

東日本の森林土壌中における昆虫病原性線虫,Steinernema sp.の生息・分布と生態的性質

誌名	玉川大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University
ISSN	0082156X
著者名	真宮,靖治 氏永,剛 中村,直子 安藤,須賀子 菊沢,亘
発行元	玉川大学農学部
巻/号	41号
掲載ページ	p. 1-19
発行年月	2001年12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



東日本の森林土壌中における昆虫病原性線虫, *Steinernema* sp. の生息・分布と生態的性質*

真宮靖治・氏永 剛・中村直子・安藤須賀子・菊沢 亘

緒 言

昆虫寄生性線虫のなかでも、細菌との特異的な共生関係において強い殺虫力をもつグループは、昆虫病原性線虫 (Entomopathogenic nematode, 略称 EPN) と呼ばれ、有望な生物的防除手段として古くから関心を集めて多くの調査・研究が行われてきた。このような線虫はすべて、Steinernematidae と Heterorhabditidae の両科に属している。両科の線虫は体内に *Xenorhabdus* 属および *Photorhabdus* 属いずれかの共生細菌を保持し、昆虫への侵入感染後これらの細菌を昆虫体内に放出して宿主に敗血症を引き起こし、急激な死をもたらし、線虫は昆虫体内で繁殖した共生細菌や分解された昆虫の体組織を餌として旺盛に増殖する。2 世代経過した後に線虫は感染態幼虫となって体外へ遊出し、次の宿主への感染をまつ。これまでに世界各地における両科線虫の広い分布が明らかにされ、近年は有用な天敵生物として探索が積極的に進められている。

わが国では、*Steinernema* 属および *Heterorhabditis* 属線虫のなかで、古くからその有用性が知られ、商業ベースでの生産も行われていた線虫を海外から導入して研究を進めるとともに、一方で有用線虫の探索が行われた (石橋 1987, 1990, 1993)。とくに、森林土壌を対象として進められた線虫探索では、*Steinernema* 属線虫の国内各地森林における広い分布が示された (真宮・小倉 1989, 真宮・小倉 1990, 真宮・氏永 1994, Mamiya 1996)。森林だけでなく、農地や牧草地でも、*Steinernema* 属や *Heterorhabditis* 属線虫の広い分布が明らかにされた (木村・石橋 1991, 吉田 1993, 吉田 1994, 吉田ら 1995)。なかでも、Yoshida *et al.* (1998) による国内の広範な地域にわたる調査と検出線虫の種類の系統的な整理で、わが国におけるこれらの線虫の分布に関する情報が体系化されることになった。わが国ではじめての分布記録となったのは、コガネムシ類幼虫に対して既往の線虫にみられないような卓効をもった *Steinernema* 属線虫で (串田ら 1986)、この線虫は新種、*Steinernema kushidai* として記載された (Mamiya 1988)。

昆虫病原性線虫、とくに *Steinernema* 属線虫の各地森林土壌中における普遍的分布を予測させるこれまでの知見は、線虫分布の実態解明に向けて体系的な調査・研究を行うことの必要性を示した。さらには、森林土壌中における線虫生息の生態的位置づけの究明へと進む方向を与えた。世界的にみて、昆虫病原性線虫に関するこれまでの研究の焦点は、有用線虫利用に合わせられていて、線虫生息の生態学的解明に向けた研究は少ない。本研究では、森林土壌中における昆虫病原性線虫の

*本研究の一部は平成 6 年度、7 年度における文部省科学研究費補助金 (一般研究 C, 研究課題番号 06660197) によって行われた。

分布実態を明らかにするとともに、その生態学的位置づけを明確にしていくための手がかりを得ようとした。

材料および方法

1. 森林土壌中における *Steinernema* sp. の生息・分布調査

玉川大学構内林地、玉川大学箱根演習林、玉川大学弟子屈演習林をそれぞれ調査対象地として、林内からの土壌の採取と線虫検出を行った。また、線虫の生息実態を明らかにするため、調査区を設定して、線虫の水平のおよび土壌中の垂直的分布状況を調査した。なお、本調査を通じて各調査地から検出された *Steinernema* 属線虫は同一種と認められたので、以下本文中ではこの線虫を *Steinernema* sp. と表記する。

(1) 調査地概況

玉川大学構内林地：多摩丘陵の南端に位置する丘陵性地形の構内において、調査地は横浜市と川崎市の境となる尾根を挟んだ両側に設定した。構内の年平均気温は 14.9℃ である。構内全域は関東ローム層に覆われていて、土壌は褐色森林土である。

玉川大学箱根演習林：神奈川県足柄郡箱根町にあって、箱根連山の一部で、標高 400 m から 900 m の範囲に位置する。演習林内標高 410 m における観測では、年平均気温 13.2℃ である。林床上層部を覆っているのは関東ローム層で、土壌は褐色森林土および黒色土である。

玉川大学弟子屈演習林：北海道川上郡弟子屈町にあって、屈斜路湖畔沿いに位置する。年平均気温は 5℃ である。林床上部は火山灰が覆い、土壌は黒色土である。

各調査地の位置、植生、調査時期などは Table 1 に示すとおりであった。

(2) 調査方法

1) 土壌試料の採取と線虫の検出

各調査地では、10m×10m の方形の調査区を設定した。調査区は 2m×2m の小区画に分け、これら小区画のうち縦横一つおきの小区画を調査対象とした。各調査対象小区画において任意に 5 箇

Table 1 Localities and characteristics of research sites for entomopathogenic nematodes

Research site symbol	Locality	Habitat	Altitude (m)	Sampling (month)	Nematode species
A	Campus of Tamagawa University in Kawasaki 玉川大学構内林学研究室裏 (川崎市)	Hinoki/cryptomeria forest ヒノキ・スギ林	40	May	<i>Steinernema</i> sp.
B	Campus of Tamagawa University in Yokohama 玉川大学構内レイモンドヒル (横浜市)	Bamboo/broadleaved forest タケ・広葉樹林	80	July	<i>Steinernema</i> sp.
C	Tamagawa University Forest in Hakone 玉川大学箱根演習林25林班ぬ1 (箱根町)	Broadleaved forest 広葉樹林	800	August	<i>Steinernema</i> sp.
D	Tamagawa University Forest in Hakone 玉川大学箱根演習林25林班わ8 (箱根町)	Broadleaved forest 広葉樹林	600	August	Not detected
E	Tamagawa University Forest in Teshikaga 玉川大学弟子屈演習林5-3小林班 (弟子屈町)	Abies/broadleaved forest トドマツ・広葉樹林	210	September	<i>Steinernema</i> sp.
F	Tamagawa University Forest in Teshikaga 玉川大学弟子屈演習林1-10小林班 (弟子屈町)	Larch forest カラマツ造林地	170	September	<i>Steinernema</i> sp.

所から合計 3kg の土壌を採取した。リター層を取り除いた後、約 10cm の深さまでの土壌を掘り取り、ポリエチレン製の袋に入れて各小区画ごとの試料とした。

線虫の検出はハチノスツヅリガ (*Galleria mellonella*) の幼虫を用い、トラップ法 (Bedding & Akhurst 1975) によって行った。小区画ごとの土壌試料をよく混和した後、ポリエチレン製カップ (直径 12cm, 深さ 8cm, 以下カップとする) に約 500ml 入れ、カップ内土壌にハチノスツヅリガ終齢幼虫を 3 頭ずつ埋め込んだ。1 小区画当たり 3 カップ、ハチノスツヅリガ幼虫計 9 頭を用いた。カップは 18°C~25°C の暗所に配置した。7~10 日後に、カップ内土壌中のハチノスツヅリガ幼虫の生死を調べた。死亡個体は個別にスクリュウ管瓶 (以下管瓶とする) に入れ、温室条件下で 25°C に置いた。死亡後の時間経過とともに死亡幼虫を解剖して体内における線虫寄生の有無を調べた。また、体内からの線虫遊出状況によっても線虫寄生の確認を行った。昆虫病原糸状菌による死亡個体については、農林水産省森林総合研究所 (現在の独立行政法人・森林総合研究所) の島津光明博士に送り、糸状菌の同定を依頼した。死亡個体で、線虫と糸状菌の同時寄生を示す例は観察されなかった。本調査を通じ、ハチノスツヅリガ幼虫死亡個体から検出された昆虫病原性線虫は *Steinernema* 属線虫だけであった。 *Heterorhabditis* 属線虫の検出例はなかった。

