

仔魚期に発生したアユ *Plecoglossus altivelis* の *Pythium* 属菌による 内臓真菌症について－Ⅱ

三浦 正之・畑井 喜司雄*¹・東條 元昭*²・和田 新平*¹・岡崎 巧

2006, 2007 年度に山梨県水産技術センター（以下、当所）で飼育中のアユ *Plecoglossus altivelis* 仔魚に内臓の白濁を特徴とする病気が発生し、アユ仔魚に累積約 2 - 3 割の死亡を引き起こした¹⁾。既報¹⁾ではフハイカビ目フハイカビ科の *Pythium* 属菌が原因菌として疑われ、本属は植物病学の中では極めて重要な種を含む属であるが^{2,3)}、魚類での大量死の事例はないと報告した。なお、本病は 2008 年度にも同様に発生している。

本報告では、本病の原因菌を種レベルで同定するとともに、分離菌による実験感染を試みることで、アユ仔魚への感染性を確認した。さらに、飼育環境の制御による防除の可能性についても併せて検討した。

材料および方法

病原体の分離・培養

2008 年度は 2008 年 12 月に本病が発生したため、病魚から GY 寒天培地⁴⁾を用いて原因菌の分離を試みた。すなわち、病魚の白濁部位もしくは魚体ごと GY 寒天培地の中心部に静置し、雑菌の増殖を抑制するため、少量のアンピシリンナトリウム（川崎三鷹製薬社製）および硫酸ストレプトマイシン（明治製薬社製）を接種部位周辺に散布した後に 15℃で培養した。また、同時期に病魚発生池の残餌・糞などの堆積物を直接鏡検するとともに、上述の方法で菌の分離を試みた。

分離菌の同定

2006 年度に病魚から分離した NJM 0702 株、2007 年度に病魚から分離した YFTM 0701, YFTM 0702 および YFTM 0703 株および 2007 年度に飼育池底堆積物から分離した YFTM 0704 株、2008 年度に病魚から分離した YFTM 0803 株および 2008 年度に本病発生池堆積物から分離した YFTM 0804 株の計 7 株について、rRNA 遺伝子の internal transcribed spacer 領域（以下、ITS 領域）である ITS1, ITS2 およびその間のサブユニット領域である 5.8rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行った。各分離菌株から Puregene Yeast and Gram-Positive Bacteria Kit (Gentra System 社製) を用いて核酸を抽出し、ITS5 および ITS4⁵⁾ をプライマー (ITS5 : GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG, ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC) として用いて Perkin Elmer 9700 thermal cycler (Perkin Elmer 社製) で DNA を増幅した。PCR の反応条件は、95℃で 5 分間加熱した後、95℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分の工程を 35 回繰り返し、最後に 72℃で 7 分保温した。増幅した PCR 産物について、QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 (White et al., 1990) をプライマー (ITS1 : TCCGTAGGTGAACCTGCGG, ITS2 : GCTGCGTTCTTCATCGATGC, ITS3 : GCATCGATGAAGAACGCAGC) としてシーケンサー (301 DNA sequencer, Perkin Elmer 社製) を用いて塩基配列解析を行った。

また、NJM 0702 株、YFTM 0701 株および YFTM 0804 株の形態観察を行った。供試株はコーンミール寒天培地（市販のスイートコーン 200 g と煮干 0.5 g を乳鉢で磨り潰し、200 mL の蒸留水と混合の後に煮沸し、さらにそれを布で濾したものを蒸留水で 1,000 mL にメスアップし、これに寒天を 1.5% 加えた培地）で、試験に供するまで 15℃で培養した。形態観察は、コーンミール寒天培地で 15℃で 7 日間前培養した後に、芝培養法⁶⁾を用いて 15 - 20℃で培養し、van der plaats-Niterink²⁾によって報告されている既知の種の形態と比較した。

Miura Masayuki, Hatai Kishio, Tojo Motoaki, Wada Shinpei, Okazaki Takumi

*¹, 日本獣医生命科学大学魚病学教室 *², 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

感染実験

YFTM 0701 株を供試菌株とした。コーンミール液体培地を用い、供試菌を 15℃ で 1 ヶ月間培養した後、芝培養法⁶⁾によって遊走子を産生させ、感染源として使用した。芝培養では、オートクレーブで滅菌した芝の葉片と YFTM 0701 株の菌糸体をガラスシャーレ中の当所の滅菌アユ飼育水に投入し、15℃ で 24 時間培養した後に、芝および菌糸体を滅菌ガーゼを用いて取り除いたものを供試遊走子浮遊液とした。遊走子数は改良ノイバウエル式血球計算板(萱垣医理科工業社製)で算定した結果、 6.9×10^4 個/mL であった。

