

きのこの菌床栽培袋を用いた効率的なマツノザイセンチュウ の大量増殖

誌名	日本森林学会誌
ISSN	13498509
巻/号	1005
掲載ページ	p. 182-185
発行年月	2018年10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



きのこの菌床栽培袋を用いた効率的なマツノザイセンチュウの大量増殖

宮下智弘^{*1}・中村人史¹・渡部公一¹

マツノザイセンチュウ（以下、線虫と呼ぶ）の大量増殖方法は、精麦したオオムギを用いた培地 20 g をガラスシャーレに入れて培養する手法が一般的であるが、必要な線虫数が多いと培養にかかる作業量が過大になりがちである。そこで著者らは、食用きのこの菌床栽培に用いられる栽培袋に着目し、この袋に多量のオオムギを入れることにより作業効率が向上できないか検討した。オオムギを用いた培地を計 2,000 g 入れたシャーレ 100 枚と、計 1,700 g 入れた栽培袋 6 袋で培養を行った。その結果、菌床用栽培袋でも線虫を培養することが可能であった。両者の採取できた線虫数に大きな違いはなかったが、線虫の培養にかかる一連の作業時間は前者が 407 分、後者が 76 分と大きく異なった。栽培袋による作業時間はシャーレの場合と比べて 20% 程度となった。栽培袋を用いることによって、線虫の培養作業を大幅に効率化できると考えられた。

キーワード：マツノザイセンチュウ、大量増殖、菌床用栽培袋

Tomohiro Miyashita,^{*1} Hitoshi Nakamura,¹ Koichi Watanabe¹ (2018) Efficient Mass Propagation Method of Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) Using Mushroom Bed Cultivation Bag. J Jpn For Soc 100: 182-185 Mass propagation of pine wood nematodes (PWNs) has generally been conducted using Petri dishes containing 20 g barley. However, this method is labor intensive, especially when a large population of PWNs is required, thus hindering the work involved in their propagation. In this study, we determined the utility of mushroom bed cultivation bags, with a capacity for a large amount of barley, for the mass propagation of PWNs. We used 100 Petri dishes and 6 cultivation bags with 2,000 and 1,700 g barley, respectively, for propagating PWNs. Sufficient and comparable numbers of PWNs were obtained from Petri dishes and cultivation bags. However, the operation time required for the propagation of PWNs varied from 407 minutes using Petri dishes to 76 minutes using cultivation bags. Thus, the operation time involved in propagating PWNs using cultivation bags was only 20% of that involved in PWN propagation using Petri dishes. On the basis of these data, we conclude that the propagation of PWNs can be greatly improved with the use of cultivation bags.

Key words: pine wood nematode, mass propagation, mushroom bed cultivation bag

I. はじめに

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*, 以下、線虫と記載する) に対して抵抗性を有するアカマツやクロマツ等を育種するため、「マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」および「東北地方等マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」が全国的に広く行われている (藤本ら 1989; 戸田 2004)。これらの事業ではマツの苗木 1 本当たり数千から 10,000 頭の線虫が接種されることが多く (東原ら 2007)、近年ではより抵抗性の高い個体を見出すため接種頭数を 20,000 頭 (宮下・渡部 2015) や 30,000 頭 (田村ら 2017) に増やす事例もある。接種する苗木の数も多いことが一般的であり、例えば著者らが所属する山形県森林研究研修センターでは例年 2,500 本程度の大量の苗木に接種を行っている。

接種本数が多いと必要な線虫も多くなる。線虫を培養する方法の一つとして PDA 培地を用いたシャーレによる培養があるが (例えば堂園・清原 1972; 堂園・吉田 1974; 小林ら 1974, 1975 など)、この方法だとシャーレ 1 枚当たり 30~50 万頭しか培養できない (戸田 1983)。一方、培地としてコムギを用いると食菌性線虫の大量増殖が可能であることが報告され (Evans 1970)、国内ではマツノザイセンチュウの大量増殖を目的として培地に精麦したオオムギが使用されるようになった (藤本ら 1989; 戸田 2004)。現在、接種検定を目的とした線虫の大量増殖は

