

査読論文

2006年に徳島市城山に植樹されたホルトノキの苗木の現状
— 生育状況とホルトノキ萎黄病感染状況について —

佐藤征弥*・箕田大祐**・高井竜平**・今田悠介**・安西隆治**・田中隆太郎**・下込衣里**・
小田彩未**・野々市元**・釜江梨紗**・奥村彰太**・平瀬未悠**・糸永千尋**・佐野慎三郎**・
中川寛章**・岡田ひろ**・山形真由**

*徳島大学生物資源産業学部、〒770-8513 徳島市南常三島町2-1

E-mail: satoh.masaya@tokushima-u.ac.jp

**徳島大学総合科学部、〒770-8502 徳島市南常三島町1-1

Present situation of *Elaeocarpus zollingeri* tree planted in Mt. Shiroyama in
2006: survival and infection status of *Elaeocarpus* yellows

Masaya Satoh*, Daisuke Mita**, Ryohei Takai**, Yuusuke Imada**, Ryuji Anzai**, Ryutaro Tanaka**,
Eri Shimogomi**, Ayami Oda**, Hajime Nonoichi**, Risa Kamae**, Shota Okumura**, Miyu Hirase**,
Chihiro Itonaga**, Shinzaburo Sano**, Hiroaki Nakagawa**, Hiro Okada**, Mayu Yamagata**

*Faculty of Bioscience and Bioindustry, Tokushima University, Tokushima 770-8513, Japan.

**Faculty of Integrated Arts and Sciences, Tokushima University, Tokushima 770-8502, Japan.

Abstract

Elaeocarpus zollingeri (synonym: *E. sylvestris*) was one of dominant trees in Mt. Shiroyama in the Tokushima City until 1970s, however, most of adult trees have died by *Elaeocarpus* yellows. To prevent extinction 300 nursery trees were planted at the foot of the mountain by local volunteers in 2006. In this study we investigated their survival, growth, and infection status of the disease. We found 40 nursery trees have survived (survival rate was 13%). Survived trees were abundant in areas facing the south, and most trees disappeared in areas facing the north and the west. Growth of the trees was well also in areas facing the south. Among the survived 40 nursery trees, we found three trees infected with phytoplasma, the pathogen of *Elaeocarpus* yellows, based on PCR analysis. It is not clear when they were infected with phytoplasma, whether they have infected after the plantation or they already had phytoplasma in the seed. Anyway, the fact that only a few tree is infected must be gratifying in considering the conservation *E. zollingeri* in Mt. Shiroyama.

Keywords: *Elaeocarpus zollingeri*, *Elaeocarpus* yellows, Mt. Shiroyama, phytoplasma, Tokushima

はじめに

徳島市の「城山原生林」のホルトノキ (*Elaeocarpus zollingeri* K. Koch (synonym: *E. sylvestris* var. *ellipticus*)は、徳島県で唯一のホルトノキ群落であることから1984年(昭和59)に徳島市の「市の木」に制定され、2009年(平成21)には「とくしま市民遺産」の一つに「城山のホルトノキと貝塚」が選定されるなど(徳島市2009)市民に親しまれている。しかし、城山のホルトノキ群落は衰退の一途をたどっており、1975年(昭和50)の調査では、胸高直径が15 cm以上のホルトノキが224本存在していたが(森本ら1977)、2014年(平成26)の調査では稚樹を除くと13本にまで減少していることが明らかになり(その後2本見つかった)、枯死の主な原因が、ホルトノキ萎黄病であることが確かめられた(佐藤ら2014)。ホルトノキ萎黄病は、植物病原菌ファイトプラズマの感染によって起こり、日本では1999年(平成11)に初めて報告され、各地で被害が出ていることが明らかになってきた(河辺ら1999, 2000; 大野ら2003)。

