The Japanese Society of Fisheries Science

Nippon Suisan Gakkaishi 65(4), 661–664 (1999)

ヨシエビ幼生から分離した卵菌類の希釈海水中における感染率の低下

泉川晃一，尾田　正，山野井英夫，畑井喜司雄

(1998年7月16日受付)

Decline of Infectivity of Oomycetes in Diluted Seawater to the Larvae of Greasyback Shrimp *Metapenaeus ensis*

Koichi Izumikawa,*1 Tadashi Oda,*1
Hideo Yamanoi,*1,*2 and Kishio Hatai*3

Haliphthoros milfordensis and *Halocrusticida panulirata* (Oomycetes, Lagenidiales) isolated from diseased greasyback shrimp larvae, *Metapenaeus ensis*, were examined in order to determine the ability of zoospore formation and their infectivity to greasyback shrimp larvae in diluted seawater at 25°C. The numbers of zoospores released from both species in 2/3 seawater (salinity between 21.3～21.7‰) were reduced to about 10^2 zoospores/m*l* from 10^4 zoospores/m*l* in undiluted seawater (salinity between 32.0～32.5‰). Experimental infection by bath method showed that oomycetes killed second zoea (mortality 55%) and second mysis (mortality 5.9%) but not post-larval stages in undiluted seawater. In 3/4 seawater (salinity between 24.4～25.1‰) oomycetes of the two species had low infectivity to the zoea and mysis stages. Judging from these results, it was considered that using diluted seawater at the initial stage of mass producting of greasyback shrimp larvae may be a useful preventive method against mycosis caused by the above species.

キーワード：ヨシエビ，真菌症，遊走子，*Haliphthoros*，*Halocrusticida*，感染率

ヨシエビ *Metapenaeus ensis* は栽培漁業対象種として西日本を中心に各地の種苗生産機関で生産されている。しかし，飼育技術は必ずしも完成されたものではなく，生残率が低い年も珍しくない。*4 この減耗の要因は単一ではないが，現在，卵菌類クサリフクロカビ目の *Haliphthoros* 属および *Halocrusticida* 属の菌による真菌症が問題となっている。*5 生産現場における本症への対応は一様ではないが，希釈海水を使用して本症の発生を抑制し得たとの事例があることから，*6 本報では希釈海水が遊走子産生に及ぼす影響について検討した。また，希釈海水下でのヨシエビ幼生に対する感染実験も合わせて実施したのでその結果を報告する。

材料および方法

原因菌の分離と培養　1996年7月11日に岡山県水産試験場栽培漁業センターで種苗生産中に死亡したヨシエビ幼生（ゾエア2～3齢期）を分離材料とした。検鏡により菌糸の確認された幼生10個体をPYGS寒天培地（ペプトン1.25 g，酵母エキス1.25 g，ブドウ糖3 g，寒天12 g，海水1 *l*）に1個体ずつ接種し，細菌の発育を抑制するために微量の抗生物質（硫酸ストレプトマイシンとアンピシリン）をその上に添加した後，25°Cで培養した。菌の発育がみられた場合は，集落の先端を寒天ごと切り取り，それを新たなPYGS寒天培地上に接種する方法で純培養菌を得た。分離菌は，以後25°Cで

*1 岡山県水産試験場 (Okayama Prefectural Fisheries Experiment Station, Ushimado, Okayama 701-4303, Japan).
*2 現所属：岡山県農林水産部水産課 (Fisheries Division, Okayama Prefectural Government Office, Uchisange, Okayama 700-8570, Japan).
*3 日本獣医畜産大学獣医学科魚病学教室 (Division of Fish Diseases, Nippon Veterinary and Animal Science University, Musashino, Tokyo 180-8602, Japan).
*4 平成9年度西日本種苗生産機関連絡協議会甲殻類分科会資料.
*5 水呉　浩，村上啓士，吉岡大介：ヨシエビ種苗生産における真菌防除に関する実験．広島県栽培漁業協会事業報告，**14**, 85–89 (1995).
*6 近藤正美，杉野博之，池田善平：希釈海水によるヨシエビの種苗生産．岡山県水産試験場報告，**11**, 115–116 (1996).

