

マツノザイセンチュウ抵抗性木の大量選抜に関する研究(Ⅱ)

佐藤 博文・須田 邦裕

Studies on the effective selection of resistant pines
against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)(Ⅱ).

Hirofumi SATO and Kunihiro SUDA

要 旨

マツノザイセンチュウ抵抗性木を効率的に見いだすため、切り枝を用いた線虫通過阻害試験により線虫通過を100%阻害した合格木とそれ以外の不合格木の家系を比較し、手法の検証を行った結果、切り枝試験は抵抗性マツの絞り込みに有効であり、従来の接種検定とほぼ同等の性能を有するものと思われた。また、切り枝への線虫接種後における松脂樹脂酸組成の分析を実施し、デヒドロアビエチン酸濃度の増加量が少ないほど抵抗性が強い可能性が示唆された。しかしながら、これまで西日本産抵抗性マツの後代実生では、抵抗性が強いマツでやや高くなる傾向がみられていることから、少なくとも何らかの形で局所的に抵抗性に関わりを持つ可能性が考えられた。季節変化が切り枝試験に及ぼす影響については、初秋～冬季にかけて線虫が当年生の切り枝内を通過し易かったことから、この時期が適しているものと判断された。抵抗性マツと感受性マツで線虫接種後における活性酸素増加量を調べた結果、アカマツ、クロマツいずれも感受性マツで接種後から5日目まで活性酸素発生量が増加する傾向があり、特にアカマツ皮層で顕著であった。マツの増殖については、挿し木において良好な成績は得られなかったが、接ぎ木においては、自然分解性の接ぎ木テープを利用して2月下旬に実施することにより、最高68%の活着率が得られた。

Ⅰ. はじめに

マツ材線虫病は、病原線虫であるマツノザイセンチュウ(以下、線虫)の感染によって引き起こされるマツ類の激害型枯損を特徴とした急速な委凋病である。本県におけるマツ材線虫病による松枯れ被害については、平成22年度の時点で既に旧大館市と小坂町を除くほぼ全域に及んでおり、その被害材積は、平成14年の3万9千m³弱をピークとして徐々に減少傾向にあるものの、依然、1万4千m³もの被害材の処理(秋田県農林水産部, 2011)や広大な被害地の復旧等、早急に取り組むべき重要な課題が残されている。

当センターでは、こうした被害対策の一環として平成4年より抵抗性マツの選抜育種に取り組んできた(須田ら, 2003)。これは、マツ材線虫病に耐性をもつマツ(以下、抵抗性マツ)の品種を開発し、被害地の復旧、再生に役だてようとするものであるが、現行の抵抗性判定法(接種検定法; 以下、接種検定または検定)は、淘汰選抜をベースとしたものであり、長い年月と多大な経費が必要となるうえ、研究者にかかる労力的な負担も少なくない。そのため、これを効率的に進める目的で、簡

便な手法をもとに抵抗性を判定しようとする取り組みが若干の試験研究機関でもみられるようになった（在原，1997；袴田ら，2004；川口，2005；川口・市原，2010）。

簡便な抵抗性の判定方法については，未だに実用例がみられていないものの，本県のような病兆進展が緩やかな寒冷地においては，現地選抜の段階で激害林分中に多数残ってしまった抵抗性の弱いマツを選抜してしまうリスクを大幅に削減し，顕著な選抜効率の向上を期待することができる。

こうした現状を踏まえ，前期試験研究課題（平成15～18年度）では，室内実験のレベルにおいて抵抗性マツを効率的に選抜しうる簡便な抵抗性判定手法の開発に取り組んだ結果，マツ切り枝を用いた線虫通過の難易（佐藤・須田，2004）や線虫接種後の松脂樹脂酸組成変化の分析（Zinkel and Han, 1986）から抵抗性の強弱を見積もれる可能性を見いだした（佐藤・須田，2006）。

本研究では，そうした結果を検証するとともに，問題点や不具合について改良を加え，実用に耐えうる手法の確立に取り組んだ。また，本県において検定に用いるマツ苗は，今もその全てが割高な外部委託による接ぎ木苗となっている現状を鑑み，自前で生産可能な技術をしっかり確立しておく必要があるため，若干の増殖に関わる試験を実施した。以下，そうしたなかでも主要な成果を報告する。

II. 材料および方法

1. 簡便な抵抗性判定法の検証

これまでの研究において開発した簡便な抵抗性判定法については，以下の3とおりの試験を実施し，主に切り枝を用いた線虫通過阻害試験（以下，切り枝試験）について，従来の検定と性能を比較，検証した。

1) 抵抗性候補木の接ぎ木苗による検証

当センターでは，別途試験研究課題として「マツノザイセンチュウ抵抗性個体の作出（H18～22）」（須田・佐藤，投稿中）を実施しており，本研究と連携して激害地からの候補木の選抜および，その接ぎ木苗や実生苗を用いた接種検定を行っている。

この研究は，「東北地方等マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業の実施について」の運用について（2003，平成4年10月6日付け4林育第72号，最終改正：平成15年4月1日付け14林育第587号）に従うもので，いわば“ローラー作戦”的に進められているものであり，樹形のよい大径木を選抜の対象とするものの，抵抗性の強弱についてはあまり考慮されていない。このため，作業の大半は，徒労に終わる場合も少なくないのが実情である。

こうしたことから，本項では，この研究で選抜した候補木を用いて，切り枝試験による選抜と接種検定の結果を比較し，接種検定をどのくらい効率的に進めることができるか考察した。

(1) 材料

県内沿岸部の激害地から毎年1～2月頃に選抜したクロマツ大径木のうち，経およそ7mm以上の太さを持つ当年枝が2本以上得られた候補木計63系統を用いた。

(2) 方法

選抜した候補木の当年枝を簡便法による切り枝試験に供し，抵抗性の強弱を見積もった。試験は，切枝長を1cmとした。線虫（島原個体群）は，1切枝あたり約200頭を一方（先端部）の木口面に接種した。培養は，30℃の暗所に24時間静置する条件により実施した。試験の結果，線虫の通過を

100%阻害した候補木を合格木とし、それ以外のものを不合格木とした。

全ての候補木は、穂木採取後、直ちに接ぎ木増殖（接ぎ木業者への委託）し、従来どおりビニール温室内にて接種検定に供した。検定は、既述の実施要領に従い、接ぎ木増殖した各クローンを2年間育苗後、試験実施年度の春に鉢（内φ230×深さ180mm）植え（1系統10本以上）して用いた。接種は、主軸注入法により線虫（島原個体群）1万頭／本（苗）の割合で行った。接種10週後の生存、枯死および枯損の状況から評点（林木育種センター，2003）を算出した。

接種検定結果との比較は、平成18年度（平成19年2月）に採取した分（平成21年度検定供試分）から順次行った。

2) 抵抗性候補木等の実生家系による検証

前述の接種検定において、選抜した抵抗性候補木（以下、候補木）の検定用苗木としては、接ぎ木苗と実生苗の使用が認められている。このうち、実生苗を用いる検定には、1候補木につき50本以上を供する必要がある。接ぎ木苗を用いる場合に比べて試験規模が理論上5倍も大きくなってしまう。

しかし、候補木が非常に大切なマツだったり、公園や保安林内にあるために大量の穂木確保が困難な場合、非常に有効な方法といえる。本項では、つぎの試験により選抜木と非選抜木の実生を用いて手法の検証を行った。

(1) 材料

秋田市浜田大森山公園周囲の被害地クロマツ林における生存木のなかでも球果着果が比較的良好であった一部の個体から球果を採取し、乾燥、精選により得た種子をもとに播種、育成した3年生実生苗を用いた。

(2) 方法

候補木の選抜については、平成18年冬に前述の被害地にて生存木の当年枝を切り枝試験に供し、予め抵抗性の強弱を見積もった。試験は、1cm長の当年切枝を用い、前項1)に従って行った。この結果をもとに、線虫の通過を100%阻害した切り枝試験合格家系と、それ以外の不合格家系に区分けを行い、その年の球果着果が比較的良好であった任意の各6家系よりそれぞれ球果を採取した。球果からは、乾燥、精選により種子を得た。種子は平成19年春に播種し、得た実生の3年生苗を材料とし、平成22年6月に接種試験に供した。

