

만다린 잡종에서 자연발생 배수체의 발생 빈도와 성장 특성

송관정^{1,2*} · 김셋별¹ · 박재현¹ · 오은의¹ · 이경욱^{1,3} · 김동욱¹ · 강종훈⁴ · 김정순⁵ · 오정환⁶ · Fred G. Gmitter⁵

¹제주대학교 생물산업학부, ²아열대농업생명과학연구소, ³감귤농업육종연구소, ⁴제주특별자치도농업기술원,

⁵University of Florida, CREC, ⁶제주감귤농협

Frequency and Growth Characteristics of Polyploids Occurred Spontaneously in Some Mandarin Hybrids

Kwan Jeong Song^{1,2*}, Sat Byul Kim¹, Jae Hyun Park¹, Eun Ui Oh¹, Kyunguk Lee^{1,3}, Dong Wook Kim¹, Jong-Hoon Kang⁴, Jeong-Soon Kim⁵, Jeong Hwan Oh⁶, and Fred G. Gmitter⁵

¹Faculty of Bioscience & Industry, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Research Institute for Subtropical Agriculture & Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³Citrus Breeding & Agricultural Research Institute, Jeju 699-904, Korea

⁴Jeju Special Self-Governing Province Agricultural Research & Extension Services, Jeju 697-828, Korea

⁵University of Florida, Citrus Research & Education Center, FL 33850, USA

⁶Jeju Citrus Agricultural Cooperative, Jeju 697-370, Korea

Abstract. The study was conducted to determine the efficiency in producing spontaneous polyploids in some mandarin hybrids with different seed embryony. Seed formation by open pollination, frequency of spontaneous polyploids, and plant growth characteristics were evaluated in four mandarin hybrids with polyembryony such as ‘Amakusa’, ‘Haruka’, ‘Hayaka’, and ‘Seminole’ and two with monoembryony such as ‘Benibae’ and ‘Harehime’. The mean number of the developed seeds per fruit was 10.0 and frequency of small seeds was 25.1%. Polyploids were selected from plants germinated in vitro by a flow cytometry and confirmed by chromosome analysis. One triploid was produced from ‘Harehime’, one tetraploid, ‘Amakusa’, and one tetraploid, ‘Benibae’. There were little differences in leaf shape, thickness, petiole length, and internode length between diploids and polyploids such as tri- or tetraploid. However, polyploids had larger stomata and lower density of stomata in abaxial epidermis than diploids. SPAS indicating chlorophyll content and photosynthetic rate were significantly affected by ploidy level. The results indicated that spontaneous polyploids might be produced by open pollination in some mandarin hybrids and monoembryony had higher frequency in polyploid occurrence than polyembryony.

Additional key words: chromosome, flow cytometry, monoembryony, polyembryony, stomata

서 언

감귤은 아열대 기원의 2배체($2n = 2x = 18$) 식물이다. 국내에서 재배되는 대부분의 감귤은 온주밀감 계열의 만다린 계통이고, 일부 ‘Shiranuhi’ 및 ‘Setoka’와 같은 만속종 만다린 잡종이 시설재배되고 있다. 이들 감귤은 거의 대부분 제주지역에서 생산되며 특히 일부 남해안 지역에서 재배되고

있다. 상업적으로 중요한 품종들은 모두 일본으로부터 도입되어 재배되고 있는 실정이다. 최근 고당도 및 고품질 과실에 대한 소비자들의 수요가 급증함에 따라 신품종에 대한 생산자들의 관심이 더욱 높아졌고, 이에 따라 외국으로부터 다양한 품종들을 도입하여 재배를 시도하고 있다. ‘Shianuhi’, ‘Setoka’, ‘Amakusa’ 등 이들 대부분의 품종들은 단위결과 성이 강하고 타 품종의 화분이 수분되면 종자형성도가 높은

*Corresponding author: kwansong@jejunu.ac.kr

※ Received 5 September 2011; Accepted 15 September 2011. This work was supported by the research grant of the Cheju National University in 2007.