供試魚は当所で飼育中の健康なアユ仔魚(平均体重 0.092 g)を用いた。3 L 容のガラスビーカー中に 2 L の人工海水(表 1)を入れ、その中にアユ仔魚 25 尾を収容した。アユ仔魚は取り扱いに弱く、収容作業に伴う死亡が発生するため、収容した 25 尾のうち、約 1 日間の馴致後に死亡した魚を全て取り除き、生残魚を供試魚とした。試験期間中はビーカー周囲に水温約 16℃ の地下水をかけ流すことで、水温を一定に保つとともに、通気を行い供試魚に酸素を補給した。実験期間中は無給餌とした。

感染試験は感染区と対照区とを各々 1 区ずつ設け、感染区のビーカーには、上述の遊走子浮遊液を 30 mL 加え、対照区には、滅菌した人工海水を 30 mL 加えた。遊走子接種後は 7 日間毎日死亡状況を観察し、供試魚が死亡した場合には、腹部の白濁などの症状の有無を確認した。症状が確認されなかった場合には、圧扁標本作製し、光学顕微鏡下で菌糸の有無を確認し、菌糸が確認されなかった場合は、死因不明とした。また、症状が確認された場合には、魚体の白濁部位の一部を切り取り圧扁標本作製し、菌糸の確認を行うとともに、GY 寒天培地で接種菌の再分離を試みた。残りの部位を 10% リン酸緩衝ホルマリン(Mildform[®]10N, 和光純薬社製)で固定し、常法に従って 4 μm のパラフィン切片とした。2008 年度は 2007 年度と異なり、病理組織標本には、真菌の染色に適しているグロコット HE 染色を用いた。また、2007 年度の自然発病魚の病理組織標本にも同様の染色を施し、実験感染魚の病変と比較した。

試験終了後には、生残魚すべてで圧扁標本作製し、光学顕微鏡下で菌糸の有無を確認した。

表1 供試人工海水の組成(1Lあたり)

塩類等	重量(g)
NaCl	3.01
MgSO ₄	0.78
MgCl ₂	0.60
KCl	0.08
CaCl ₂	0.18
NaHCO ₃	0.03

水温および人工海水の塩分濃度調整による防除の可能性の検討

試験には YFTM 0701 株を供し、以下のように実施した。発育適温試験は、前培養菌集落の辺縁を No. 2 コルクボーラー(内径 5.5 mm)で打ち抜いた寒天小片を 7 枚の GY 寒天培地の中心部に 1 個ずつ静置し、それぞれ 5, 10, 15, 20, 25, 30 および 36.5℃ で培養した。集落の直径は培養開始 5 日後にデジタルノギスで測定し、菌糸の発育径は集落の直径からコルクボーラーの内径を差し引き 2 で割った値とした。

塩分耐性試験は、0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 および 4.0% NaCl 加 GY 寒天培地上に寒天小片を静置し、25℃ で 5 日間培養し、培養終了後の菌糸の発育径を上述と同様の方法で算出した。また、塩分耐性試験は液体培地についても同様の試験を行った。すなわち、0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 および 4.0% NaCl 加 GY 液体培地を、滅菌プラスチックシャーレ(直径 90 mm × 深さ 20 mm)に 30 mL ずつ分注し、それぞれに寒天小片を 1 個ずつ接種し、25℃ で 5 日間培養した。発育した菌糸体は培養終了後に蒸留水で軽く洗浄した後に、寒天小片ごと 50℃ で約 12 時間乾燥し、乾燥重量を求めた。

飼育水の塩分濃度調整により発病を防除できるか否かを検討するために、飼育水の塩分濃度上昇に伴うアユ仔魚への影響を調べた。供試魚は当所で飼育中の健康なアユ仔魚（平均体重 0.089g）とした。表 1 に示した人工海水を 3L 容のガラスビーカー中に 2 L 入れた後に、アユ仔魚 25 尾を収容し、約 1 日間の馴致後に死亡した魚を取り除いた生残魚とした。なお、水温を一定に保つなどの飼育環境は感染実験と同様とした。

