

## カンキツにおける同型のCMA分染パターンを示す染色体の識別

別府まゆみ・北島 宣\*・長谷川耕二郎

高知大学農学部 783-8502 高知県南国市物部乙200

## Classification of the Citrus Chromosomes with Same Types of Chromomycin A Banding Patterns

Mayumi Befu, Akira Kitajima\* and Kojiro Hasegawa

Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502

## Summary

Chromosomes were isolated enzymatically from young leaves of 'Tanikawa-Buntan' pummelo (an uncertain hybrid with *Citrus grandis*), 'Yoshida-Ponkan' mandarin (*C. reticulata* Blanco), 'Mukaku-Kishu' (*C. kinokuni* Hort. ex Tanaka), and sour orange (*C. aurantium* Linn.). The chromosomes were stained with Giemsa, chromomycin A<sub>3</sub> (CMA), and quinacrine mustard (QM).

In CMA staining, five characteristic banding patterns (types A, B, C, D and E) were observed. The chromosome compositions with different CMA banding patterns were 3A+2C+4D+9E for 'Tanikawa-Buntan', 1B+1C+9D+7E for 'Yoshida-Ponkan', 1C+8D+9E for 'Mukaku-Kishu', and 1B+2C+8D+7E for sour orange. The chromosome composition in 'Mukaku-Kishu' was identical with koji (*C. leiocarpa* Hort. ex Tanaka).

The sour orange had a type C chromosome with an elongated second constriction. Some chromosomes classified as the same CMA type exhibited different relative sizes in the CMA(+) regions. Type D chromosomes, which were not classifiable on the basis of chromosome lengths were categorized into two groups in 'Mukaku-Kishu' and three groups in the sour orange based on the relative sizes of their CMA(+) regions.

Therefore, the relative sizes of CMA(+) regions are useful as indices for chromosome classification so that the relationships within the genus *Citrus* could be established.

**Key Words:** chromosome, citrus, CMA banding pattern.

## 緒 言

カンキツ類の中期染色体長は1-4 μmと短く、互いに形態が似ているため、個々の識別が困難である。近年、蛍光色素クロモマイシン A<sub>3</sub> (CMA) および 4'-6-di-amidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた対比染色により、数種のカンキツ類について種子根端の染色体構成が明らかにされている (Guerra, 1993; Matsuyama ら, 1996; Miranda ら, 1997)。

Befu ら (2000) は、幼葉を用いた染色体標本作製法を確立した。また、数種カンキツの幼葉を用いて、CMA(+) 領域の位置による分染パターンに基づき、カンキツ染色体を5つのグループ [ 両端および動原体近傍に CMA(+) 領域を持つ A 型、一方の端部および動原体近傍に CMA(+) 領域を持つ B 型、両端に CMA(+) 領域を持つ C

型、一方の端部に CMA(+) 領域を持つ D 型および CMA(+) 領域を持たない E 型 ] に分類し、これらのカンキツの染色体構成を明らかにした (別府ら, 2001)。ほとんどの種および品種では、A 型から E 型のいずれかにおいて染色体数が奇数であり、カンキツにおいては減数分裂に際し、必ずしも同型の染色体が対合するとは限らないと考えられた。さらに染色体長の比較を行うことにより、染色体を5つ以上のグループに分類できる種および品種が存在することを明らかにした。しかし、概して D 型および E 型染色体の個々の識別は困難であり、何らかの指標に基づく更に詳細な分類が必要である。

カンキツと同様に中期染色体長の短いイネにおいては、画像解析による核型分析が試みられている (Fukui・Iijima, 1991; Iijima ら, 1991)。この手法は、染色体長、短腕/長腕比、各染色体の凝縮の速さの違いによる凝縮パターンおよび染色体の視覚的な形態的特徴に基づき、各染色体の特徴を記述し分類するものである。

カンキツ染色体のギムザ染色像は、ウンシュウミカンなどを除いて、通常一様に濃染され、凝縮パターンによ

2001年4月2日 受付。2001年8月27日 受理。

本研究の一部は文部省科学研究費の助成により行われた (課題番号 10660030, 12660029)。

\*Corresponding author.