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

培養し，3～4週間ごとに継代する方法で保存した。なお，本報では，原則として砂ろ過海水を用いた。

供試菌の同定 PYGS寒天培地上に発育させた供試菌の先端部を寒天ごと切り取り，滅菌シャーレに分注したPYGS液体培地に接種し，25℃で3～4日間培養した。発育した菌糸体は滅菌海水で数回洗浄した後，新たな滅菌海水中に収容し，25℃で培養することにより遊走子の産生を促した。菌の同定は，遊走子の産生様式などから，Karling[1]に従った。

遊走子懸濁液の調製 調製は浜崎・畑井の方法[2]に準じた。すなわち，NJM9632株とNJM9633株の2株の分離株をPYGS寒天培地で10日間培養後，集落の先端部をメスを用いて約1×1 cmのブロック状に切り出し（寒天ブロック），それらの数個をPYGS液体培地に収容し，さらに3～4日間，25℃で培養した。その後，それらを滅菌海水で洗浄し，20 m*l*の滅菌海水へ数個ずつ収容して，再び25℃で培養した。NJM9632株は約48時間，NJM9633株は約24時間経過した海水をそれぞれ遊走子懸濁液として感染実験に用いた。なお，遊走子数の算定には金枠付きの界線入計数板（離合社製）を用いた。

供試幼生 供試したヨシエビ幼生は，ゾエア2齢期（以下，Z2），ミシス2齢期（以下，M2），ポストラーバ変態1日目幼生（以下，P1，変態後n日目をPnで示す），P4およびP8の健全な個体とし，これらの幼生には発育段階に応じてテトラセルミス*Tetraselmis tetrathele*および配合飼料を与えた。供試幼生数は，各発育段階で20尾ずつとした。

希釈海水中での遊走子産生 滅菌した海水（塩分32.0～32.5‰）を用い，滅菌蒸留水で1/2（塩分16.0～16.3‰），2/3（塩分21.3～21.7‰）および3/4海水（塩分24.0～24.4‰）を調製した。これらの滅菌希釈海水と海水は各々20 m*l*ずつプラスチックシャーレに分注し，その後各シャーレに前述の寒天ブロックをそれぞれ3個ずつ収容し，25℃で7日間静置培養した。遊走子の産生は毎日遊泳している遊走子を算定する方法で行った。

感染実験 遊走子数は，NJM9632株では10^3個/m*l*，NJM9633株では10^4個/m*l*となるように調整した。海水の塩分濃度は2/3海水（塩分21.3～22.3‰）および3/4海水（塩分24.0～25.1‰）となるように蒸留水で調整した。なお，海水の塩分濃度は，32.0～33.5‰であった。1000 m*l*容量の滅菌ビーカーにNJM9632株では各500 m*l*，NJM9633株では各1000 m*l*ずつ各希釈海水および海水を分注した後，各ビーカーに幼生を20個体ずつ収容し，上述の遊走子数となるように遊走子懸濁液を接種した。遊走子接種後は，無給餌で弱い通気を行い，25℃の恒温室内で幼生を飼育した。供試幼生は遊走子接種後3日目に顕微鏡下で観察し，その体内に菌糸が観察されるか否かにより真菌感染の有無を判定した。なお，実験期間中，真菌感染個体および死亡個体はビーカーから除去しなかった。

結　果

原因菌の分離と培養 感染個体から得られた分離菌の多くは，集落の形状および発育速度などから2種類に分類された。また，1感染個体から両菌種が同時に分離されることはなかった。1種類の菌は発育が比較的速く，菌糸は細かったが，他の菌は集落が小さく，菌糸が若干太いのが特徴であった。前者の菌および後者の菌から無作為に選択したNJM9632株とNJM9633株の2株を以下の試験に供した。

供試菌の同定 NJM9632株は，菌糸内にfragmentが形成され，それから放出管を伸長させながらその内部に遊走子を形成し，やがて放出管の先端から遊走子を遊出させた。これらの特徴から，本株は*Haliphthoros*属に同定された。また，既知の*H. milfordensis*の形状と差異は認められなかったことから，*H. milfordensis*に同定された。[3]