接種試験は、当センターの苗畑（露地）およびビニール温室の2箇所で行った。供試苗は、苗畑では1床苗の直植え、温室ではこれを鉢植え（2床苗の2本植え）とした。線虫（島原個体群）は、主軸注入法により苗1本につき1万頭を接種した。接種は、苗畑：6月9日、温室：6月22日に実施した。接種後16週目（温室）および18週目（苗畑）に生存、枯死状況を調査した。

3) 激害地から選抜した実生家系による検証（佐藤，2010）

激害林分中にある生存木は、各個体が有するそれぞれの抵抗性によって残ったものと考えられることから、その周囲にみられる実生は、こうしたもの同士の交配によって生じたものである可能性が高い。そのため、これらの実生のなかには、強い抵抗性を持つ個体の存在が期待できる。本項では、こうした点に着目し、切り枝試験による選抜とその検証を行った。

(1) 材料

秋田市下浜羽川の激害地クロマツ林（写真-1および2，試験供試時の林齢89）にて，生存木の周囲にみられる苗高50cm前後の天然更新実生を用いた。



写真-1 試験地の全景



写真-2 生存木の周囲にある供試木

(2) 方法

平成18年の冬，前述の激害林分より任意に抽出した幼苗50本を用い，当年枝を切り枝試験および樹脂酸分析に供してデヒドロアビエチン酸増加量の違いから4試験区，合格区（L区：1mg/g乾材未満，M区：1mg以上2mg/g乾材未満，H区：2mg/g乾材以上），N区：不合格，各区5本（ただし，H区のみ4本）となるよう無作為に振り分けた。これらの苗は平成19年の春に掘取りを行い，当センター構内（秋田市河辺戸島字井戸尻台）にある苗畑に移植した。試験方法および条件等については，前項1）に従って行った。

各区の苗には，平成19～21までの3カ年間苗畑（露地）において毎年6月上旬に1本あたり1万頭の線虫（島原個体群）を接種し，翌年の接種時まで生存，枯死状況を調査した。なお，線虫の接種は平成19年には主軸注入法により，翌年からは剥被法により前年枝基部に鋸傷を付けて行った。

2. 選抜手法の改良試験

本項では，上述の実証試験において浮上した問題，選抜性能のさらなる向上や実験作業の効率化等を目的にその可能性を探る試験を実施した。

切り枝試験の結果については，季節や供試線虫の系統によって異なるといわれているが（軸丸・黒田，2007と2008），試験に適した時期や条件のはほとんどは検討・統一されていないのが現状である。ここでは，秋田県内に自生しているアカマツ，クロマツ実生若齢木（抵抗性については不明）の一，二年枝を用いて季節変化が切り枝試験に及ぼす影響を調べ，試験に適した時期や枝の部位等の調査を行った。

1) 季節変化が切り枝試験に及ぼす影響（佐藤，2009）

(1) 材料

アカマツ，クロマツの天然更新実生を対象とした。材料は，本県沿岸部のほぼ中央に位置する秋田

県立大学秋田キャンパス（秋田市下新城野字街道端西）周辺のマツ林林縁部から採取した。採取は、2008年4月（一年枝は伸長を始めた5月）から毎月1回上旬（10日前後）に行った。供試枝は、均一なものを大量に採取し易いこと、病虫害による影響が比較的少ないことなどを考慮して約5～10年生若齢木の一および二年枝とし、一試験あたりそれぞれ10本ずつ無作為に採取した。

採取した枝は、直ちに不要な部分を切除した。そして、適度に水で濡らした新聞紙にくるんでポリ袋に二重にして入れた後、クーラーボックスに入れて搬送し、使用時まで冷蔵庫（4℃）に保存した。保存期間は最長でも2週間以内とした。

(2) 方法

切り枝試験は、前項1-1) に従い実施した。一年枝は針葉発生がほとんど見られない節に近い部分から、二年枝は針葉を取り除き、極端に太い部分を避けて切り枝を調製した。常法により一方の木口面に線虫（島原個体群）約200頭を接種後、24時間30℃の暗所に置き、月別に線虫が通過した枝の数および線虫通過阻害率（%）を算出、比較した。

2) 活性酸素の定量（佐藤, 2010）

切り枝試験を第一の篩（一次スクリーニング）とすれば、第二の篩（二次スクリーニング）を設定することで、選抜のさらなる効率化を図ることができる。こうした二次スクリーニングとして、線虫接種後における切り枝の松脂樹脂酸組成の変化、特にデヒドロアビエチン酸の顕著な増加に着目した（Bolla *et al.*, 1989）。

そして、前期研究のなかでは、*in vitro* 条件下において、抵抗性が強い家系のマツほど、切り枝への線虫接種後のデヒドロアビエチン酸濃度が高まる傾向にあること、植物防御に深い関わりを持つ活性酸素が松脂樹脂酸中におけるデヒドロアビエチン酸の増加を速やかに進めることを実験的に証明した（佐藤ら, 2006）。本項では、このデヒドロアビエチン酸との関与が示唆される活性酸素の挙動を調べた。

(1) 材料

以下のマツ（各区5系統を供試）を用いた。なお、感受性クロマツとして扱っている羽川2, 4, 9の抵抗性は不明であるが、切り枝試験においては抵抗性が見込まれなかった系統である。

- ・ アカマツ 抵抗性（五城目103, 上越1, 長岡17, 新潟47, 村山6）
感受性（北秋田105, 佐渡105, 中頸城103, 西蒲原3, 由利102）
- ・ クロマツ 抵抗性（志摩ク64, 土佐清水63, 波方37, 鳴瀬39, 亘理56）
感受性（秋田128, 本荘140, 羽川2, 4, 9）

(2) 方法

アカマツは、平成21年10月中旬、クロマツは11月中旬に各系統の当年枝からそれぞれ約2cmの切り枝を調製し、上端木口面に線虫（島原個体群）5,000頭/50 μ lを接種した。接種切り枝は、予め0.2mlの水を入れておいた10ml容のクライオバイアル（株式会社TOHO, 東京都江戸川区）中に接種面を上にして入れ、軽く蓋をして30℃, 暗条件下に静置した。これらの枝は、接種後1, 3および5日目に取り出してペーパータオルで余分な水分をぬぐい取り、直ちに液体窒素に投入して凍結を行

い、 -60°C 下に超冷凍保存後、測定試料とした。

活性酸素産生率の測定は、JiangとZhangの方法(2002)を若干改変し、発色試薬であるXTT(図-1a: XTT sodium salt, 和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区, 以下, 和光)をWST-1(図-1b: 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono sodium salt, 株式会社同仁化学研究所, 熊本県上益城郡益城町)(受田, 2004)に代えて行った。

分析用サンプルは、チューブから取り出した試料(切り枝)の上下両端より約5mmずつを切り捨てた後、皮層と木部に分離して、それぞれを液体窒素と乳鉢により粉碎して得た。

測定は、U-2000形ダブルビーム分光計(日立製作所, 東京都渋谷区)を用い、438nmで約5分間のタイムスキャンを続け、生成物(ホルマザン)の吸光係数 $3.7 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ から組織新鮮重あたりのWST-1還元速度($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$)から活性酸素発生量を見積もった。

タンパク質量定量は、Advancsd Protein Assay試薬(フナコシ株式会社, 東京都文京区)を用いて行った。得られたデータは、試験区ごとに平均値を求めて統計的に比較した。

