

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 -

佐藤 征弥¹・高橋 英誠²・近森 美保²・谷 由里恵²・安達 直之²

¹徳島大学大学院 ソシオ・アート・アンド・サイエンス 研究部、〒770-8502 徳島市南常三島町1-1

²徳島大学 大学総合科学部、〒770-8502 徳島市南常三島町1-1

責任著者：佐藤征弥 (E-mail: satoh.masaya@tokushima-u.ac.jp)

Prevalence of *Elaeocarpus* Yellows in Mt. Shiroyama in Tokushima City

Masaya Satoh¹, Hideaki Takahashi², Miho Chikamori², Yurie Tani², Naoyuki Adachi²

¹Institute of Socio-Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima 770-8502, Japan.

²Faculty of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima 770-8502, Japan.

Corresponding author: Masaya Satoh (E-mail: satoh.masaya@tokushima-u.ac.jp)

Abstract

Elaeocarpus sylvestris var. *ellipticus* was a dominant tree species in Mt. Shiroyama (castle mountain) in the Tokushima Central Park until 1970s, however, most of the *E. sylvestris* trees have died. In this study we investigated whether the death has been caused by *Elaeocarpus* yellows. Results of nested PCR revealed that DNA of phytoplasma, the pathogen of *Elaeocarpus* yellows, was found in all *E. sylvestris* trees in Mt. Shiroyama and about 80% *E. sylvestris* trees in the Tokushima Central Park. Results of PCR-RFLP showed that the all the trees had the same DNA type of phytoplasma, and it was identical to the one that had been found in Japan. These results indicated that the recent decrease of *E. sylvestris* in Mt. Shiroyama is due to *Elaeocarpus* yellows.

Keywords: *Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*, *Elaeocarpus* yellows, Mt. Shiroyama, phytoplasma, Tokushima

はじめに

徳島市「城山原生林」のホルトノキ (*Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*) は、本県で唯一のホルトノキ群落であることから 1984 年に徳島市の「市の木」に制定され、2009 年には徳島市が伝統文化や歴史、景観を指定した「とくしま市民遺産」にも入れられた (徳島市 2009)。しかし、近年、城山のホルトノキの個体数は急激に減少している。1975 年の調査では、城山はホルトノキ群落が優占しており、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)、1987 年までに多数が枯れた (森本と西浦 1987)。1987 年よりホルトノキの衰弱・枯死の要因の解

明と森林の活性化対策の調査が開始され、衰弱・枯死は林地の極端な乾燥が原因であると判断され、1988 年から土壌水分と有機物の補給を主とした保護活性化対策が行なわれた (赤井ら 1992)。その後、1991 年まで定期的に樹の健康度のモニタリングが行なわれ、樹勢の回復が確認された (妹尾ら 1995)。ところが、2000 年頃から再び衰弱・枯死が再発している (徳島県県民環境部環境局環境企画課 2004)。久戸瀬 (2008) は毎木調査の結果を基にしたシミュレーションを行い、この傾向が続けば、十数年後には城山のホルトノキは完全に消失すると予測した。

近年、日本各地でホルトノキの衰弱・枯死が起

きており、その原因がファイトプラズマの感染によるホルトノキ萎黄病 (*Elaeocarpus yellows*) であることが分かってきた (河辺ら 1999, 2000 ; 大野ら 2003)。ファイトプラズマの 16S rDNA 領域を PCR で増幅することにより感染を確認する方法が確立されている (Lee *et al.* 1993; Gundersen and Lee 1996, 河辺ら 2001)。「城山原生林」のホルトノキの衰弱・枯死については、長年、水ストレスが原因であると考えられてきており、久戸瀬 (2008) はホルトノキ萎黄病の可能性を指摘していたものの、これまで病気の調査は行なわれていなかった。そこで、本研究は、城山に残存するホルトノキと、城山を擁する徳島中央公園に植栽されているホルトノキについて、本病の原因である植物病原細菌ファイトプラズマに感染しているかどうかを調べ、衰弱・枯死の原因がホルトノキ萎黄病であるか検証することを目的として行なった。

材料と方法

供試試料

城山と徳島中央公園に植栽されたホルトノキの調査や葉の採取は、2014年5月30日、6月10日、6月20日、7月8日、9月18日に行なった。

採取した葉 0.2 g から植物 DNA 抽出キット *illustra Nucleon 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、PCR を行なった。

nested PCR

nested PCR に用いたプライマーは Gundersen and Lee (1996) に示された下記の配列を委託合成した。

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'-TGACGGCGGTGTGTACAAACCCCG-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 含まれるよう加えた。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、1% 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。