る分類は困難である。しかし、筆者らがこれまでに染色体を観察する中で、視覚的な形態的特徴にはいくつかのパターンが観察されたことから、これを指標として染色体をいくつかのグループに分けられる可能性が考えられた。また、複数のカンキツ類の染色体を比較すると、CMA(+)領域を有するA型からD型までの染色体において、CMA(+)領域の相対的な大きさに違いがみられる場合も観察される。

本研究においては、CMA(+)領域の位置による染色体の分類に加え、CMA(+)領域の相対的な大きさや染色体の形態的特徴および染色体長によるカンキツ染色体の識別の有効性を検討した。

### 材料および方法

高知大学農学部植栽の購入苗、‘吉田ポンカン’(*Citrus reticulata* Blanco)およびダイダイ(*C. aurantium* Linn.)、高知県果樹試験場に植栽されている‘谷川文旦’(*C. grandis* が関与した不明雑種)および‘無核紀州’(*C. kinokuni* Hort. ex Tanaka)を用いた。4月上旬に長さ3-5 mmの幼葉を採取し、2 mM オキシキノリンで20 °C、3時間の前

処理を行った後、固定液(メタノール:酢酸=3:1)で固定し、酵素解離法(Befuら, 2000)により染色体標本を作製した。

プレパラートを室温で乾燥した後、ギムザ、クロモイシンA<sub>3</sub>(CMA)、およびキナクリンマスタード(QM)染色を行い、検鏡した。各染色法は、Befuら(2000)に準じて行った。

ギムザ染色に関してはOLYMPUS BX50生物顕微鏡で検鏡して写真撮影を行った。蛍光染色に関してはOLYMPUS BX-FLA落射蛍光装置を用い、BV励起(励起フィルタ400-410 nm, 吸収フィルタ475 nm)で検鏡して写真撮影を行った。写真撮影には全自動写真撮影装置OLYMPUS PM-20を用いた。

CMA染色像15核板を調査し、CMAバンドパターンによる染色体の分類を行った。CMAバンドパターンの鮮明な10核板のQM染色像を用いて、写真上で短腕および長腕を測定し、その和を染色体長とした。さらに、CMA(+)領域の相対的な大きさや染色体の形態的特徴および染色体長によるカンキツ染色体の識別の有効性を検討した。その指標に基づいて明確に再分類できた核板