調査区 A において、線虫分布が確認された小区画を対象に、線虫の垂直分布状況を調査した。リター層を取り除いた後、地中 32cm までの深さで、2cm~7cm の深さ別に土壌を採取した。採取した土壌は、水平分布調査と同様にして線虫検出を行った。

2) 検出線虫の同定と殺虫効果の確認

各調査地について、ハチノスツヅリガ幼虫死亡個体から検出した線虫を同定に供した。死亡個体の体内における発育段階別の線虫、とくに雄成虫と感染態幼虫 (Infective third stage juvenile) を同定の手がかりとして、詳細な形態観察を行った。検出した線虫は、次に述べる殺虫効果試験に供試したが、その結果得られた多数の線虫について、ホルマリン固定標本、さらには Seinhorst 法 (Seinhorst, 1959) によるグリセリン包埋標本を作成して、種々の形態値を計測した。検出線虫と比較するため、*Steinernema feltiae* の培養系統を森林総合研究所線虫研究室から譲り受け、グリセリン包埋標本を作製して形態観察に供した。また、真宮が森林総合研究所構内アカマツ林 (茨城県茎崎町) で採取し、保存していた *Steinernema* 属線虫 (真宮・小倉 1989, 真宮・小倉 1990) のグリセリン包埋標本との比較観察も行った。

各調査地から検出した線虫は、感染態幼虫を用いてハチノスツヅリガ幼虫に対する殺虫効果を濾紙接触法により検討した。ペトリ皿 (径 9cm) の底面に濾紙を敷き、感染態幼虫の水懸濁液を滴下 (1ml) した後、ハチノスツヅリガ幼虫を 5~10 頭濾紙上に置いた。ペトリ皿は 25°C の恒温器に入れ、その後、経時的にハチノスツヅリガ幼虫の死亡状況を観察した。

本研究を通じ供試したハチノスツヅリガ幼虫は、玉川大学学術研究所ミツバチ科学研究施設から分譲を受け、以後実験室でミツバチ巣板を餌として飼育・維持したものである。

2. 玉川大学弟子屈演習林内カラマツ林におけるニホンカラマツヒラタハバチ潜土幼虫に対する *Steinernema* sp. の寄生実態

本調査実施期間中に、演習林内のカラマツはニホンカラマツヒラタハバチ (*Cephalcia lariciphila japonica*, 以下ヒラタハバチとする) による激害を受けていた。1994 年 9 月の調査に際し、調査区を設定した 1-10 小林班のカラマツ林内で樹冠から落下して土壌中へ潜行した潜土幼虫を採取した。これらのうち、死亡個体について *Steinernema* 属線虫寄生の有無を調べた。また、1995 年 6 月にも

同様にして林内土壤中におけるヒラタハバチの線虫感染状況を調査した。

3. ニホンカラマツヒラタハバチ潜土幼虫に対する *Steinernema* sp. の殺虫効果

玉川大学弟子屈演習林カラマツ林で検出した *Steinernema* sp. について、ヒラタハバチ潜土幼虫に対する殺虫効果を濾紙接触法で検討した。ペトリ皿の濾紙上に線虫懸濁液を滴下した後（感染態幼虫1万頭/ml/ペトリ皿）、ヒラタハバチ幼虫を放した（10頭/ペトリ皿）。比較のためハチノスツブリガ幼虫も同様にして供試した。1995年9月に調査地Fの調査区画内で採取した土壌をカップに分配し（500ml/カップ）、1カップ当たり1万頭の感染態幼虫を接種した後、ヒラタハバチ潜土幼虫を各カップの土壤中に埋め込んだ（3頭/カップ）。対照としてハチノスツブリガ幼虫を同様にして供試した。

4. *Steinernema* sp. の殺虫効果に及ぼす温度の影響

25℃、20℃、15℃、10℃の各温度条件下における *Steinernema* sp. の殺虫効果をハチノスツブリガ幼虫を供試して検討した。ペトリ皿内の濾紙に *Steinernema* sp. の水懸濁液（3,000~10,000/ml/ペトリ皿）を滴下した後、ハチノスツブリガ幼虫を5頭ずつ供試した。比較のため、*S. feltiae*、*S. carpocapsae* の両種についても同様に濾紙接触法による殺虫効果をみた。供試した両種は、森林総合研究所線虫研究室から培養線虫の分譲を受けた。

5. *Steinernema* sp. の生活史に及ぼす温度の影響

実験は前項と同様な設定で行った。ハチノスツブリガ幼虫死亡個体は1頭ずつ管瓶に入れて各温度条件下で維持したものを経時的に解剖して体内の線虫発育経過を追跡した。比較のため、*S. feltiae*、*S. carpocapsae* 両種について同様に生活史を追跡した。

Steinernema 属線虫の昆虫体内におけ発育は一般に次のような経過となる。生活史追跡に当たっては、それぞれのステージが出現した時間的経過を記録した。宿主体内に侵入した感染態幼虫は第4期幼虫を経て大型の雌雄成虫に成長する（第1世代）。交尾後の雌成虫から生まれた次世代幼虫は発育して小型の第2世代成虫となり、産卵、幼虫の発育とつづく。幼虫発育の第3期に相当する感染態幼虫にいたると生活史は完成で、宿主体内の感染態幼虫はやがて土壤中に遊出して、新しい宿主体内へ侵入・感染を果たす。*Steinernema* 属線虫は昆虫体内で普通2世代を経過して、感染態幼虫にいたるが、人工培地上での増殖経過では、感染態幼虫にいたる世代経過は2世代以上にわたっていると考えられる。

6. 人工培地上における *Steinernema* sp. の増殖に及ぼす温度の影響

線虫の発育に及ぼす温度の影響を比較検討するため、*Steinernema* sp. と *S. feltiae* 両種を異なる温度条件のもとで培養し、増殖経過を追跡した。培養にはドッグフード培地を使用した。

ドッグフード培地は以下のように調整した（近藤・石橋 1984）。市販のドッグフード（ゲインズハーティ）を粉末とし、4gずつ試験管（径18mm、長さ180mm）に入れ、1%寒天液を10ml加えてよく混和した。培地はオートクレーブで120℃、20分間の高圧滅菌を行った。滅菌後、試験管内培地は斜面となるように固化させた。

試験管内ドッグフード培地で培養中の *Steinernema* sp. および *S. feltiae* を滅菌蒸留水に懸濁し、それぞれ試験管培地上に滴下した。線虫懸濁液は2滴の滴下で試験管1本当たり200頭（感染態幼虫）

の接種となるようあらかじめ調整しておいた。

線虫接種後、試験管は 25°C、20°C、15°C、10°C の各温度に設定した恒温器に配置して培養を行った。培養開始後、試験管培地上で増殖した線虫を、経時的に兩種線虫につき各温度 5 本ずつの試験管を供試してベルマン法により分離した。分離した線虫は、ピーターの 1 ml 計数板を用いて希釈法による計数を行った。培養経過において、増殖線虫個体数および感染態幼虫の出現経過と全線虫個体数に対する比率を記録した。

結 果

1. 調査地における線虫検出状況

各調査地において、ハチノスツヅリガ幼虫を用いたトラップ法による線虫検出状況は Table 2 のとおりであった。Table 2 は各調査地に設定した調査区で、調査対象区画ごとに採取した土壌に対して実施したトラップ法の結果を、調査地全体としてまとめたものである。

調査地 D をのぞいて、その他すべての調査地で *Steinernema* 属線虫が検出された。線虫検出率（供試幼虫数に対する線虫検出幼虫数の比率）は各調査地平均で 15% であった。いずれの調査地に

Table 2 Occurrence of steinernematids in soils collected at each research site

Symbol	Research site Locality	No. of insects tested	No. of insects detected*	No. of dead insects	
				with nematodes**	with fungi***
A	Campus of Tamagawa University in Kawasaki	117	106	19 (18%)	10 (9%)
B	Campus of Tamagawa University in Yokohama	117	116	12 (10%)	15 (13%)
C	Tamagawa University Forest in Hakone (800 m)	117	112	14 (13%)	6 (5%)
D	Tamagawa University Forest in Hakone (600 m)	117	114	0	17 (15%)
E	Tamagawa University Forest in Teshikaga (Abies)	117	117	6 (5%)	1 (1%)
F	Tamagawa University Forest in Teshikaga (Larch)	117	115	33 (29%)	3 (3%)

*: Number of *Galleria mellonella* larvae recovered from the soil assayed.