PCR-RFLP

河辺ら (2001) が報告している 4 種類の制限酵素 *Afa* I (*Rsa* I), *Alu* I, *Hap* II (*Hpa* II, *Msp* I), *Rsp*Rs II (*Mse* I) を用いた。制限酵素はすべて TaKaRa (大津、日本) より購入した。制限酵素反応は、nested PCR 終了後の反応液 3 μ L に制限酵素付属のバッファーを 1 μ L、制限酵素 1U を加え、純水を加えて 10 μ L としたものを反応液とした。酵素反応は 37°C (*Rsp*Rs II のみ 60°C) で 3.5~4 h インキュベーションして行なった。反応終了後、制限酵素付属のローディングバッファーを 2 μ L 加えた。6% ポリアクリルアミドゲルにより TBE 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

図 1 に城山と徳島中央公園のホルトノキの分布を示す。城山で見つけることのできたホルトノキは、稚樹を除くと図で示した No. 1~13 の 13 本であった。なお、城山の No. 13 の脇には大きな切り株があり、No. 13 と根元で繋がっている。この切り株からひこばえの小枝が生えており、これを No. 13' として葉を採取した。表 1 は、これらのホルトノキの幹周囲と外観を示す。1975 年の調査において胸高直径が 15 cm 以上のホルトノキが 224 本存在することが報告されているが (森本ら 1977)、今回の調査でその大きさに相当するものは 11 本のみであった (No. 9 については実測できなかったが、目視でそれ以上であることは明らかであり、数に含めている)。ホルトノキ萎黄病の病徴である葉の黄化と樹冠全体の葉量減少は、城山の No. 7 で認められた。この症状は、5 月~7 月の調査では確認されなかったが、9 月 18 日の調査ではっきりと表れており、夏の間症状が顕在化したと考えられる。他のホルトノキでは、このような症状は見られなかったが、およそ半数の木で枯枝の存在が目立った。また城山の No. 12 は主幹の損傷が顕著であった。

これらの樹の葉から DNA を抽出し、nested PCR によりホルトノキ萎黄病の原因となる植物病原細菌ファイトプラズマの有無を調べた。No. 13' の DNA 分析には、切り株から発生したひこばえの枝の葉を用いた。また、城山の No. 6 の木については枝が高く、葉を採取することができなかった。



図1 城山原生林と徳島中央公園のホルトノキ分布

●は城山原生林、●は徳島中央公園内に植栽されたホルトノキを示す。
地図は国土地理院標準地図（2500）を基に作成した。

表 城山のホルトノキの幹周囲と状態

No	胸高周囲 (cm)	状態
1	246	枯枝あり
2	37	枯枝あり
3	46	枯枝あり
4	250	
5	280, 101 (根元より 二叉に分かれる)	
6	136	
7	165	葉の黄化。樹冠葉量の減少。 枯枝多い。
8	29	
9	-*	
10	247	
11	81	枯枝あり
12	268	幹の損傷激しい。枯枝あり。
13	190	

*傾斜地のため測定できず

図2 に nested PCR の結果を示す。城山のホルトノキでは分析した 14 本全ての樹において、1.3 kb 付近にファイトプラズマ DNA の増幅産物が検出された。また、徳島中央公園に植栽されたホルトノキについては、分析した 14 本中 11 本でファイトプラズマ DNA の増幅産物が検出された。このように城山および徳島中央公園のファイトプラズマの感染状況は非常に深刻であることが明らかになった。なお、各ホルトノキについて、別の日に採取した葉を用いて再実験を行ったが、結果は変らなかった。

河辺ら（2000, 2001）は、PCR-RFLP により、日本のホルトノキ萎黄病のファイトプラズマに 2 つのタイプが存在することを報告している。そこで、同じ手法を用いて城山と徳島中央公園のホルトノキについても分析を行なった。図3 は、原生林 No. 1 の樹について、nested PCR の増幅産物を 4 種類の制限酵素で切断した電気泳動の結果を示す。RFLP パターンは、河辺ら（2001）が報告している 2 つのタイプのうちの 1 つと一致した。他の試料についても分析した結果、バンドパターンが一致しており、城山と徳島中央公園のホ