シャーレにオオムギ 20 g を入れた方法 (戸田 1983) が一般的に普及しており、シャーレ 1 枚当たり 80 万から 100 万頭の線虫が培養できる (戸田 2004)。山形県の場合、例年 2,500 本程度の苗木に対して、苗木 1 本当たり 1 万頭または 2 万頭を接種するので、必要な線虫数はおおむね 3,000 万頭、すなわちシャーレ 30 枚分の線虫が必要となる。しかし、シャーレによっては培養に失敗する可能性もあり、また、接種作業中に線虫懸濁液をこぼすなどのリスクにも対応する必要がある。このため、例年山形県では必要量の 3 倍程度となる約 90 枚のシャーレを用いて培養を行っており、オオムギで作製した培地を用いても大量増殖に要する作業量は決して少なくない。

線虫の増殖量をさらに増やすためには培養容器当たりの培地量を増やすことが効果的と考えられ、そのためには培養容器について検討する必要がある。線虫培養に用いられる一般的な容器として試験管やシャーレが挙げられるが、それよりも容量の大きなものでは三角フラスコによる培養事例が報告されている (戸田 1983; 真宮ら 2004)。300 mL の三角フラスコには 40 g のオオムギが最適少量であり、シャーレの倍の量を入れられるが、口径が小さいため線虫の分離が難しいと報告されている (戸田 1983)。口径が大きい大容量の容器としては培養瓶による事例が報告されている。培養できた線虫頭数等の詳細は不明であるが、大量に繁殖した線虫がしばしば容器の壁面上部に集合することが知られている (Evans 1970; 真宮ら 2004)。培養瓶

*連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: miyashitato@pref.yamagata.jp

¹ 山形県森林研究研修センター 〒991-0041 山形県寒河江市大字寒河江丙 2707 (Yamagata Prefectural Forest Research and Instruction Center, 2707 Sagaehi, Sagae, Yamagata 991-0041, Japan)

(2018 年 2 月 21 日受付: 2018 年 7 月 17 日受理)

であれば多量のオオムギを用いることが可能となるため線虫の大量増殖が効率的に行え、口径も大きいため分離は困難でないが期待できる。しかしながら、培養瓶の形状は一般的に縦長であるため培地は厚くなり、これにより線虫が培地底部まで十分に培養できない可能性も考えられる。以上のことを考えると、大量増殖のための容器としては固定の形状のものではなく、形状を自由に換えられる素材の方が望ましいと思われる。また、これまで述べた容器は線虫の分離後に培地を取り出し洗浄することが一般的であるため、培養作業の効率化を目指した本研究の目的を考えると、使い捨てできる安価な資材が望ましい。

そこで著者らは、食用きのこの菌床栽培において一般的に用いられている栽培袋に着目した。菌床栽培用の袋には耐熱性を持つ中低圧ポリエチレンまたはポリプロピレンが使われており(井上 2000)、オートクレーブによる高温・高圧条件の滅菌が可能である。さらに栽培袋には呼吸用の通気口が備わっており(井上 2000)、線虫の培養に適していると考えられる。この袋には多量の培地を入れることができ、一度の作業でシャーレ数枚分の線虫の培養が行えると期待できる。本研究では、栽培袋でも線虫が培養可能であるか検討し、さらに一般的な培養方法であるシャーレによる培養と比べて線虫の培養量や作業効率がどの程度異なるか検討した。

II. 材料と方法

本研究で用いた栽培袋(株式会社サカト産業)は、通気用のフィルター(タイベックシート, デュボン株式会社)とキャップ(株式会社リョウケ)を袋にセットして取り付ける形式(井上 2000)のものである(図-1)。また、栽培袋のサイズは麦の重量により適当な大きさのものを使用した。培地には市販されているオオムギの押麦(100g当たり蛋白質6.1g, 脂質2.1g, 炭水化物71.8g, 食物繊維7.4g, ナトリウム4mg。以下、麦と呼ぶ。)を使用し、100, 200, 400, 600gの4種類の試験体を作製した。麦200gの栽培袋は三つとしたが、他のものは全て一つとした。栽培袋のサイズは、麦100gでは25cm×10cm, 200gと400gでは35cm×13cm, 600gでは40cm×20cmのものを用い、全ての栽培袋にはマチがついている。電子天秤で麦を計量し、それと同じ重量の2.5%スクロース水溶液も電子天秤上で計量し麦と混合した。対照として、一般的な線虫の大量増殖法であるシャーレによる増殖も行った(戸田 2004)。直径9cmのガラスシャーレに20gの麦を計量し、そこへピペットにより2.5%スクロース水溶液20mLを注入した。シャーレによる大量増殖にはシャーレ100枚を用いた。培地を入れた後、栽培袋とシャーレをオートクレーブに入れ、121°Cで滅菌した。一般的な滅菌時間は20分間であるが(真宮ら 2004; 戸田 2004)、今回は山形県が従来行っている滅菌時間である60分間とした。以上の工程で作製した培地を本報告では麦培地と呼ぶ。