***: Number of dead *G. mellonella* larvae infected with *Steinernema* sp.

***: Number of dead *G. mellonella* larvae infected with entomopathogenic fungi.

Table 3 Entomopathogenic fungi detected in cadavers of *Galleria mellonella* larvae

Research site	No. of insects with fungi	No. of insects infected by fungi			
		<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Paecilomyces fumososeus</i>	<i>Metarizium anisopilae</i>	Others*
A	10 (9%)**	1	9	0	0
B	15 (13%)	10	0	1	4
C	6 (5%)	3	2	0	1
D	17 (15%)	5	2	1	9
E	1 (1%)	1	0	0	0
F	3 (3%)	3	0	0	0

*: Entomophilic fungi such as *Aspergillus* and *Fusarium*.

***: Percent of insects infected by entomopathogenic fungi

においても、供試したハチノスツリガ幼虫に昆虫病原糸状菌による感染死亡個体がみられた。各調査地における昆虫病原糸状菌の種類および感染率は Table 3 のとおりであった。すべての調査地で昆虫病原糸状菌の分布が認められたが、なかでも *Beauveria bassiana* はもっとも普遍的な分布を示した。なお、線虫寄生と糸状菌感染が同時に起こっている死亡個体は観察されなかった。

2. 検出線虫の同定

各調査地で検出された *Steinernema* 属線虫の感染態幼虫について行った形態計測の結果を Table 4 に示した。比較のため、森林総合研究所構内（茨城県稲敷郡茎崎町）のアカマツ林から検出した線虫および *S. feltiae* のそれぞれ培養系統から分離・作成した感染態幼虫標本の計測値をあわせて記した。また、韓国のカラマツ林から検出し新種記載された *S. monticolum* (Stock *et al.* 1997) の計測値を Table 4 に原記載から転記した。

A, B, C, E, F 各調査地の線虫は、感染態幼虫の形態計測値がよく一致していた。*Steinernema* 属線虫に関する検索表 (Hominick *et al.* 1997, Stock *et al.* 1997) では、本線虫は *S. feltiae* および *S. monticolum* にもっとも近かった。*S. monticolum* とは a 値がより大きい点が異なった。吉田陸浩氏 (独立行政法人・農業環境技術研究所) によって行われた PCR-RFLP によるソーティングの結果で

Table 4 Morphometrics of infective juveniles of steinernematid species isolated from forest soils and other *Steinernema* species

Character	Campus of Tamagawa Univ.		Hakone	Teshikaga		Ibaraki Pref.	<i>Steinernema</i>	<i>Steinernema</i>
	A	B	C	E	F	Kukizaki*	<i>feltiae</i> **	<i>monticolum</i> ***
n	30	30	30	25	30	25	25	
L	735±43 (640-830)	774±57 (660-880)	728±38 (650-840)	750±41 (660-840)	710±29 (650-750)	681±41 (610-769)	715±38 (622-769)	706 (612-821)
W	33±2.6 (30-40)	27±1.2 (25-30)	26±1.4 (25-30)	26±1.6 (25-30)	29±2.3 (27-35)	26±4.0 (23-31)	29±2.3 (24-33)	37 (32-46)
EP	60±3.8 (50-65)	56±2.8 (50-62)	55±2.7 (50-60)	60±2.1 (55-65)	55±2.2 (50-60)	50±2.9 (48-57)	53±2.1 (51-57)	58 (54-62)
ES	131±7.2 (112-142)	120±4.6 (110-130)	111±5.5 (95-117)	129±5.9 (118-140)	115±4.8 (107-142)	110±5.7 (99-120)	112±4.9 (105-120)	124 (120-131)
T	82±5.9 (72-97)	72±5.4 (60-82)	70±4.8 (60-80)	76±4.3 (68-83)	74±4.0 (62-80)	65±5.2 (54-72)	66±4.0 (57-75)	77 (71-95)
a	22±1.8 (20-27)	29±2.4 (24-34)	28±2.4 (22-34)	29±1.4 (26-31)	24±2.3 (20-28)	26±1.8 (23-31)	25±2.5 (21-32)	19 (14-22)
b	5.6±0.3 (4.8-6.1)	6.4±0.6 (5.5-7.6)	6.6±0.4 (5.9-7.3)	5.8±0.4 (5.2-6.4)	6.2±0.2 (5.8-6.7)	6.2±0.3 (5.7-7.0)	6.4±0.3 (5.8-6.9)	5.7 (5.0-6.4)
c	8.7±1.5 (7.8-10.0)	10.8±0.5 (9.5-11.9)	10.4±0.6 (9.2-11.7)	9.9±0.4 (9.1-10.8)	9.7±0.5 (8.7-10.8)	10.5±0.7 (9.4-12.0)	10.9±0.5 (10.2-11.7)	9.3 (7.6-11.1)
D%	46±1.8 (42-49)	47±2.9 (40-52)	49±2.8 (44-58)	47±2.0 (43-51)	48±1.0 (42-52)	45±1.9 (42-49)	47±2.1 (43-51)	47 (44-50)
E%	74±4.7 (64-84)	79±6.1 (69-93)	78±5.4 (69-90)	79±4.0 (69-89)	75±4.8 (71-90)	77±6.2 (65-89)	80±5.4 (71-90)	76 (63-86)

Figures show mean±SD and range (measurements in μm).

Abbreviation: L=total body length; W=greatest width; EP=distance from anterior end to excretory pore; ES=esophagus length; T=tail length; a=L/W; b=L/ES; c=L/T; D%=EP/ES×100; E%=EP/T×100

*: *Steinernema* sp. isolated from soil collected at Forestry and Forest Products Research Institute in Kukizaki, Ibaraki Pref.

***Steinernema feltiae* (Otis strain) provided by Forestry and Forest Products Research Institute.

***: From Stock *et al.* 1997.

は、各調査地から検出された線虫は、*S. feltiae* および *S. monticolum* とはそれぞれ異なるパターンを示した（吉田睦浩氏私信）。各調査地の線虫は茨城県産の *Steinernema* 属線虫と形態計測値が一致し、さらに PCR-RFLP の分析結果も一致した（吉田氏私信）。雄成虫の形態についても、各調査地および茨城県茎崎町産の線虫は一致する特徴が観察された。とくに交接刺と副刺の形態的特徴がよく一致した。それらが orange-yellow を呈すること、また雄成虫の尾端に小突起を有する点では、*S. feltiae* と一致していた。一方、*S. monticolum* では尾端に小突起を有するが、交接刺と副刺の色は brown-orange と記載されている。各調査地から検出した *Steinernema* 属線虫の寄生によるハチノスツリガ幼虫の死亡個体は、やや黄色味をおびた特徴的な体色となるが、*S. feltiae* による場合は黒褐色となり、明らかな差が認められた。以上のような形態その他の特徴から、各調査地から検出された *Steinernema* 属線虫はすべて同一種であり、本文中では *Steinernema* sp. と表記した。また、茨城県茎崎町産の線虫も同じ種であると判断した。

本種の保持する共生細菌に関しては、十分な検討にいたらなかったが、培地上で黄色がかったコロニーを形成するのが特徴的だった。このこととハチノスツリガ幼虫の死亡個体が、黄色味を呈することと関連していると推測できた。

