

葉緑体DNA多型によるツバキ属園芸品種‘炉開き’と‘田毎の月’の母系祖先種の解明

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者名	谷川,奈津 伴,雄介 森田,裕将 中山,真義 柴田,道夫
発行元	園芸学会
巻/号	12巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 9-14
発行年月	2013年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



葉緑体 DNA 多型によるツバキ属園芸品種 ‘炉開き’ と ‘田毎の月’ の母系祖先種の解明

谷川奈津*・伴 雄介^a・森田裕将^b・中山真義・柴田道夫^c

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所 305-8519 茨城県つくば市藤本

Identification of Maternal Ancestor Species of Camellia Cultivars ‘Robiraki’ and ‘Tagoto-no-tsuki’ by Chloroplast DNA Polymorphisms

Natsu Tanikawa*, Yusuke Ban^a, Yasumasa Morita^b, Masayoshi Nakayama and Michio Shibata^c

NARO Institute of Floricultural Science, Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-8519

Abstract

The majority of ornamental camellia cultivars are derived from *Camellia japonica*. *Camellia japonica* subsp. *rusticana*, *C. sasanqua*, and *C. reticulata* have also been utilized. The four species/subspecies and their hybrids form the majority of modern camellias; however, some cultivars may have arisen from other species because of their unique morphological and physiological characteristics. Based on these characteristics and the location where it was discovered, ‘Robiraki’ was considered to be a natural interspecific hybrid between *C. sinensis* and *C. japonica* subsp. *rusticana*. Molecular analyses indicated that the seed parent was *C. japonica* or *C. japonica* subsp. *rusticana*. ‘Tagoto-no-tsuki’, thought to be one of the *sasanqua* cultivars, was assumed to be derived from the native Chinese species *C. oleifera* based on the morphological characteristics. Chloroplast DNA shows maternal inheritance in the genus *Camellia*. PCR-RFLP analysis using chloroplast DNA of the *atpI-atpH* region digested by *TaqI* and the *trnL-trnF* region digested by *TasI* (*TspEI*) can distinguish *C. japonica* from *C. japonica* subsp. *rusticana* and *C. sasanqua* from *C. oleifera*. Here, we conducted PCR-RFLP analyses, and found coincident polymorphisms between ‘Robiraki’ and *C. japonica* subsp. *rusticana* and between ‘Tagoto-no-tsuki’ and *C. oleifera*, respectively. Because the DNA sequences of the *atpI-atpH* region also coincided respectively, we concluded that the maternal ancestor of ‘Robiraki’ is *C. japonica* subsp. *rusticana*, and that of ‘Tagoto-no-tsuki’ is *C. oleifera*.

Key Words : interspecific hybrid, PCR-RFLP

キーワード : PCR-RFLP, 種間雑種

緒 言

花の観賞を目的とするツバキの園芸品種は、日本に自生するヤブツバキ (*Camellia japonica* L.) を中心に、ユキツバキ (*C. japonica* subsp. *rusticana* (Honda) Kitamura), サザンカ (*C. sasanqua* Thunb.), 中国に自生するトウツバキ (*C. reticulata* Lindl.) をもとに成立し、これらの種内変異あるいは種間雑種から発達してきた (Chang・Bartholomew, 1984; 箱田, 1987). ツバキの園芸品種の中には、独特の形態的、生理的特徴を持つことから上記以外のツバキ属植物の関与が議論されているものも存在する. 優れた品種の成立起源の解明は、今後の交配育種計画の有益な情報になると期待

される. 従来、ツバキ園芸品種の成立起源については、形態的あるいは生理的特性についての比較から研究が進められてきた. 近年ではこれに加え、分子生物学的手法による解明も求められるようになりつつある.