試験区は表 1 に示す塩分約 5 % の人工海水を基準として、基準×1 倍区（対照区）、2 倍区（10 % 区）、4 倍区（20 % 区）、6 倍区（30 % 区）および 8 倍区（40 % 区）を設けた。試験は 2 回行い、第 1 回目の試験では、アユを収容している 2 L の飼育水に、1 L の塩類溶液（混合後に飼育水が目的の濃度となるように塩類がすでに溶解してあるもの）を速やかに混合し、その後の 7 日間死亡尾数を計数した。

第 2 回目の試験では、目的の濃度とするまでに 1 日間かけ 2 段階で濃度を上昇させた。すなわち、試験開始日には、塩分が目的濃度の半分となるように、飼育水に 500 mL の塩類溶液を混合し（対照区のみ濃度は一定であるため塩類溶液を添加後も濃度は変わらないようにした）、その翌日にさらに 500 mL の塩類溶液を飼育水に混合することで、最終的な目的濃度とし、その後の 7 日間死亡尾数を計数した。

結果

病原体の分離・培養

既報¹⁾ 同様、すべての病魚から集落が白色を呈する菌が純培養的に分離された。また、病魚発生池堆積物からも同様の菌が分離され、堆積物を直接鏡検した結果、卵孢子様の粒子が多数観察された（図 1）。

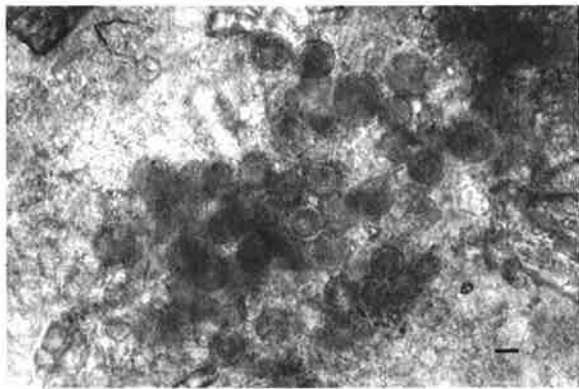


図 1 病魚発生池の池底の堆積物中に観察された卵孢子様の粒子 Scale bar = 20 μ m.

分離菌の同定

塩基配列解析の結果、試験に供した 7 株の ITS 領域の全長は 774 bp で、すべて同一の塩基配列を示した。また、この塩基配列は *Pythium flevoense* CBS 234.72⁷⁾ の ITS 領域の配列と 100 % 一致した。

分離菌の形態観察の結果を表 2 に示す。NJM 0702 株、YFTM 0701 株および YFTM 0804 株の主要な菌糸の径はいずれも 6 μ m 未満であった。どの株も遊走子嚢は糸状で、菌糸の形状と類似していた（図 2）。また、造卵器は球形、平滑で、直径はそれぞれ 22.0 – 31.0 μ m（平均 27.3 μ m）、19.0 – 35.0 μ m（平均 26.8 μ m）および 21.0 – 28.0 μ m（平均 24.3 μ m）であった（図 3）。どの株も造卵器には、複数の造精器が複雑に絡みつくように付着しており、付着形態はディクリナス型またはモノクリナス型であった。卵孢子は非充満性であり、直径はそれぞれ 18.0 – 27.0 μ m（平均 22.4 μ m）、18.0 – 27.0 μ m（平均 22.4 μ m）および 17.3 – 23.0 μ m（平均 19.5 μ m）で、卵孢子の壁の厚さはそれぞれ 1.0 – 2.0 μ m（平均 1.5 μ m）、0.5 – 2.0 μ m（平均 1.2 μ m）および 1.0 – 1.5 μ m（平均 1.1 μ m）であった。上述の形態学的特長は van der plaats-Niterink²⁾ によって報告されている *P. flevoense* の形態的特徴と類似していた。

