

日本各地に現存するツバキ '有楽' 古木の遺伝的同一性

宮島郁夫¹・尾崎行生¹・猪立山三鈴^{1*}・池松良平^{1**}・大久保 敬¹・五井正憲²

¹九州大学農学部 812-8581 福岡市東区箱崎

²香川大学農学部 761-0795 香川県木田郡三木町

Genetic Identity of Old *Camellia* 'Uraku' Trees Existing in Japan

Ikuko Miyajima¹, Yukio Ozaki¹, Misuzu Itateyama^{1*}, Ryohei Ikematsu^{1**}, Hiroshi Okubo¹ and Masanori Goi²

¹Laboratory of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

²Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0795

Summary

The genetic identity of old *Camellia* 'Uraku' trees, growing in various locations in Japan, was assessed by RAPD analysis.

Four camellia varieties and two seedlings of 'Uraku' were easily distinguishable from 'Uraku' by RAPD analysis, using 51 of 12-mer arbitrary primers. Genetic monomorphism was recognized among the seven lines of old 'Uraku' trees and 'Koshikibu' which was growing at Chofukuji Temple in Kyoto.

Seemingly, these old 'Uraku' trees and 'Koshikibu' are clonal strains which proliferated more than 400 years ago by vegetative propagation.

Key Words: *Camellia*, genetic identity, PCR, RAPD.

緒 言

ツバキ (*Camellia*) 属の園芸品種のなかで、'太郎冠者' は最も古くから知られている品種のひとつであり、元文 4 年 (1739 年) に出版された「本草花蒔絵」にすでにその記載が見られる。この品種は別名 '有楽 (うらく)' と呼ばれ、中輪一重で紫色を帯びた薄桃色の花を咲かせる。'有楽' という品種名は、織田信長の実弟で茶人の織田有楽斎に因むと言われ (北村, 1961), 幹周り 1 m 前後もしくはそれ以上の古木が京都府の由緒ある寺院や旧家、奈良、鳥取および宮崎県など日本各地に点在している (桐野, 1998)。なかでも、宮崎県西都市の市街地から北西約 20 km, 九州山地に連なる地蔵岳から南南東に延びた尾根の中腹に位置する尾八重地区とその周辺には、幹周りが 2 m 以上もある日本最大級の '有楽' の古木群が現存している。

'有楽' は雄ずいが退化した雄性不稔のツバキで、いわゆるワビスケ類の代表的な品種のひとつであるが、種子親としての稔性を有するため、これまで、'有楽' と形態的に類似した実生が数多く得られている。しかし、これ

ら日本各地の '有楽' が実生株か、特定の '有楽' からの栄養繁殖株かは不明である。

近年、多くの植物において類縁関係を明らかにするため、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分析が用いられている (Fahima ら, 1999; Gehrig ら, 1997; Mailer ら, 1994; Whitkus ら, 1998; Wachira ら, 1994)。

本研究は日本各地に現存する '有楽' 古木の RAPD 分析を行い、遺伝的同一性について考察した。

なお、'有楽' は '太郎冠者' の異名同種とされており (Savidge, 1993), 後者のほうが命名時期は早いので、分類学上の正式な品種名は '太郎冠者' であると思われる。しかし、本研究で用いた系統は、京都府長福寺の '小式部' を除き、いずれも '有楽' と呼ばれていることから、本論文ではその呼称に従った。

材料および方法

1. '有楽' とその実生の RAPD 分析

宮崎市内のレジャー施設「こどものくに」保存の '有楽' とその自然交雑実生 2 個体 (No.1, No.2) を供試した。

各個体の葉芽から改変 CTAB 法 (Kobayashi ら, 1998) により全 DNA を抽出した。抽出した DNA を GENE-CLEAN キット (フナコシ) により精製後、TE バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解し、約

2000 年 7 月 10 日 受付. 2000 年 9 月 13 日 受理.