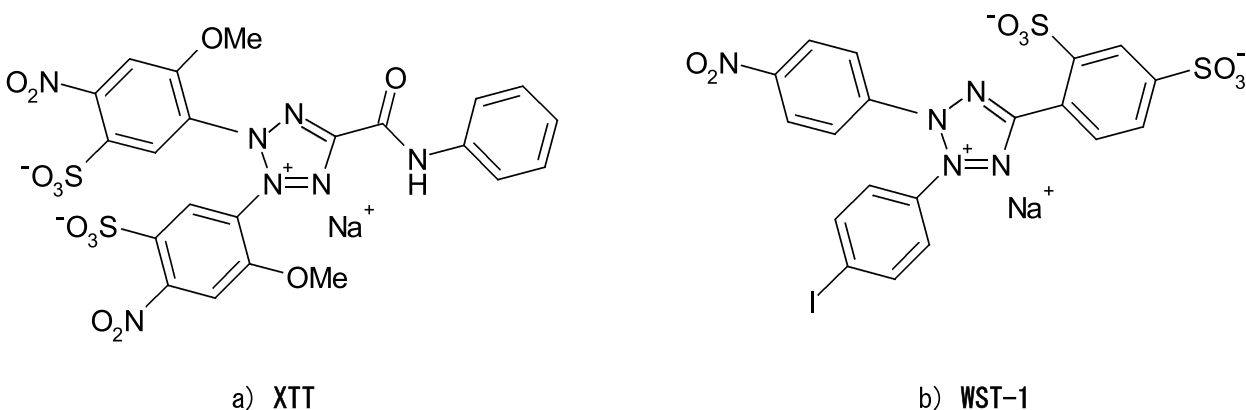


図-1 XTTおよびWST-1の化学構造

3. 増殖試験

既述のとおり林木育種事業における抵抗性の検定結果を得るには、1候補木につき最低10(以前は15)本以上の接ぎ木クローン数が必要とされる。しかし、マツの挿し木や接ぎ木増殖は、一般的に困難であり、近年ようやく技術が確立されてきてはいるものの(渡邊・小澤, 2005), 通常、その確実性から殆どの県では業者委託により割高な接ぎ木増殖を行っているのが現状である。

ここでは、このような委託予算の削減による検定のコストダウンを狙いとして、所内における増殖の可能性を検討した。

1) 穂木の増産試験

(1) 材料

ア、イの試験においては、主に本県の精英樹と西日本産抵抗性花粉を人工交配した4, 5年生の実生5系統(表-1)を用いた。また、ウの試験においては、2および3月下旬に接ぎ木試験に用いる採穂のための剪定を行った16系統のうち、アおよびイに用いた系統(7年生苗)から同様にデータ収集を行った。

(2) 方法

① 試験1: 平成20年6月下旬, 供試木の当年枝を約半分の長さで切断後, それぞれの木口面と垂直

になるよう縦に約1cm程切れ込みを入れた。そして、切れ込みには、6種類の植物成長調節剤（以下、薬剤）をそれぞれに含ませたφ6mmのペーパーディスク（薄手、アドバンテック東洋株式会社、東京都文京区）を挟み込んだ。用いた薬剤は、サイトカイニン活性を持つ6-ベンジルアミノプリン（以下、BAP、和光）、ゼアチン（以下、ZEA、和光）、カイネチン（以下、KIN、和光）、N-(2-クロロ-4-ピリジル)-N'-フェニルウレア（以下、4PU、シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京都品川区、以下、シグマ）、6(γ-γ-ジメチルアミノ)プリン（以下、2iP、シグマ）およびジベレリン（以下、GIB、和光）の6種類とした。これらの薬剤の用量は4PUのみ0.1mg/mlとし、その他の薬剤は1mg/ml溶液（アセトンやクロロホルムなどの有機溶剤、いずれも和光または関東化学株式会社、東京都中央区、以下関東）とした。ペーパーディスクはピンセットに挟んでこれら薬剤の溶液中に数秒間浸漬した後、ガラスシャーレ上において真空デシケーター中にて一昼夜乾燥を行い、有機溶剤を除去した。各薬剤につき1系統あたり2本の枝を供した。

その年の10月末に切断面付近からの発芽、枝条形成数を調査し、各平均値から効果的な薬剤の探索を行った。

② 試験2：平成21年6月上旬、前述 i) の試験において有効であったBAPを用いて次の試験を行った。すなわち、BAPをトップジンMペースト1g（日本曹達株式会社、東京都千代田区）につき0.1, 1, 10mgをそれぞれ混合した3用量の薬剤を調製し、前試験同様におよそ真ん中で切断した当年枝の木口面にこれを塗布した。また、対照としてトップジンのみを塗布した。この薬剤には、切断面の保護、殺菌効果があるとされるが、そのほかに混合薬剤の展着効果を期待した。1系統につき2本の枝を供した。その年の10月末に切断面付近からの発芽、枝条形成数を調査し、各平均値から効果的な濃度を探索した。

③ 試験3：平成23年2月下旬に、接ぎ穂採取のため剪定を行った。切断部は、前年枝のほぼ中間で針葉がついている部分とした。その年の10月中旬、各系統につき5切断面付近における発芽、枝条形成数を調査し、薬剤を使用した場合と比較検討を行った。

2) 挿し木試験

マツの挿し木については、試験当初より春先に前年枝挿しや当年枝の管伏せなど様々な手法を用いて取り組んできたものの、発根率は限りなく0%に近く増殖は到底期待し難い結果となっていた（佐藤、2009）。ここでは、平成22年2月に森林総合研究所林木育種センター東北育種場にて催されたマツの挿し木講習を基に、その後当センターにて試験、検討を行った部分のみ報告する。

(1) 材料

下表-1のとおり、人工交配による西日本産抵抗性クロマツを花粉親とする秋田県産精英樹3品種と、同じく西日本産抵抗性アカマツを花粉親とする新潟産抵抗性アカマツ2家系および西日本産抵抗性後代実生1家系の計6系統を用いた。

表-1 挿し木試験供試系統

No.	クロマツ	No.	アカマツ
1	波方ク73 ×能代3	4	総社ア39 ×村上6
2	土佐清水ク63 ×由利101	5	大分ア137 ×上越34
3	志摩ク64 ×山本104	6	久留米ア144 後代実生

(2) 方法

穂木は、平成22年3月10日に採取し、その後約1週間ガラス温室内で順化、水揚げして挿しつけを行った。挿し穂は、約10cmの長さに調製した。挿し床は、バーミキュライトを主体に木炭を添加するなどし、縦310×横460×深さ100mmの育苗箱に充填して調製した。挿し穂は、挿し木の直前に切り口を発根促進液剤に5秒ほど浸漬した後、挿しつけを行った。発根促進剤には、オキシベロンの0.4%液剤（バイエルクロップサイエンス株式会社、東京都千代田区）の原液およびこれに微粉化した活性炭 Darco G-60（和光）を混合したものをを用いた。

挿し木床は、1床ごと縦435×横665×深さ250mm（いずれも内側長）の発泡スチロール箱内に置き、上面をビニールで覆って挿し床の保温と乾燥防止につとめた。同年7月下旬に発根調査を行った。

3) 接ぎ木試験

接ぎ木は、マツのクローン増殖に最も適した方法であるが、専門の業者も存在するほど一般には難しい技術である。こうしたなか、福島県の渡邊らは、割り接ぎの際に金属製の目玉クリップを用いて接ぎ穂の台木への固定を迅速に行っても、8割以上の活着が得られるという（渡邊ら、2003）。当所における作業は、もう少し基本に戻り、渡邊・小澤（2005）による方法を参考として接ぎ木テープを用いた試験を実施した。

(1) 材料

県産精英樹×西日本産抵抗性花粉による人工交配家系16系統（家系）を用いた。台木は11月末に1床2年生苗木400本を購入（有限会社田村山林緑化農園、秋田県山本郡三種町）した。接ぎ木テープには、New Medel（株式会社アグリス、福岡県八女市）を使用した。この製品は、離型紙をはがす手間がかからず、テープは自然劣化するので除去する必要がないことなどから、金属製目玉クリップの使用上で問題となる除去作業の手間や金属製ゆえ避けられない錆による劣化がないために、接ぎ木作業に多少時間はかかるものの、省力化、低コスト化が期待できるなど、トータルの面で様々なメリットが期待できる。

(2) 方法

挿し木は2回に分けて行った。すなわち1回目を2月22、23日に8家系、2回目を3月28、29日に8家系実施し、作業時期による活着の良否を比較した。材料は、採取当日または翌日に接ぎ木に供した。翌日使用する場合は、ポリ袋に入れたままとし、封をする前にミストスプレーをかけて乾燥防止につとめた。台木は、前年12月上旬に半数を苗畑に仮植し、残りは縦330×横580×深さ240mmの