NJM9633株は，集落が葉状で菌糸が隔壁様の膜で仕切られ，それらが遊走子のうへと変化する場合と，ゲンマが形成され，それらが遊走子のうへと変化する場合とがみられた。本株は，このような特徴およびfragmentやvesicleを形成しないことから，*Halocrusticida*属に同定された。[4] また，本株は放出管が分岐しないこと，および集落に色素沈着がみられず発育至適温度は25℃であったことなどから*H. panulirata*に同定された。[5]

希釈海水中での遊走子産生能 各希釈海水中での遊走子産生数の推移をFig. 1（NJM9632株）およびFig. 2（NJM9633株）に示した。両菌株とも1/2海水に菌糸体を収容したものは，試験期間中全く遊走子の産生が認められなかった。NJM9632株は，2/3海水において菌糸体収容後3日目から遊走子産生がみられ始め，4日目に6.0×10^2個/m*l*で最大数となり，その後6日目以降は確認されなかった。3/4海水では，菌糸体収容後2日目から遊走子が産生され，4日目に1.4×10^4個/m*l*で最大数に達し，7日目には認められなくなった。海水では，菌糸体収容後1日目から遊走子が産生され，2日目に1.1×10^4個/m*l*と最大数に達した後，減少して6日目以降はみられなくなった。

一方，NJM9633株の2/3海水における遊走子数は菌糸体収容後から3日目までは10^1個/m*l*で推移したが，4日目以降は確認されなかった。3/4海水では菌糸体収容後1日目に1.8×10^3個/m*l*と最大数に達したが，そ

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

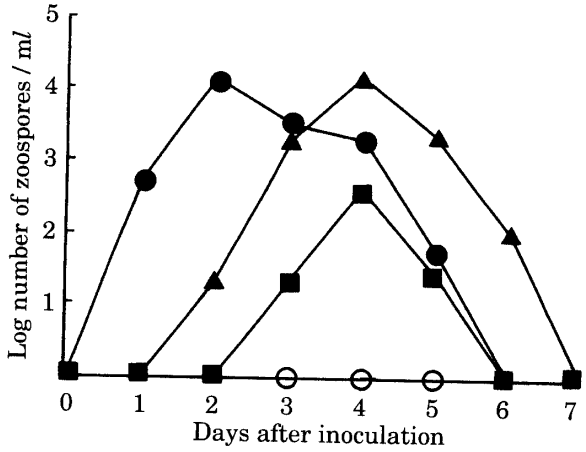

Fig. 1. Effect of salinity on the release of zoospores from *Haliphthoros milfordensis* NJM9632 at 25°C.
Symbols: ●, undiluted seawater (salinity 32.0‰); ▲, 3/4 seawater (24.0‰); ■, 2/3 seawater (21.3‰); ○, 1/2 seaeater (16.0‰)

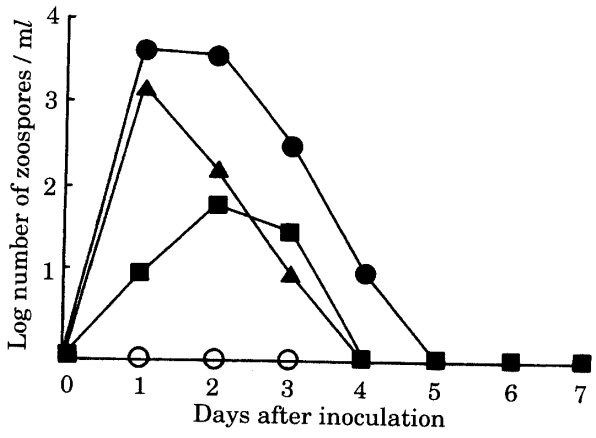

Fig. 2. Effect of salinity on the release of zoospores from *Halocrusticida panulirata* NJM9633 at 25°C.
Symbols: ●, undiluted seawater (salinity 32.5‰); ▲, 3/4 seawter (24.4‰); ■, 2/3 seawater (21.7‰); ○, 1/2 seawater (16.3‰)