表2 分離菌の形態的特徴

	NJM 0702株	YFTM 0701株	YFTM 0804株	<i>Pythium flevoense</i> van der Plaats-Niterink (1981)
菌糸の径 (μm)	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
遊走子のう	糸状	糸状	糸状	糸状
造卵器の形態	球形, 平滑	球形, 平滑	球形, 平滑	球形, 平滑
造卵器の径 (μm)	22.0-31.0 (平均 27.3)	19.0-35.0 (平均 26.8)	21.0-28.0 (平均 24.3)	17.0-30.0 (平均 19.0)
造精器	ディクリナス型およびモノクリナス型 1個の造卵器につき複数付着	ディクリナス型およびモノクリナス型 1個の造卵器につき複数付着	ディクリナス型およびモノクリナス型 1個の造卵器につき複数付着	ディクリナス型 1個の造卵器につき複数付着
卵胞子	非充満性	非充満性	非充満性	非充満性 (場合によっては, ほぼ充満性)
卵胞子の径 (μm)	18.0-27.0 (平均 22.4)	18.0-27.0 (平均 22.4)	17.0-23.0 (平均 19.5)	14-24 (平均 17.7)
卵胞子の壁の厚さ (μm)	1.0-2.0 (平均 1.5)	0.5-2.0 (平均 1.2)	1.0-1.5 (平均 1.1)	2-4

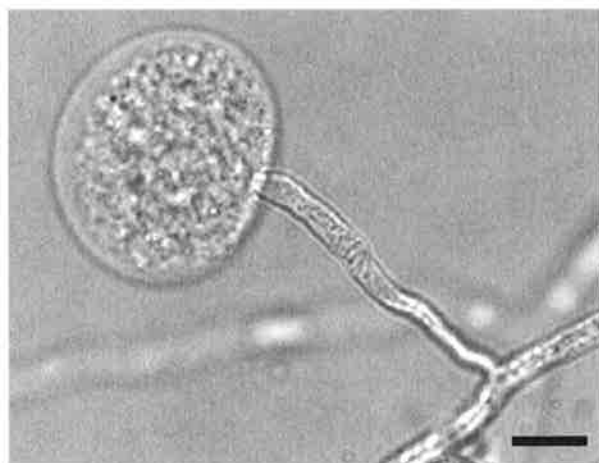


図2 NJM 0702株の遊走子嚢（無性生殖器官）

Scale bar = 10 μm



図3 NJM 0702株の有性生殖器官

Scale bar = 10 μm.

感染実験

感染区での死亡尾数は供試魚 23 尾のうち 2 尾であった。そのうち 1 尾（接種 6 日後に死亡）は外観症状が認められず、圧扁標本からも菌糸を確認することができなかつたため死因不明とした。残りの 1 尾（接種 5 日後に死亡）は、腹部から尾柄にかけて自然発病魚と同様の白濁が確認されたため（図 4）、尾柄部のみ圧扁標本を作製し、鏡検したところ、菌糸径約 5 μm の無隔壁の菌糸が多数観察された。また、尾柄部から原因菌の分離を試みた結果、接種菌が再分離された。圧扁標本および接種菌の分離に供した尾柄部を除いた残りの部位の病理組織検査を行ったところ、総排泄孔、腸管、腎臓、筋肉、脊索および腹腔など広範囲にわたり無隔壁の菌糸が確認された（図 5, 6）。また、自然発病魚ではすべての標本で鰾中に無隔壁の菌糸の増殖が確認されたが（図 7）、実験感染魚の鰾には菌糸は観察されず、総排泄孔での菌糸の増殖が顕著であった。菌糸の増殖部位では炎症性細胞の浸潤は殆ど認められなかつたことは自然発病魚と共通であった。対照区の死亡尾数は供試尾数 22 尾中 1 尾（接種 4 日後に死亡）であったが、外観症状はなく、圧扁標本からも菌糸は確認されず死因不明とした。なお、試験終了後、両区の生残魚すべての圧扁標本を鏡検したが、菌糸は確認されなかつた。



図4 実験感染による死亡魚の外観

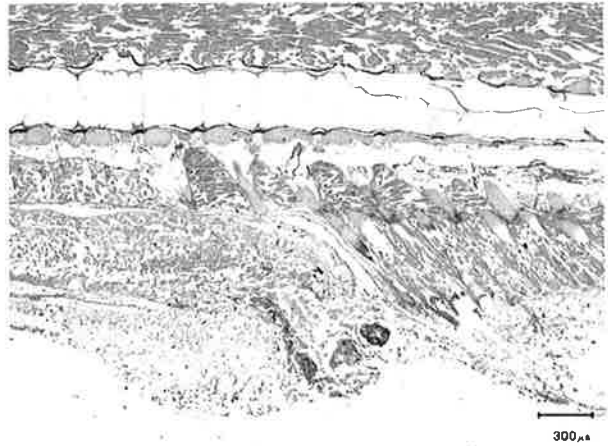


図5 死亡魚の病理組織像
総排泄孔の崩壊および菌糸の増殖が確認される
グロコット HE 染色 Scale bar = 300 μ m.