樹脂製プランターに畑土を用いて50本ずつ仮植して冷暗室内におき、厳冬期に雪中から穂木の掘取りをする手間を省くようにした。また、これらの苗は、使用まで新聞紙を二枚重ねにして上面にかぶせ、適宜かん水や粉雪をまいて乾燥、枯死を防いだ。

接ぎ木は、割り接ぎとした。1系統につき25本の接ぎ木を行った。接ぎ木苗は赤玉土（中、小粒混合）を用土とした自作のプランターに順次植栽した。自作のプランターには、写真-3のように下部が網状になっているコンテナボックス（縦330×横485×深さ295mm）を用いた。用土漏れを防ぐため、その内側を90リットルのポリ袋（家庭用ゴミ袋（大）または同規格の代用品を使用）で



写真-3 自作プランターを用いて各系統毎に行った接ぎ木

覆った。ポリ袋には、排水のためカッターナイフで底に多数の穴を空けた。用土はコンテナボックスに半分程度の深さとなるように用土約14リットルを充填した。このプランターには、苗木植栽後に十分灌水し、写真-3のように1プランターに3本の園芸用支柱（ ϕ 3mm、長さ100mm）をドーム状に設置してポリ袋で上部を覆い、乾燥や急激な温度変化を防止した。順化は、植え付け約1カ月後から上部のビニールを徐々にずらして開口し、2カ月後には完全に外気に暴露させた。活着調査は、同年6月下旬に行った。

Ⅲ. 結果および考察

1. 簡便な抵抗性判定法の検証

1) 抵抗性候補木の接ぎ木苗による検証

結果を表-2に示す。切り枝試験による調査は、平成18年度（平成19年2月）以降に選抜した候補木から順次実施した。よって、最初の一次接種検定は平成21年度となる。なかには試験条件を満たす枝が採取できなかったため、切り枝試験には供さない候補木もあった。

21年度においては、切り枝試験に合格した12系統のうち3系統が一次接種検定に合格し、同様に22年度には切り枝試験に合格した7系統のうち1系統が合格した。両年を通じて、切り枝試験の不合格木から一次接種検定合格木が出ることはなかった。

切り枝試験における二年間の選抜率をみると、合格木19系統のうち4系統が一次接種検定に合格しており、この割合は、次式（ $4/19 \times 100$ ）から21.1（%）と算出されるが、この結果は、（独法）森林総合研究所林木育種センター東北育種場における抵抗性育種事業（須田ら、2003；林木育種センター、2003）の開始からこれまでに至る二次検定合格率（（二次接種検定合格木数/二次接種検定供試木数） $\times 100$ から算出）、即ち、各県等にて一次接種検定に合格した系統が再試験（二次接種検定）により合格する割合と比較した場合、平成22年度までの段階においてアカマツ：19.5、クロマツ：22.4%となっており（独立行政法人森林総合研究所林木育種センター東北育種場、2011）、クロマツの結果より若干劣っていたものの、その性能はほぼ同程度と考えても良いように思われた。

切り枝試験については、秋～冬、特に9～12月頃が適期である（佐藤，2009，軸丸・黒田，2006）が、本試験では、接ぎ穂採取後の2月中下旬以降に実施したことから、絞り込みが甘くなった可能性が考えられた。しかしながら、切り枝試験による不合格木から接種検定合格木が出ていない事実からは、切り枝試験が接種検定に合格する見込みのないマツを排除するのに有効な手法であることが示唆された。

表-2の結果をもとに、縦軸に切り枝試験の阻害率，横軸に一次接種検定の評点としてこれらの関係を調べたところ、図-2のとおり大まかには線虫通過阻害率の低い個体は一次検定における評点が低い傾向がみられたものの、両因子に明確な相関関係は見いだせなかった。このことから、抵抗性マツにおける線虫通過，分散の難易は、抵抗性マツにとって必要な要素ではあることに間違いはないと思われるものの、それだけで抵抗性を説明するにはやや難があることから、動的抵抗性のような異なる因子の存在が示唆された。

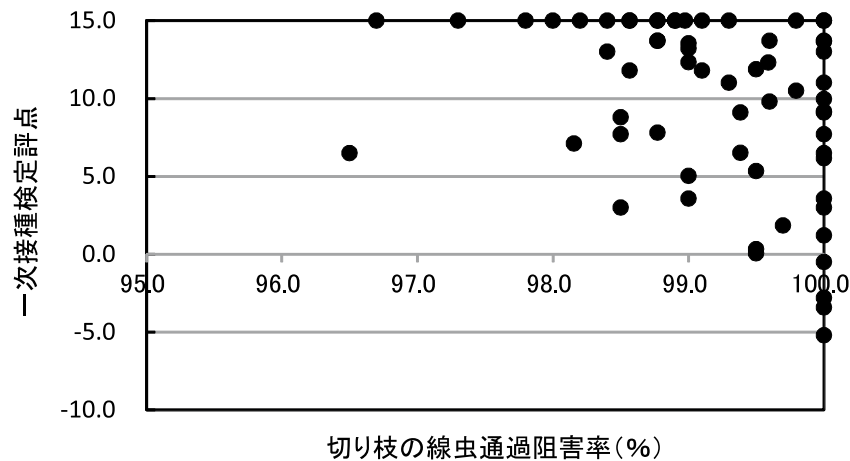


図-2 マツ新梢切り枝を用いた線虫通過阻害率と一次接種検定結果（評点）との関係

表-2 抵抗性候補木のマツ新梢切り枝の線虫通過阻害率および一次接種検定結果

平成21年度				平成22年度			
系 統	阻害率 ^a	一次評点 ^b	合否 ^c	系 統	阻害率 ^a	一次評点 ^b	合否 ^c
男 鹿 119	100	7.7		金 浦 72	99.3	11.0	
男 鹿 120	100	6.2		金 浦 83	98.4	15.0	
男 鹿 121	99.5	0.3		にかほ 108	97.8	15.0	
男 鹿 122	100	-5.2	○	にかほ 109	98.6	11.8	
男 鹿 123	99.0	5.0		にかほ 110	98.9	15.0	
男 鹿 124	99.5	0.1		にかほ 111	---	15.0	
男 鹿 125	99.0	3.6		金 浦 113	98.2	15.0	
秋 田 126	100	3.0		金 浦 114	99.0	15.0	
秋 田 127	100	6.5		金 浦 117	100	15.0	
秋 田 128	98.5	3.0		金 浦 118	100	9.1	
秋 田 129	98.5	7.7		男 鹿 149	98.6	15.0	
秋 田 130	100	-3.4	○	男 鹿 150	99.6	9.8	
秋 田 131	96.5	6.5		男 鹿 151	100	-2.8	○
秋 田 132	---	1.7		男 鹿 152	98.8	13.7	
秋 田 133	---	11.8		男 鹿 153	99.3	15.0	
にかほ 134	---	11.0		男 鹿 154	100	13.7	
にかほ 135	100	3.6		男 鹿 155	---	15.0	
にかほ 136	100	10.0		男 鹿 156	99.4	6.5	
にかほ 137	99.0	12.3		男 鹿 157	99.1	11.8	
にかほ 138	99.0	13.5		男 鹿 158	98.2	7.1	
本 荘 139	100	13.7		男 鹿 159	97.3	15.0	
本 荘 140	99.7	1.9		男 鹿 160	98.4	13.0	
本 荘 141	99.5	11.9		男 鹿 161	100	15.0	
本 荘 142	99.5	5.3		男 鹿 162	96.7	15.0	
本 荘 143	100	1.2		男 鹿 163	98.9	15.0	
金 浦 144	100	9.2		金 浦 164	99.1	15.0	
金 浦 145	98.5	8.8		金 浦 165	98.0	15.0	
金 浦 146	---	3.1		金 浦 166	99.6	12.3	
金 浦 147	100	-0.5	○	金 浦 167	99.8	15.0	
金 浦 148	99.0	13.2		金 浦 168	99.4	9.1	
				金 浦 169	99.8	10.5	
				金 浦 170	99.6	13.7	
				金 浦 171	100	13.0	
				金 浦 172	98.6	15.0	
				金 浦 173	98.8	7.8	
				金 浦 174	98.8	15.0	
				金 浦 175	98.8	15.0	
				金 浦 176	---	9.8	
				金 浦 177	100	11.0	
				金 浦 178	98.8	13.7	
30系統を供試, うち3系統が一次検定合格				40系統を供試, うち1系統が一次検定合格			

a マツ新梢切り枝を用いた線虫通過阻害試験阻害率 (%)

b 一次接種検定評点 ()

c 一次接種検定による合否判定 (○ : 合格)