徳島市の城山では分析した全ての成木がファイトプラズマに感染していた(佐藤ら2014)。そこで、感染したホルトノキの延命をはかるため、試験木を定めて2015年(平成27)4月に抗生物質オキシテトラサイクリンを主成分とした農薬マイコシールドの散布による試験治療が実施され、さらに同年9月にオキシテトラサイクリンの樹幹注入による試験治療が実施された。そして治療前後のファイトプラズマの変動をリアルタイムPCR法により分析した結果、試験治療に一定の効果が認められた(加藤・佐藤2016)。

一方、城山のホルトノキの消滅に危機感を抱いた市民の手によって苗木の植樹も行われた。2006年(平成18)6月25日、NPO「徳島城址を愛する会」が主催して300本のホルトノキの苗木が城山山麓に植えられた。この時使われた苗木は、城山で集めた種子に由来するものが150本、県内の山地から集めた種子に由来するものが150本であった。城山産の種子は「徳島城址を愛する会」が集め、それ以外は(株)徳島県植物市場が集めた。これらは50 cm前後に成長するま

で苗床で育てられてから植樹された。植樹は「徳島城址を愛する会」の他にも募集で集まった一般参加者も参加して行われた。

植樹して20日後、1年後、2年後の生育状況が徳島市の委嘱を受けた(株)緑化コンサルタントにより調査され、生存率は植樹20日後で100%、1年後では64.7%、2年後は40.0%であったことが報告されている(徳島市開発部公園緑地課2008)。しかし、その後追跡調査が行われていなかった。そこで、植樹後10年目となる今年、これらの苗木の生育状況を調査するとともにホルトノキ萎黄病の感染状況についても調べ、今後のホルトノキの保全対策を検討するためのデータを得ることにした。

方法

本研究は徳島大学総合科学部の平成28年度前期講義「総合科学実践プロジェクト」の中で実施した。

現地調査

城山に植えられた苗木の調査は2016年(平成28)4月13日、4月22日、5月20日、6月3日、7月6日、7月7日、7月25日、7月29日に行った。

苗木には植樹した際に小さなプラスチックプレートが幹に結びつけられ、ピンク色、青色、白色のプレートにそれぞれ1から100までの番号が記されていて、各個体が識別できるようになっている。本調査ではホルトノキの苗木のプレートを確認し、樹高を測定し、ファイトプラズマの分析のために葉を採取した。採取した葉は -60°C の冷凍庫に保存した。

ファイトプラズマの分析

採取した葉は0.2 gとなるように切り取り、乳ばちですりつぶして植物DNA抽出キット *illustra* DNA Extraction Kit PHYTOPURE (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAは20 ng/mLに希釈した後、Gundersen and Lee (1996)の方法で nested PCR を行ってファイトプラズマ

DNAの有無を調べた。用いたプライマーは次の通りである。

1回目のPCRに用いたプライマーペア

R16mF2: 5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3'

R16mR1: 5'-CTTAACCCCAATCATCGAC-3'

2回目のPCRに用いたプライマーペア

R16F2n: 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'

R16R2: 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCG-3'

DNAの増幅は、illustra puReTaq Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて行なった。nested PCRの1回目の増幅反応では反応液25 μ L中にテンプレートDNAを20 ng、プライマーを各12.5 pmol含む

ように加えた。94°Cで1分、60°Cで2分、72°Cで3分のサイクルを35回行なってDNAを増幅した。なお、最初のサイクルでは熱変性処理を2分、最後のサイクルでは伸長反応を7分行なった。増幅後、100倍希釈した反応液1 μ Lを2回目のPCRのテンプレートとした。反応条件は、アニーリング温度を55°Cとした以外は1回目のPCRと同じである。反応終了後、アガロース電気泳動によりTAE buffer中で電気泳動を行い、EB染色後、バンドパターンを観察した。