の後は日数の経過に伴って減少し，4日目以降では遊走子の産生はみられなかった。また，海水では他の試験区よりも遊走子が多く産生され，しかも遊走子が産生された期間が1日長かった点を除いて，3/4海水とほぼ同様の推移を示した。

感染実験 NJM9632株を用いた実験結果をTable 1に，NJM9633株の結果をTable 2に示した。本実験ではすべての死亡個体の体内に真菌の感染が確認された。

NJM9632株の場合，Z2幼生の死亡率は海水では55.0%と高かったが，2/3および3/4海水では幼生の死亡個体はまったく認められなかった。M2幼生は海水

Table 1. Effects of salinity and developmental stage on the infectivity of *Haliphthoros milfordensis* NJM9632 in greasyback shrimp

Stage		Mortality (%)	
		10^3 zoospores/ml	Control
Zoea 2	Undiluted seawater (33.0‰)	55.0	0
	3/4 Seawater (24.8‰)	0	0
	2/3 Seawater (22.0‰)	0	0
Mysis 2	Undiluted seawater (33.5‰)	5.9	0
	3/4 Seawater (25.1‰)	0	0
	2/3 Seawater (22.3‰)	0	0
Postlarva 1, 4, 8	Undiluted seawater (32.0～33.5‰)	0	0
	3/4 Seawater (24.0～25.1‰)	0	0
	2/3 Seawater (21.3～22.3‰)	0	0

Beakers containing 20 larvae each were exposed to zoospores and mortality were observed three days after inoculation; water temperature at 25°C.

区でのみ死亡がみられたが死亡率は低く，P1～8幼生の場合には，いずれの試験区でも死亡は認められなかった。

NJM9633株の場合，Z2幼生の死亡率はNJM9632株と同様に発育段階が進むほど，また塩分濃度が低くなるほど低下する傾向が認められた。

考　察

わが国では卵菌類に分類される菌による甲殻類の真菌症の報告は比較的多く，*Lagenidium myophilum* によるホッコクアカエビ *Pandalus borealis* およびトヤマエビ *P. hypsinotus* の真菌症,[6,7] *Haliphthoros* sp. に起因するノコギリガザミ *Scylla serrata* の卵および幼生の疾病,[8] *Haliphthoros* 属，*Lagenidium* 属，*Sirolpidium* 属および *Halocrusticida* 属によるガザミ *Portunus trituberculatus* 幼生の真菌症,[2,9] *Haliphthoros milfordensis* に起因するクルマエビ *Penaeus japonicus* 幼生の疾病[10] および *Halocrusticida panulirata* によるイセエビ *Panulirus japonicus* 幼生の疾病[5]などがある。これらの真菌症は，発生後短期間のうちに甲殻類の幼生を全滅させることが多いため，主に治療法よりも予防法が検討されてきてお

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

Table 2. Effects of salinity and developmental stage on the infectivity of *Halocrusticida panulirata* NJM9633 in greasyback shrimp

Stage		Mortality (%)	
		10^4 zoospores/m*l*	Control
Zoea 2	Undiluted seawater (33.5‰)	40.0	0
	3/4 Seawater (25.1‰)	5.3	0
	2/3 Seawater (22.3‰)	0	0
Mysis 2	Undiluted seawater (32.5‰)	20.0	0
	3/4 Seawater (24.4‰)	0	0
	2/3 Seawater (21.7‰)	0	0
Postlarva 1, 4, 8	Undiluted seawater (33.5‰)	0	0
	3/4 Seawater (25.1‰)	0	0
	2/3 Seawater (22.3‰)	0	0

Beakers containing 20 larvae each were exposed to zoospores and mortality were observed three days after inoculation; water temperature at 25℃.