2) 抵抗性候補木等の実生家系による検証

結果を表-3に示す。切り枝試験における合格木(100%線虫通過阻害木)家系と不合格家系の実生苗を用いた接種試験においては、統計的に有意な差が見られなかった。こうした結果については、現地で自由交配が行われたために、抵抗性の強いものと弱いものが交配し、然るべき差が相殺されてしまったことや、切り枝試験が単年度のみであるために、結果の精度に粗さが出てしまったことなどが考えられた。

しかしながら、両接種試験から温室、露地のいずれにおいても切り枝試験合格家系のほうが若干生存苗木数が多く、枯損苗木が少ない傾向にあることを伺うことが出来た。なかでも114号による温室での結果は、生存率58.3%(7/12)と良好な成績を示した。この結果は、抵抗性対照家系(標準木:抵抗性テーダマツと同程度の強さとされる)の生存率平均値の55.2%(69/125)より若干高目であったことから、抵抗性候補木としては有望(一次接種検定に合格する可能性が高い)であることが考えられた。

発展的な試験として、枯損数が少なかった露地の接種木には、次年(平成23年)の6月中旬に再度接種試験を実施し、露地での接種検定が可能であるかどうか確認した。線虫は、固定された系統の中でも強毒とされるKa-4(蓬田・小岩, 2000)を接種した。接種は主軸注入法により十分充実した側軸に行った。

結果は表-4に示したとおりで、大半のマツで枯損が少なかった。そのうえ、対照家系の枯損数も少なかったことから、寒冷地においては、強毒線虫をもってしても露地での接種試験は成立し難いことが伺えた。

結果の内容を見ると、切り枝試験の合格家系の生存率は平均91.8%(56/61)で、不合格家系のそれは76.9%(50/65)だった。このとき、対照家系は88.0(44/50)で、その大半の前年針葉には黄化が観察されていることなどから、切り枝試験による選抜家系は強い抵抗性を有している可能性が示唆され、当初の仮説が正しいことを検証することが出来た。

表-3 マツ新梢切り枝を用いた線虫通過阻害試験による合否と接種検定結果

区 分	温 室		露 地	
	供試数	生存/枯死	供試数	生存/枯死
切り枝試験合格家系 (クロマツ)				
45	12	3/9	10	7/3
82	12	5/7	12	12/0
102	12	1/11	12	11/1
111	12	3/9	10	9/1
114	12	7/5	12	12/0
154	12	0/12	12	10/2
計	72	19/53	68	61/7
切り枝試験不合格家系 (クロマツ)				
31	12	5/7	12	12/0
43	12	3/9	12	10/2
91	12	0/12	12	11/1
105	12	3/9	12	11/1
107	12	1/11	12	11/1
182	12	2/10	12	10/2
計	72	14/58	72	65/7
抵抗性対照家系 (アカマツ)				
一関101	25	10/15		
岩泉101	25	15/10		
岩手104	25	12/13		
三本木3	25	16/9		
北蒲原3	25	16/9		
計	125	69/56		
感受性対照家系 (クロマツ)				
精英樹	12	2/10	12	11/1

表-4 マツ新梢切り枝を用いた線虫通過阻害試験による合否と露地におけるKa-4接種検定結果

区 分	露 地	
	供試数	生存／枯死
切り枝試験合格家系（クロマツ）		
45	7	7／0
82	12	11／1
102	11	8／3
111	9	9／0
114	12	12／0
154	10	9／1
計	61	56／5
切り枝試験不合格家系（クロマツ）		
31	12	10／2
43	10	7／3
91	11	9／2
105	11	8／3
107	11	10／1
182	10	6／4
計	65	50／15
抵抗性対照家系（アカマツ）		
一関101	10	8／2
岩泉101	11	10／1
岩手104	10	10／0
三本木3	9	9／0
北蒲原3	10	7／3
計	50	44／6
感受性対照家系		
精英樹	11	6／5

3) 激害地から選抜した実生家系による検証

結果を図-3および4に示す。調査木50本中線虫が通過したものは23本、通過できなかったものは27本で全体の54%を占めた。これにより、幼木は成木より線虫が通過しにくい傾向（佐藤・須田，2006）が現場においても確認された。これには若い組織が予想以上に緻密に出来ている可能性が考えられた。

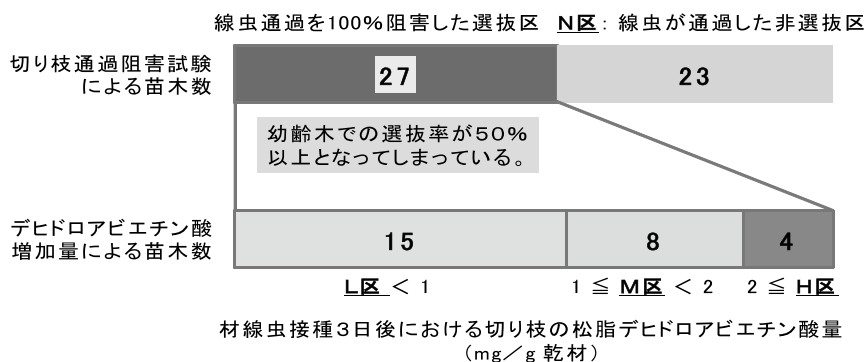


図-3 クロマツ新梢を用いた切り枝通過阻害試験結果および当該選抜木切片に線虫5,000頭を接種した3日後におけるデヒドロアビエチン酸増加量と苗木数

試験は、図-3によりN, L, MおよびH区の4区に分けて実施した。図-4においては、線虫の通過を阻害しなかったN区の苗において、平成22年春まで5本中1本しか健全な個体が見られず、3本は枯死、残りの1本は生育不良の状況であった。

線虫の通過を完全に阻害した選抜区のなかで苗のデヒドロアビエチン酸含量を調べたところ、低いもので0.5から高いもので3.1mg/g乾材まで約6倍もの開きがあった。この含量をもとにL, MおよびH試験区分けしたマツの枯損状況においては、2mg/g乾材以上のH区の個体が全て枯損、1mg/g乾材以上2mg/g乾材未満であるM区個体の生存数が5本中1本であったが、1mg/g乾材未満のL区の個体では5本中4本が健全に生存しており、枯損し難いことが明らかとなった(図-4)。

本結果においては、切り枝試験が一選抜手法として有効であることが検証できたものの、マツ樹体内への線虫侵入に伴うデヒドロアビエチン酸の増加が、線虫の移動増殖に阻害的にはたらく動的抵抗性物質の本体と考えた当初の我々の仮説とは全く逆となり、むしろ被害の程度に関わる可能性を示唆する結果となった。

しかしながら、デヒドロアビエチン酸には、線虫を不動化したり殺す活性を持つ(Bolla et al., 1989) ことなどから、線虫の移動・通過がし難い性質を持つ抵抗性木において、線虫の広範囲樹体内への拡散や増殖を阻害するには、局所的にみれば十分でありかつ適度な増加量となっている可能性は考えられる。このような見解については、今後継続して精査、検証を進めたい。