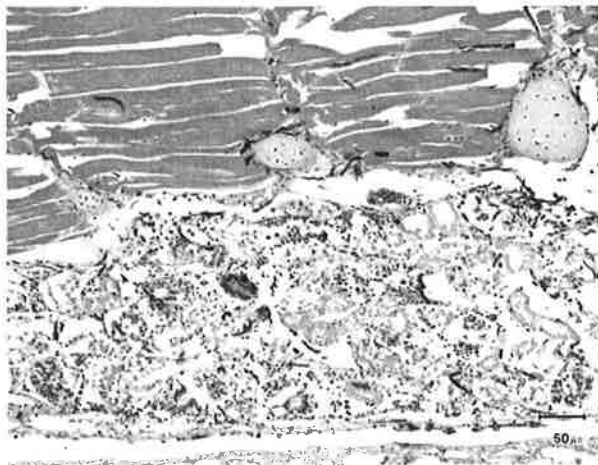


図6 実験感染死亡魚の腎臓および筋肉の病理組織像
腎臓, 筋肉で無隔壁の菌糸が観察される
グロコット HE 染色 Scale bar = 50 μ m.

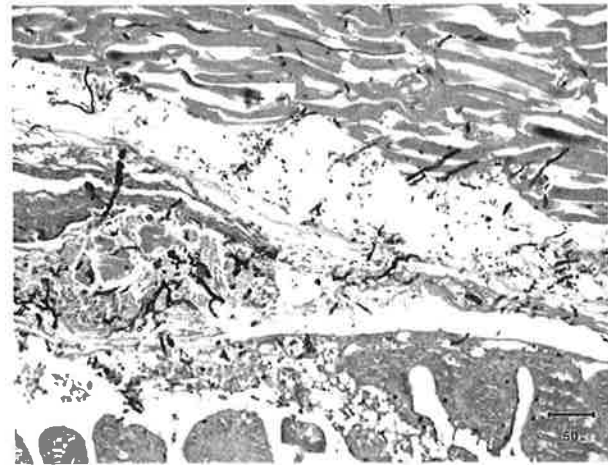


図7 自然発病魚の病理組織像
鰓は菌糸の増殖により激しく崩壊し、鰓で増殖した菌糸はその周辺組織である腎臓、腸管および筋肉へと感染を拡大させている。グロコット HE 染色 Scale bar = 50 μ m.

水温および人工海水の塩分濃度調整による防除の可能性の検討

供試菌の発育は5 - 30℃で認められ、36.5℃では認められなかった。また、25℃で最も良好な発育を示し、培養開始5日後の発育径は30 mm以上であった(図8)。

塩分耐性試験の結果、供試菌は0.5%で最良な発育を示し、次いで0%が良好であり、ともに培養開始5日後の発育径は30 mm以上に達した(図9)。また、1.0%以上のNaCl濃度では、濃度の上昇に伴い発育が抑制され、発育径は2.0%では約15.0 mm、4.0%では0 mmとなった。

続いて、液体培地での試験の結果、4.0%の濃度では、肉眼的に菌糸の発育が全く確認されなかったため、4.0%の乾燥重量の値が0となるように各濃度における値を補正し、菌糸の発育量を算出した。液体培地中で最も良好な発育を示した濃度は0%であり、次いで0.5%での発育が良好であった(図10)。また、1.0%以上の濃度では、寒天培地上で行った試験よりも塩分濃度の影響を受けやすく、2.0%以上の濃度では、乾燥重量は0 mgに近い値となった。