편이다(Matsumoto et al., 2003; Yun et al., 2007). 이들 품종들의 재배에서 화분 임성이 높은 종이나 품종들이 인근에 재식되는 경우 다수의 종자가 형성되어 소비자들의 기호도와 거리가 먼 과실이 생산되어 경제적 가치가 크게 줄어들게 된다(Usman et al., 2006). 그러므로 인근에 재배되는 품종에 관계없이 무핵 과실을 생산할 수 있는 3배체 품종의 개발이 다양하게 시도되어 왔다(Recupero et al., 2005).

3배체 품종의 개발은 통상적으로 2배체와 4배체간 교잡을 통해서 이루어질 수 있기 때문에, 무엇보다도 4배체 품종의 개발이 매우 중요하다. 4배체 품종은 체세포배형성 캘러스 또는 액아에 대한 콜히친 등 배수체 유도 화학물질의 처리(Aleza et al., 2009; Dutt et al., 2010; Wakana et al., 2005), 체세포잡종 또는 원형질체 융합(Chen et al., 2004; Costa et al., 2004), 자연발생 교배실생의 선발(Usman et al., 2006) 등에 의해 이루어질 수 있다.

한편 감귤은 종자 발아 식물로부터 다양한 배수체를 발생시키는 특징이 있는 것으로 알려져 왔다(Usman et al., 2006). 4배체(Usman et al., 2006)는 물론 반수체(Toolapong et al., 1996), 3배체(Chen et al., 2008; Oiyama et al., 1991; Yasuda et al., 2010), 5배체(Oiyama and Kobayashi, 1991) 등 다양한 배수체와 더불어 이수체(Yasuda et al., 2010)의 획득도 가능하다. 이들 배수체와 이수체의 발생 빈도는 품종과 환경에 따라 달라지는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 대부분의 연구는 오렌지, 자몽, 탕자 등을 이용하여 수행되었고, 상업적으로 재배되는 만다린 계통에 대해서는 거의 보고된 바가 없다.

그러므로 본 연구에서는 다양한 육종 소재를 확보하기 위해 국내 교배육종에의 이용가치가 높은 상업적 재배 만다린 계통의 일부 품종에 대해 다배성과 단배성의 종자형성 특성에 따른 방임수분 실생의 배수체 발생 빈도를 분석하고자 하였으며, 또한 이들 배수체들로부터 일반적으로 알려진 감귤 배수체 특성과의 유사성을 평가하고자 성장 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

식물재료

제주감귤농협 모수원 및 제주대학교 실험농장에 재식된 다배성의 'Amakusa', 'Harumi', 'Hayaka' 및 'Seminole' 4 품종과 단배성의 'Benibae'와 'Harumi' 2품종의 성목으로부터 성숙한 과실을 수확한 후 과실을 70% 에탄올에 10분간 침지하여 표면 살균한 다음 무균상에서 발육 종자를 채취하였다. 채취한 종자 중 발육이 충분치 못한 작은 종자들을

구분하여 3% 자당 첨가 한천 고형의 MT 배지(Murashige and Tucker, 1969)에서 발아를 유도하였다. 발아 및 유묘 생육은 25°C 생육상에서 수행하였다. 유묘의 어린 잎으로부터 배수성이 확인된 잠정 배수체들은 탕자 유묘에 기의 접목하였고, 이를 온실에서 순화하고 생육을 관리하였다.