多くの植物で母性遺伝をする葉緑体 DNA は、母系祖先を調べるよい指標となる. ツバキ属植物においても葉緑体 DNA は母性遺伝をする (Corriveau・Coleman, 1988; 黒岩・堀, 1990; Tanikawa ら, 2010). 著者らは、ツバキ属植物の葉緑体 DNA の *atpI-atpH* 領域について制限酵素 *TaqI* による PCR-RFLP 解析を行い、多くの多型を検出できることを明らかにした (Tanikawa ら, 2008). この *atpI-atpH* 領域の多型は、これまでに 2 つの重要な園芸品種群であるハルサザンカ (*C. vernalis* Makino) およびワビスケツバキの母系祖先種の解明に利用されている (Tanaka ら, 2005; Tanikawa ら, 2010). 現在のサザンカ園芸品種の成立には、サザンカだけではなく他のツバキ属の種が関与していると考えられている (箱田ら, 1974). サザンカの園芸品種は、主に形態的特徴をもとにして、サザンカ品種群、カンツバキ品種群、

2012 年 2 月 14 日 受付. 2012 年 7 月 5 日 受理.

本研究の一部は園芸学会平成 23 年度秋季大会で発表した.

* Corresponding author. E-mail: natsu@affrc.go.jp

^a現在: 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所

^b現在: 香川大学農学部

^c現在: 東京大学大学院農学生命科学研究科

(a)



(b)



第1図 ‘炉開き’の花(a)と樹(b)

(a)



(b)



第2図 ‘田毎の月’の花(a)と樹(b)

ハルサザンカ品種群およびタゴトノツキ品種群の4群に大別され、それぞれの成立起源について議論されている(箱田ら, 1974). サザンカとヤブツバキの種間雑種から発達したと考えられているハルサザンカ品種群について(Chang・Bartholomew, 1984; 箱田ら, 1974; Tanaka ら, 2005), Tanaka ら(2005)は, *atpI-atpH* 領域のPCR増幅産物の長さがサザンカでは約800 bpであるのに対し, ヤブツバキでは約1,200 bpであることを利用して, ハルサザンカ品種群がサザンカを母系祖先種として成立していることを示した. ワビスケツバキ品種群は, ワビスケツバキの1品種である‘太郎冠者’の子孫から成立し, ‘太郎冠者’は中国に自生する

C. pitardii Cohen Stuart var. *pitardii* と日本のヤブツバキの雑種から生じた品種であるという説が有力である(桐野, 1986; Tanaka ら, 2001). 著者らは, *atpI-atpH* 領域のPCR-RFLPと一塩基多型の解析を行い, ‘太郎冠者’の母系祖先種が *C. pitardii* var. *pitardii* であること, および多くのワビスケツバキ品種が‘太郎冠者’を母系祖先として成立したことを支持する結果を得た(Tanikawa ら, 2010). このように, ツバキ属園芸品種の母系祖先を解明する手段として, 葉緑体DNAの多型解析の有効性が示されている.

本研究では, 葉緑体DNAの多型解析により, 成立起源が議論されている2つの品種‘炉開き’(第1図)と‘田毎

の月’ (第2図) の母系祖先種の同定を試みた。‘炉開き’は小輪の桃色花の品種で、非常に早咲きで9月頃から開花し、葉が密に茂ってコンパクトな樹形となる特徴を有する品種である (第1図)。葉にカフェインを含有し (Nagata・Sakai, 1985)、花柄があって萼と苞が区別できるというチャ (*C. sinensis* (L.) O. Kuntze) の特性と、花糸が黄色といったユキツバキの形態的特徴を併せて持つこと、発見された新潟県栃尾市 (現長岡市) がユキツバキの自生・栽培の多い地域であること、さらに原木の推定樹齢から、‘炉開き’はチャとユキツバキの自然交雑によって100年以上前に生じた品種と考えられている (萩屋・甲, 1981)。チャは、江戸時代には九州から東北地方に至る各地で栽培されるようになっていた (大石, 2004)。明治初期に出版され、当時の各地の特産品を収録した日本地誌略物産弁 (床井・斎藤, 1979) には、「古志郡長岡辺ニテモ、作ル」との記載がある。萩屋・甲 (1981) は、新潟県下の農家の垣根などにチャがしばしば植えられている様子から、城下町として栄えた栃尾市でも昔は自家用としてチャが多く植えられていたと推測している。本来秋咲きであるチャの花蕾が、この地域の豪雪によって積雪下で越冬し、春になって開花したことで春咲きのユキツバキと交雑した可能性、あるいは、ユキバタツバキと呼ばれるユキツバキとヤブツバキの交雑雑種で早咲き性のものが多く出現することから、秋咲き性のユキバタツバキがチャと交雑した可能性が考えられている (萩屋・甲, 1981)。田中ら (2003) は、‘炉開き’について RAPD や SSR マーカーを用いた分析を行い、その雑種性を確認するとともに、花粉親がチャであり、種子親がユキツバキあるいはヤブツバキであることを示している。