3. *Steinernema* sp. の森林土壌中における水平分布

各調査地に設定した調査区の小区画ごとに調査した *Steinernema* sp. の分布状況は Fig.1 のとおり

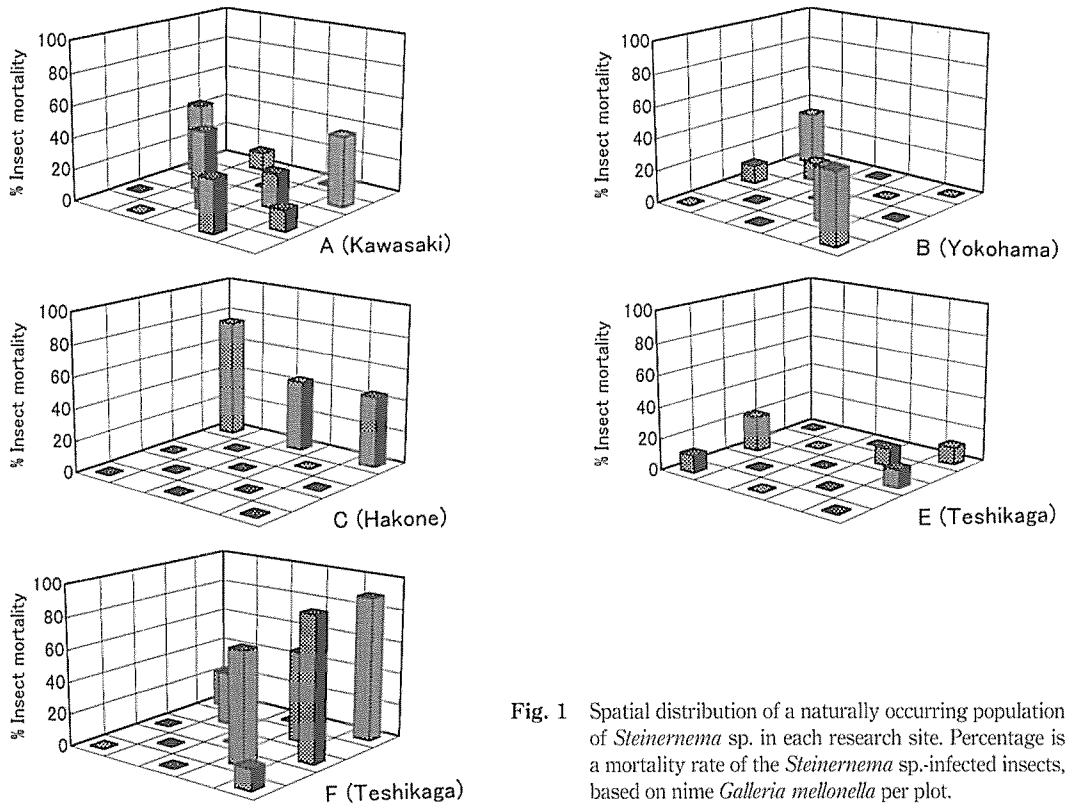


Fig. 1 Spatial distribution of a naturally occurring population of *Steinernema* sp. in each research site. Percentage is a mortality rate of the *Steinernema* sp.-infected insects, based on nine *Galleria mellonella* per plot.

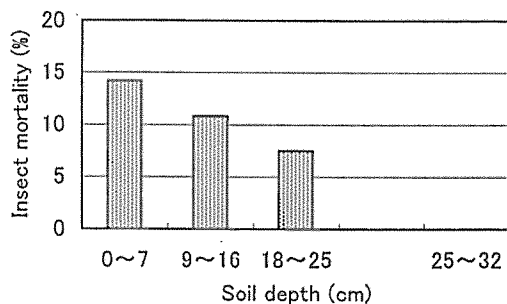


Fig. 2 Vertical distribution of *Steinerema* sp. in soil of the research site A. Insect mortality is a percentage of dead insects, *Galleria mellonella*, from which steinerematids were detected.

であった。各地調査区で、土壌を採取した 13 小区画のうち、調査地 A における 8 小区画を最高に、3 小区画以上で線虫の生息・分布が確認された。

垂直分布については、深さ 25 cm までの範囲における線虫分布が示された (Fig. 2)。25 cm 以上の深さでは、線虫の分布は確認できなかった。

4. *Steinerema* sp. の殺虫効果

各調査地で検出した *Steinerema* sp. のハチノスツヅリガ幼虫に対する殺虫効果を Table 5 に示した。供試したすべての *Steinerema* sp. に高い殺虫効果が認められた。死亡したハチノスツヅリガ幼虫の体内で、線虫は感染態幼虫にまで発育し、それらは引き続き殺虫効果を維持した。

5. 玉川大学弟子屈演習林のカラマツ林におけるニホンカラマツヒラタハバチ被害と *Steinerema* sp. の検出

1-10 小林班カラマツ林の林床土壌中から採集したヒラタハバチ潜土幼虫についての *Steinerema*

Table 5 Lethal effect of *Steinerema* sp. isolated from each research site on *Galleria mellonella* larvae

Research site	No. of insects tested	No. of insects killed	Mortality %	Time until death (days)
A	50	50	100	2~4
B	20	20	100	2~4
C	30	30	100	2~4
E	30	30	100	2~4
F	30	30	100	2~4

Five insects larvae on moist paper in a petri dish were inoculated with 10,000 infective juveniles of *Steinerema* sp.

Table 6 Occurrence of steinenematids in cadavers of larch sawfly, *Cephalcia lariciphila japonica*, at a larch forest of Tamagawa University Forest in Teshikaga, Hokkaido

Soil sampling		Insects collected			Insects infected by <i>Steinerema</i> sp.		
Site	Time	Larvae	Pupae	Adults	Larvae	Pupae	Adults
Larch forest	September, 1994	84	0	0	8	0	0
	June, 1995	56	8	6	2	3	2

sp. の寄生状況調査結果は Table 6 のとおりであった。9 月に採集した幼虫の死亡個体では約 10% に *Steinernema* sp の寄生が認められた。また、6 月に採集した幼虫、蛹、成虫それぞれの死亡個体に線虫寄生が確認され、寄生率は 10% であった。

ヒラタハバチ死亡個体から検出した *Steinernema* sp. につき、ヒラタハバチ幼虫とハチノスツヅリガ幼虫に対する殺虫効果を濾紙接触法で調べた結果は Table 7 のとおりであった。ハチノスツヅリガ幼虫における 100% の致死効果に対し、ヒラタハバチ幼虫での致死効果は小さかった。

カラマツ林内数カ所から採集した土壌に *Steinernema* sp. 感染態幼虫を接種して行ったトラップ法の結果では、ハチノスツヅリガ幼虫の感染死亡率 42% に対し、ヒラタハバチ幼虫では 2% 以下であった (Table 8)。

6. *Steinernema* sp. の殺虫効果に及ぼす温度の影響

ハチノスツヅリガ幼虫に対する異なる温度条件下における *Steinernema* sp., *S. feltiae*, *S. carpocapsae* それぞれの濾紙接触法による殺虫効果は Table 9 のとおりであった。各種線虫はいずれもハチノスツヅリガ幼虫に対して高い殺虫効果を示し、種間の差はみられなかった。殺虫効果に及ぼす温度の影響に関しても、線虫の種による差はなく、25℃ から 10℃ の範囲で同様な高い殺虫効果が示された。低温になるほど、線虫接種後ハチノスツヅリガ幼虫が死亡するまでの時間が長くなったが、この経過時間についても線虫の種間で大きな差はみられなかった。どの種でも、10℃ での経過時間がより高い温度条件に比べ、有意に長かった。

Table 7 Lethal effect of *Steinernema* sp. on *Cephalcia lariciphila japonica* larvae

Insect larvae tested	Sampling time of insects	<i>Steinernema</i> sp. (A)*		<i>Steinernema</i> sp. (F)**		<i>Steinernema</i> sp. (F)**	
		No. of insects tested		No. of insects tested		No. of insects tested	
			killed		killed		killed
<i>Galleria mellonella</i>		20	20	20	20	20	20
<i>Cephalcia lariciphila japonica</i>	June, 1995	20	0	20	0		
do.	September, 1995					20	3

Insects on moist filter paper in a petri dish were inoculated with 10,000 infective juveniles of *Steinernema* sp.