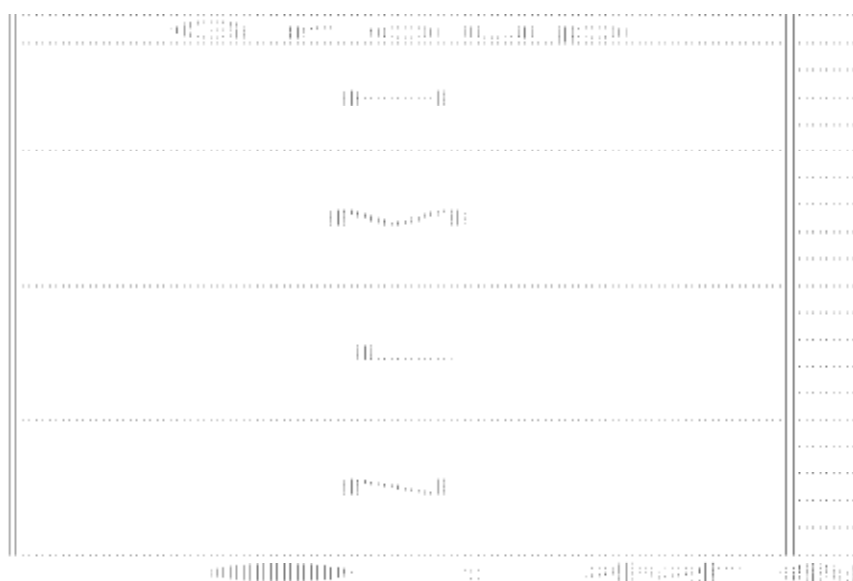


図-4 クロマツ各区における接種試験の結果（生存，枯死等の状況）および経過

2. 選抜手法の改良試験

1) 季節変化が切り枝試験に及ぼす影響

クロマツおよびアカマツの結果を図-5に示す。クロマツの前年枝（以下，二年枝と記す）において，線虫が通過した切り枝数の推移は，平均およそ3本であり，月によって多少増減はしているものの，顕著な季節的変動傾向はみられなかった。当年枝（以下，一年枝と記す）は，形成後の5月から徐々に増加する傾向にあり，9月をピークとして以後2月までほぼ7～8本を維持し，樹液の流動や樹の成長がはじまると思われる3月頃から低下することが分かった。一方，アカマツについては，一，二年枝ともに0～3本の増減がみられた程度であったが，一年枝においては8～10月に若干切り枝を通過しやすい可能性が示唆され，その数は少ないもののクロマツと同様の傾向にあることが伺えた。

切り枝試験による線虫通過阻害率（以下，阻害率）は，クロマツの一年枝で9月と2月にいずれも97%弱（9月：96.6，2月：96.8%）まで，アカマツの一年枝で9月と1月に99%前後（9月：99.1，1月：98.6%）まで低下した時期があった。これには，気温の低下や日照時間の変化に伴う樹液流動や吸水量の減少といったマツの生理活性の低下に起因することが考えられた。一方，これらの二年枝は，年間を通じて高い阻害率を維持していたことから，切り枝試験にはあまり適さないことが示唆された。

以上から，本試験に供したマツの大半が感受性であると仮定した場合，切り枝試験において，アカマツ若齢木は試験条件（静置時間や切り枝長など）を若干見直す必要はあるものの，クロマツと同様に一年枝を初秋～冬季間に供することで，線虫が通過する個体の排除を可能とし，抵抗性の低いマツを選抜してしまう危険を減らす効果が期待出来ることが示唆された。

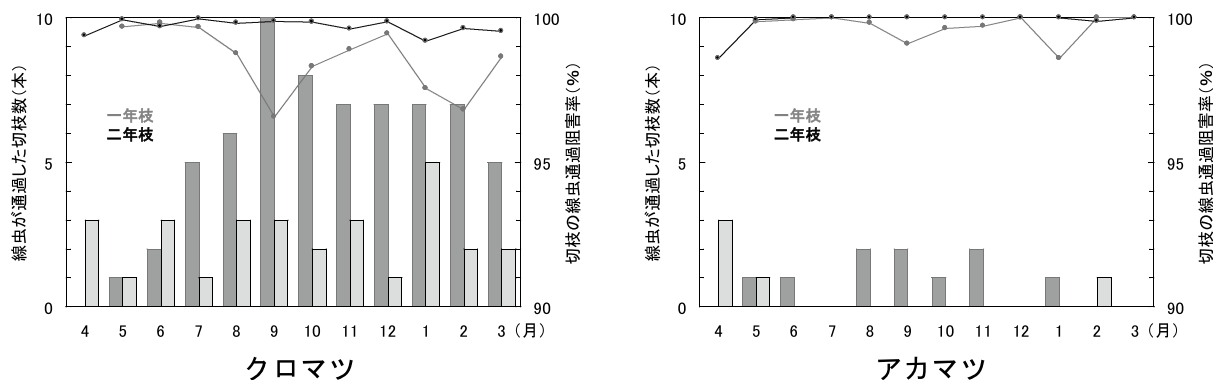


図-5 クロマツ，アカマツの一，二年枝切り枝を用いた線虫通過切り枝数（本）および切り枝通過阻害率（%）

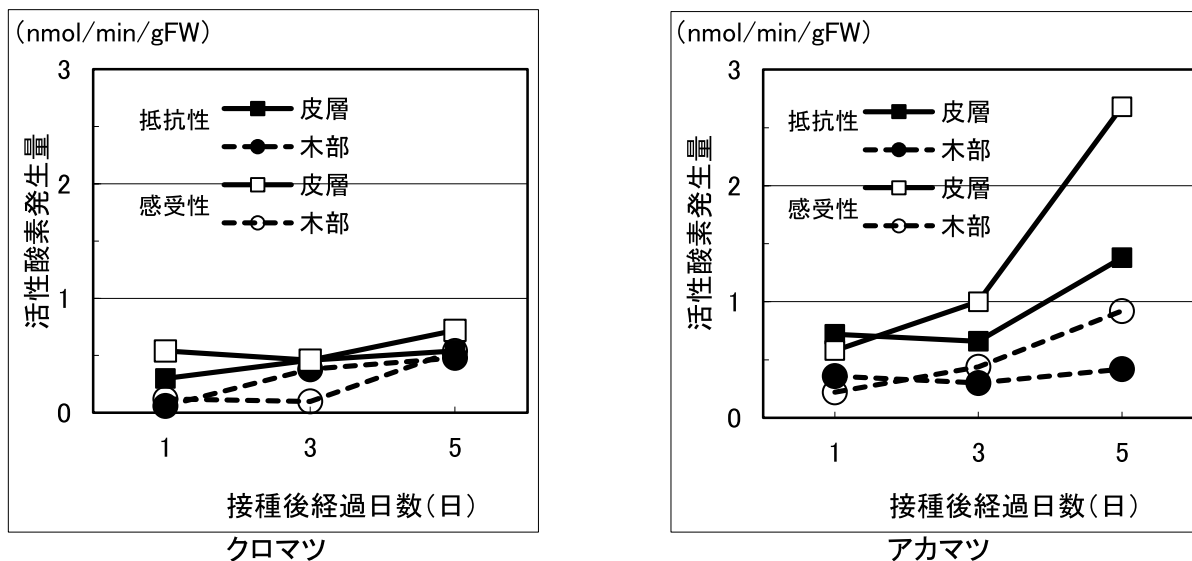
2) 活性酸素の定量

線虫接種後1, 3および5日の活性酸素発生量の推移を図-6に，タンパク質量の推移を図-7に示す。活性酸素発生量を見ると，アカマツでは，接種3および5日後に感受性区の皮層で発生量が増加する傾向がみられ，特に，5日後になると皮層，木部ともに感受性区で有意な増加 ($p < 0.01$) が確認された。一方，クロマツでは，接種後1日目において感受性区の皮層で抵抗性区より発生量がやや多かったが，接種3日後以降からは両区の皮層と木部において活性酸素量の増加傾向が確認されたものの，区間および部位間において統計的な差はあまり認められなくなった。