배수성 및 염색체 분석

기내 유묘의 어린 잎을 채취하여 400μL의 핵 추출 용액과 함께 약 30초간 면도날로 잘게 조각 낸 후 30μm 체로 여과하였다. 이를 1.6mL 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 용액으로 염색한 후 곧바로 배수성 분석기(flow cytometry, PA-II, Partec, Munster, Germany)로 배수성을 분석하였다. 이로부터 배수성이 잠정 확인된 식물체들은 Dutt et al.(2010)의 방법에 따라 염색체 분석을 수행하였다. 기의 접목 순화된 식물로부터 0.5cm 크기의 유엽을 채취하여 2mM 8-hydroxyquinoline(HQ) 용액에 담가 10°C 에서 12시간 처리하였다. 이를 다시 고정액(메칠알코올:초산 = 3:1)에서 10°C, 10시간 처리하였다. 고정된 시료는 세포 분해 효소액(2% Cellulase Onozuka RS, 1% Macerozyme, 0.3% Pectolyase Y-23)에서 37°C 1시간 처리하였다. 효소처리 시료는 조심스럽게 꺼낸 후 슬라이드글라스 상에 올려 놓고 고정액과 핀셋으로 세포를 펼치고 건조시켰다. 건조한 슬라이드 시료를 2% Giemsa 용액을 이용하여 45분간 염색하였으며, 이를 현미경하에서 관찰하여 배수성을 확인하였다.

성장 특성 분석

포트에서 생육 중인 배수성 식물과 2배체 식물로부터 생장이 정지한 신초 상부의 잎에서 잎의 길이, 폭 및 두께, 엽병 길이, 기공 크기와 분포, 엽록소 함량, 광합성 특성 및 줄기의 절간장을 각각 조사하였다. 기공 분포는 일반 메니큐어를 잎 이면에 바른 후 건조시킨 다음, 이를 핀셋으로 분리하고 현미경하에서 관찰하였다. 엽록소 함량은 엽록소계(SPAD-502, Minolta, Japan)를 이용하여 측정하였다. 광합성 특성은 LI-6400 portable photosynthesis system(LI-COR, Ltd., USA)을 이용하여 맑은 날 오전 10시경에 측정하였다. 모든 생육조사는 개별 잎 또는 줄기를 반복으로 하여 3반복 수행하였다.

결과 및 고찰

감귤 만다린 잡종에서 방임수분된 과실의 종자 형성 정도와 배수체 발생 빈도를 Table 1에 나타내었다. 다배성 4품종과 단배성 2품종으로부터 총 1,301개 과실을 이용하였고,

Table 1. Occurrence of small seeds and spontaneous polyploids in open pollinated fruits of some mandarin hybrids.

Seed parent	Seed embryony	No. of fruits	No. of developed seeds			No. of polyploids		
			Small (%)	Normal	Total	3x	4x	Total (%)
Amakusa	Poly	301	1,227 (43.9)	1,317	2,544	0	1	1 (0.1)
Harumi	Poly	267	811 (35.3)	1,488	2,299	0	0	0 (0.0)
Hayaka	Poly	296	752 (16.6)	3,786	4,518	0	0	0 (0.0)
Seminole	Poly	102	275 (13.0)	1,836	2,110	0	0	0 (0.0)
Benibae	Mono	189	206 (14.7)	1,196	1,402	0	1	1 (0.4)
Harehime	Mono	146	14 (8.0)	160	174	1	0	1 (7.1)
Total		1,301	3,285 (25.1)	9,783	13,068	1	2	3 (0.1)