滅菌後に麦が充分冷めたことを確認した後、クリーンベンチ内でボトリチス菌(*Botrytis cinerea*)を移植した。移植に用いたボトリチス菌は麦培地で培養したのものを用い

た。この元種をメスマまたはピンセットによって麦3~5粒程度のかたまりとして取り出し、これをシャーレには3点、栽培袋には全ての袋に6点ずつ移植した。ボトリチス菌を移植後、山形県森林研究研修センターきこの培養棟の室温23.5°Cに設定した室内で培養した。培養開始から10日頃よりボトリチス菌が全体的に増殖していることが確認できるようになり、増殖が進んだものから適宜5°Cに設定した冷蔵庫に移動させ増殖を停止させた。なお、栽培袋で培養したもののうち、麦の重量400gと600gについては袋の底の麦まで培養できていないものが認められたが、長期間培養し続けるとボトリチス菌の活性が低下する可能性も考えられたため、12日目には全て冷蔵庫へ移動した。なお、今回培養したものでは栽培袋において雑菌の混入は認められなかったが、一部のシャーレでは雑菌の混入が確認された。しかしながら、雑菌の面積は狭く、また少量の雑菌であれば線虫の培養は可能であることを経験的に確認していたため、このようなシャーレも廃棄せず線虫培養に用いた。

次に、培養したボトリチス菌に線虫を移植した。移植に用いた線虫も麦培地で培養したのものを用いた。線虫の移植方法はボトリチス菌の移植方法と同じである。なお、線虫アイソレートは、シャーレ20枚と200g栽培袋一つについてはKa-4(Aikawa *et al.* 2003)を、それ以外は全て島原(藤本ら 1989)を移植した。線虫を移植後、25.5°Cに設定したきこの培養棟の室内で培養した。Ka-4は5日頃、島原は7日頃より麦全体に増殖が確認できるようになったので、そのようなシャーレまたは栽培袋は適宜冷蔵庫に移動させ増殖を止めた。

続いて線虫を培地から分離した。分離作業は山形県鶴岡市にある山形県森林研究研修センター林木育種園の事務所内の作業部屋で行った。作業時は窓を開けており、園内の百葉箱で記録していた外気温が25度程度であったことから、分離中の室温もおおむね25度程度であったと考えられる。フィルターとして市販のレンジフードフィルター(三菱アルミニウム株式会社46cm×9m)を用い、培地を蒸留水に浸漬して線虫を沈殿させた。シャーレの場合、フィルター上に麦培地をシャーレごと裏返して蒸留水に浸漬し、シャーレの蓋に付着した線虫も洗浄ビンにより浸漬中の蒸留水へ洗い流した。なお、一つのフィルターには約20枚のシャーレを重ねて載せた。また、裏返したシャーレ内には空気が残ることが観察されたが、シャーレを揺らすなどして気泡を取り除くよう配慮した。栽培袋の場合、袋から麦培地を取り出してフィルター上に置き、蒸留水に浸漬させた。さらに袋の内側に蒸留水を入れて攪拌することにより袋内側に付着した線虫も洗い流した(図-1)。麦培地が大きいときは分離する容器の大きさを適宜変えた。麦培地は細かく崩さないよう袋から取り出したが、崩れたものもあった。しかし、このような場合でも栽培袋内の全ての麦培地を分離装置に入れて線虫を分離した。袋内の麦培地は浸漬時間を長くすれば線虫の回収効率は高まるが、麦の夾雑物の混入が多くなるため、線虫の頭数測定が困難となる(戸田 2004)。これを防ぐため、本研究ではこれまで山形県が事業的に採用している分離時間である3時間を