一方、サザンカ園芸品種として扱われ、タゴトノツキ品種群の代表品種である‘田毎の月’は、昭和初期に石井 (1933) により初めて記録された品種で (箱田ら, 1974)、純白小輪の花が咲き、赤味の強い木肌が特徴である (第2図)。葉が大きくて厚く、光沢がないといった他のサザンカ品種とは異なる形態的特徴から、‘田毎の月’は中国自生種のユチャ (*C. oleifera* Abel) であると考えられている (箱田ら, 1974)。箱田ら (1974) は、大正時代に中国からユチャの種子油が輸入され、暖地においてユチャが試作されたことから、‘田毎の月’はその際に生き残った個体であろうと推測している。

ツバキ属植物では、葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域を制限酵素 *TspEI* で消化する PCR-RFLP 分析でも多くの多型を検出できることが報告されている (Tateishi ら, 2007)。*atpI-atpH/TaqI* と *trnL-trnF/TspEI* の2つの PCR-RFLP 分析を組み合わせることにより、ヤブツバキとユキツバキおよびサザンカとユチャの区別が可能である (Tanikawa ら, 2008; Tateishi ら, 2007, 2010)。そこで、‘炉開き’および‘田毎の月’の成立において関与が議論されているツバキ属植物について、*atpI-atpH/TaqI* および *trnL-trnF/TspEI* の PCR-RFLP 分析を行うとともに、*atpI-atpH* 領域の DNA 塩基配列を解

析して比較することにより、これらの品種の母系祖先種の同定を試みた。なお、制限酵素 *TspEI* が入手困難であったため、本研究では *TspEI* と同じ塩基配列を認識するアイソシゾマーの *TasI* を用い、*trnL-trnF/TasI* の PCR-RFLP 分析を行った。

材料および方法

1. 供試材料

花き研究所で栽培している‘炉開き’、‘田毎の月’、ユキツバキ (NIFS No. 732)、ヤブツバキ (No. 606, No. 1079 および‘玉之浦’)、チャ‘とよか’、サザンカ (No. 1099) およびユチャ (No. 1115) より、新葉または葉が未展開の状態である「たけのこ芽」を採取した。実験に供試するまで -80°C で保存した。