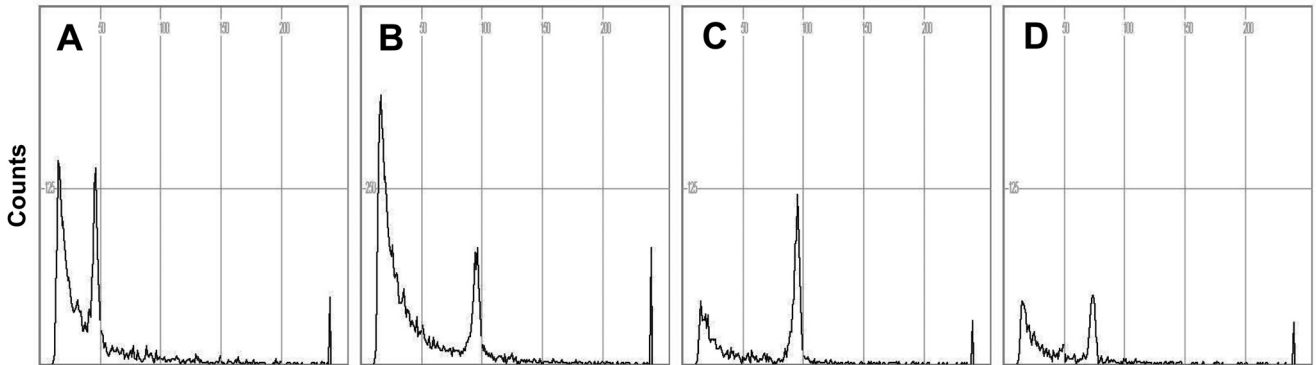


Fig. 1. Flow cytometry analysis of nuclear DNA from fully developed leaves of diploidy Amakusa (A), tetraploidy Amakusa (B), tetraploidy Benibae (C), and triploidy Harehime (D).

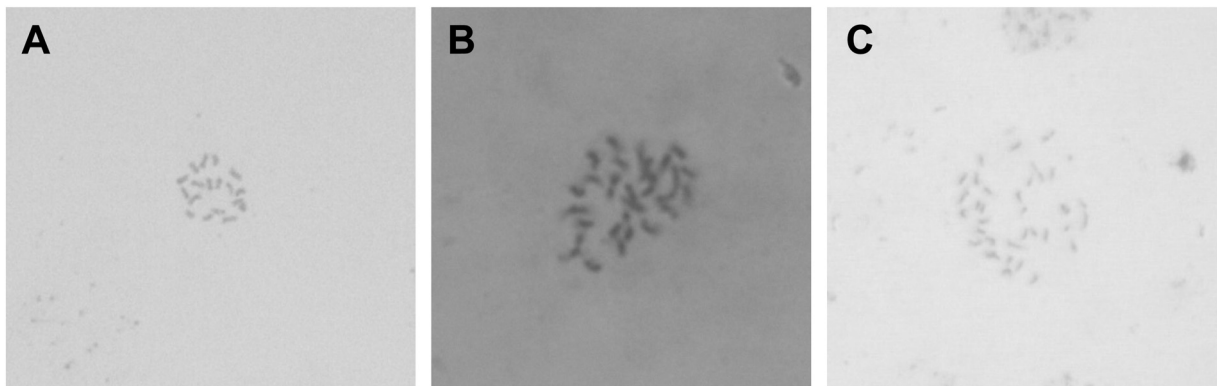


Fig. 2. Giemsa stained chromosomes from young leaf cells of diploid (A), triploid (B), and tetraploid (C) occurred spontaneously in some mandarin hybrids.

총 13,068개의 발육종자를 얻을 수 있어 과실당 평균 종자 수는 10.0개이었다. 그러므로 앞으로 이들 품종들을 노지에서 재배하게 될 경우는 다수의 종자가 형성됨에 따라 식미감을 감소시킬 우려가 매우 큼을 보여주었다.

전체의 발육 종자 중에서 소형의 발육 종자가 차지하는 비율은 25.1%이었다. 이들 소형 종자를 MT 배지가 첨가된 기내에서 발아시킨 후 유엽을 채취하여 배수성 분석기(flow cytometry, PA-II, Partec, Munster, Germany)로 배수성 정도를 판정(Fig. 1)하였으며, 이를 다시 염색체를 분석(Fig.