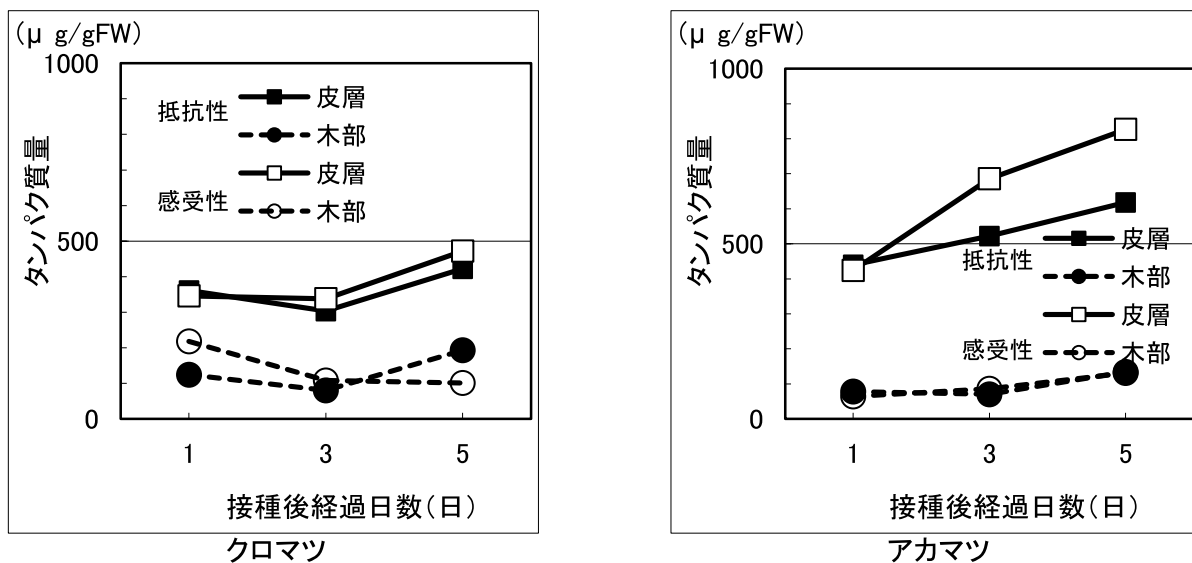
同様に，試験期間中のタンパク質量の推移を見ると，アカマツでは，感受性区において皮層，木部共に接種後3～5日目まで抵抗性区より有意に高くなった ($p < 0.01$)。クロマツでは，区間および部位間において顕著な差は見られなかったものの，木部においては感受性区で減少，抵抗性区で増加する傾向が見られた。

以上から，マツにおける活性酸素の発生は，線虫の樹内侵入に伴うダメージの大きさとの関係があることが考えられるが，その場合，クロマツ抵抗性区における接種後の活性酸素発生量の増加は，いったん線虫の侵入を受け入れた後に発揮しうる抵抗性（動的抵抗性）の存在を強く示唆するものと思われる。タンパク質量の増加については，アカマツにおいて感受性区で特に高まっていることから，線虫の移動や増殖といった動態変化に起因した何らかの生理変化によるものと考えられ，二次スクリーニングへ応用しうる可能性が示唆された。

Yamada (1987) は，4年生クロマツの主軸に1万頭のマツノザイセンチュウを接種し，組織の脂質過酸化とその関連酵素群（パーオキシターゼやSOD，カタラーゼ等）のその後の推移について調べ，これらの酵素は接種後4週目まで増加すると報告している。この点では，本研究結果同様に線虫の侵入が活性酸素の発生を促す原因となりうる可能性が示されたものの，抵抗性と関連した情報については不足している。こうしたことについては，今後継続して精査を行い明らかにしたい。



図—6 クロマツ、アカマツ切り枝への線虫接種後1, 3および5日における活性酵素発生量



図—7 クロマツ、アカマツ切り枝への線虫接種後1, 3および5日におけるタンパク質含量

3. 増殖試験

1) 穂木の増産試験

試験1, 2および3の結果をそれぞれ表-3, 4および5に示す。試験1において、枝条形成に有効なサイトカイニンは、BAP (3.1) > 2iP (2.6) > ZEA (2.5) > KIN (1.6) の順に顕著であることが分かった。一方、4PUとGIBは、大半の系統の枝条形成にほとんど効果は無かったが、4PUは次年に伸長しうる芽の形成(発芽活性)が顕著であった(表-1)。

表-3 各種サイトカイニンおよびジベレリンによるマツの発芽，枝条形成に及ぼす影響

系 統	BAP	KIN	2iP	ZEA	4PU	GIB
能代3 ×波方ク73	4.5(0.5)	1.0(2.0)	3.5(2.0)	0 (3.0)	0.5(6.0)	2.0(2.5)
山本104×志摩ク64	1.5(1.5)	2.0(0.5)	4.0(1.0)	1.5(1.0)	0 (3.5)	0 (2.0)
由利1 ×川内ク290	5.5(0.5)	1.0(3.0)	3.0(1.0)	0.5(3.0)	0 (3.0)	0 (2.0)
由利6 ×夜須ク37	1.0(4.5)	1.0(1.5)	1.5(3.0)	5.0(2.0)	0 (4.5)	0 (2.0)
由利101×土佐清水ク63	3.0(1.0)	4.0(0.5)	1.0(1.0)	5.5(0)	0 (3.5)	0 (0)
平均値	3.1(1.6)	1.8(1.5)	2.6(1.6)	2.5(1.8)	0.1(4.1)	0.4(1.7)

n=2, 裸数値は枝条数を, ()内の数値は伸長がみられなかった芽の数を示す。

この結果を受けて翌年実施した試験2においては，枝条形成に最も有効であったBAPを様々な用量に調製して枝の切断面に塗布したところ，BAP濃度の上昇に伴い形成した枝条数が多かった。本結果においては，BAPの効果は確認できたが，最適濃度を押さえることはできなかった。なお，ペーパーディスクに薬剤を染み込ませて用いた場合より，トップジンのみを用いた結果の方が枝条形成数が多かったことから，この時期に用いるトップジンにもサイトカイニン様の活性が期待できることが示唆された（表-4）。

表-4 種々の濃度のBAPがマツの枝条形成に及ぼす影響

系 統	BAP濃度 (mg/gトップジン)			
	0	0.1	1.0	10.0
能代3 ×波方ク73	6.5	6.5	7.0	7.0
本荘1 ×波方ク73	2.5	5.5	6.0	7.0
山本104×志摩ク64	7.0	4.5	4.5	10.5
由利3 ×夜須ク37	1.0	3.0	5.5	6.0
由利101×土佐清水ク63	5.0	6.5	7.5	6.0
平均値	4.4	5.2	6.1	7.3

n=2, 裸数値は枝条数を示す。

試験3においては、単に冬季剪定のみによる枝条形成数を調べた。調査系統は、主に強い抵抗性が期待される波方ク73による交配家系を主体にそれぞれ5箇所の剪定部位について調べ平均値を求めた。その結果、5系統による平均は5.8と、試験イにおけるBAP0.1～1.0mg/gトップジンの使用とほぼ同等であり、枝条の成長状況も挿し木の挿し穂としてばかりではなく、接ぎ木の接ぎ穂として使用可能なほど程度が良いものが多かった（表-5、写真-1）。



写真-4 冬季剪定がマツの枝条形成に及ぼす影響

本試験によって得た穂木は、平成23年度内に挿し木および接ぎ木試験に供する予定である。

表-5 冬季剪定がマツの枝条形成に及ぼす影響

系 統	n	枝条形成数 (本)
能代3 ×波方ク73	5	6.0
本荘1 ×波方ク73	5	3.6
山本104×志摩ク64	5	6.0
由利3 ×夜須ク37	5	6.6
由利101×土佐清水ク63	5	6.6
平均値		5.8

2) 挿し木試験

挿し木試験結果を表-6に示す。発根については、全体的に好ましい成績は得られなかったが、強いて分析すれば、クロマツの方がアカマツより良かった。また、用土別にはどのような条件においても大差はなかったものの、いずれも発根促進剤で処理したもののみから発根していたため、この処理は必要であることがわかった。今後の苗木増殖に向けては、バーミキュライト単用に発根促進処理を行うことで対応したい。

表-6 クロマツ，アカマツの用土別挿し木試験結果

挿し床条件	発根促進剤 ^a	クロマツ			アカマツ			計
		1	2	3	4	5	6	
バーミキュライト	—	0 ^b	0	0	0	0	0	0
バーミキュライト	+	1	0	0	0	0	1	2
バーミキュライト10：木炭1	—	0	0	0	0	0	0	0
バーミキュライト10：木炭1	+	0	1	1	0	0	0	2
バーミキュライト+Darco25%	+	0	0	0	0	0	0	0
バーミキュライト+Darco13%	+	0	2	0	0	0	0	2

a 発根促進処理は，挿し付け基部（切り返し部位）をオキシベロン原液に約5秒浸漬した。

b n=5

3) 接ぎ木試験

接ぎ木試験結果を表-7に示す。試験は2月下旬と3月下旬に実施した。活着は，2月下旬の成績が3月下旬のそれより平均で約2倍以上高かった。この理由には，穂木の生理状態すなわち樹液流動が活発となる時期や，作業に関わった職員の技術等の影響が考えられた。