2. DNA 抽出および PCR-RFLP 分析

液体窒素下で粉碎した供試材料から、ISOPLANT II (ニッポンジーン) を使って葉緑体 DNA を含むゲノム DNA を抽出し、CHROMA SPIN+TE-1000 Columns (Clontech Laboratories) で精製して PCR に用いた。葉緑体 DNA の *atpI-atpH* 領域の PCR 増幅には、プライマー 5'-CCGCAGCTTATATAGGCGAA-3' および 5'-TTGACCAACTCCAGGTCCAA-3' (Tanikawa ら, 2008) を使用した。葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域の PCR には、プライマー 5'-GGTCAAGTCCCTCTATCCC-3' および 5'-ATTGAACTGGTGACACGAG-3' (Tateishi ら, 2007) を使用した。*atpI-atpH* と *trnL-trnF* 領域の PCR による増幅は、いずれも以下の溶液濃度および反応条件によって行った。PCR 反応溶液は、ゲノム DNA が $2\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、dNTP が 0.2 mM 、5'側および3'側プライマーがそれぞれ $0.15\text{ }\mu\text{M}$ 、*Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ) が $0.05\text{ units}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10\times\text{ Ex Taq Buffer}$ が $1\times$ の濃度になるように調製し、 $20\text{ }\mu\text{L}$ の容量とした。PCR 反応は、 $94^{\circ}\text{C}\cdot 30\text{ 秒}$ の前処理の後、 $94^{\circ}\text{C}\cdot 30\text{ 秒}$ 、 $60^{\circ}\text{C}\cdot 2\text{ 分}$ 、 $72^{\circ}\text{C}\cdot 3\text{ 分}$ を35サイクル繰り返し、 $72^{\circ}\text{C}\cdot 7\text{ 分}$ の保温を行って終了した。*atpI-atpH* 領域の PCR 増幅産物は、 $0.15\text{ units}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ の制限酵素 *TaqI* (ニッポンジーン) により 65°C で消化した後、4%濃度のアガロースゲルで電気泳動を行い、UV 光下でバンドパターンを観察した。*trnL-trnF* 領域の PCR 増幅産物は、 $0.2\text{ units}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ の制限酵素 *TasI* (Fermentas UAB) により 65°C で消化した後、6%濃度のアガロースゲルで電気泳動を行い、UV 光下でバンドパターンを観察した。

3. *atpI-atpH* 領域のクローニングとシーケンス解析

PCR-RFLP 分析では検出されない多型についても詳細に調査するため、‘炉開き’と‘田毎の月’の *atpI-atpH* 領域の PCR 増幅産物の DNA 塩基配列の解析を行った。‘炉開き’と‘田毎の月’の *atpI-atpH* 領域を以下の条件で PCR により増幅した。PCR 反応溶液は、ゲノム DNA が $7\sim 14\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、dNTP が 0.2 mM 、 MgSO_4 が 1.5 mM 、5'側および3'側プライマーがそれぞれ $0.3\text{ }\mu\text{M}$ 、KOD DNA ポリメラーゼ (KOD-Plus-, 東洋紡) が $0.02\text{ units}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10\times\text{ Buffer}$

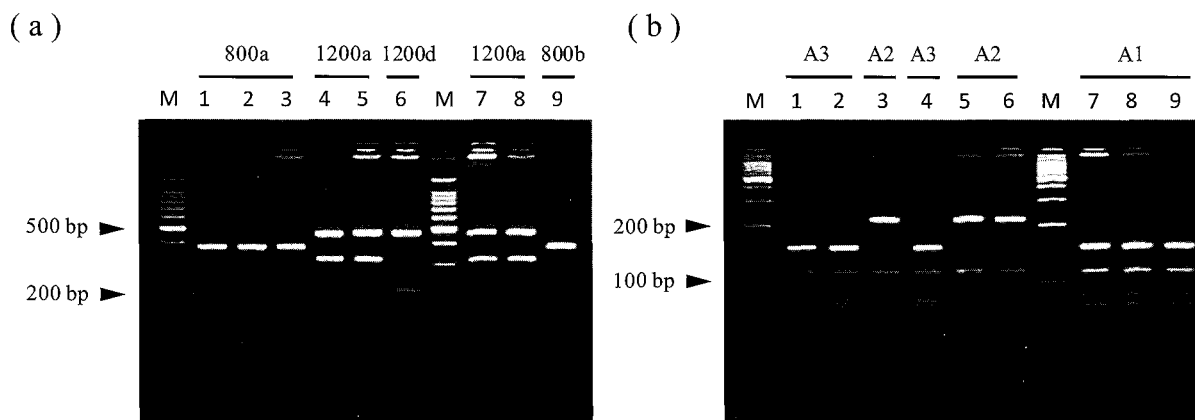
for KOD-Plus- Ver. 2 (東洋紡) が 1× の濃度になるように調製し, 10 または 20 μ L の容量とした. PCR 反応は, 94°C・2 分の前処理の後, 94°C・15 秒, 60°C・30 秒, 68°C・3 分を 35 サイクル繰り返した. 得られた PCR 増幅産物を, Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) を使って pCR Blunt または pCR 4Blunt TOPO ベクターに挿入してクローニングを行い, M13 Forward プライマーと M13 Reverse プライマーを使って DNA シークエンサー (3100 または 3130 xl, Applied Biosystems) により解析を行った. 得られた ‘炉開き’ と ‘田毎の月’ の塩基配列について, それぞれ既報 (Tanikawa ら, 2008) のユキツバキ (No. 732, DDBJ AB364654), およびユチャ (No. 1115, AB364667) の塩基配列と比較を行った. なお, *atpI-atpH* 領域には, 十数塩基のアデニンが連続する部分が 2 か所存在する. この箇所は正確なアデニンの数を特定できないため比較対照から除外した.

