が約15%と高かった。三倍体や異数体の獲得には、種子重61~180 mgの実生個体を用いるのが効率的と考えられた。

種子重61~180 mgの実生128個体のうち、三倍体が8個体、四倍体が3個体得られた。異数体は8個体出現し、その染色体数は $2n=17$, 19 , 28 であった。また、二倍体は109個体と多かった。

引用文献

- Cameron, J. and H. Frost. 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. p.325-370. In: W. Reuther, L. Batchelor and H. Webber (eds.), The Citrus Industry. Vol. II. Univ. California Press, California.
- Ehlenfeldt, M. K. and R. E. Hanneman, Jr. 1988. Genetic control of endosperm balance number (EBN): three additive loci in a threshold-like system. Theor. Appl. Genet. 75: 825-832.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1971. Unexpected triploids in citrus: their origin, identification and possible use. J. Hered. 62: 329-333.

- Esen, A. and R. K. Soost. 1972a. Tetraploid progenies from $2x \times 4x$ crosses and their origin. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 410-414.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1972b. Aueuploidy in citrus. *Amer. J. Bot.* 59: 473-477.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1973. Seed development in citrus with special reference to $2x \times 4x$ crosses. *Amer. J. Bot.* 60: 448-462.
- Esen, A., R. K. Soost and G. Geraci. 1978. Seed set, size and development after $4x \times 2x$ and $4x \times 4x$ crosses in citrus. *Euphytica* 27: 283-294.
- Geraci, G., A. Esen and R. K. Soost. 1975. Triploid progenies from $2x \times 2x$ crosses of citrus cultivars. *J. Hered.* 66: 177-178.
- 春崎聖一・国武久登・小松春喜. 1996. 単胚性カンキツにおける小粒種子の3倍体および半数体の発生. 園学雑. 65 (別2): 90-91.
- 岩川 孝. 1986. トサブンタンの結実に関する研究. 京都大学学位論文
- 岩政正男・衛藤徹雄. 1976. カンキツ類実生に発生する3倍体 (第1報). 園学要旨. 昭51春: 92-93.
- Johnston, S. A., T. P. M. den Nijs, S. J. Peloquin and R. E. Hanneman, Jr. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor. Appl. Genet.* 57: 5-9.
- 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3倍体品種の育成 (第1報) ウンシュウミカンと4倍体ポンカンの交雑による雑種3倍体の作出. 園学雑. 66: 9-14.
- 喜多景治・佐川正典・窪田聖一・松本英紀. 1987. 3倍体利用によるカンキツ類の無核品種育成に関する研究. 園学要旨. 昭62春: 6-7.
- 北島 宣・堀田智子・別府まゆみ・楊 曉伶・長谷川耕二郎. 1997a. カンキツ類の染色体標本作製における酵素処理条件の検討と染色体数. 園学雑. 66 (別2): 190-191.
- 北島 宣・片岡朝和・長谷川耕二郎. 1997b. '土佐文旦' と '水晶文旦' の受精と種子形成の差異について. 園学雑. 66 (別1): 110-111.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- 生山 巖. 1981. カンキツの根端組織における染色体の一観察法について. 果樹試報 D. 3: 1-7.
- Oiyama, I. And S. Kobayashi. 1990. Polyembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a citrus tetraploid. *HortScience* 25: 1276-1277.
- Oiyama, I., S. Kobayashi, K. Yoshinaga, T. Ohgawara and S. Ishii. 1991. Use of pollen from somatic hybrid between citrus and poncirus in the prodnction of triploids. *HortScience* 26: 1082.
- 生山 巖・奥代直己. 1983. カンキツ類の倍数性育種に関する研究Ⅲ. $2x$ スイートオレンジ $\times 2x$ の組み合わせにおける3倍体の出現について. 果樹試報 D. 5: 1-18.
- Schneider, G. W. 1953. Megagametogenesis and embryology in a diploid and an aneuploid apple. *Amer. J. Bot.* 40: 196-203.
- 田中諭一郎. 1980. 日本柑橘図譜. p.17-19. 養賢堂. 東京.
- Toolapong, P., H. Komatsu and M. Iwamasa. 1996. Triploids and haploid progenies derived from small seeds of 'Banpeiyou' pummelo, crossed with 'Ruby Red' grapefruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 65: 255-260.
- 若菜 章・上本俊平・岩政正男. 1981. カンキツ多胚品種の3倍および5倍性胚乳における胚の発育と小粒種子形成. 園学要旨. 昭56春: 8-9.
- 趙興濟・若菜 章・白石真一. 1988. カンキツ類の種子の退化に関する研究. 第1報. 退化種子に出現する3倍体とその起源. 園学要旨. 昭63秋: 10-11.