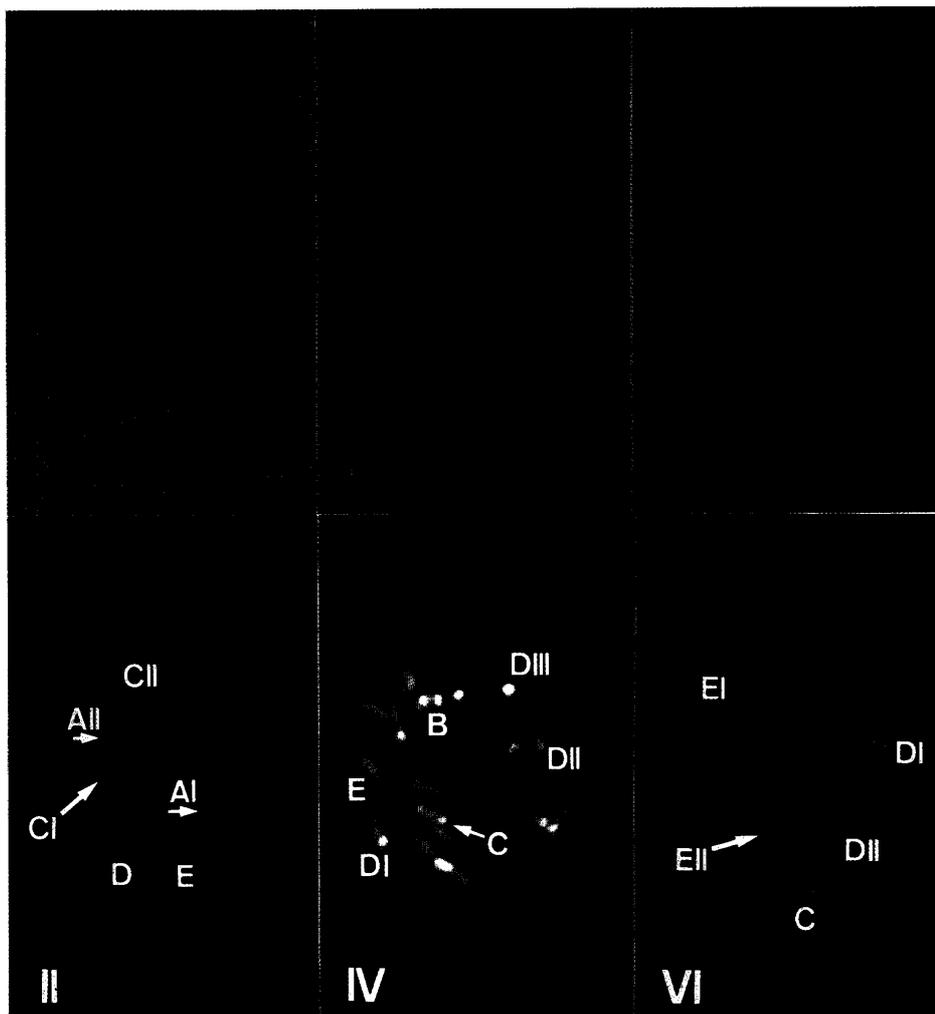


Fig. 1. Chromosomes of ‘Tanikawa-Buntan’ (I, II), ‘Yoshida-Ponkan’ (III, IV) and ‘Mukaku-Kishu’ (V, VI) stained with Giemsa (I, III, V) and CMA (II, IV, VI). Scale bar = 5  $\mu$ m.

6~10核板を用い、染色体長の比較を再度行った。

## 結 果

‘谷川文旦’の染色体構成は、15核板全てにおいて3A+2C+4D+9Eであった(第1図I, II, 第1表)。3本のA型染色体および2本のC型染色体は、各々、染色体長が有意に異なり、互いに識別することができた(第2表)。9本のE型染色体のうち、染色体長の長い3本は染色体長が有意に異なり、互いに識別できた。残りの6本は染色体長に基づき、長い2本、中程度の3本、最も短いもの1本に分けられた。その結果、E型染色体を6つのグループに分けることができた。3本のA型染色体のうち、1本は動原体近傍のCMA(+)領域が両端のものに比べて大きかった。残りの2本は、動原体近傍および二次狭窄のある腕の端部のCMA(+)領域の蛍光がやや小さかった。前者をA-I, 後者をA-IIとした(第1図II)。2本のC型染色体は、両端のCMA(+)領域の大きさが同程度のものと一方のCMA(+)領域がやや小さいものに識別できた。前者をC-I, 後者をC-II(第1図II)とした。この分類に基づき、10核板について染色体長の比較を再度行った(第2表)。2本のA-II型染色体は染色体長が有意に異なり、互いに識別できた。C-I型染色体とC-II型染色体は、CMA(+)領域の大きさだけでなく、染色体長も有意に異なった。E型染色体は前述同様に6つのグループに分けられた。

‘吉田ポンカン’の染色体構成は、15核板中10核板において、1B+1C+9D+7Eであった(第1図III, IV, 第1表)。残りの5核板では、分染パターンが不明瞭で染色体構成を明らかにできなかった。以下の種および品種においても、同様の理由から染色体構成を明確に判断できない核板があった。いずれの型の染色体も染色体長に有意差はなく、互いを識別することができなかった(第3表)。D型染色体は、CMA(+)領域の大きさが中程度のもの7本、小さいもの1本、大きいもの1本であった。前からD-I, D

**Table 1.** CMA banding patterns and chromosome compositions of ‘Tanikawa-Buntan’ pummelo, ‘Yoshida-Ponkan’, ‘Mukaku-Kishu’ and sour orange.