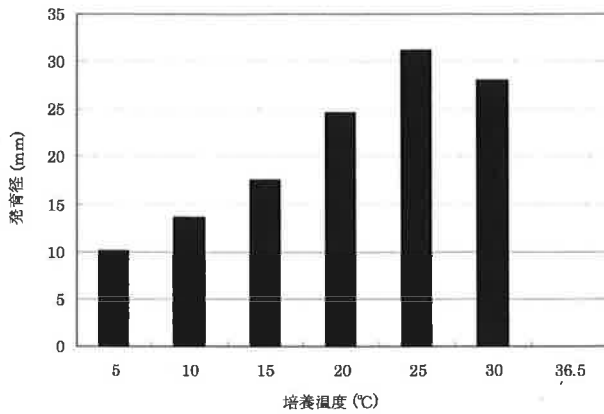


図8 YFTM 0701 株の発育に及ぼす温度の影響
(GY 寒天培地, 5日間培養)

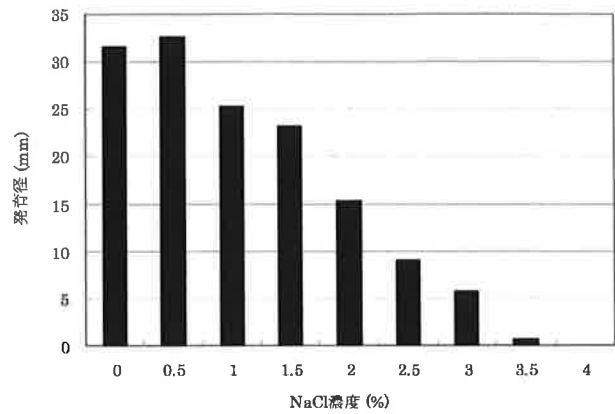


図9 YFTM 0701 株の発育に及ぼす NaCl 濃度
の影響 (GY 寒天培地, 25°C, 5日間培養)

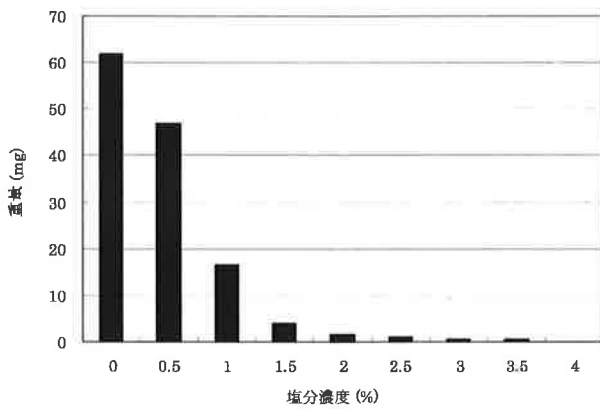


図10 分離菌の発育に及ぼす NaCl 濃度の影響
(GY 液体培地, 25°C, 5日間培養)

飼育水の塩分上昇がアユ仔魚へ及ぼす影響を検討した結果、急激に濃度を上昇させた第1回目の試験では、試験終了時の生残率が対照区、10、20、30および40%区でそれぞれ91.3、95.5、90.5、50.5および12.5%であり、30%以上の試験区では、対照区と比較して生残率が有意に低かった (Fisher's exact test, $p < 0.01$) (図11)。その他の試験区では、対照区との有意差は確認されなかった ($p > 0.05$)。なお、30%以上の試験区では、塩類投入翌日の死亡が特に多く、その生残率は30、40%区でそれぞれ59.1、20.8%であった。

2段階で濃度を上昇させた第2回目の試験では、試験終了時の生残率が対照区、10、20、30および40%区でそれぞれ95.2、90.9、92.0、96.0および45.5%であり、40%区のみ対照区と比較して有意に低かったが ($p < 0.01$)、その他の試験区では、対照区と比較して、有意な差は認められなかった ($p > 0.05$) (図12)。第2回目の試験では、第1回目の試験と比較して30、40%区における塩類投入完了後翌日の死亡が大幅に減少し、試験終了時の生残率が高かったことから、濃度上昇に時間をかけることで、影響を軽減できることが確認された。