結果と考察

生存率

図1に2006年(平成18)に植樹された苗木の位置図を示す。城山を取り囲むように山麓に19箇所のエリアが設定され、No. 12, 14, 16, 18



図1 城山山麓に苗木を植樹したエリア

19箇所の植樹エリアを示す。地図は、徳島市開発部公園緑地課(2008)の地図を改変して作成した。

表1 確認できたホルトノキ苗木

エリア	プレート番号*	高さ(cm)	感染**
3	ピンク 21	105	-
3	ピンク 23	80	-
4	青 17	95	-
4	-(青 23?)	110	-
4	青 24	65	-
4	青 25	140	-
4	-(青 29?)	74	-
4	青 30	90	-
4	-(青 26?)	130	-
5	ピンク 33	120	-
5	ピンク 34	160	○
5	ピンク 36	190	-
5	ピンク 37	160	-
5	ピンク 38	155	-
5	ピンク 39	350	-
5	ピンク 40	200	-
5	-(ピンク 41?)	230	-
5	ピンク 42	125	-
5	ピンク 43	280	-
5	ピンク 44	200	○
5	ピンク 46	105	-
5	ピンク 47	200	-
6	青 34	186	-
6	青 37	173	-
6	青 45	190	-
6	青 46	230	○
6	-	230	-
7	ピンク 61	260	-
9	-	70	-
11	-(ピンク 85?)	110	-
12	青 81	90	-
12	青 83	60	-
12	青 88	75	-
12	青 91	75	-
12	青 92	60	-
13	ピンク 98	100	-
17	白 81	150	-
17	白 92	92	-
17	-(白 86?)	160	-
18	-	71	-

*プレートがなくなっていた苗木は-で示し、植樹時の情報から特定できそうな場合はカッコ内に番号を示す。

**ファイトプラズマに感染しているものは○、感染していないものは-で示す。

の4つのエリアには15本ずつ、それ以外のエリアには16本ずつ植えられた。偶数番号のエリアは城山産の種子から育てた苗が植えられ、奇数番号のエリアには城山以外の県内産の種子から育てた苗木が植えられた。なお、エリアNo. 19のみ城山産種子由来の苗が10本、それ以外の県内産の種子由来の苗が6本植えられた。

今回の調査の結果、これらのうち40本の苗木の生存が確認された。これは当初植えた300本の13.3%である。エリア別にみると、南側山麓に位置するNo. 5において13本と最も多く残っており、隣接するNo. 4とNo. 6でも比較的多く残っていた。他の場所では東側山麓のNo. 12やNo. 17でも複数の苗木が残っていた。西側山麓では1本しか残っていなかった。

エリアによって生存率に大きな差が出たのは、南側や東側では日照条件が良かったためだと考えられる。また、エリアによっては下草刈りによってホルトノキの苗木が伐られたと思われるものもあった。

表2に過去10年間のエリア毎の生存数の推移を示す。徳島市が行った植樹後2年間の調査では、植樹後20日では300本全ての苗木が生存していたが、1年後には194本に減り(生存率64.7%)、2年後には120本に減り(生存率40.0%)、10年後に40本(生存率13.3%)に減った。2年後の調査において10本以上生存が確認されたエリアは、No. 4, 5, 6, 17であり、今回の10年後の調査で生存数が多かったエリアと一致していた。

樹高についてみると、最も成長したのはエリアNo. 5の苗木で、3.5mにまで伸びていた(表1)。樹高は同一エリア内でも差が大きく、成長速度は個別の状況によって影響を大きく受けることがわかれる。しかし、南側エリアでは樹高2m以上に達しているものが9本存在するのに対して、その他のエリアでは樹高2mに達した苗木は1本もなく、生存率の高かった南側が生育速度も高かったことが分かった。

今後新たにホルトノキの植林をすることがあれば、日照の良い場所を選ぶか、あるいはそのようになるよう周辺の環境を整える必要がある。

表2 植樹後の生存数の推移

エリア	植付本数	20日後	1年後	2年後	10年後
1	16	16	7	3	0
2	16	16	2	0	0
3	16	16	11	9	2
4	16	16	15	12	7
5	16	16	16	15	13
6	16	16	14	14	5
7	16	16	16	9	1
8	16	16	10	4	0
9	16	16	10	4	1
10	16	16	10	1	0
11	16	16	14	5	1
12	15	15	12	9	5
13	16	16	10	8	1
14	15	15	5	2	0
15	16	16	5	1	0
16	15	15	7	2	0
17	16	16	12	11	3
18	15	15	10	6	1
19(県内産種子)	6	6	1	1	0
19(城山産種子)	10	10	7	4	0
計	300	300 (100%)	194 (64.7%)	120 (40.0%)	40 (13.3%)