結果および考察

ツバキ属植物では, *atpI-atpH/TaqI* の PCR-RFLP で 800a, 800b, 800c, 1200a, 1200b, 1200c, 1200d および 1200e の 8 種類の多型が検出され (Tanikawa ら, 2008), *trnL-trnF/TspEI* の PCR-RFLP で A1 ~ A5 までの 5 種類の多型が検出されている (Tateishi ら, 2007). これまでの研究から (Tanikawa ら, 2008; Tateishi ら, 2007, 2010), 日本に分布するヤブツバキには 800a・A2 型, 1200a・A2 型, 1200d・A2 型の 3 種類の多型が存在することが示されている. また, ユキツバキには 800a・A3 型と 1200a・A2 型の 2 種類の多型が

存在すると報告されている. サザンカは 800b・A1 型, ユチャは 1200a・A1 型であると報告されている. チャは *atpI-atpH/TaqI* が 1200a 型であり, *trnL-trnF/TspEI* は未調査である. 以上の情報に基づいて, 本研究では, ヤブツバキについて 800a・A2 型, 1200a・A2 型, 1200d・A2 型を持つ系統および品種を選び, ユキツバキは 800a・A3 型を持つ系統を選び, それぞれ多型の指標として用いた. サザンカ, ユチャおよびチャについても, それぞれ 1 系統・品種を多型の指標として用いた (第 3 図). PCR-RFLP 分析の結果, チャは 1200a・A3 型であった (第 3 図, レーン 4). ‘炉開き’ の多型は, ヤブツバキおよびチャでは検出されず, ユキツバキで検出される多型の 800a・A3 型を示した (第 3 図, レーン 1). 一方, ‘田毎の月’ は, ユチャと同じ 1200a・A1 型を示した (第 3 図, レーン 7).

atpI-atpH 領域の DNA 塩基配列について, より詳細な多型の比較を行うために, ‘炉開き’ と ‘田毎の月’ の *atpI-atpH* 領域の DNA 塩基配列を決定し, 既報 (Tanikawa ら, 2008) のユキツバキとユチャの配列と比較した (第 4 図). その結果, ‘炉開き’ の配列はユキツバキの配列 (AB364654) と一致した. また, ‘田毎の月’ の配列はユチャの配列 (AB364667) と一致した. ‘田毎の月’ とユチャの配列では, 5' 末端側から 114 番目の塩基がグアニンであった (第 4 図). 著者らがこれまでに解析した 26 種 (亜種や変種を含む) のツバキ属植物の *atpI-atpH* 領域の DNA 塩基配列の中で (Tanikawa ら, 2008, 2010), この 5' 末端側から 114 番目の塩基がグアニンであったのはユチャのみであり, 他



第 3 図 PCR-RFLP バンドパターン

(a) *atpI-atpH/TaqI* (b) *trnL-trnF/TspEI*

レーン 1, ‘炉開き’ (800a・A3)

レーン 2, ユキツバキ No. 732 (800a・A3)