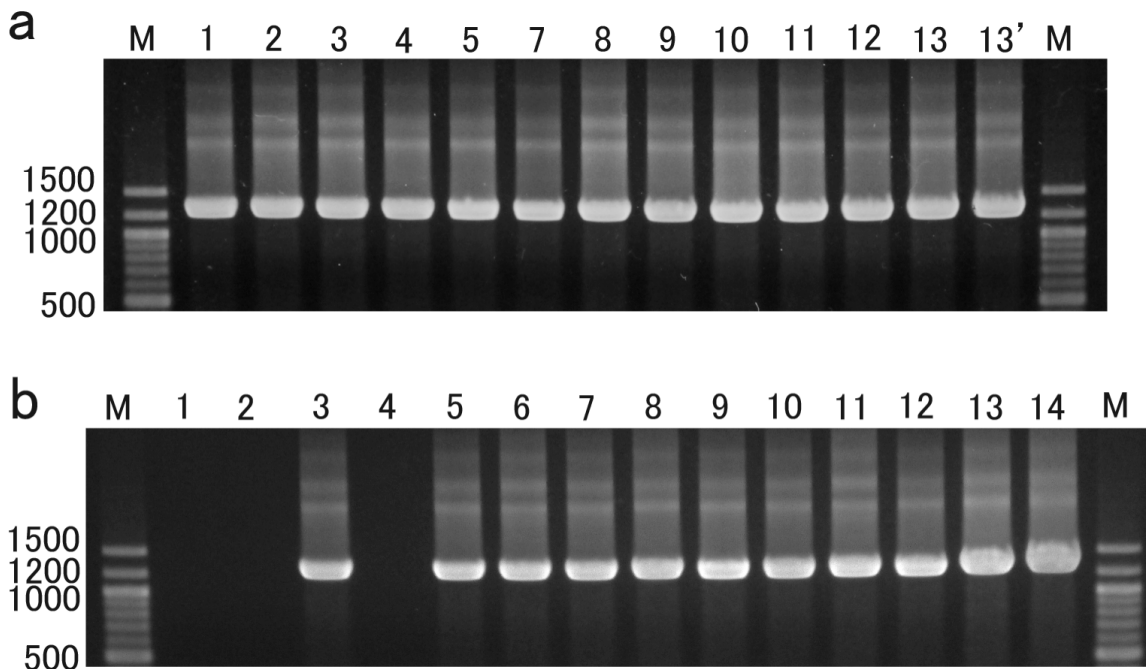


図2 城山と徳島中央公園のホルトノキの nested PCR の結果

a、b はそれぞれ城山と徳島中央公園の試料であり、レーンの上の番号は図1および表のホルトノキの番号に対応している。城山の6は葉が採取できなかつたため分析していない。Mは分子量マーカであり、左に塩基数を示す。

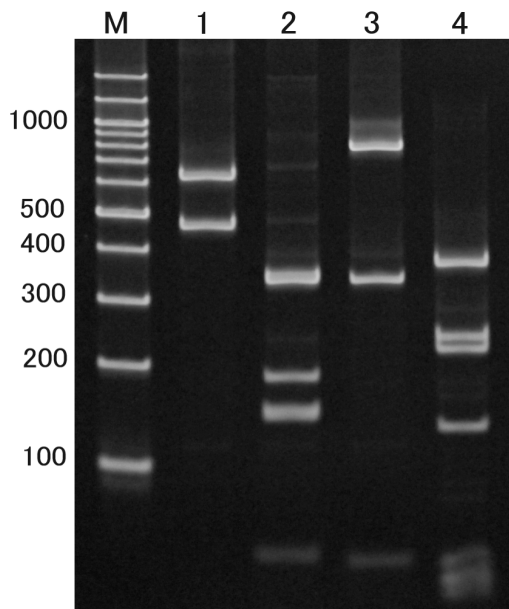


図3 PCR-RFLP の結果

原生林 No.1 の DNA を試料とし、nested PCR 後、4 種類の制限酵素で処理して電気泳動を行なった。レーン1: *Afa* I (*Rsa* I), レーン2: *Alu* I, レーン3: *Hap* II (*Hpa* II, *Msp* I), レーン4: *RspRs* II (*Mse* I)。Mは分子量マーカであり、左に塩基数を示す。

ルトノキは同じタイプのファイトプラズマに感染していることが示唆された。

城山のホルトノキが、最初にファイトプラズマに感染したのがいつ頃なのか、正確な時期は不明である。しかし、1975年の調査では枯木及び半枯木の個体数が6本であったものが(森本ら1977)、1985年の調査では急激に増加し、全体の40%以上にあたる107本が半枯木の異常木であり、他の樹種と比べて極めて高い割合であったことが報告されている(徳島県自然保護協会1986)。また、1985~1987年の2年間で、胸高直径15cm以上の現存本数は70本も減少した(赤井1992)。これらのことから城山での感染は1970年代後半から1980年代の初めにかけてであり、1980年代前半以降に爆発的に発病した可能性が考えられる。当時の観察記録を見ると、葉量の減少や葉色の黄化といったホルトノキ萎黄病と共通する症状が記されているが、これらの症状は本病に限ったものではなく、当時は本病の存在も明らかになっていなかったため、水ストレスが衰弱の原因であると判断された(赤井ら1992)。