2)하여 배수성을 확인하였다. 분석결과 다배성의 품종에서는 ‘Amakusa’에서 1개의 4배체를 선발할 수 있었으나, 나머지 다배성 품종에서는 2배체가 아닌 어떤 다른 배수체도 선발할 수 없었다(Table 1, Figs. 1, and 2). 반면 단배성 품종에서는 ‘Benibae’에서 4배체 1개를, 그리고 ‘Harehime’에서 3배체 1개를 선발하였다(Table 1, Figs. 1, and 2). 본 연구결과 다배성 품종보다는 단배성 품종에서 배수체의 자연발생 빈도가 높게 나타났다.

감귤에서는 반수체, 3배체, 4배체 및 5배체 등 다양한 배

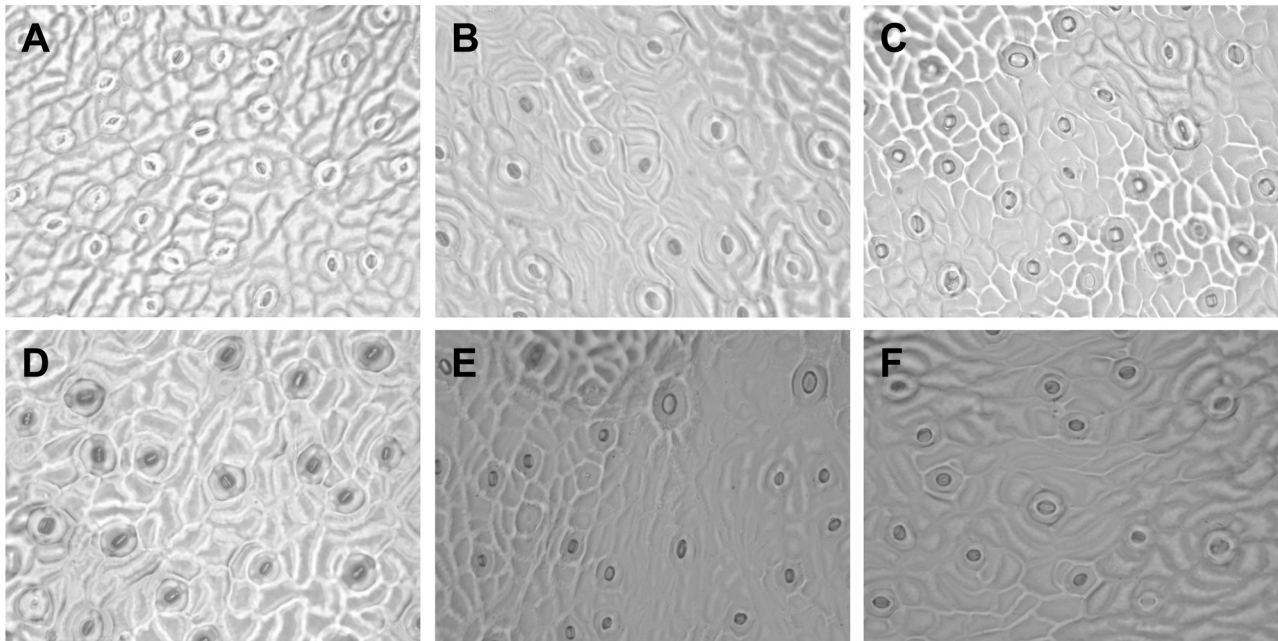


Fig. 3. Stomata prints of abaxial epidermis in spontaneous polyploids obtained from some mandarin hybrids. A, 'Amakusa' diploid; B, 'Amakusa' tetraploid; C, 'Benibae' diploid; D, 'Benibae' tetraploid; E, 'Harehime' diploid; F, 'Harehime' triploid.

Table 2. Plant growth characteristics in spontaneous polyploids obtained from some mandarin hybrids.