植樹20日後、1年後、2年後の結果については徳島市開発部公園緑地課（2008）のデータを示す。

植樹記録のない苗木の存在

エリア No. 4 において、青 24 と青 25 の苗木の間に 2 本の苗木が見つかった。これら 2 本は植樹記録にない位置に生えており、プレートもついておらず、どのような経緯でこの場所にあるのかは不明である。樹高は同じエリアの他の木よりも低いことから、他の苗木を植樹した後で自然に生えてきたか、あるいは新たに人為的に植えられたと考えられる。

ファイトプラズマの感染状況

今回確認できた植樹した苗木 40 本、および前節で述べた植樹記録のない 2 本が、ホルトノキ萎黄病の原因菌ファイトプラズマに感染しているかどうかを nested PCR により確認した。その結果、3 本がファイトプラズマに感染していることが明らかになった（表 1）。これら 3 本は、外見上病兆を呈していない。また、周りの苗木と比べ

て成長が悪いこともなく、感染による成長への影響は表れていない。

これら 3 本がファイトプラズマに感染したのが植樹後なのか、それとも種子の段階で感染していたのかは不明である。執筆者は、感染した成木から採取した種子にファイトプラズマが存在することを確認している（加藤・佐藤 2016）。植樹のために城山の種子を採取した方の話では、城山のあちこちから種子を集めたとのことであったが、その頃には城山のホルトノキが著しく減少し、遠からず城山からホルトノキが消滅するだろうと予測されており（久戸瀬 2008）、採取した種子も全てかあるいは高い割合でファイトプラズマに感染していたと考えられる。また、植樹する種子を発芽させて苗木を育てた方の話では、城山で採取した種子 500 粒前後で植樹する苗木を賄う予定であったが、発芽したのが 150 粒位であったため、城山以外の所からも種子を集めて育て、

300本用意したとのことであった。城山の種子の発芽率が悪かった原因が、ファイトプラズマ感染によるものとは断定できない。ホルトノキの種子の採取は通例1月か2月に行うが、城山の場合12月に採取したため、時期が早すぎたという可能性もある。なお、感染が確認された3本は、1本が城山産であり、2本が城山以外の県内産種子由来の苗であった。県内産種子由来の苗の感染の経緯は分からない。執筆者は徳島県小松島市の市天然記念物のホルトノキで感染を確認しており、ホルトノキ萎黄病は城山以外にも広がっていることから、これら2本についても種子の段階で感染していた可能性は否定できない。

今回の調査で生存していた40本は、城山産の種子由来が18本、その他県内産の種子由来が22本であり、生存率に大きな違いはなかった。徳島市が行った植樹後2年間のモニタリング調査の結果においても、1年後に残っていた194本のうち、城山産の種子の苗が85本、他の県内産の種子苗が109本であった。2年後の調査では、120本残存しており、うち城山産の種子の苗が54本、他の県内産の苗が66本であった。このように10年間を通じて城山産の種子の生存割合が若干低いものの、両者に大きな差はみられなかった。

もし、植樹時においてファイトプラズマに感染しておらず、その後感染したものであれば、他の植物のファイトプラズマによる病害と同様に媒介昆虫による感染であろう。感染個体はエリアNo.5と6で確認されたが、どちらも苗木の生存率が高かったエリアであり、このまま放置すれば近隣の苗木に感染が拡大する可能性がある。このエリアの苗については2015年(平成27)4月21日にマイコシールドを散布したが、結局ファイトプラズマは消失しなかった。樹幹注入を実施するには小さすぎるため、治療するよりも除去して他の苗木への感染リスクをなくすべきであると考えた。城山を管理する徳島市公園緑地課にもそのように申し入れ、許可を得て、感染した苗木3本を2016年10月4日に除去した。