*現在: カバヤ食品 (株)

**現在: (株) 山之内製菓

20 ng・ μl^{-1} になるように調整した。濃度調整した DNA を鋳型として、予備的な実験で容易に多型が得られた CMN-A10 および CMN-A34 の 2 種類の 12 塩基ランダムプライマー (BEX) を用いて RAPD 分析を行った。

PCR 反応液は、20 ng の鋳型 DNA、2.5 μl の 10 × PCR バッファー、0.5 unit の Tth DNA Polymerase (TOYOBO), 0.15 μM のプライマー、200 μM の各 dNTP を混合して最終容量を 25 μl とした。

PCR 反応液にミネラルオイルを重層した後、プログラムテンプコントロールシステム (PC-700, ASTEC) 上で、94℃-30秒の前処理の後、熱変性 (94℃-30秒), アニール (40℃-2分), 伸長反応 (72℃-3分) を 45 サイクル繰り返し、72℃-7分の後処理を行う条件下で DNA を増幅させた。得られた増幅産物をエチジウムブロマイドを含む 1.5 % アガロースゲルで電気泳動し、UV 照射下で観察した。なお、各個体ともそれぞれのプライマーについて 2 回以上反復を行った。

2. 日本各地の‘有楽’古木の遺伝的同一性

日本各地の‘有楽’古木 7 系統、すなわち、京都府の高台寺月真院 (以下、高台寺)、東福寺竜眠庵 (以下、東福寺)、奈良県の大宇陀町、鳥取県家町の大樹寺、宮崎県西都市尾八重地区内の大椎葉、尾八重、樺木尾の各集落の‘有楽’、および、形態的に‘有楽’と酷似する京都府長福寺の‘小式部’、さらに、宮崎市の「こどものくに」と九州大学保存の‘有楽’を供試材料とした (第 1 表)。対照として、ワビスケ類の中から‘土佐有楽’、‘数寄屋’、‘胡蝶侘助’、‘永楽’の 4 品種と長崎県平戸市産の野生ヤブツバキ 1 系統を供試した。

RAPD 分析には 51 種類の 12 塩基ランダムプライマー (CMN-A00~CMN-A50; BEX) を用い、DNA の抽出、

PCR 反応および電気泳動などの方法は 1 に準じた。

結 果

1. ‘有楽’とその実生の RAPD 分析

「こどものくに」保存の‘有楽’とその自然交雑実生での、プライマー CMN-A10 と CMN-A34 を用いて得られた増幅 DNA 断片の電気泳動像を第 1 図に示した。プライマー CMN-A10 を用いた場合、実生 No.2 には 1,150 bp のバンドが見られたが、このバンドは‘有楽’と実生 No.1 には見られなかった。また、プライマー CMN-A34 を用いた場合、‘有楽’と実生 No.2 に見られた 1,150 bp のバンドが実生 No.1 には見られなかった。

2. 日本各地の‘有楽’古木の遺伝的同一性

第 2 図に日本各地の‘有楽’古木 7 系統、‘小式部’、ワビスケ 4 品種およびヤブツバキのプライマー CMN-A10 による RAPD パターンを示した。1,300 bp のバンドは‘土佐有楽’と‘永楽’にのみ見られ、他の系統には見られなかった。同様に、1,150 bp のバンドは‘胡蝶侘助’とヤブツバキにのみ見られた。また、900 bp のバンドは‘数寄屋’とヤブツバキを除くすべての系統で見られた。これに対し、‘有楽’古木 7 系統および‘小式部’の RAPD パターンはすべて同一であった。また、「こどものくに」と九州大学保存の‘有楽’も‘有楽’古木 7 系統や‘小式部’と全く同じバンドパターンであった (データ省略)。

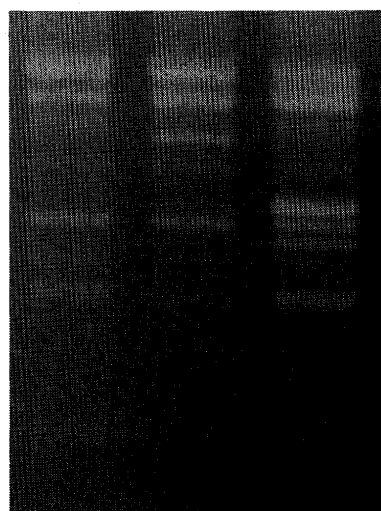
第 2 表に 51 種類のプライマーによる RAPD 分析の結果をまとめた。供試した全 15 系統では、30 種類のプライマーで合計 133 本のバンドが検出され、このうち 21 種類のプライマーで増幅された 59 本のバンドに多型が見られた。一方、‘有楽’9 系統および‘小式部’間では 30 種類のプライマーで合計 120 本のバンドが検出されたが、すべ

Table 1. ‘Uraku’ and other *Camellia* accessions and their locations.