*: Isolated from soil of research site A

** : Isolated from soil of research site F

Table 8 Lethal effect of *Steinernema* sp. on *Cephalcia lariciphila japonica* larvae in soil

Insect larvae tested	No. of insects tested	No. of insects killed		
		total	infected by nematodes	infected by fungi*
<i>Galleria mellonella</i>	60	35	25	10
<i>Cephalcia lariciphila japonica</i>	60	7	1	6

Each polyethylene cup which contained soil (500 ml) obtained from the research site F and three insect larvae was inoculated with 10,000 infective juveniles of *Steinernema* sp.

*: *Beauveria bassiana* was isolated from more than 70% of insect larvae infected with fungi

7. *Steinernema* sp. の生活史に及ぼす温度の影響

ハチノスツブリガ幼虫の線虫感染死亡個体を個体別に管瓶内で各温度条件下で維持して、死亡後の時間的経過と体内における線虫の発育経過を追跡した。その結果から、*Steinernema* sp., *S. feltiae*, *S. carpocapsae* それぞれの各温度条件下における生活史を Table 10 にまとめた。

いずれの線虫についても、低温であるほど発育経過が遅くなり、感染態幼虫にいたるまでの日数

Table 9 Effect of temperatures on mortality of *Galleria mellonella* larvae inoculated with each of *Steinernema* sp., *S. feltiae* and *S. carpocapsae*

Nematode	Temperature °C	No. of insects		Mortality %	Time until death days*
		tested	killed		
<i>Steinernema</i> sp.	25	30	30	100	3.2±0.2 a
	20	30	29	97	3.0±0.4 a
	15	30	30	100	5.3±0.7 ab
	10	30	27	90	6.2±1.5 b
<i>S. feltiae</i>	25	50	50	100	2.5±0.7 a
	20	40	40	100	2.8±0.5 a
	15	60	60	100	4.0±0.3 ab
	10	50	50	100	5.3±0.3 b
<i>S. carpocapsae</i>	25	10	10	100	2
	20	10	10	100	2
	15	10	10	100	4
	10	10	10	100	8

Insects on moist filter paper in a petri dish were inoculated with 3,000~10,000 infective juveniles of steinernematids: 5 insect larvae /petri dish

*: Mean ± SD Data followed by the same letter are not significantly different (p<0.05)

Table 10 Development of *Steinernema* sp., *S. feltiae* and *S. carpocapsae* on *Galleria mellonella* larvae at several temperatures (at 25°C : ○, at 20°C : ●, at 15°C : △, at 10°C : ▲)

Steinernema sp.

Days after insect death	1st generation		2nd generation		Infective juvenile
	adult	juvenile	adult	juvenile	
1~2	○ ● △				
3~4	○ ● △	○ ●			
5~6	○ ● △	○ ● △			
7~8	○	▲ ○ △	○ ● △	● △	
9~10		▲	○ ● △	○ ● △	○ ●
11~12		▲	○ ●	○ ● △	○ ●
13~14		▲	○ ●	○ ● △	○ ● △
15~16		▲		○ ● △	○ ● △
17~18		▲	▲		○ ● △
19~20			▲		○ ● △ ▲
21~22				▲	○ ● △ ▲
23~24				▲	○ ● △ ▲
25<					○ ● △ ▲

Steinernema feltiae

Days after insect death	1st generation		2nd generation		Infective juvenile
	adult	juvenile	adult	juvenile	
1~2	○ ●				
3~4	○ ● △	○ ●			
5~6	○ ● △ ▲	○ ●			
7~8		△ ○	○ ●		
9~10		△ ▲	○ ●	○ ●	
11~12		▲		○ ●	○ ●
13~14			△ ▲		○ ●
15~16			△	△ ▲	○ ●
17~18			△	△ ▲	○ ●
19~20			△	△	○ ●
21~22				△	○ ●
23~24				△	○ ●
25<				△	○ ● △

Steinernema carpocapsae

Days after insect death	1st generation		2nd generation		Infective juvenile
	adult	juvenile	adult	juvenile	
1~2	○ ●				
3~4	○ ● △	○ ●			
5~6	○ ● △	○ ●			
7~8			○ ●	○ ●	
9~10		△	○	○ ●	○ ●
11~12		△	○	○ ●	○ ●
13~14		▲		●	○ ●
15~16		▲	△		○ ●
17~18		▲	△	△	○ ●
19~20		▲			○ ●
21~22					○ ●
23~24					○ ●
25<					○ ●

が長くなった。その傾向は、とくに *S. carpocapsae* で他の 2 種に比べて顕著であった。*S. carpocapsae* は、10℃ では第 1 世代成虫以後の発育がみられなかったように、低温適応性の低さを示した。*Steinernema* sp. の発育経過は、15℃ で *S. feltiae* との差が現れ、とくに感染態幼虫にいたる経過において両種で明らかな違いが認められた。*Steinernema* sp. は、15℃ で 13~14 日には感染態幼虫にいたったが、*S. feltiae* では 25 日以上を要した。また 10℃ で、*Steinernema* sp. は 19~20 日後に感染態幼虫へと達しているが、*S. feltiae* では感染態幼虫の出現を確認できなかった。このような結果から、生活史に及ぼす温度の影響の差異は 3 種間で明らかで、*Steinernema* sp. は *S. feltiae*、*S. carpocapsae* に比べて低温への適応性が大きい種であることが示唆された。

8. 培地上における *Steinernema* sp. の増殖に及ぼす温度の影響

培地上での線虫の増殖経過を Fig. 3 に示した。*Steinernema* sp., *S. feltiae* とともに 20℃ で増殖がもっとも盛んであった。両種とも、10℃ では増殖が抑制された。いずれの温度条件でも、*S. feltiae* の