実際，2月下旬に実施した接ぎ木の大半は，何年か経験を積んだ研究職員と現業職員によるものだが，3月下旬に実施した接ぎ木は経験の無い3名の現業職員が主体となって実施したものである。この結果からは，マツの接ぎ木に適期を考慮する必要はあるものとして，それ以前に作業にあたって技術的にも十分な経験が必要であることが伺える。

試験に供した系統は，後代実生の抵抗性が高いとされる波方ク73および37，土佐清水ク63と東北地方等基本区内の精英樹との交配家系であることから，強い抵抗性を有する家系の存在が期待される。

これらの系統は，今後接種検定に供して抵抗性の強さを調べる予定である。

表-7 接ぎ木試験結果

接ぎ木時期および系統	活着率 (%)
平成23年2月22-23日	
本荘1 ×波方ク73	60.0
能代3 ×波方ク73	52.0
山本101×波方ク73	44.0
山本102×土佐清水ク63	45.8
由利3 ×波方ク73	64.0
由利6 ×土佐清水ク63	68.0
由利101×波方ク73	62.5
由利101×土佐清水ク63	64.0
平均	57.5
平成23年3月28-29日	
飽海101×土佐清水ク63	24.0
飽海101×波方ク37	16.0
象潟1	12.0
本荘1 ×波方ク37	16.0
由利1 ×波方ク37	16.0
由利3 ×波方ク37	24.0
由利4 ×波方ク37	40.0
由利101×波方ク37	16.7
平均	20.6

IV. おわりに

マツ材線虫病の研究は、長期にわたり様々な方面から進められてきたが、マツの枯損機構については、未だ明らかにされたとは言い難い。一方、抵抗性機構についても、物質示唆の報告はあるが、抵抗性との関係を結びつけた報告は少ない。こうしたなか、本研究では、8カ年という研究期間のなかで、抵抗性の強いマツを効率的に選抜する手法を暫定的ではあるが確立することができた。このことは、これまでに蓄積された数多くの知見の賜物にほかならない。

今日、マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業の成果として、抵抗性クロマツ98、同アカマツ207品種が登録されており（平成22年度現在）、抵抗性機構の解明に向けた試験材料が整ってきたことは、大変心強いことである。しかしながら、これらのリスト中に未だ本県産のクロマツが加わっていない現実もしっかりと受けとめる必要がある。特に、本県の海岸線のほとんどが砂浜であり、マツ林は地域住民の生活基盤を守る重要な役割を果たしていることから、早急なる抵抗性マツの開発が望まれている。今後、本研究の成果を活用することにより、こうしたニーズに応えたい。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、独立行政法人森林総合研究所林木育種センター東北育種場からは、マツノザイセンチュウ、ボトリチス菌および抵抗性マツ対照苗木等を配布いただいた。秋田県立大学生物資源科学部小川敦史先生には活性酸素定量法をご指導賜った。また同大学からは、試験に用いる多くのマツ枝を採取させていただいた。ここに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 秋田県農林水産部（2011）秋田県林業統計. 140-141, 秋田.
- 在原登志男（1997）マツ材線虫病抵抗性簡易検定法の試み（Ⅰ）－冬期間に接種した数種マツ切り枝におけるマツノザイセンチュウの移動，増殖または死滅－. 森林防疫 46：3-8;マツ材線虫病抵抗性簡易検定法の試み（Ⅱ）－年間を通じて接種したストローブマツおよびアカマツの切り枝における線虫の移動，増殖または死滅－. 森林防疫 46：224-226.
- Bolla, R. I., Nosser, C. and Tamura, H. (1989) Chemistry of Response of Pinus to *Bursaphel-enchus xylophilus* : Resin Acids. Jpn. J. Nematol. 19：1-6.
- 独立行政法人森林総合研究所林木育種センター東北育種場（2011）林木育種推進東北地区協議会，平成23年度資料：57-61.
- 袴田哲司・加藤公彦・牧野孝宏・山本茂弘（2004）マツノザイセンチュウを接種したクロマツから発生する微弱発光. 日植病報 70：162-167.
- 軸丸祥大・黒田慶子（2007）抵抗性アカマツ数家系の切り枝におけるマツノザイセンチュウ通過数の比較. 第118回日本林学会大会学術講演集：65pp. ; (2008) 抵抗性アカマツ数家系の切り枝におけるマツノザイセンチュウ通過数の比較（Ⅱ）. 第119回日本林学会大会学術講演集：126pp.
- Jnag M. and Zhang J. (2002) Water Stress-induced Abscisic Acid Accumulation Triggers the Increased Generation of Reactive Oxygen Species and Up-regulates the Activities of Antioxidant Enzymes in Maize Leaves. J. Exp. Bot. 53：2401-2410.
- 川口エリ子（2005）皮層樹脂道の形質とマツノザイセンチュウの移動－抵抗性の異なる樹種間での比較－. 第116回日本林学会要旨集：628pp.
- 川口エリ子・市原 優(2010)クロマツの節におけるマツノザイセンチュウの移動抑制. 林誌日：1-7.
- 佐藤博文・須田邦裕（2004）マツ新梢切枝を用いたマツノザイセンチュウ通過阻害試験. 東北森林科学会第9回大会講演要旨集：44pp.
- 佐藤博文・須田邦裕（2006）マツノザイセンチュウ抵抗性木の大量選抜に関する研究. 秋田県森林技研報 16：145-162.
- 佐藤博文・澁谷 栄・土居修一（2006）マツノザイセンチュウを接種したマツ切枝の成分. 東北森林科学会第11回大会講演要旨集：40pp.
- 佐藤博文（2009）秋田県におけるマツ切枝によるマツノザイセンチュウ通過阻害の季節変化. 第120回日本森林学会講演要旨集：653pp.
- 佐藤博文（2009）マツノザイセンチュウ抵抗性木の大量選抜に関する研究（Ⅱ）. 秋田県農技セ森

林平成21年度業務概要：23pp.

佐藤博文（2010）マツノザイセンチュウを接種したマツ切り枝のWST-1還元. 第120回日本森林学会講演要旨集：668pp（講演中止）.

佐藤博文（2010）マツノザイセンチュウを接種したクロマツ切り枝の松脂デヒドロアビエチン酸増加量と抵抗性について. 東北森林科学会第15回大会講演要旨集：15pp.

須田邦裕・佐藤博文（2011）マツノザイセンチュウ抵抗性個体の作出. 秋田県農技森林研報 21：投稿中.

須田邦裕・伊藤精二・真坂京子・富樫 均・澤田智志・佐々木明夫（2003）東北地方等マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業. 秋田県森林技術センター研究報告：1-12.

林木育種センター（2003）「東北地方等マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業の実施について」の運用について, 林育第587号.

受田浩之（2004）WST-1を用いたスーパーオキシドアニオンの検出とその応用. Dojin News 112：1-8.

渡邊次郎・斉藤 寛・小澤 創(2003)マツの大量つぎ木技術の確立とマツノザイセンチュウ抵抗性一次検定実施率100%の達成. 林木の育種特別号：1-4.

渡邊次郎・小澤 創（2005）針葉を調整しない穂木を用いたマツの大量つぎ木改良試験林木の育種特別号：7-9.

蓬田英俊・小岩俊行（2000）アカマツ精英樹人工交配家系に対するマツノザイセンチュウ再接種による選抜効果の推定. 林木の育種特別号：38-40.

Yamada, T. (1987) Lipid Peroxidation during the Development of Pine Wilt Disease. Ann. Phytopath. Soc. Japan 53：523-530.

Zinkel, D., F. and Han, J., S. (1986) GLC Detection of the Resin Acid Composition in Rosin and Oleoresins：State of Art. Naval Stores Rev. 14：14-19.