日本においてホルトノキの枯死の原因がファイトプラズマの感染によるものであることが報告されたのは、小田原市城山のホルトノキである。小田原城の堀の土塁のホルトノキ群は、「MRA アジアセンターODAWARAのホルトノキ群」として市

指定文化財であった。しかし、1996年に異常が認められてから枯死する個体が増え（河辺ら1999；大野ら2003）、罹病したホルトノキからファイトプラズマの存在が確認されたため、新病害としてホルトノキ萎黄病と呼ぶことが提唱された（河辺ら1999）。このホルトノキは最終的に全滅し、2013年に文化財指定が解除された（小田原市教育委員会2013）。神奈川県では、まとまったホルトノキが湯河原街の山神社にも存在し、他の樹木とあわせて「山神の樹叢」として国指定天然記念物になっているが、ここでも大きなものはホルトノキ萎黄病により枯死し、稚樹のみ残っている（小田原市教育委員会2013）。

ファイトプラズマがどのように各地のホルトノキに広がっていったのかは不明である。ファイトプラズマに由来する多くの植物の病害は、昆虫が媒介して感染が広がることが知られているが、ホルトノキ萎黄病についてはまだ媒介昆虫が明らかになっていない。

ホルトノキ萎黄病に罹病した木に対する治療法に関しては、抗生物質オキシテトラサイクリンの樹勢樹幹注入が、樹勢の回復に効果があることが報告されている（河辺ら2006；檜崎2007）。しかし、オキシテトラサイクリン処理後もファイトプラズマは完全には除かれなことから、永続的な症状軽減のためには、薬剤注入を継続的に行なわなければならないとされている（河辺ら2011）。とはいえ、このまま放置すれば城山のホルトノキは近いうちに完全に消失し、徳島市の貴重な財産が失われてしまうと考えられ、このような治療による延命が望まれる。

引用文献

- 赤井龍男・本城尚正・妹尾俊夫. 1992. 徳島市「城山原生林」におけるホルトノキの衰弱、枯死の要因と森林の活性化対策に関する調査報告書. 徳島市.
- Gundersen D.E. and Lee I.-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopath. medit.* **35**: 144-151.
- 河辺祐嗣・菊地泰生・楠木 学・大野啓一朗・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・宮下俊一郎・菊地泰生. 2001. 樹木ファイトプラズマ病の遺伝子診断法の

- 開発. 独立行政法人森林総合研究所 平成12年度研究成果選集2000:10-11.
- 河辺祐嗣・楠木 学・大野啓一朗. 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.
- 河辺祐嗣・津田城栄・松浦邦昭・小野誠司・宇佐美陽一・楠木 学. 2011. ホルトノキ萎黄病罹病木におけるオキシテトラサイクリン製剤樹幹注入後のオキシテトラサイクリン濃度およびファイトプラズマ検出. 樹木医学研究 **15** : 97-101.
- 河辺祐嗣・宇佐美陽一・津田城栄・楠木 学・小河誠司・松浦邦昭. 2006. ホルトノキ萎黄病の抗生物質薬剤樹幹注入による治療試験. 第117回日本森林学会大会.
- 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.
- Lee I.-M., Hammond W, Davis R.E. and Gundersen D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* **83**: 834-842.
- 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.
- 森本康滋・西浦宏明. 1987. 城山のホルトノキ群落 - ホルトノキの枯死の現状. 徳島県高等学校理科学会誌 **28** : 30-34.
- 檜崎康二. 2007. 緑化樹等の樹木病害に対する防除薬剤の効率的適用化に関する研究. 平成18年度福岡県森林林業技術センター年報. 36-37.
- 小田原市文化財保護委員会. 2013. 市指定文化財「旧MRAアジアセンターODAWARAのホルトノキ」の指定解除について. 平成23年度第2回小田原市文化財保護委員会会議概要. 1-3.
- 大野啓一朗・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.
- 妹尾俊夫・本城尚正・赤井龍男. 1995. 色彩計を用いた都市公園樹木の活性度診断 - 徳島市城山公園のホルトノキを対象として -. 日林関西支論 **4** : 117-118.
- 徳島県県民環境部環境局環境企画課. 2004. 『徳島県環境基本計画（資料編）』. 徳島県. 97.
- 徳島県自然保護協会. 1986. 「城山原生林」自然環境調査報告.
- 徳島市. 2009. 徳島市HP「とくしま市民遺産」
http://www.citytokushima.tokushima.jp/kankou/simin_isan/

原稿受付 2014年9月19日
原稿受理 2014年9月29日