Cultivar and polyploidy level	Leaf growth				Petiole length (mm)	Internode length (mm)
	Length (mm)	Width (mm)	Ratio	Thickness (mm)		
Amakusa diploid	61.6 ± 5.1 bcd ^z	27.5 ± 2.4	0.45 ± 0.02 a	0.12 ± 0.00 e	9.1 ± 2.3	12.1 ± 1.5 cd
tetraploid	49.4 ± 1.9 d	26.3 ± 1.6	0.53 ± 0.01 a	0.14 ± 0.00 e	9.7 ± 1.5	13.1 ± 0.4 bcd
Benibae diploid	71.5 ± 4.5 bc	36.3 ± 3.5	0.51 ± 0.02 a	0.21 ± 0.03 abc	16.7 ± 4.2	14.6 ± 0.9 bc
tetraploid	49.0 ± 4.0 d	30.0 ± 0.9	0.62 ± 0.06 a	0.23 ± 0.02 ab	9.5 ± 1.4	8.8 ± 0.6 e
Harehime diploid	85.2 ± 2.5 a	30.3 ± 1.1	0.36 ± 0.00 b	0.25 ± 0.00 a	17.4 ± 0.7	14.8 ± 0.9 b
triploid	72.4 ± 4.8 b	29.3 ± 1.8	0.40 ± 0.01 a	0.20 ± 0.01 bcd	20.2 ± 2.9	25.0 ± 1.5 a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

Table 3. Stomata and photosynthetic characteristics in spontaneous polyploids obtained from some mandarin hybrids.

Cultivar and polyploidy level	Stomata		SPAD value	Photosynthetic rate ($\mu\text{M CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
	Guard cell length (μm)	Stomata density ($\text{No.} \cdot \text{mm}^{-2}$)		
Amakusa diploid	33.2 ± 0.5 c ^z	259.3 ± 7.2 bc	61.8 ± 2.6 a	10.6 ± 0.5
tetraploid	42.6 ± 1.0 ab	174.7 ± 1.2 e	48.1 ± 2.0 cd	11.3 ± 2.2
Benibae diploid	36.3 ± 1.7 c	270.0 ± 4.0 ab	59.8 ± 0.8 ab	6.6 ± 0.6
tetraploid	43.0 ± 0.9 a	185.7 ± 0.9 d	54.0 ± 4.1 abc	8.1 ± 0.6
Harehime diploid	36.1 ± 1.2 c	278.3 ± 4.4 a	41.9 ± 1.6 d	8.1 ± 0.4
triploid	34.6 ± 1.8 c	170.0 ± 3.8 e	49.4 ± 3.7 cd	9.2 ± 0.2

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

수체는 대형 발육종자가 아닌 소형의 발육종자로부터 획득할 수 있는 것으로 알려져 왔다(Chen et al., 2008; Oiyama and Kobayashi, 1991; Oiyama et al., 1991; Toolapong et al., 1996; Usman et al., 2006; Yasuda et al., 2010). 소형의

종자들은 배낭 세포 또는 화분 세포 형성시 어떤 이유로 정상적인 감수분열이 이루어지지 못하여 중복수정에 의해 형성되는 배유와 배의 염색체 비율이 3:2에서 벗어나게 되기 때문에 나타나는 것으로 알려져 있다(Chen et al., 2008; Oiyama and

Kobayashi, 1991). 이들 자연발생 배수체 빈도는 10-25% 범위로 알려져 있으며(Usman et al., 2006), 소형 종자라 하더라도 종자 크기에 따라서 그 발생 빈도가 크게 달라지는데, 그 크기가 작을수록 3배체 획득율이 증가하였다(Toolapong et al., 1996). 또한 단배성 품종에서는 소형종자 빈도가 낮고, 화분친에 따라서는 그 빈도가 달라질 수도 있다(Yasuda et al., 2010). 그러므로 본 연구에서의 낮은 배수체 발생빈도는 품종의 특성, 화분친의 영향과 소형종자의 범위에 대한 요인들의 복합적인 상호작용으로 인해 나타난 결과로 생각되었다.