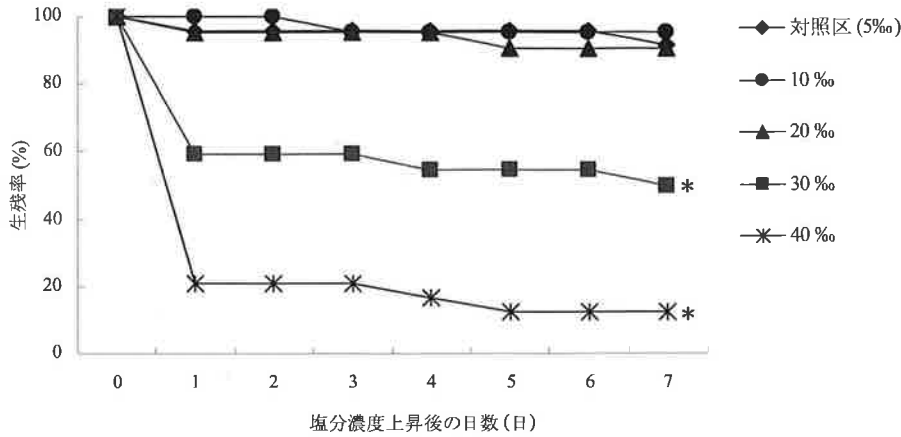


図 11 飼育水の塩分上昇が及ぼすアユ仔魚の生残率への影響 (第 1 回試験)
 飼育水の塩分濃度を急激に上昇させた後に、7 日間斃死状況を観察した
 * , 試験終了後の生残率において、対照区と比較して有意差 (Fisher's exact test, $p < 0.05$) .
 ** , 試験終了後の生残率において、対照区と比較して有意差 (Fisher's exact test, $p < 0.01$) .

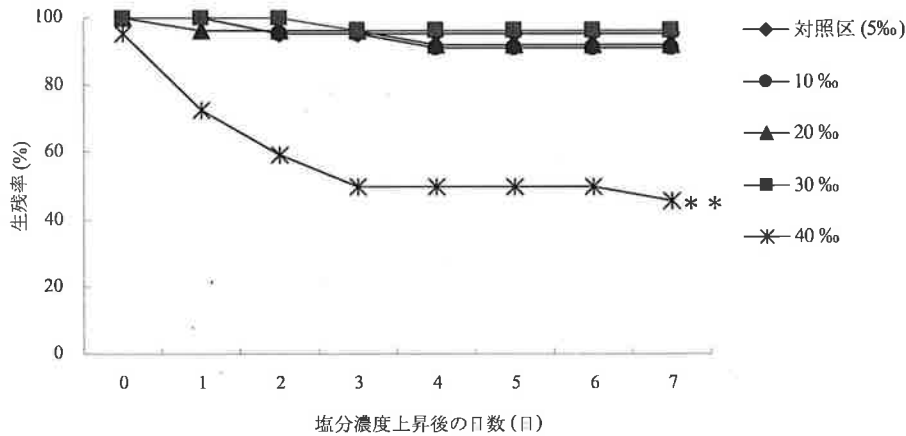


図 12 飼育水の塩分上昇が及ぼすアユ仔魚の生残率への影響 (第 2 回試験)
 飼育水の塩分濃度を 1 日間かけて 2 段階で上昇させた後に、7 日間斃死状況を観察した
 * , 試験終了後の生残率において、対照区と比較して有意差 (Fisher's exact test, $p < 0.05$) .
 ** , 試験終了後の生残率において、対照区と比較して有意差 (Fisher's exact test, $p < 0.01$) .

考 察

本病による死亡魚の多くは過去 2 年と同様に内臓が白濁しており、白濁部位からはすべて同種の真菌が分離された。さらに、分離菌の遊走子を用いた感染実験で、供試魚 23 尾のうち 1 尾で内臓の白濁を伴う接種菌の感染が確認されたことから、本病は後述する分離菌によって引き起こされた感染症であることが明らかとなった。

2007 年度の試験では、分離菌の ITS 領域のうち、ITS1 のみの塩基配列解析を行なったため、種レベルで分離菌を同定することができなかった。しかし、今回の ITS 領域全域の塩基配列解析では、その塩基配列は *Pythium. flevoense* CBS 234.72⁷⁾ のそれと 100 % 一致した。真菌の塩基配列解析で、Sugita et al.⁸⁾ は *Trichosporon* 属を用いて、rRNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列類似性を、絶対的同定基準である染色体 DNA-DNA 交雑実験に基づく DNA 相同値と比較した結果、塩基配列の類似性が約 99 % 以上であれば同一種以内の変種以上の関係であることを示し、種レベルの真菌の同定は ITS 領域の塩基配列解析で可能であるとしている。いっぽう、分離菌の形態的特徴 (菌糸径、遊走子の産生様式、有性生殖器官など) も van der plaats-Niterink²⁾ が示した *P. flevoense* の特徴と極めて類似しており、分離菌を本種に同定するのは妥当と思われた。