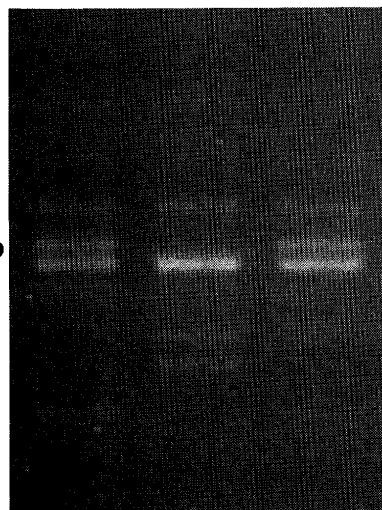
Cultivar or species	Source	Trunk circumference (m)
‘Uraku’	Kodaiji Temple, Kyoto City, Kyoto Pref.	0.93
	Tofukuji Temple, Kyoto City, Kyoto Pref.	0.75
	Ouda Town, Nara Pref.	1.56
	Daijyuj Temple, Koge Town, Tottori Pref.	1.85
	Oshiba, Saito City, Miyazaki Pref.	1.72
	Ohae, Saito City, Miyazaki Pref.	2.02
	Momigio, Saito City, Miyazaki Pref.	2.43
	Kodomonokuni Amusement Park, Miyazaki City, Miyazaki Pref.	— ²
	Kyushu Univ., Fukuoka City, Fukuoka Pref.	—
‘Koshikibu’	Chofukuji Temple, Kyoto City, Kyoto Pref.	—
‘Tosa Uraku’	Kagawa Univ., Miki Town, Kagawa Pref.	—
‘Sukiya’	Kyushu Univ.	—
‘Kocho Wabisuke’	Kyushu Univ.	—
‘Eiraku’	Kyushu Univ.	—
<i>C. japonica</i>	Hirado City, Nagasaki Pref.	—

²Not measured.

CMN-A10



CMN-A34



'Uraku' No. 1 No. 2
Seedlings of 'Uraku'

'Uraku' No. 1 No. 2
Seedlings of 'Uraku'

Fig. 1. RAPD profiles using arbitrary primers, CMN-A10 and CMN-A34, in *Camellia* 'Uraku' and its progenies.

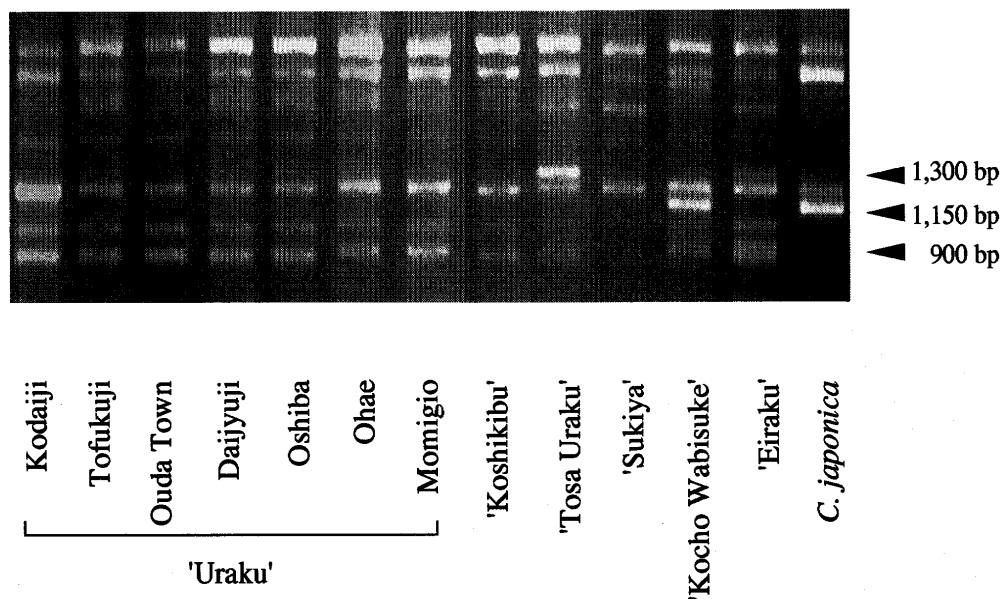


Fig. 2. RAPD profiles using the arbitrary primers CMN-A10 in *Camellia* 'Uraku' and other accessions.