배수체간 성장 특성을 분석하기 위해 잎의 길이, 폭, 길이/폭, 두께, 엽병 길이, 절간장을 조사하였다(Table 2). 잎의 길이는 2배체가 길고 3배체 및 4배체에서 짧았다. 그러나 잎 폭과 길이에 대한 비율에 있어서는 차이가 없어 잎의 형태에 있어서는 차이가 없었다. 또한 엽병의 길이에 있어서는 차이가 없었다. 절간장에 있어서는 'Harehime'의 3배체가 가장 크게 나타났으나, 다른 품종에서는 차이가 거의 없었다.

배수체 및 품종간 잎 이면에서의 기공의 크기와 밀도를 비교하였다(Table 3 and Fig. 3). 공변세포의 길이로 기공의 크기를 비교할 때, 4배체는 3배체 및 2배체보다 컸으나, 3배체와 2배체간에는 차이가 없었다. 그러나 기공의 밀도에 있어서는 4배체와 3배체에서 2배체보다 유의하게 낮게 나타났다. 엽록소 함량을 나타내는 SPAD 값은 배수체와 품종에 따라 일정하게 나타나지 않았다. 광합성율에 있어서는 품종과 배수체간 차이가 없었다.

감귤에서는 일반적으로 4배체의 잎은 2배체의 잎보다 크며, 둥근 형태를 나타낸다(Wakana et al., 2005). 이는 본 연구결과와는 다소 차이가 있는 것이다. 그러나 Romro-Aranda et al.(1997)에 의하면 배수체간 잎의 크기와 두께가 환경에 따라 달라질 수 있는데, 특히 잎 크기의 차이가 강광 조건에서 생육할 때는 차이가 크게 줄어든다. 그러므로 배수체간 잎의 크기와 두께에 대해서는 광 및 온도 조건 등 외부 생육 환경과 유목과 성목에서의 차이 등 생리적 단계에 따라 서로 다르게 나타날 수 있다고 보아지며, 보다 상세한 연구가 필요한 것으로 생각되었다.

또한 엽록소 함량과 광합성율에 있어서는 배수체간 차이가 품종 및 환경에 따라 상반되게 나타난다(Romro-Aranda et al., 1997). 이는 본 연구결과에서도 유사한 경향이였다. Costa et al.(2004)에 의하면 체세포잡종의 4배체는 2배체보다 기공의 크기는 크고, 단위면적당 기공수는 적어진다고 하였는데, 본 연구결과에서는 이와 유사하였다. 그러나 기공의 크기는 유사하나 기공밀도는 낮게 나타나서 배수체간 품

종 또는 생육환경에 대한 반응에 있어서도 추가적인 연구가 필요하다고 생각되었다.

초 록

자연발생 배수체를 이용한 다양한 육종 소재를 개발함에 있어 그 효율성을 평가하고자 종자의배형성이 다른 일부 만다린 잡종에 대해 종자 형성 정도, 자연발생 배수체의 발생 빈도, 배수체의 성장 특성을 분석하였다. 다배성의 'Amakusa', 'Haruka', 'Hayaka' 및 'Seminole' 4품종과 단배성의 'Benibae'와 'Harehime' 2품종에 대해 방임수분된 과실로부터 종자를 채취하였다. 과실당 종자수는 10.0개이었고, 이 중 소형의 발육종자 형성 빈도는 25.1%이었다. 이들 소형 종자의 기내 발아 식물체에 대해 배수체 분석기 및 염색체 분석으로 배수성을 분석하고 배수체를 선발하였다. 'Harehime' 3배체 1개, 'Amakusa' 4배체 1개, 그리고 'Benibae' 4배체 1개가 각각 획득되었다. 이들 4배체와 3배체의 잎의 형태, 두께, 엽병 길이 및 절간장을 2배체와 비교하였는데, 큰 차이는 나타나지 않았다. 그러나 기공의 크기와 분포에 있어서는 분명한 차이를 나타내어 3 또는 4배수체 식물에서 기공의 크기가 커지고 분포 밀도는 감소하였다. 엽록소 함량을 나타내는 SPAD 값과 광합성 정도에 있어서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 본 연구결과로 감귤 만다린 잡종에서 방임수분으로도 자연발생 배수체 생산이 가능하며, 다배성보다는 단배성에서 발생 빈도가 높은 것을 확인할 수 있었다.