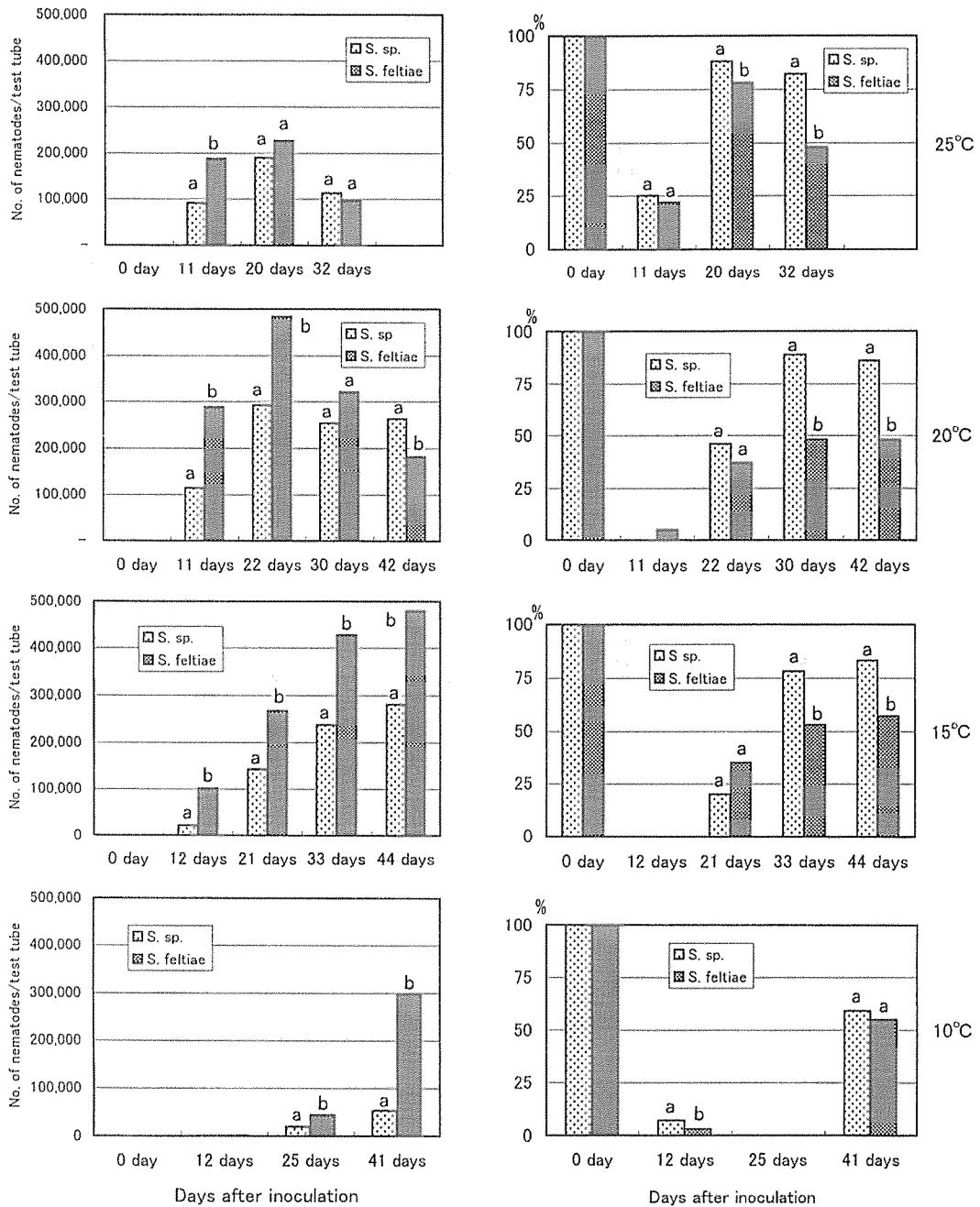


Fig. 3 Effect of temperatures on population growth of *Steinernema* sp. and *S. feltiae* on dog food agar in test tubes and percentage of infective juvenile of the population. Each test tube was inoculated with 200 infective juveniles of *Steinernema* sp. and *S. feltiae*. Bars with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$).

増殖が *Steinernema* sp. より勝っていた。感染態幼虫の増殖全個体数に対する比率は、*Steinernema* sp. がどの温度条件でも高い傾向にあった。培地上では、*S. feltiae* の感染態幼虫の出現は、15℃、10℃でも *Steinernema* sp. の場合と変わらなかった。

考 察

1. 各調査地における *Steinernema* sp. の生息・分布

東日本に位置する3地域の森林に設定した6箇所の調査地のうち5調査地について *Steinernema* 属線虫の生息・分布が確認された。最近、世界各地で森林を含む自然生態系における昆虫病原性線虫の分布実態解明が急速に進んでいるが、その成果として昆虫病原性線虫の各地における広くそして普遍的な分布が明らかにされてきた (Akhurst & Brown 1994, Akhurst & Bedding 1986, Blackshaw 1988, Griffin *et al.* 1991, Hominick & Briscoe 1980, 1990, Mracek & Webster 1993, Mracek *et al.* 1998, Sturhan & Liscova 1999)。同時に、これまで未記載であった種が新たに発見され、多くの新種がこの線虫グループに加わった。現在、*Steinernema* 属 25 種、*Heterorhabditis* 属 9 種、*Neosteinernema* 属 1 種がそれぞれ既知種として記載されている (Burnell & Stock 2000)。その他、各地で多くの未同定種の生息・分布が示されていて、それらを整理することで種数はさらに増えることになる。日本でも、Yoshida *et al.* (1997) の報告によると、*Steinernema* 属線虫で少なくとも9種が未記載種として国内における分布が明らかにされている。

本研究の各調査地で生息・分布が確認された *Steinernema* 属線虫は、すべて同一種であると同定された。各調査地での調査区画ごと、あるいは調査区画外の土壌についての検証結果から、本種の各調査地における普遍的な分布は明らかで、本調査を通じ、本種以外の *Steinernema* 属線虫、あるいは *Heterorhabditis* 属線虫は検出されなかった。本種はこれまで茨城県、秋田県、岩手県などの東日本各地森林で検出されていた *Steinernema* 属線虫 (真宮・小倉 1989, 1990, Mamiya 1996) と形態上の一致がみられたことから、本種が東日本の森林土壌中に広く分布している線虫であることが示唆された。さらには、Yoshida *et al.* (1998) が日本国内での分布を明らかにしている *Steinernema* 属線虫の1種とも一致することから、実際の分布はさらに広範囲に及んでいるものと推察された。

2. 線虫の同定

Steinernema sp. は形態的特徴から既知種のなかでは *S. feltiae* ともっとも近似していた。しかし、2、3の生態的性質から別種であると判断した。とくに温度に対する適応性については、低温適応性に関して両種の差が示された。さらに、吉田陸浩氏による分子生物学的検討の結果から、*Steinernema* sp. は *S. feltiae* とは別な種であることが証明された。形態的な計測値から近似種として注目した *S. monticolum* についても、吉田陸浩氏の DNA 解析結果は別種としての可能性を示した。本種は、Yoshida *et al.* (1998) によって日本国内分布における広い分布が明らかにされた *Steinernema* 属線虫の MY3 グループと同一であることが示唆された (吉田陸浩氏私信)。

3. *Steinernema* sp. の森林土壌中における水平分布

各地調査区画内における線虫検出状況から、*Steinernema* sp. が森林土壌中に広く分布していることが明らかになった。本調査では、土壌中における線虫分布様式の統計的解析にはいたらなかったが、調査地 A および B を対象に同じ調査区画内で行った線虫の分布様式に関するその後の調査結果として、線虫の集中分布が明らかにされた (真宮・佐藤 1998, 真宮・佐藤 未発表データ)。*Steinernema* 属線虫の土壌中における生息・分布が線虫のどのような行動様式、あるいは生態的要因によって左右されされているのかについてはまだほとんど解明されていない。例えば、線虫の宿主となる昆虫の土壌中での生息実態が線虫の分布を決める主要な要因となるのだが、このような観点からの追求はまだ行われていない。土壌中における線虫の行動や分布実態を明らかにするうえでの今後の課題である。アメリカのトウモロコシ畑で *S. riobrave* の水平および垂直的分布が体系的に調べられ、線虫が局在的あるいは集中的なパッチ状に分布していることが示された (Cabanillas & Raulston 1994)。この研究は、本来トウモロコシ害虫に対する生物的防除における殺虫効果評価のための基礎として行われた。

自然条件下、土壌中で昆虫体内に侵入して宿主を殺すにいたる *Steinernema* 属の感染態幼虫の数には大きな変異があると考えられるので、昆虫の死亡率 (= 線虫検出率) から土壌中に生息する線虫個体数を直接推定することはできない。生態的な位置づけを明らかにするうえで、土壌中における線虫の量的分布の解明が今後の課題である。その方向に向けての研究も進められてきている。*Steinernema* 属線虫の土壌中での垂直分布について、線虫は深さ 0~20 cm の範囲にもっとも多く分布するとされていて (Cabanillas & Raulston 1994)、本調査の結果もこれを裏付けた。

4. *Steinernema* sp. の殺虫効果

各調査地で検出した *Steinernema* sp. はいずれもハチノスツリガ幼虫に対して高い殺虫効果を示した。線虫感染後の死亡経過や死亡個体の外観の変化、とくに体色変化なども各調査地で共通していて、同一種の分布であることを裏付けていた。

5. 玉川大学弟子屈演習林のカラマツ林におけるニホンカラマツヒラタハバチ被害と *Steinernema* sp. の検出

調査地 F で、カラマツ林のヒラタハバチ被害と関連して、林内土壌中におけるヒラタハバチ潜土幼虫の *Steinernema* sp. による自然感染を確認することができた (真宮ら 1995)。ヒラタハバチの羽化時期である 6 月の調査結果から、土壌中では潜土幼虫、蛹そして羽化成虫も線虫感染により死亡していることが示された。*Steinernema* sp. について、ヒラタハバチ潜土幼虫に対する殺虫効果は、*in vitro* ではハチノスツリガ幼虫に比べて明らかに劣っていた。ヒラタハバチに対する自然条件下での生物的防除手段としての有効性に関しては、ヒラタハバチ幼虫の土壌中での生息期間を通じた線虫感染の経過など、解明すべき問題が多い。