り，ホルマリン浴[2,11]や飼育水のpH調整[9]がガザミ幼生では有効であったと報告されている。

ヨシエビでは，これまでに親エビのホルマリン浴，[*7]幼生エビのマラカイトグリーン浴，ホルマリン浴および硫酸銅浴と飼育水のpH調整法[*8]が試みられたが，いずれもその効果は不明瞭であった。また，薬浴剤はその後の幼生の成長や環境に悪影響を及ぼす可能性があることから，薬剤を用いない本症の発生防止方法を早急に確立することが望まれてきた。

そこで，幼生への影響が比較的少ないと思われる希釈海水の効果を検討した結果，供試菌は海水の塩分濃度が低下するに従って遊走子産生能が低下し，3/4海水以下の希釈海水中ではヨシエビ幼生に対して低い感染率しか示さず，しかも希釈海水はポストラーバ期の幼生を死亡させることはないことが判明した。

以上のことから，供試した2種類の卵菌類に起因する真菌症は，菌の感染に対するヨシエビ幼生の感受性が低下するポストラーバ期まで2/3（塩分濃度22‰前後）または3/4海水（塩分濃度25‰前後）中で飼育する方法により防除可能であることが明らかになった。なお，今回感染実験を行ったいずれの発育段階においてもヨシエビ幼生は1/2海水（塩分濃度16‰前後）に耐性を有していなかった。そのため，種苗生産現場においてヨシエビ幼生期に飼育水を1/2海水にまで希釈することは現実的ではないと思われた。また，本症の原因菌は*Haliphthoros milfordensis*および*Halocrusticida panulirata*だけではない可能性もあり，今後他の菌に起因する真菌症に対しても本法が有効であるか否かを検討する必要がある。

謝　辞

研究の機会を与えて下さった岡山県水産試験場栽培漁業センターの福田富男所長に感謝します。また，本研究を進めるにあたり御協力いただいた栽培漁業センターの池田善平専門研究員をはじめとする職員各位並びに岡山県水産資源保護協会の高見純一技師に深く感謝します。

文　献

1) J. S. Karling: Predominantly holocarpic and eucarpic simple biflagellate Phycomycetes, Strauss and Cramer, Hirschberg, 1981, 252p.
2) 浜崎活幸，畑井喜司雄：ガザミおよびノコギリガザミの卵と幼生から分離された卵菌類の病原性について．日水誌，**59**, 1059–1066 (1993).
3) T. P. Tharp and C. E. Bland: Biology and host range of *Haliphthoros milfordensis*. *Can. J. Botany*, **55**, 2936–2944 (1997).
4) K. Nakamura and K. Hatai: *Atkinsiella dubia* and its related species. *Mycoscience*, **36**, 431–438 (1995).
5) N. Kitancharoen and K. Hatai: A marine oomycete *Atkinsiella panulirata* sp. nov. from philozoma of spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Mycoscience*, **36**, 97–104 (1995).
6) K. Nakamura, S. Wada, K. Hatai, and T. Sugimoto: *Lagenidium myophilum* infection in the coonstripe shrimp *Pandalus hypsinotus*. *Mycoscience*, **35**, 99–104 (1994).
7) K. Hatai and O. Lawhavinit: *Lagenidium myophilum* sp. nov., a new parasite on adult northern shrimp (*Pandalus borealis* Krøyer). *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **29**, 175–184 (1988).
8) 加治俊二，兼松正衛，手塚信弘，伏見　浩，畑井喜司雄：ノコギリガザミの卵およびふ化幼生のハリフトロス症に対するホルマリン浴の効果．日水誌，**57**, 51–55 (1991).
9) 安信秀樹，永山博敏，中村和代，畑井喜司雄：飼育水のpH調整によるガザミ幼生真菌症の防除．日水誌，**63**, 56–63 (1997).
10) K. Hatai, W. Rhoobunjongde, and S. Wada: *Haliphthoros milfordensis* isolated from gills of juvenile kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) with black gill disease. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **33**, 185–192 (1992).
11) 浜崎活幸，畑井喜司雄：ガザミおよびノコギリガザミの卵とふ化幼生の真菌症に対するホルマリン浴の効果．日水誌，**59**, 1067–1072 (1993).

*7 村田　守，池田善平，元谷　剛：ヨシエビの種苗生産．岡山県水産試験場報告，**8**, 99–102 (1993).
*8 池田善平，元谷　剛，近藤正美，杉野博之：ヨシエビの種苗生産．岡山県水産試験場報告，**10**, 225–236 (1995).

NII-Electronic Library Service