ての系統が同じバンドパターンを示し、多型は全く確認されなかった。

考 察

RAPD分析は系統間の遺伝的多型を容易に検出できることが知られており (Gehrigら, 1997; Leeら, 1996; Yamagishiら, 1998), チャなどの親子識別 (田中・山口, 1995) やウメ (Shimadaら, 1994), カカオ (de la Cruzら, 1995) などの栄養繁殖性作物における品種識別に利用されている。また、本分析法はわずかな DNA の塩基配列の差を検出できるため、ニンニク (Al-Zahimら, 1999) やクロマツ (Gotoら, 1998) などの不定胚培養系における変異

個体の検出にも利用されており、サツキでは16種類の10塩基ランダムプライマーを用いたRAPD分析で、枝変わり品種とその親系統との違いを検出できることも明らかになっている (小林, 1996)。

一般に、ツバキ属植物は他家受粉を行うことが知られているが、なかでも本研究に用いた‘有楽’はやくが退化した雄性不稔の系統であるため自家受粉が不可能である。従って、‘有楽’の実生は花粉親となったツバキの遺伝子をもつことになり、種子親である‘有楽’とは異なった遺伝子組成となる。本研究の結果、RAPD分析により‘有楽’とその自然交雑実生とが容易に区別できることが明らかとなったことから、ツバキ類では種子繁殖を行えば容

Table 2. Number of RAPD markers using 51 arbitrary primers in *Camellia* 'Uraku' and other accessions.

Primer	Among 15 accessions ²			Among 'Uraku' and 'Koshikibu' accessions ²		
	Monomorphic	Polymorphic	Total	Monomorphic	Polymorphic	Total
CMN-A00	5	4	9	9	0	9
CMN-A01	6	4	10	8	0	8
CMN-A02	2	2	4	4	0	4
CMN-A03	3	5	8	8	0	8
CMN-A04	0	3	3	3	0	3
CMN-A05	1	0	1	1	0	1
CMN-A06	5	0	5	5	0	5
CMN-A07	4	0	4	4	0	4
CMN-A08	0	0	0	0	0	0
CMN-A09	0	0	0	0	0	0
CMN-A10	6	3	9	6	0	6
CMN-A11	0	0	0	0	0	0
CMN-A12	2	3	5	5	0	5
CMN-A13	0	0	0	0	0	0
CMN-A14	0	0	0	0	0	0
CMN-A15	0	0	0	0	0	0
CMN-A16	0	0	0	0	0	0
CMN-A17	0	0	0	0	0	0
CMN-A18	0	0	0	0	0	0
CMN-A19	0	0	0	0	0	0
CMN-A20	2	1	3	3	0	3
CMN-A21	2	0	2	2	0	2
CMN-A22	3	2	5	3	0	3
CMN-A23	4	0	4	4	0	4
CMN-A24	1	6	7	6	0	6
CMN-A25	0	2	2	2	0	2
CMN-A26	0	1	1	1	0	1
CMN-A27	0	0	0	0	0	0
CMN-A28	2	0	2	2	0	2
CMN-A29	0	0	0	0	0	0
CMN-A30	2	1	3	3	0	3
CMN-A31	2	0	2	2	0	2
CMN-A32	2	0	2	2	0	2
CMN-A33	1	4	5	4	0	4
CMN-A34	1	6	7	5	0	5
CMN-A35	0	0	0	0	0	0
CMN-A36	0	0	0	0	0	0
CMN-A37	1	0	1	1	0	1
CMN-A38	0	0	0	0	0	0
CMN-A39	2	1	3	3	0	3
CMN-A40	2	3	5	4	0	4
CMN-A41	0	0	0	0	0	0
CMN-A42	0	0	0	0	0	0
CMN-A43	0	0	0	0	0	0
CMN-A44	3	3	6	5	0	5
CMN-A45	7	3	10	10	0	10
CMN-A46	0	0	0	0	0	0
CMN-A47	0	0	0	0	0	0
CMN-A48	2	1	3	3	0	3
CMN-A49	0	0	0	0	0	0
CMN-A50	1	1	2	2	0	2
Total	74	59	133	120	0	120

²See Table 1.