추가 주요어 : 염색체, 배수성분석기, 단배성, 다배성, 기공

인용문헌

- Aleza, P., J. Juarez, P. Ollitrault, and L. Navarro. 2009. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Rep.* 28:1837-1846.
- Chen, C., M.T. Lyon, D. O'malley, C.T. Federici, J. Gmitter, J.W. Grosser, J.X. Chaparro, M.L. Roose, and F.G. Gmitter, Jr. 2008. Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* × *Pocirus trifoliolate* and their reciprocal crosses. *Plant Sci.* 174:1-8.
- Chen, C.L., W.W. Guo, H.L.Y. Yi, and X.X. Deng. 2004. Cytogenetic analysis of two interspecific Citrus allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. *Plant Breeding* 123:332-337.
- Costa, M.A.P., W.A.B. Almeida, F.A.A.M. Filho, B.M.J. Mendes, and A.P.M. Rodriguez. 2004. Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. *Pesq. Agropec. Bras. Brasilia* 39:297-300.
- Dutt, M., M. Vasconcellos, K.J. Song, F.G. Gmitter, Jr., and J.W.

- Grosser. 2010. In vitro production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata*) using cell suspension culture. *Euphytica* 173:235-242.
- Matsumoto, R., M. Yamamoto, T. Kuniga, T. Yoshioka, N. Mitani, N. Okudai, Y. Yamada, K. Asada, H. Ikemiya, K. Yoshinaga, S. Uchihara, I. Oiyama, and H. Murata. 2003. New citrus cultivar 'Setoka'. *Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci.* 2:25-31.
- Murashige, T. and D.P.H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Proc. 1st Intl. Citrus Symp.* 3:1155-1161.
- Oiyama, I. and S. Kobayashi. 1991. Citrus pentaploids from small seeds of diploid \times diploid crosses. *HortScience* 26:292-293.
- Oiyama, I., S. Kobayashi, and K. Yoshinaga. 1991. Use of pollen from a somatic hybrid between *Citrus* and *Poncirus* in the production of triploids. *HortScience* 26:1082.
- Recupero, G.R., G. Russo, and S. Recupero. 2005. New promising Citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. *HortScience* 40:516-520.
- Romero-Aranda, R., B.R. Bondada, J.P. Syvertsen, and J.W. Grosser. 1997. Leaf characteristics and net exchange of diploid and autotetraploid citrus. *Ann. Bot.* 79:153-160.
- Toolapong, P., H. Komatsu, and M. Iwamasa. 1996. Triploids and haploid progenies derived from small seeds of Banpeiyu, a pummel, crossed with Ruby Red grapefruit. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 65:255-260.
- Usman, M., T. Saeed, M.M. Khan, and B. Fatima. 2006. Occurrence of spontaneous polyploids in *Citrus*. *Hort. Sci. (PRAGUE)* 33(3):124-129.
- Wakana, A., N. Hanada, S.M. Park, I. Fukudome, and K. Kajiwara. 2005. Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicines. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 50:93-102.
- Yasuda, K., M. Yahata, H. Komatsu, Y. Kurogi, and H. Kunitake. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 79:16-22.
- Yun, J.-U., H.B. Yang, Y.-H. Jung, S.-H. Yun, K.S. Kim, C.-S. Kim, and K.J. Song. 2007. Identification of zygotic and nucellar mandarin seedlings using randomly amplified polymorphic DNA. *Hort. Environ. Biotechnol.* 48:171-175.