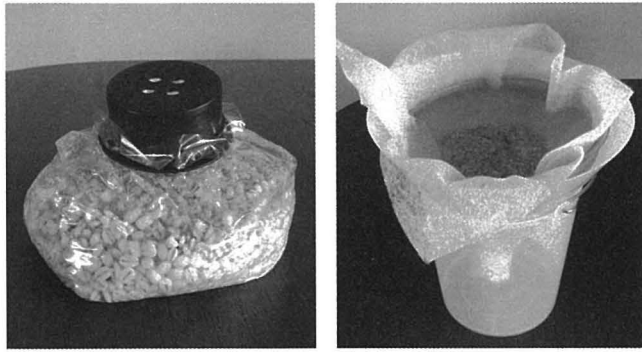


図-1. 菌床栽培袋に入れたオオムギによる培地(左)と線虫の分離状況(右)

左の写真はオオムギを200g入れた菌床栽培袋である。黒いキャップの内側には通気用のフィルターが取り付けられている。右の写真は線虫を分離している状態である。金網の上にフィルターを置き、そこに栽培袋から取り出した培地を置いた。なお、水面のレベルは培地の上端が浸る程度とした。

全てのシャーレおよび栽培袋に採用し、浸漬後に上澄み液を廃棄して沈殿した線虫原液を採取した。

得られた線虫のカウント方法は以下のように行った。すなわち、よく攪拌した線虫原液の中層部から1mLをサンプリングし、それを水で1,000倍に希釈した。希釈液についてもよく攪拌させた中層部より液をサンプリングし、線虫計数板(富士理化学工業株式会社)を用いて1mL中の線虫頭数をカウントした。線虫のカウントは栽培袋では袋ごとに5回、シャーレでは線虫のアイソレイトごとに3回繰り返し、その平均値を求めた。この平均値を1,000倍し、さらにメスシリンダーで測定した線虫原液量を乗じて、得られた線虫頭数を推定した。

また本研究では、栽培袋による大量増殖の作業効率も評価することを目的として、これまで述べてきた麦の計量・滅菌から線虫の分離まで、一連の作業時間を計測した。なお、シャーレによる培養では、線虫の分離が終了した後に麦培地をシャーレから取り除き、シャーレを洗浄する工程も必要であるので、これも作業時間として測定した。一方、栽培袋による培養では、線虫分離後の麦培地はフィルターごと廃棄し、栽培袋も廃棄するだけであるため、片付け作業はほとんどなく作業時間を測定しなかった。

III. 結果・考察

栽培袋でも線虫はシャーレ同様に増殖した。栽培袋による線虫増殖結果を見ると、麦の重量が増えるにしたがい採取した線虫頭数も増加し、麦100gでは1,881万頭得られたのに対し、麦600gでは4,368万頭得られた(表-1)。島原の増殖結果のみに注目すると、麦重量と線虫頭数の間には高い相関関係が認められ($r=0.99$ $p<0.01$)、麦を増やすことは線虫の増殖に効果的であった。また、シャーレお

よび栽培袋ともに島原よりもKa-4の増殖結果が良く、資材が異なってもアイソレイトの増殖特性は反映されていると考えられた。

一方、麦1g当たりの増殖頭数は、袋内の麦の量が多くなるにつれて少なくなり、100gの栽培袋では麦1g当たり18.8万頭であったのに対して、600gの栽培袋では7.3万頭と2.5倍程度の違いが認められた。どの栽培袋も、20gのシャーレ1枚当たりの一般的な培養目標頭数である80~100万頭(麦1g当たり4~5万頭)(戸田2004)は上回っていたが、今回の培養結果では、400gと600gの栽培袋の麦1g当たりの頭数はシャーレのものより少なかった。

この理由として、麦が多くなるにつれボトリチス菌の増殖が袋内全体に及びにくかったことが考えられた。400gと600gの栽培袋では培養後12日経過してもボトリチス菌が全く増殖していない部分が観察された。そのまま培養を継続すればそのような部位にもボトリチス菌は増殖できたのかもしれないが、初期に増殖したボトリチス菌の活性が低下する可能性も考えられたため今回の試験では増殖を停止させた。これらの栽培袋で麦1g当たりの増殖頭数が少ない原因は、このようなボトリチス菌の増殖していない麦の存在が影響していると考えられる。種菌の移植数を増やすなどによりこれらの改善が可能であるか、今後検討が必要であろう。