易に遺伝的多型が検出できるものと考えられる(第1図)。しかし、本実験では51種類ものランダムプライマーを用いたにも関わらず、日本各地の‘有楽’の古木7系統間では多型が全く確認されなかった。このことから、これらは実生により繁殖された個体群ではなく、特定の‘有楽’から栄養繁殖されたクローンであることが強く示唆された。また、‘小式部’は光格天皇(在位期間1779年~1817年)から長福寺へ下賜された勅銘のツバキとされるが(渡辺, 1969), RAPD分析の結果, ‘小式部’のバンドパターンは供試した各地の‘有楽’古木のそれと全く同じであったことから、本品種は‘有楽’と同一品種とみなすべきであることが強く示唆された。

ところで、江戸時代前期の屏風絵「梅椿図屏風」(伝尾形光琳筆, 仁和寺蔵)には台木と穂木との接合部がタケノコの皮で覆われたツバキの切り接ぎの様子が描かれている。また、慶安5年(1652年)に著された随筆「飛鳥川」には、当時、ツバキの切り接ぎがすでに一般的であったことを示す記述がある(岸川・渡邊, 1999)。このことから、江戸時代の初期にはツバキの接ぎ木による繁殖は広く行われていたものと思われる。一方、九州各地にみられる樹齢約500年以上のスギ(*Cryptomeria japonica*)の大部分は、特定の母株から採取した比較的太い枝の直挿しによって成立したものと考えられており(宮島, 1989), ツバキでも直径約3 cmもしくはそれ以上の太さの枝を挿し穂として直挿しするとよく活着することが知られている(農林省山林局, 1931)。このようなことから、ツバキでは古くから挿し木による増殖も一般的な方法であったと考えられる。

従って、ツバキでは今から約400年前にはすでに挿し木や接ぎ木などによる栄養繁殖が広く行われていたと考えられる。

‘有楽’は日本だけでなく、中国にも「美人茶」、「楊妃」、「冬紅」という名で複数本現存するが、最大のものでも推定樹齢は約160年(地際の幹周り約80 cm)といわれる(桐野, 1998)。これらも含めて、最大のものは宮崎県西都市の‘樅木尾有楽’であり、その幹周りは約240 cmである。ツバキの樹齢は幹周りの2倍年で計ると言われているので(土師, 1994), これに従えば‘樅木尾有楽’の樹齢は約480年となる。また、Caddell(1989)が示したヤブツバキの直径と樹齢との関係に関する調査結果から推定すると、その樹齢は約410年となり、‘樅木尾有楽’は少なくとも今から400年ほど前にはすでに現在の場所に存在していたと推定される。

ところで、今から約400年前の慶長元年(1596年), ‘樅木尾有楽’や‘尾八重有楽’がある尾八重集落の地頭であった米良(めら)重秀は、延岡城主高橋元種との領地争いの調停を願い出るため、当時の米良家当主である米良重隆に伴って上洛し、豊臣秀吉、秀頼に拝謁したとされている(中武, 1929)。当時、京都を中心として公家や武

家のあいだでは茶の湯が盛んであったので、米良重秀が尾八重集落にあった薄桃色の花をつけるこのツバキを茶席にふさわしい珍花として豊臣秀吉やその側近に献上し、それが関西一円に広がった可能性がある。一方、この領地争いでは米良家の申し出が通り、高橋家が侵出していた中之又集落(尾八重集落の北隣り)は米良領と裁断されたという。今回の研究では用いなかったが、中之又集落には幹周り216 cmもの‘有楽’が現存することから、逆に、秀吉の領地裁定の証拠として京都の‘有楽’が米良家へ下賜され、それが尾八重周辺に広がったのかもしれない。しかし、現在、京都府に中之又集落や尾八重集落の‘有楽’よりも古いと思われる‘有楽’はない。

‘有楽’は足利義満の時代に中国(明)からもたらされたのではないかとの説もあるが(桐野, 1996), これが事実とすれば、明から渡来した‘有楽’の原木はすでに枯れてしまい、そのクローンだけが各地に残ったとも考えられる。

本研究では原木となった‘有楽’を特定することはできなかったが、調査した日本各地の‘有楽’古木7系統と‘小式部’のいずれも、ひとつの母株からの栄養系個体であり、茶花として観賞性の高い‘有楽’が、今から400年以上も前から各地に広がったと推察される。

摘 要

RAPD分析により日本各地の‘有楽’古木の遺伝的同一性について調査した。51種類の12塩基ランダムプライマーを用いたRAPD分析の結果, ‘有楽’とその実生および他のツバキ類とは容易に区別できた。しかし、京都、奈良、鳥取および宮崎に現存する‘有楽’古木7系統および京都府長福寺の‘小式部’間での遺伝的多型はまったく確認されなかった。このことから、これらの‘有楽’および‘小式部’は、特定の‘有楽’から栄養繁殖された個体であり、今から400年以上前から各地に広がったことが強く示唆された。