レーン 3, ヤブツバキ ‘玉之浦’ (800a・A2)

レーン 4, チャ ‘とよか’ (1200a・A3)

レーン 5, ヤブツバキ No. 1079 (1200a・A2)

レーン 6, ヤブツバキ No. 606 (1200d・A2)

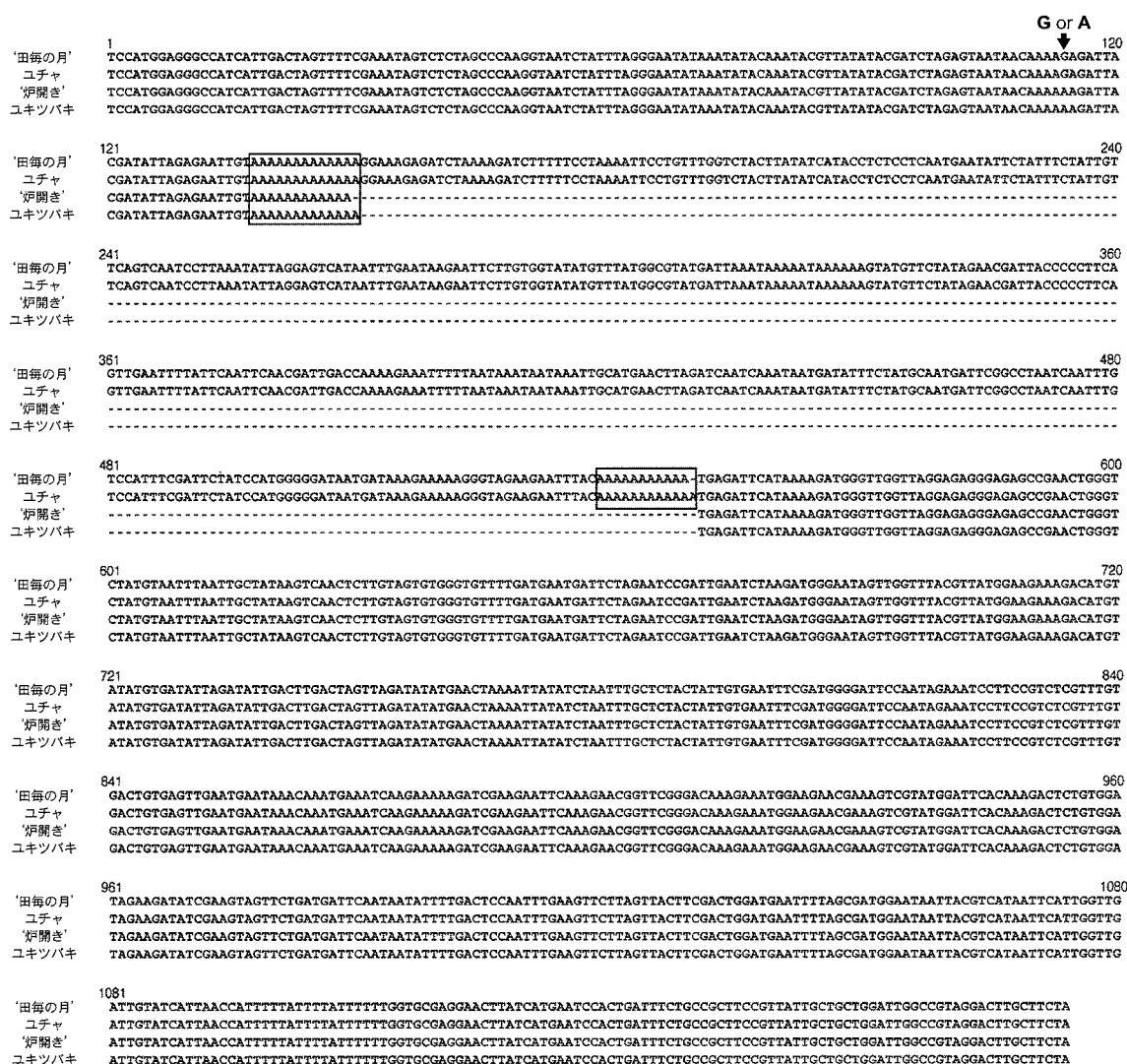
レーン 7, ‘田毎の月’ (1200a・A1)