Cultivar	CMA banding patterns and chromosome compositions	Number of cells <sup>z</sup>
‘Tanikawa-Buntan’	3A <sup>y</sup> +2C+4D+9E	15 (15)
‘Yoshida-Ponkan’	1B+1C+9D+7E	10 (15)
‘Mukaku-Kishu’	1C+8D+9E	12 (15)
sour orange	1B+2C+8D+7E	10 (15)

<sup>z</sup> Figures in parenthesis are number of cells observed.

<sup>y</sup> A: two terminal CMA (+) regions and a proximal one, B: one terminal CMA (+) region and a proximal one, C: two terminal CMA (+) regions, D: one terminal CMA (+) region, E: no CMA (+) region.

-II, D-IIIとし(第1図IV), 6核板について染色体長の比較を再度行った(第3表)。いずれの型の染色体も染色体長に有意差はなく、互いに識別することができなかった。

‘無核紀州’の染色体構成は、15核板中12核板において、1C+8D+9Eであった(第1図V, VI, 第1表)。9本のE型染色体のうち、染色体長の最も長い1本は、他の染色体と染色体長が有意に異なり識別できた(第4表)。C型染色体は一方の端部のCMA(+)領域が他方に比べ小さかった。D型染色体は、CMA(+)領域の大きさが中程度のもの5本、小さいもの3本であった。前者をD-I, 後者をD-IIとした(第1図VI)。E型染色体の1本は短腕端部から極小の断片が伸長していた。これをE-IIとし、その他のE型染色体をE-Iとした。8核板について染色体長の比較を再度行ったが、いずれの型の染色体も染色体長に有意差はなく、互いに識別することができなかった(第4表)。

**Table 2.** CMA banding patterns and chromosome lengths in ‘Tanikawa-Buntan’ pummelo.

	Classification without relative sizes of the CMA (+) regions		Classification with relative sizes of the CMA (+) regions	
	CMA band <sup>z</sup>	Chromosome length (μm)	CMA band <sup>y</sup>	Chromosome length <sup>x</sup> (μm)
1	A	4.09a <sup>w</sup>	A-I	4.06a
2	A	3.81bc	A-II	3.85ab
3	A	3.40d	A-II	3.40c
4	C	3.97ab	C-I	3.28cd
5	C	3.28de	C-II	3.97a
6	D	3.08ef	D	3.08de
7	D	2.92fgh	D	2.92ef
8	D	2.69hi	D	2.69fg
9	D	2.47ij	D	2.47gh
10	E	3.65c	E	3.65b
11	E	3.35d	E	3.35c
12	E	3.05ef	E	3.05de
13	E	2.73gh	E	2.73fg
14	E	2.61hi	E	2.61g
15	E	2.32jk	E	2.32hi
16	E	2.22jk	E	2.22hi
17	E	2.09k	E	2.09i
18	E	1.82l	E	1.82j

<sup>z</sup> Confer Table 1.

<sup>y</sup> A-I: a proximal CMA (+) region larger than two terminal ones, A-II: proximal and terminal CMA (+) regions smaller than another terminal one, C-I: two same-sized CMA (+) regions, C-II: one CMA (+) region larger than another one.

<sup>x</sup> Average in 10 cells.

<sup>w</sup> Figures followed by the same letter are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

ダイダイの染色体構成は、15核板中10核板において、1B+2C+8D+7Eであった(第2図I, II, 第1表)。C型染色体のうち1本は、二次狭窄部分が大きく伸長しており、一方の端部のCMA(+)領域が非常に小さく、他の種および品種に見られるC型染色体とは明らかに異なっていた。残り5核板のうち2核板では、このC型染色体に代わり、動原体近傍のCMA(+)領域が非常に弱いA型染色体が観察された(第2図III, IV)。2本のC型染色体は染色体長が有意に異なり、互いに識別できた(第5表)。7本のE型染色体のうち、染色体長の長い2本は、染色体長が有意に異なり、互いに識別できた。残りの5本の染色体は、長い2本と短い3本に分けられた。その結果、7本のE型染色体を4つのグループに分けることができた。一方の端部のCMA(+)領域がやや小さいC型染色体をC-II, 狭窄部分が伸長しているC型染色体をC-IIIとした(第1図II)。D型染色体は、CMA(+)領域の大きさが中程度のもの4本、小さいもの2本、大きいもの2本であった。前からD-I, D-II, D-IIIとし、8核板について染色体長の比較を再度行った(第5表)。2本のD-II型染色体は染色体長が有意に異なり、互いに識別できた。E型