終わりに

今回の調査で、10年前に植樹した苗木300本

のうち40本が生存していることが分かった。10年後の生存率は13.3%であった。これは成功した植林事業と比べれば低い数値であるが、生育に適した環境を配慮せずに城山の山麓を取り囲むように植えたことや植樹後の管理をしていないことを考慮すればやむをえないと言えるだろう。今後は、これ以上苗木が減らないよう注意して管理していく必要がある。また、生存数の多いエリアにおいては、苗木が1m位の間隔で植わっており、将来的には移植が必要になるかもしれない。

一方、十数本のみとなった成木については、すべてファイトプラズマに感染しているもののオキシテトラサイクリンの樹幹注入による試験治療によりファイトプラズマの減少が確認され、延命の可能性が見えてきた(加藤・佐藤2016)。しかし、この治療ではファイトプラズマを完全に個体内からなくすることはできず、また種子感染するために天然更新によってかつてのようなホルトノキ群落を再生させるのは難しいと考えられる。よって今回調査した苗木が成長し、繁殖していくことを目指さなければならない。その意味では、ファイトプラズマに感染していた苗木が僅かしかなかったことは今後の保全や再生を考えるうえで朗報である。今回感染が確認された3本の苗木については、感染拡大を防ぐために除去することになったが、残った苗木について今後も定期的にファイトプラズマの感染状況をモニタリングしていく必要がある。

謝辞

本研究にあたって10年前の植樹について教えていただいたNPO徳島城址を愛する会の酒井勇治様ならびに森本康滋様、(株)徳島県植物市場の森本泰好様、また植樹後のモニタリング調査の結果について教えていただいた(株)緑化コンサルタントの岩根義治様に感謝いたします。

引用文献

Gundersen D.E. and Lee I.-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas

by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopath. mediterr.* 35: 144-151.

告書

2016年8月31日受付
2016年9月6日改訂
2016年9月7日受理

加藤愛里・佐藤征弥. 2016. ホルトノキ萎黄病に感染した徳島市城山のホルトノキの治療について. 第73回中国四国植物学会大会.

河辺祐嗣・菊地泰生・楠木 学・大野啓一郎・加藤貞一・小林元男・小河誠司・宇佐美陽一・伊禮英毅. 2000. ホルトノキから検出された異なる群の2種類のファイトプラズマ. *日本植物病理学会報* 66(3): 280.

河辺祐嗣・楠木 学・大野啓一郎. 1999. ファイトプラズマによるホルトノキ萎黄病 (新称). *日本植物病理学会報* 65: 654.

久戸瀬隆之. 2008. 「徳島市城山樹林の衰退過程分析と保全に向けた市民意識の抽出」. 徳島大学大学院・先端技術科学教育部. 修士論文.

森本康滋・石井愷義・小西貴代美・宮井敦子. 1977. 城山の植生. *徳島県自然保護協会調査報告* 2: 27-47.

大野啓一郎・河辺祐嗣・加藤貞一・菊地泰生・楠木 学. 2003. ホルトノキ萎黄病による衰弱枯死経過. 樹木医学会第7回大会.

佐藤征弥・高橋英誠・近森美保・谷 由里恵・安達直之. 2014. 「徳島市城山のホルトノキの衰弱・枯死の原因について — ホルトノキ萎黄病を引き起こすファイトプラズマの深刻な感染状況 —」. *自然科学研究*. 徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部. 第28巻3号25-29頁.

徳島市. 2009. 徳島市HP 「とくしま市民遺産」
http://www.city.tokushima.tokushima.jp/kankou/simin_isan/

徳島市開発部公園緑地課. 2008. 徳島中央公園ホルトノキモニタリング (3回目) 業務調査報