レーン 8, ユチャ No. 1115 (1200a・A1)

レーン 9, サザンカ No. 1099 (800b・A1)

M, 100 bp DNA Ladder

多型の分類は, *atpI-atpH/TaqI* は Tanikawa ら (2008), *trnL-trnF/TspEI* は Tateishi ら (2007) に基づく



第4図 '炉開き'、'田毎の月'、ユキツバキ (DDBJ AB364654) およびユチャ (AB364667) の *atpI-atpH* 領域の DNA 塩基配列
矢印が 5' 末端側から 114 番目の塩基
ハイフン (-) はギャップを示す
黒色囲み部分は、連続するアデニンの正確な数が決定できないため比較の対象としない
ツバキ属植物では、*atpI-atpH* 領域の PCR 増幅産物の長さが約 800 bp であるものと約 1,200 bp であるものの 2 種類が存在する (Tanikawa ら, 2008)
800 bp 型では約 400 bp の連続する配列が欠失している

の種ではすべてアデニンであった。このユチャに特徴的な多型を含めて、ユチャと '田毎の月' の *atpI-atpH* 領域の DNA 塩基配列は一致していた。

以上の葉緑体 DNA の PCR-RFLP 分析および塩基配列の解析から、'炉開き' の母系祖先種がユキツバキであり、'田毎の月' の母系祖先種がユチャであることが示された。これまで '炉開き' の種子親にユキツバキが関与していることについて DNA 情報に基づく判別には至っていなかった。'炉開き' の葉緑体 DNA の多型がチャヤブツバキの多型と一致せず、ユキツバキの多型と一致することを示した今回の結果は、'炉開き' の種子親がユキツバキまたはユキバツバキであることを示すものである。また、'田毎の月' の葉緑体 DNA の多型がユチャと一致したことは、'田毎の月' が

ユチャに由来する品種であることを示すものである。

ハルサザンカやワビスケツバキ品種における研究とともに、本研究は成立起源が議論されてきたツバキ属園芸品種の母系祖先種の解明に、葉緑体 DNA の多型解析が有効な手法であることを示すものである。本研究ではさらに複数の葉緑体 DNA 領域を組み合わせた多型解析が有効であることが示された。ツバキ属植物のように、交配から開花までに長い年月を必要とする植物においては、既存の品種の成立起源に関する情報は、交配育種の効率化のために役立つものと考えられる。ツバキ属園芸品種では、近代以前に出現し、その成立起源に関する記録が残されていないものが多い。また、作出されてから長い年月が経過すると、その起源に関する情報があいまいになる場合も考えられる。

そうしたツバキ属園芸品種の成立起源の解明に、今後も葉緑体 DNA 多型解析が役立てられるものと期待する。

摘 要

ツバキ属の園芸品種は、主にヤブツバキをもとに成立しており、次いでユキツバキ、サザンカおよびトウツバキが利用されてきた。これらの種内変異および種間雑種から現在のツバキ園芸品種の大部分が成り立っている。いくつかの園芸品種は形態的、生理的に独特の特徴を有することから、その成立において他のツバキ属植物の関与が論じられている。‘炉開き’は、その特性と発見された地域から、チャとユキツバキの自然交雑によって生じたと考えられている。分子生物学的な調査から、その種子親がヤブツバキあるいはユキツバキであることが示されている。また、サザンカ園芸品種に分類される‘田毎の月’は、形態的特徴から中国原産のユチャから成立した品種と考えられている。ツバキ属植物において葉緑体 DNA は母性遺伝する。葉緑体 DNA の *atpI-atpH* 領域と制限酵素 *TaqI* や *trnL-trnF* 領域と *TasI* (*TspEI*) による PCR-RFLP により、ヤブツバキとユキツバキおよびサザンカとユチャの区別が可能である。本研究においてこれらの PCR-RFLP 分析を行った結果、‘炉開き’はユキツバキと、‘田毎の月’はユチャとそれぞれ多型が一致した。さらに *atpI-atpH* 領域の DNA 塩基配列も、それぞれ一致したことから、‘炉開き’の母系祖先種がユキツバキであること、‘田毎の月’の母系祖先種がユチャであることが示された。