ヒラタハバチ類の *Steinernema* 属線虫の自然条件下における宿主リストには、*Cephalcia abieitis*, *C. falleni* に対する *S. kraussei* が記録されている (Peters 1996)。イギリスでニホンカラマツの林に大発生した *C. lariciphila* の被害について、潜土幼虫に対する *S. carpocapsae* の寄生が確認され、寄生蜂などとともに天敵生物の 1 種として注目された (Billany & Brown 1980, Georgis & Hague 1981)。各地被害林の調査結果として、線虫による感染死亡は 8~15% であり、前蛹がとくに線虫に対して感受性で死亡率の高いことが示された (Georgis & Hague 1981)。感染死亡率に関しては、本調査の結果

は近似していた。チェコスロバキア（当時）のトウヒ林で大発生した *C. abietis* による被害では、潜土幼虫の *S. kraussei* による自然感染があって、30% に及ぶ死亡率であった。この線虫の林地に対する施用試験では 90% 以上の殺虫率で、その高い効果が認められた (Mracek & David 1986, Bednarek & Mracek 1986)。 *Steinernema* sp. のヒラタハバチ被害に対する天敵生物としての役割解明のために、今後さらに検討を続ける必要がある。

6. *Steinernema* sp. の生態に及ぼす温度の影響

線虫はその地理的分布において、環境条件に適応した生理的、生態的特徴を有することが当然のこととして予測される。例えば低温への適応性については、寒冷地に分布する線虫が、温暖な地における線虫より高いことが知られている。宿主に対する寄生が行われる温度範囲について、寒冷地 (7~20°C) に分布する *S. feltiae* は低温域で活性が高く、一方、温暖な地 (26~29°C) の線虫、 *Heterorhabditis* sp. は 20~33°C で宿主への寄生が活発であった (Kaya 1990)。 *Steinernema* sp. については、箱根演習林における標高 800m の広葉樹林、また弟子屈演習林のように寒冷な場所を含めた分布であり、低温への適応性が予測された。 *Steinernema* sp. は殺虫効果に関しては、15~25°C の範囲で差がなく、また比較した *S. feltiae*、 *S. carpocapsae* とともに温度条件による差は認められなかった。一方、発育への温度の影響については、 *S. feltiae*、 *S. carpocapsae* 両種との差が明らかであった。 *Steinernema* sp. は、低温適応性が大きいとされている *S. feltiae* よりもさらに低温に適応していることが示された。ハチノスツリガ幼虫死亡虫体内で、15°C での感染態幼虫の出現経過に *Steinernema* sp. と *S. feltiae* とで明らかな差があった。10°C でも *Steinernema* sp. では感染態幼虫が出現したのに対し、 *S. feltiae* では感染態幼虫の出現にはいたらなかった。

森林昆虫にはその生活史において、土壌中で過ごすステージをもつものが多い。越冬のための土壌生息で、このような昆虫との関係において低温に適応した線虫が有利であり、森林土壌中には低温適応性を備えた *Steinernema* 属線虫が生息している可能性が高い。生物的防除手段としても、低温適応性は有利な特性であり、この点を重視した *Steinernema* 属や *Heterorhabditis* 属の探索が行われている (Mracek & Webster 1993)。韓国のカラマツ林土壌から分離された *S. monticolum* が低温適応性をもつことが明らかにされて、生物的防除手段としての活用につながる今後の研究が期待されている (Koppenhofer *et al.* 2000)。 *Steinernema* sp. の生態的特性の解明は、森林生態系維持機構において線虫が果たす役割を明らかにするとともに、生物的防除手段としての有用性を検討するうえでも必要なことである。

要 約

玉川大学構内（横浜市、川崎市）のスギ・ヒノキ林（A）およびタケ・広葉樹林（B）、玉川大学箱根演習林の広葉樹林 2 箇所（C, D）、同弟子屈演習林のトドマツ・広葉樹林（E）およびカラマツ林（F）の計 6 箇所に調査地を設定して昆虫病原性線虫の分布実態調査を行った。調査地 D を除く他の調査地すべてにおいて同一の *Steinernema* 属線虫の生息・分布が確認された。本線虫は既知種 *S. feltiae* および *S. monticolum* に近似していたが、2, 3 の形態的特徴により区別できた。このような形態上の差異に加え、生態的な特徴においても相違が認められた。本線虫は新種の可能性

もあり、本報告では *Steinernema* sp. とした。 *Steinernema* sp. はハチノスツヅリガ幼虫に対して強い殺虫効果を有し、20℃~25℃ 条件下では 3 日以内に 100% の致死率を示した。

各調査地に設定した調査区 (10m×10m, 25 小区画) 内で *Steinernema* sp. の水平分布を調査した。各 13 小区画から採取した土壌に対するトラップ法による線虫探索で、各調査地を通じ 3~8 小区画における線虫分布が確認された。このような結果は、森林内の土壌中に本線虫が広く分布していることを示唆した。土壌中での垂直分布に関しては、深さ 25cm までの範囲における分布が示された。

調査地 F ではカラマツを加害していたニホンカラマツヒラタハバチの潜土幼虫をはじめ蛹、羽化成虫のそれぞれ死亡個体から本線虫が検出された。本線虫のニホンカラマツヒラタハバチ幼虫に対する殺虫効果は、*in vitro* 実験の結果としてハチノスツヅリガ幼虫に対するほど大きくなかった。温度を異にした条件下における本線虫のハチノスツヅリガ幼虫体内での発育経過から、本線虫の低温適応性が明らかであった。 *Steinernema* sp. はその生活史において 10℃ でも感染態幼虫にまで発育が進んだが、 *S. feltiae* は 10℃ では感染態幼虫にまでいたらなかった。また、 *S. carpocapsae* では 10℃ で第 1 世代成虫以後の発育が抑制されるなど、発育における温度適応性に *Steinernema* sp. と大きな差が認められた。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、 *Steinernema* 属線虫の培養系統を分譲して下さった農林水産省森林総合研究所森林生物部線虫研究室長小倉信夫博士、同橋本ほしみ主任研究官、昆虫病原糸状菌の同定をして下さった同昆虫病理研究室長島津光明博士、また、ハチノスツヅリガ幼虫の飼育に有益なご助言を賜り、さらにミツバチの巣板などの実験材料を提供して下さい下さった玉川大学学術研究所ミツバチ科学研究施設の吉田忠晴教授と中村純講師、以上の方々に深甚なる謝意を表します。 *Steinernema* sp. の同定にあたっては、当該線虫の DNA 解析の労を取って下さり、また有益なご助言を賜った農林水産省農業環境技術研究所線虫小動物研究室の吉田陸浩主任研究官に深く感謝します。また、弟子屈演習林におけるニホンカラマツヒラタハバチの調査にあたって多大なるご助力とご助言を賜った玉川大学農学部林学研究室の杉本和永助教授と山岡好夫講師に厚くお礼を申し上げます。

引用文献

- Akhurst, R. J. & Bedding, R. A. 1986. Natural occurrence of insect pathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in soil in Australia. *J. Aust. ent. Soc.* 25: 241-244.
- Akhurst, R. J. & Brooks, W. M. 1984. The distribution of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in North Carolina. *J. Invert. Path.* 44: 140-145.
- Bedding, R. A. & Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil.