**Table 3.** CMA banding patterns and chromosome lengths in 'Yoshida-Ponken'.

Classification without relative sizes of the CMA (+) regions		Classification with relative sizes of the CMA (+) regions		
CMA band <sup>z</sup>	Chromosome length (μm)	CMA band <sup>y</sup>	Chromosome length <sup>x</sup> (μm)	
1	B	3.60ab <sup>w</sup>	B	3.19ab
2	C	3.25abcd	C	2.64bcde
3	D	4.09a	D-I	3.35a
4	D	3.87a	D-I	3.19ab
5	D	3.59ab	D-I	2.90abcd
6	D	3.36abcd	D-I	2.73bcde
7	D	3.25abcd	D-I	2.67bcde
8	D	3.14abcd	D-I	2.44cde
9	D	2.89abcd	D-I	2.16ef
10	D	2.54bcd	D-II	2.32def
11	D	2.16d	D-III	2.89abcd
12	E	4.12a	E	3.41a
13	E	3.49abc	E	2.92abc
14	E	3.27abcd	E	2.70bcde
15	E	3.11abcd	E	2.64bcde
16	E	2.90abcd	E	2.47cde
17	E	2.54bcd	E	2.16ef
18	E	2.26cd	E	1.88f

<sup>z</sup> Refer to Table 1.

<sup>y</sup> D-I : a medium-sized CMA (+) region, D-II : a relatively smaller CMA (+) region than D-I, D-III : a relatively larger CMA (+) region than D-I.

<sup>x</sup> Average in 6 cells.

<sup>w</sup> Refer to Table 2.

染色体は最も長いもの1本のみが染色体長が有意に異なり、識別できた。

## 考 察

本研究では、4種類のカンキツについて、CMA分染パターンに基づく染色体構成を明らかにした。さらに、CMA(+)領域の相対的な大きさを基に、CMA型の詳細な分類を試みた。

マンダリン類に含まれる'吉田ポンカン'の染色体構成は、ウンシュウミカンやコウジ (*C. leiocarpa* Hort. ex Tanaka) (別府ら, 2001)と同様に単純で、DおよびE型染色体が合わせて16本を占めた。

'無核紀州'は、キシウミカンの無核の変異系である。キシウミカンは中国原産で、古くから日本で栽培されている比較的古いマンダリン類の一つである。'無核紀州'の染色体構成は、コウジの染色体構成(別府ら, 2001)と同一であった。コウジは、日本固有の品種で、タチバナ (*C. tachibana* Tanaka)由来の雑種とみなされている。従

**Table 4.** CMA banding patterns and chromosome lengths in 'Mukaku-Kishu'.

Classification without relative sizes of the CMA (+) regions			Classification with relative sizes of the CMA (+) regions	
CMA band <sup>z</sup>	Chromosome length (μm)	CMA band <sup>y</sup>	Chromosome length <sup>x</sup> (μm)	
1	C	3.53bcd <sup>w</sup>	C	3.53bcd
2	D	3.66bc	D-I	3.68bc
3	D	3.53bcd	D-I	3.60bcd
4	D	3.41cde	D-I	3.34cde
5	D	3.29cdef	D-I	3.15defg
6	D	3.22def	D-I	2.94efgh
7	D	3.11efg	D-II	3.45bcd
8	D	2.99fgh	D-II	3.19def
9	D	2.73hij	D-II	2.83fgh
10	E	4.16a	E-I	4.28a
11	E	3.83b	E-I	3.90ab
12	E	3.39bcde	E-I	3.43bcd
13	E	3.09defg	E-I	3.13defg
14	E	2.79fghi	E-I	2.81fgh
15	E	2.65hij	E-I	2.68ghi
16	E	2.53ijk	E-I	2.51hi
17	E	2.39jk	E-I	2.33i
18	E	2.24k	E-II	2.51hi

<sup>z</sup> Refer to Table 1.