謝 辞 本研究を実施するにあたり、宮崎県西都市教育委員会からは同市尾八重地区の‘有楽’について、葉芽と穂木の採集許可をいただいた。記して感謝の意を表す。また、南九州大学園芸学部山口雅篤教授には「こどものくに」保存の‘有楽’ならびにその実生の葉芽を提供していただいた。記して深甚の謝意を表す。

引用文献

- Al-Zahim, M. A., B. V. Ford-Lloyd and H. J. Newbury. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep.* 18: 473-477.
- Caddell, G. M. 1989. Pollination, mating system, and distribution of genetic variation within populations of *Camellia japonica* L. (Theaceae). Ph.D. Thesis. The

- University of North Carolina, Chapel Hill, NC.
- de la Cruz, M., R. Whitkus, A. Gómez-Pompa and L. Mota-Bravo. 1995. Origins of cacao cultivation. *Nature* 375: 542-543.
- Fahima, T. G., L. Sun, A. Beharav, T. Krugman, A. Belies and E. Nevo. 1999. RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theor. Appl. Genet.* 98: 434-447.
- Gehrig, H. H., H. Rösicke and M. Kluge. 1997. Detection of DNA polymorphisms in the genus *Kalanchoë* by RAPD-PCR fingerprint and its relationships to infrageneric taxonomic position and ecophysiological photosynthetic behaviour of the species. *Plant Sci.* 125: 41-51.
- Goto, S., R. C. Thakur and K. Ishii. 1998. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD makers. *Plant Cell Rep.* 18: 193-197.
- 土師 武. 1994. 有楽幻想. 日本ツバキ協会会誌“椿”. 33: 163-166.
- 北村四郎. 1961. 京都のツバキの古い園芸品種. 京都園芸. 47: 1-5.
- 桐野秋豊. 1996. 太郎冠者(有楽椿)を考える. 日本ツバキ協会会誌“椿”. 35: 17-24.
- 桐野秋豊. 1998. 太郎冠者の“中国輸出”を推理する. 日本ツバキ協会会誌“椿”. 37: 51-56.
- 岸川慎一郎・渡邊光夫. 1999. 京椿の雅名. p. 20-27. 日本ツバキ協会監修. 古文書に見る日本のツバキ文化史. 日本ツバキ協会. 東京.
- 小林伸雄. 1996. 常緑性ツツジの類縁関係と園芸品種の起源解明に関する研究. 筑波大学学位論文.
- Kobayashi, N., T. Horikoshi, H. Katsuyama, T. Handa and K. Takayanagi. 1998. A simple and efficient DNA extraction method from the plants, especially from woody plants. *Pl. Tissue Cult. Biotechnol.* 4: 76-80.
- Lee, S. J., J. S. Shin, K. W. Park and Y. P. Hong. 1996. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 92: 719-725.
- Mailer, R. J., R. Scarth and B. Fristensky. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphism amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 697-704.
- 宮島 寛. 1989. 九州のスギとヒノキ. p. 15-143. 九州大学出版会. 福岡.
- 中武安正. 1929. 菊池氏を中心とする米良史. p. 194-196. 中武雅周発行. 宮崎.
- 農林省山林局. 1931. 椿及山茶花ニ關スル調査. p. 40-46. 農林省山林局発行. 東京.
- Savige, T. J. 1993. Uraku. p.1094. The International Camellia Register. vol.2. The International Camellia Society. NSW. Australia.
- Shimada, T., T. Haji, M. Yamaguchi, T. Takeda, K. Nomura and M. Yoshida. 1994. Classification of mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63: 543-551.
- 田中淳一・山口 聡. 1995. RAPD法によるチャの品種識別と親子鑑別. 育種. 45(別1): 241.
- Wachira, F. N., R. Waugh, C. A. Hackett and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934-940.
- 渡辺 武. 1969. 衣装染織のツバキ. p. 349-353. 京都園芸倶楽部編著. 椿-花と文化-. 誠文堂新光社. 東京.
- Whitkus, R., M. de la Cruz, L. Mota-Bravo and A. Gómez-Pompa. 1998. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Southern Mexico. *Theor. Appl. Genet.* 96: 621-627.
- Yamagishi, H., M. Tateishi, T. Terachi and S. Murayama. 1998. Genetic relationships among Japanese wild radishes (*Raphanus sativus* f. *raphanistroides* Makino), cultivated radishes and *R. raphanistrum* revealed by RAPD analysis. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 526-531.