引用文献

- Chang, H. T. and B. Bartholomew. 1984. *Camellias*. B. T. Batsford Ltd., London.
- Corriveau, J. L. and A. W. Coleman. 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Amer. J. Bot.* 75: 1443–1458.
- 萩屋 薫・甲 政治. 1981. ユキツバキとチャの自然雑種・「炉開き」. 椿. 20: 6–12.
- 箱田直紀. 1987. わが国に導入されたツバキ属の種の来歴について. 西武舞鶴植研報. 3: 1–5.
- 箱田直紀・武永順次・松本正雄. 1974. サザンカの品種分化に関する史的考察. 農工大農情報. 6: 巻頭および1–65.
- 石井勇義. 1933. 茶梅の品種解説 (二). 実録園芸. 15: 577–580.
- 桐野秋豊. 1986. 茶席の花 椿と侘助. p. 33–54. 文化出版局. 東京.
- 黒岩常祥・堀 輝三. 1990. 母性遺伝の様式と植物の系統. p. 149–188. 研究成果報告書編集委員会編. 文部省特定研究 植物の生活環調節機構の動的解析.
- Nagata, T. and S. Sakai. 1985. Caffeine, flavanol and amino acid contents in leaves of hybrids and species of the section *Dubiae* in the genus *Camellia*. *Japan. J. Breed.* 35: 1–8.
- 大石貞男. 2004. 日本茶業発達史. p. 236–319. 農山漁村文化協会. 東京.
- Tanaka, T., S. Kirino, N. Hakoda, K. Fujieda and T. Mizutani. 2001. Studies on the origin of *Camellia wabiske*. *Proc. Sch. Agric. Kyushu Tokai Univ.* 20: 1–7.
- Tanaka, T., T. Mizutani, M. Shibata, N. Tanikawa and C. R. Parks. 2005. Cytogenetic studies on the origin of *Camellia* × *vernalis*. V. Estimation of the seed parent of *C. × vernalis* that evolved about 400 years ago by cpDNA analysis. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 74: 464–468.
- 田中淳一・太田 (目徳) さくら・武田善行. 2003. ツバキ園芸品種 ‘炉開き’ が種子親ヤブツバキ (*Camellia japonica*) × 花粉親チャ (*C. sinensis*) の種間交雑種であることの RAPD および SSR マーカーによる確認とチャ育種への利用の可能性. 育学研. 5: 149–154.
- Tanikawa, N., T. Onozaki, M. Nakayama and M. Shibata. 2008. PCR-RFLP analysis of chloroplast DNA variations in the *atpI-atpH* spacer region of the genus *Camellia*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 77: 408–417.
- Tanikawa, N., T. Onozaki, M. Nakayama and M. Shibata. 2010. Maternal origin of ‘Tarokaja’ and other wabisuke camellia cultivars indicated by chloroplast DNA variation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 79: 77–83.
- Tateishi, N., M. Oishi, Y. Ozaki and H. Okubo. 2007. Chloroplast DNA variation in the genus *Camellia* with reference to the origin of ‘Tamanoura’. *J. Hort. Sci. Biotech.* 82: 377–382.
- Tateishi, N., Y. Ozaki and H. Okubo. 2010. Chloroplast DNA phylogeography in the genus *Camellia* in Japan. *Acta Hortic.* 885: 367–373.
- 床井 弘・斎藤時泰編纂. 1979. 日本産物誌. p. 98–101. 八坂書房. 東京.