また、これとは別の理由として、栽培袋の大きさや投入した麦の量の組合せが不適正であった可能性も考えられた。戸田(1983)はオオムギに加えるショ糖溶液を多くすると線虫頭数が減少することを見出し、この原因としてオオムギ同士の間隙が少なくなっていたことを指摘している。培地内の間隙が少ないと繁殖できる表面積が少なくなるため、ボトリチス菌あるいは線虫の増殖量が少なくなると考えられる。本研究では、特に400gと600gの栽培袋において麦の厚みがあり、袋の底部では麦がつぶれ互いに隙間なく密着していた。麦自体の重みによって特に下層の培地で間隙が少なくなっていたと考えられた。これに加え、これらの栽培袋では培養した線虫を分離するための時間が不十分であった可能性も考えられる。これを改善するためには、より大きな袋を用いて培地を薄く作製し、培地の量や厚みに適した分離時間を設定するべきであったのかもしれない。その一方で、100gの栽培袋では麦培地の状態が他の袋と異なり、オオムギの量はおおむね適正であったと考えられた。すなわち、小さな団粒状の塊によって構成され、栽培袋に力を加えると麦培地は容易にほぐれやすい状態であった。このことから、ボトリチス菌と線虫が繁殖できる表面積が増え、1g当たりの増殖頭数が多くなったと考えられた。

表-1. 異なる培養資材と麦重量の組合せから得られたマツノザイセンチュウ頭数

線虫アイソレイト	島原					Ka-4		
	栽培袋		シャーレ 80枚			栽培袋	シャーレ 20枚	
麦重量(g)	100	200	200	400	600	1600	200	400
総頭数(万頭)	1881	2557	2116	3486	4368	15506	4033	4710
麦重量当たり頭数(万頭/g)	18.8	12.8	10.6	8.7	7.3	9.7	20.2	11.8

以上のように線虫の増殖率の観点から考察すると、三角フラスコや培養瓶などを用いて大量の麦培地を作製しても(真宮ら 2004)、これらの容器は底面積が限られているため大容量の容器を用いない限り培地は厚くなり、線虫の増殖効率は低下する可能性が考えられる。一方、栽培袋の場合は底面積を広げて麦培地を作製することは容易であり、適当なサイズのものを選べば大量の麦にも対応でき、線虫の増殖効率は高まると期待できる。また、大容量の三角フラスコや培養瓶は1個当たり数千円以上と高価だが、フィルター付きの栽培袋では1枚当たり数十円程度と安価で、経済的な利点もあると思われる。

次に、麦の滅菌から線虫分離までにかかった作業時間を検討した(表-2)。培養に用いた麦の量は、シャーレでは100枚分の2,000gであり、栽培袋では6袋の総量が1,700gであった。全てのシャーレおよび全ての栽培袋から得られた線虫の総頭数は、それぞれ20,216万頭と18,440万頭であり、両方法により得られた線虫数に大きな違いはなかった。しかし、両者の作業時間には明らかな違いがあり、栽培袋の培養に要する作業時間は、従来のシャーレによる方法と比べ大幅に少なかった。作業ごとに整理してみると、まず、麦およびスクロース水溶液の計量作業に要した時間は、シャーレでは91分であったのに対して栽培袋では16分と、作業時間は18%に削減した。シャーレでは計量作業を100回行ったのに対し、栽培袋では6回のみであったことが作業時間の大幅な削減理由であると考えられる。同様の理由により、ボトリチス菌の移植に要したシャーレおよび栽培袋の作業時間はそれぞれ97分と22分、線虫の移植作業では64分と13分であった。一方、線虫の分離作業に要した時間は、シャーレでは45分であったのに対して栽培袋では25分と56%の作業時間となり、計量作業や移植作業ほど作業時間は削減されなかった。シャーレで培養した培地を分離する場合、フィルター上にシャーレを並べてから蒸留水を浸してあり、シャーレの数が多くてもそれらを並べる作業にそれほど時間を要さなかったことが理由と考えられる。最後に、シャーレでは線虫の分離後にシャーレから麦培地を取り出す作業として30分、シャーレを洗浄する作業として80分、計110分を要した。もしもプラスチックシャーレを用いれば洗浄工程は不要になるが、プラスチックシャーレは一般的にオートクレーブによる滅菌ができないため、通常はPDA培地を用いることになる。PDA培地により得られる線虫は麦培地の半数程度(戸田 1983)であるため、使い捨てのプラスチックシャーレを用いてもシャーレ数を倍増させる必要があり効率的でない。これらの結果から、両者の作業時間の合計は大きく異なり、シャーレによる培養では合計407分を要したのに対し、栽培袋による培養は合計76分と大幅に短縮し、20%程度の作業時間となった。栽培袋を用いることによって、線虫の培養作業は著しく効率化できることが示された。