<sup>y</sup> D-I : a medium-sized CMA (+) region, D-II : a relatively smaller CMA (+) region than D-I, D-III : a relatively larger CMA (+) region than D-I, E-I : common type-E chromosome, E-II : a very small fragment elongated from one terminal.

<sup>x</sup> Average in 8 cells.

<sup>w</sup> Refer to Table 2.

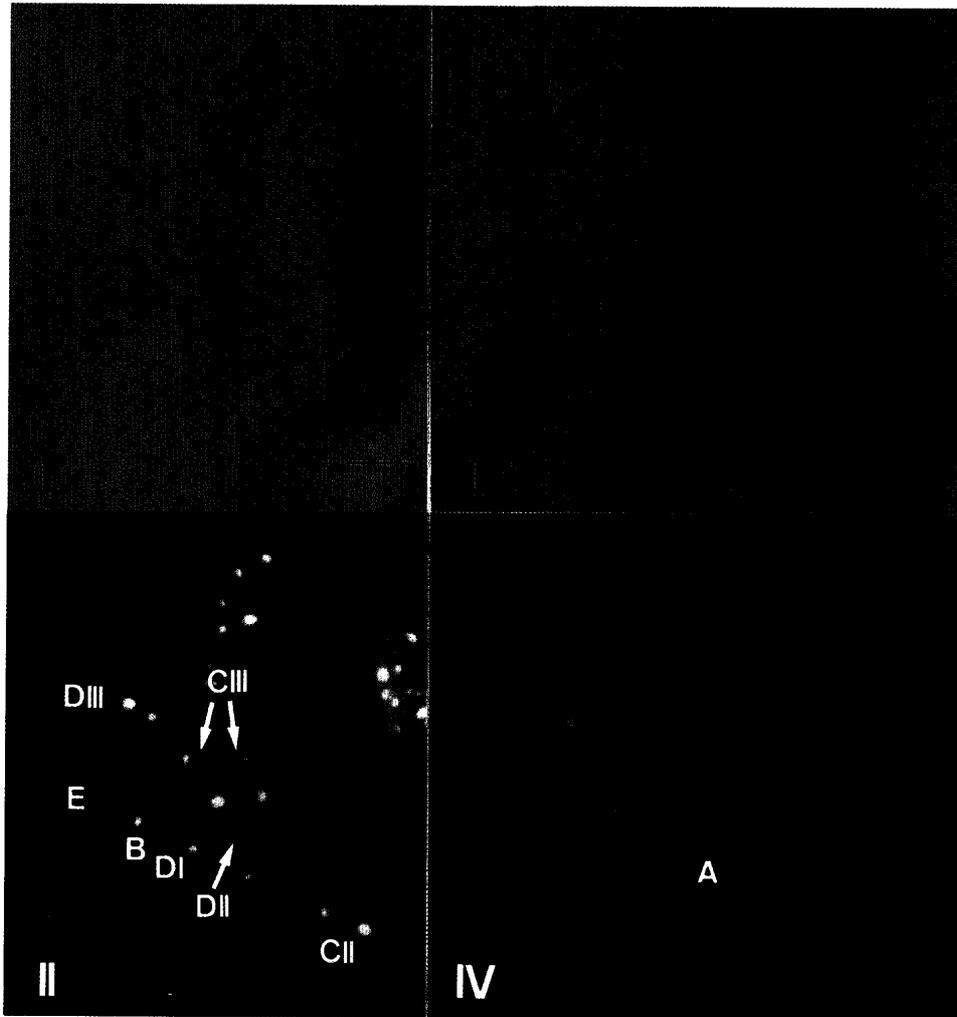


Fig. 2. Chromosomes of sour orange stained with Giemsa ( I , III ) and CMA ( II , IV ). Scale bar = 5  $\mu$ m.