- Nematologica 21: 109-116.
- Bednarek, A. & Mracek, Z. 1986. The incidence of nematodes of the family Steinernematidae in *Cephalcia falleni* Dalm. (Hymenoptera: Pamphiliidae) habitat after an outbreak of the pest. J. Appl. Ent. 102: 527-530.
- Billany, D. J. & Brown, R. M. 1980. The web-spinning larch sawfly, *Cephalcia lariciphila* Wachtl. (Hymenoptera: Pamphiliidae), a new pest of *Larix* in England and Wales. Forestry 53: 71-80.
- Blackshaw, R. P. 1988. A survey of insect parasitic nematodes in Northern Ireland. Ann. appl. Biol. 113: 561-565.
- Burnell, A. M. & Stock, S. P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. Nematology 2: 31-42.
- Cabanillas, H. E. & Raulston, J. R. 1994. Evaluation of the spatial pattern of *Steinernema riobravis* in corn plots. J. Nematol. 26: 25-31.
- Georgis, R. & Hague, N. G. M. 1981. A neoaplectanid nematode in the larch sawfly *Cephalcia lariciphila* (Hymenoptera: Pamphiliidae). Ann. appl. Biol. 99: 171-177.
- Griffin, C. T., Moore, J. F. & Downes, M. J. 1991. Occurrence of insect-parasitic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in the Republic of Ireland. Nematologica 37: 92-100.
- Hominick, W. M. & Briscoe, B. R. 1990. Survey of 15 sites over 28 months for entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). Parasitology 100: 289-294.
- Hominick, W. M. & Briscoe, B. R. 1990. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in British soil. Parasitology 100: 295-302.
- Hominick, W. M., Briscoe, B. R., del Pino, E. G., Heng, Jian, Hunt, D. J., Kozodoy, E., Mracek, Z., Nguyen, K. B., Reid, A. P., Spiridonov, S., Stock, P., Sturhan, D., Waturu, C. & Yoshida, M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. J. Helminthol. 71: 271-298.
- 石橋信義 (研究代表者). 1987. 昆虫寄生性線虫による生物的防除手法の開発. 昭和 61 年度文部省試験研究 (I) 研究成果報告書 pp.179.
- 石橋信義 (研究代表者). 1990. 有用線虫による病害虫総合防除法の開発. 平成元年度文部省試験研究 (I) 研究成果報告書 pp.159.
- 石橋信義 (研究代表者). 1993. 有用線虫の探索とその大量生産ならびに施用法のシステム化. 平成 4 年度文部省試験研究 (I) 研究成果報告書 pp.172.
- Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. In Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Ed. by Gaugler, R. & Kaya, H. K. Boca Raton, Florida, CRC Press. pp. 93-115.
- 木村良徳, 石橋信義. 1991. 九州における Steinernematidae 科線虫ならびに同所性の高い土壌線虫. 昆虫学会 51 回, 35 回応動昆大会合同大会講演要旨集 p. 185.
- 近藤栄造, 石橋信義. 1984. 昆虫寄生性線虫 *Steinernema* spp. のドッグフード培地上での発育と増殖に及ぼす共生菌添加の影響. 九州病虫研会報 30: 120-123.
- Koppenhoffer, A. M., Ganguly, S. & Kaya, H. K. 2000. Ecological characterisation of *Steinernema monticolum*, a cold-adapted entomopathogenic nematode from Korea. Nematology 2: 407-416.
- 串田保, 真宮靖治, 三橋淳. 1987. 静岡県下苗畑土壌から検出された昆虫寄生性線虫 *Steinernema* sp. のコガネムシ類幼虫に対する殺虫性. 応動昆 31: 144-149.
- Mamiya, Y. 1988. *Steinernema kushidai* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoka, Japan. Appl. Ent. Zool. 23: 313-320.
- Mamiya, Y. 1996. A steinernematid nematode occurring in forest habitats in eastern Japan. Abstracts of Third International Nematology Congress, Guadeloupe. p. 175.
- 真宮靖治, 中村直子, 杉本和永, 山岡好夫. 1995. 玉川大学弟子屈演習林におけるカラマツおよびグイマツのヒラタハバチ被害とそれに関連する昆虫病原性 *Steinernema* 属線虫. 106 回日林論 pp. 455-456.

- 真宮靖治, 小倉信夫. 1989. Steinernematidae および Heterorhabditidae 科線虫についての各地土壌の検索 (予報). 33 回応動昆大会講演要旨集 p. 49.
- 真宮靖治, 小倉信夫. 1990. 本邦森林土壌における *Steinernema* 属線虫の分布. In 有用線虫による病害虫総合防除法の開発. 研究代表者, 石橋信義. 平成元年度文部省試験研究 (I) 研究成果報告書 pp. 1-8.
- 真宮靖治, 佐藤信. 1998. *Steinernema* 属線虫の森林土壌中における水平・垂直分布と移動能力(要旨). 日線虫誌 28: 34.
- 真宮靖治, 氏永剛. 1994. 森林における *Steinernema* 属線虫分布実態の一事例 (要旨). 日線虫誌 24: 46.
- Mracek, Z. & David, L. 1986. Preliminary field control of *Cephalcia abietis* L. (Hymenoptera: Pamphiliidae) larvae with steinernematid nematodes in Czechoslovakia. J. Appl. Ent. 102: 260-263.
- Mracek, Z. & Webster, J. M. 1993. Survey of Heterorhabditidae and Steinernematidae (Rhabditida, Nematoda) in western Canada. J. Nematol. 25: 710-717.
- Mracek, Z., Becvar, S. & Kindlmann, P. 1998. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the Czech Republic. BioControl 8: 160-164.
- Peters, A. 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. Biocontrol Science and Technology 6: 389-402.
- Seinhorst, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. Nematologica 4: 67-69.
- Stock, S. P., Choo, H. Y. & Kaya, H. K. 1997. An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. Nematologica 43: 15-29.
- Sturhan, D. & Liskova, M. 1999. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in the Slovak Republic. Nematology 1: 273-277.
- 吉田陸浩. 1993. 本邦昆虫寄生性線虫の分布と生態 A. 分布. In 有用線虫の探索とその大量生産ならびに施用法のシステム化. 研究代表者, 石橋信義. 平成 4 年度文部省試験研究 (I) 研究成果報告書 pp. 1-9.
- 吉田陸浩. 1994. 西日本太平洋沿岸地域から検出された *Steinernema* 属線虫について (要旨). 日線虫誌 24: 46-47.
- 吉田陸浩, 田辺博司, 木村卓生, 柴田裕子. 1995. 九州から検出された *Steinernema* 属昆虫病原性線虫について (要旨). 日線虫誌 25: 125-126.
- Yoshida, M., Reid, A. P., Briscoe, B. R. & Hominick, W. M. 1998. Survey of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Japan. Fundam. appl. Nematol. 21: 185-198.

Summary

Occurrence and Distribution of Entomopathogenic Nematodes in Forest Soil in Eastern Japan and Ecological Characteristics of *Steinernema* sp.

Yasuharu Mamiya, Tsuyoshi Ujinaga, Naoko Nakamura, Sugako Ando and Wataru Kikuzawa
(Fac. Agric. Tamagawa Univ., Machida-shi, Tokyo 194-8610)
Bull. Fac. Agr. Tamagawa Univ. No. 41: 1-19

Surveys were done in forests of eastern Japan to determine the occurrence of Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida). Soil samples were collected from the research sites established at

forests on the campus of Tamagawa University (Kawasaki and Yokohama), forests in Tamagawa University Forest in Hakone (Kanagawa Pref.) and forests in Tamagawa University Forest in Teshikaga (Hokkaido), respectively. Soil samples from forest habitats of each research site were tested for the presence of entomopathogenic nematodes by baiting with *Galleria mellonella* larvae. An undescribed *Steinernema* species was found at five research sites. At a research site of Hakone, the nematode was not detected. Other than this species of *Steinernema*, none of steinernematids and heterorhabditids were found in all research sites. The nematode, *Steinernema* sp., is closely related with *S. feltiae* and *S. monticolum* in morphological features of infective juveniles and the first generation adult males. *Steinernema* sp. can be differentiated from both species on the basis of ecological characterisations and the results of DNA analysis (Yoshida, personal communication). It was indicated that *Steinernema* sp. might be widely distributed and of common occurrence in eastern Japan forests. In the larch forest of Tamagawa University Forest in Teshikaga where an outbreak of larch sawfly, *Cephalcia lariciphila japonica*, occurred sawfly larvae in soil were naturally infected by the nematode. This is the first known record of steinernematid nematodes found in larch sawfly cadavers under natural conditions in Japan. *Steinernema* sp. caused high mortality to *Galleria mellonella* larvae, but not so high to larch sawfly larvae. The results of experiments on stage development of *Steinernema* sp. in the body of insect larvae at different temperatures indicated that this nematode was one of cold-adapted entomopathogenic nematodes. *Steinernema* sp. produced infective juveniles at 10 °C, whereas *S. feltiae* did not grow into the infective juvenile stage at 10 °C.