以上のことから、菌床用栽培袋を用いた線虫の培養は可能であり、麦の量を増やすことによって線虫の大量増殖が可能であることが明らかとなった。さらに一般的方法であるシャーレによる培養と比べて作業効率は極めて高いこと

表-2. マツノザイセンチュウの増殖作業に要した時間

	シャーレ	栽培袋
麦・スクロース水溶液の計量	91分	16分
ボトリチス菌の移植	97分	22分
線虫の移植	64分	13分
分離	45分	25分
培地取り出し	30分	—
シャーレ洗浄	80分	—
計	407分	76分

シャーレはオオムギ20gを入れた100枚のシャーレの作業時間を、栽培袋は100gから600gのオオムギを入れた6個の袋の作業時間を示す。

が示された。シャーレの数を増やして少量ずつ培養することは培養の失敗リスクを分散することに有効であるかもしれないが、上記のような作業性を考慮すると栽培袋による線虫の効率的な大量増殖はメリットが大きい。しかし、麦の量が増えるにしたがい麦1g当たりの線虫数は減少する傾向も見出された。その原因の一つとして、麦の量が多くなると一定期間内に麦培地全体にボトリチス菌が増殖できないことが考えられた。これについては、ボトリチス菌の移植方法や移植点の数、栽培袋の種類を変更するなど、検討すべき点は多くあると考えられる。また、本研究では麦培地の厚みによって得られる線虫数が変動する可能性を示唆したが、これを実証するためのデータを得ておらず詳細な議論はできなかった。効率的な線虫の大量増殖を目指すため、今後これらについても検討していく必要がある。

引用文献

- Aikawa T, Kikuchi T, Kosaka H (2003) Demonstration of interbreeding between virulent and avirulent populations of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by PCR-RFLP method. *Appl Entomol Zool* 38: 565-569
- 堂園安生・清原友也(1972) 菌糸培養法におけるマツノザイセンチュウの増殖温度. 林業試験場九州支場年報 14: 11
- 堂園安生・吉田成章(1974) *Botrytis cinerea* 菌上におけるマツノザイセンチュウの増殖に対するロジスチック曲線の適用. 日林誌 56: 146-148
- Evans AAF (1970) Mass culture of mycophagous nematodes. *J Nematol* 2 (1): 99-100
- 藤本吉幸・戸田忠雄・西村慶二・山手廣太・冬野勲一(1989) マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業—技術開発と事業実施10か年の成果—. 林木育種センター研究報告 7: 1-84
- 東原貴志・蓬田英俊・今野幸則・須田邦裕・渡部公一・伊藤信治・金子岳夫・小澤 創(2007) マツノザイセンチュウ抵抗性候補木の選抜および接種検定結果—東北地方(岩手県, 宮城県, 秋田県, 山形県, 新潟県および福島県)における平成4年度から17年度までの実行結果—. 林木育種センター研究報告 23: 319-413
- 井上貞行(2000) 菌床シイタケ栽培の施設・資機材(2001年版)のガイドブック. 農村文化社きこのガイドブック編集部編, 農村文化社). 114
- 小林亨夫・佐々木克彦・真宮靖治(1974) マツノザイセンチュウの生活環に関連する糸状菌(I). 日林誌 56: 136-145
- 小林亨夫・佐々木克彦・真宮靖治(1975) マツノザイセンチュウの生活環に関連する糸状菌(II). 日林誌 57: 184-193
- 真宮靖治・二井一禎・小坂 肇(2004) マツノザイセンチュウの培養法. (線虫学実験法. 線虫学実験法編集委員会編, 日本線虫学会). 141-143
- 宮下智弘・渡部公一(2015) 山形県におけるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの選抜手法の改良. 日林誌 97: 243-250
- 田村 明・三浦真弘・松永孝治・高橋 誠(2017) 優良品種の開発について—マツノザイセンチュウ抵抗性品種—. 森林遺伝育種 6: 93-97
- 戸田忠雄(1983) マツノザイセンチュウの大量培養法—ムギによる培養基の調整と線虫の加害性—. 九州林木育種場年報 10: 111-114
- 戸田忠雄(2004) アカマツおよびクロマツのマツ材線虫病抵抗性育種に関する研究. 林木育種センター研究報告 20: 83-217