来の報告 (Guerra, 1993; Matsuyamaら, 1996; Mirandaら, 1997, Befuら, 2000; 別府ら, 2001) および本研究で扱った種および品種の染色体構成は非常に多様性に富んでおり, スイートオレンジを除く種および品種は, 同じ種に分類されていても染色体構成が一致しない. スイートオレンジは有性生殖を介在せずに突然変異で品種分化したとされており, 異なる品種でも同じ染色体構成であると考えられる. コウジと '無核紀州' の染色体構成が一致したことは, 両者が非常に近い類縁関係にあることを示唆していると考えられる.

Guerra(1993)は, CMA(+)領域の位置と大きさを指標としてカンキツ染色体を7グループに分類している. しかし, 染色の不均一, 写真撮影時の露光時間の長短, 焼き付けの加減など人為的要因により, 同じ種あるいは品種においても核板によってCMA(+)領域の大きさあるいは蛍光の強さが異なるため, 筆者らはCMA(+)領域の位置のみに着目して染色体の分類を行ってきた.

しかし, 複数のカンキツ類の染色体を種間および品種間で比較すると, 同じCMA型に分類される染色体の中に, CMA(+)領域の相対的な大きさが異なるものが含まれることが認められた. これは, ダイダイのC型染色体

で特に顕著であった. ダイダイの2本のC型染色体のうち1本は第二次狭窄が非常に伸長していたが, これは他の種および品種のC型染色体には見られなかった特徴であり, 明らかに質の異なる染色体であると考えられた. 15核板中2核板では伸長したC型染色体(C-III)の代わりに, 動原体近傍のCMA(+)領域が極めて微弱なA型染色体が観察された. このことから, C-III型染色体は, 第二次狭窄部分の微弱なCMA(+)領域が伸長によって認識されなくなったA型染色体の変異型である可能性も考えられ, これまでのCMA(+)領域の位置に基づく5つの分類には当てはまらないものと思われる. CMA分染パターンに基づく染色体型の分化に関して, A型染色体はC型染色体と関連性が高い可能性が考えられる.

さらに, 1本の染色体上に複数のCMA(+)領域を持つA型, B型およびC型染色体では, 同一染色体上のCMA(+)領域の相対的な大きさにいくつかのパターンが認められた. D型染色体では, CMA(+)領域が相対的に大きいもの, 小さいもの, 中程度のものの3つの型が認められた.

これらのことから, CMA(+)領域の位置と相対的な大きさを指標として, 染色体構成を再検討した結果, 染色

**Table 5.** CMA banding patterns and chromosome lengths in sour orange.

Classification without relative sizes of the CMA (+) regions		Classification with relative sizes of the CMA (+) regions		
CMA band <sup>z</sup>	Chromosome length ( $\mu\text{m}$ )	CMA band <sup>y</sup>	Chromosome length <sup>x</sup> ( $\mu\text{m}$ )	
1	B	3.95cd <sup>w</sup>	B	3.84cd
2	C	4.71a	C- II	4.71a
3	C	4.34b	C- III	4.40ab
4	D	3.94cd	D- I	3.83cd
5	D	3.61de	D- I	3.44def
6	D	3.57de	D- I	3.14d
7	D	3.41ef	D- I	2.99fgh
8	D	3.25efg	D- II	3.21f
9	D	3.06fghi	D- II	2.55hi
10	D	2.86hij	D- III	3.74cd
11	D	2.74ij	D- III	3.41def
12	E	4.07bc	E	4.17bc
13	E	3.59de	E	3.69de
14	E	3.15fgh	E	3.25ef
15	E	2.98ghi	E	3.03fg
16	E	2.52jk	E	2.60ghi
17	E	2.21kl	E	2.30ij
18	E	2.04l	E	2.09j

<sup>z</sup> Refer to Table 1.<sup>y</sup> C- II : one CMA (+) region larger than another one, C- III : one CMA (+) region larger than another one and the elongated secondary constriction, D- I : a medium-sized CMA (+) region, D- II : a relatively smaller CMA (+) region than D- I, D- III : a relatively larger CMA (+) region than D- I.<sup>x</sup> Average in 8 cells.<sup>w</sup> Refer to Table 2.

体長では識別できなかった‘吉田ポンカン’、‘無核紀州’およびダイダイのD型染色体を2ないし3のグループに分類することができた。

核板により細胞分裂のステージが異なると考えられること、および前述した人為的要因を考慮すると、写真上のCMA(+)領域の大きさを数値的に比較することが妥当であるとは言えない。しかし、同一核板におけるCMA(+)領域の相対的な大きさが視覚的に明らかに異なる染色体を互いに識別することは可能であり、カンキツ染色体の識別の指標として有効であると考えられる。CMA(+)領域の相対的な大きさを加味した染色体構成を多数のカンキツやその雑種で明らかにすることにより、カンキツ類の類縁関係に関する新たな知見が得られる可能性も考えられる。

## 摘 要

‘谷川文旦’、‘吉田ポンカン’、‘無核紀州’およびダイダイの幼葉を用いて、酵素解離法により染色体標本を作製

し、ギムザ、クロモマイシンA<sub>3</sub>(CMA)、キナクリンマスタード(QM)で染色し、染色体長の調査およびCMA分染パターンに基づく染色体の分類を行った。

CMA染色においては、A型からE型の5種類の特徴的な分染パターンが観察された。染色体構成は、‘谷川文旦’では3A+2C+4D+9E、‘吉田ポンカン’では1B+1C+9D+7E、‘無核紀州’では1C+8D+9E、ダイダイでは1B+2C+8D+7Eであった。‘無核紀州’の染色体構成は、同じマンダリン類であるコウジと一致した。

ダイダイでは、他の種および品種ではみられなかった、狭窄部分が非常に伸長したC型染色体が観察された。また、同じCMA型に分類される染色体に、CMA(+)領域の相対的な大きさの異なるものが含まれることが認められた。CMA(+)領域の相対的な大きさに基づき、染色体長では識別できなかったD型染色体を‘無核紀州’では2グループに、ダイダイでは3グループに分類することができた。

これらのことから、CMA(+)領域の相対的な大きさは、カンキツ染色体の識別の指標として有効であり、これに基づく染色体構成を明らかにすることにより、カンキツ類の類縁関係について新たな知見を得られる可能性が示唆された。

謝 辞 高知県農業技術センター果樹試験場からは実験材料の一部を提供して頂きました。ここに記して、感謝の意を表します。

## 引用文献

- 別府まゆみ・北島 宣・長谷川耕二郎. 2001. クロモマイシンA<sub>3</sub>(CMA)染色の分染パターンに基づく数種カンキツの染色体構成. 園学雑. 70: 83-88.
- Befu, M., A. Kitajima, X. L. Yang and K. Hasegawa. 2000. Classification of ‘Tosa-Buntan’ pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), ‘Washington’ navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69: 22-28.
- Fukui, K. and K. Iijima. 1991. Somatic chromosome map of rice by imaging methods. Theor. Appl. Genet. 81: 589-596.
- Guerra, M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. Heredity 71: 234-241.
- Iijima, K., K. Kakeda and K. Fukui. 1991. Identification and characterization of somatic rice chromosomes by imaging methods. Theor. Appl. Genet. 81: 597-605.
- Matsuyama, T., T. Akihama, Y. Ito, M. Omura and K. Fukui. 1996. Characterization of heterochromatic regions in ‘Trovia’ orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by the fluorescent staining and FISH methods. Genome

39: 941-945.

Miranda, M., F. Ikeda, T. Endo, T. Moriguchi and M. Omura.

1997. Comparative analysis on the distribution of

heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella*  
chromosomes. *Chromosome Research* 5: 86-92.