本病の原因菌である *P. flevoense* は van der plaats-Niterink²⁾ によってオランダのフレボラント州の干拓地から

の分離事例が報告されている。その後、本種はオーストラリアで稲の根⁹⁾、リトアニアにおいて観賞用植物の鉢植えの根圏¹⁰⁾から分離されているが、植物に対して重篤な被害を及ぼす種としての報告はない。その他、アメリカのカリフォルニア州で、蚊の一種である *Ochlerotatus sierrensis* の幼生への感染事例が知られている。いずれにせよ、本種の魚類への感染事例はない。今回本種がアユに病気を引き起こした経緯は不明であるが、*Pythium* 属菌は一般的に土壤中に存在することから、当所の土壤中に本種が存在している可能性も考慮した上で、今後、本種の存在箇所を明らかにする必要がある。

自然発病魚の病理組織標本をグロコット HE 染色で観察した結果、鰓への原因菌の重篤な感染が確認されたことから、誤嚥により鰓内へ *P. flevoense* が取り込まれることが感染の要因であることが改めて確認された。但し、実験感染魚では鰓に菌糸は確認されず、総排泄孔の崩壊および菌糸増殖が著しかったことから、総排泄孔からの感染も起こりうることを示唆された。本試験では 23 尾中 1 尾しか感染が成立しなかったため、引き続き検証が必要であろう。

本病の防除法に関しては、原因菌が土壤中に存在する可能性があることは推察できるものの、飼育池への侵入経路が不明であるため、感染経路の遮断によって発生を未然に防ぐことは難しい。但し、飼育環境の改善により被害を軽減できる可能性はあると考えられる。今回の調査で、飼育池底の残餌、糞等を含んだ堆積物中に本菌の卵孢子様の粒子が多数観察され、実際に原因菌も分離されたことから、池掃除の徹底および池掃除時に堆積物を巻き上げないような注意をすることは対策として有効であろう。また、分離菌の発育適性温度を調査した結果、5 - 30℃まで増殖が確認されたことから、水温の制御による病気の発生防除は難しいと判断されたが、NaCl 濃度の影響について調査した結果では、濃度の上昇に伴い菌糸の生育が抑制される傾向がみられた。特に 2 %NaCl 以上の濃度の液体培地中では菌糸の増殖が殆ど確認されなかった。アユ仔魚の飼育水の塩分濃度を 1 日以上かけて上昇させれば、約 5 から 30 %までの濃度上昇であっても 7 日後の死亡率に影響が出なかったという本試験の結果からも、塩分濃度の調整は有効な防除法となる可能性がある。

要 約

1. 2006 年度以降発生しているアユ仔魚の *Pythium* 属菌による内臓真菌症が 2008 年度も発生した。
2. 病魚からは過去 2 年度と同一の真菌が分離され、本菌は塩基配列解析および形態観察により *Pythium flevoense* に同定された。
3. 本菌の遊走子浮遊液を用いてアユ仔魚に実験感染を試みた結果 23 尾中 1 尾で感染が成立した。
4. 本菌は 5 - 30℃で発育したが、36.5℃では発育しなかった。また、1.0 % 以上の NaCl 濃度では、濃度上昇に伴い発育が抑制された。
5. 池底の掃除、飼育水の塩分濃度の制御が今後の防除対策となり得ると考えられた。

文 献

- 1) 三浦正之・畑井喜司雄・東條元昭・岡崎巧 (2009) : 仔魚期に発生した *Plecoglossus altivelis* の *Pythium* 属による内臓真菌症について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 36, 9-14.
- 2) van der Plaats-Niterink, A. J. (1981) : Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*, 21, 1-242.
- 3) Jarvis, W. R. (1992) : Managing diseases in greenhouse crops. American Phytopathological Society, Saint Paul, 288p.
- 4) 畑井喜司雄・江草周三 (1979) : 真菌性肉芽腫症起病真菌に関する研究 - III. MG-fungus 用人工培地の開発. 魚病研究, 13, 147-152.
- 5) White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990) : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (ed. by Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White) . Academic Press, San Diego, 315-322.
- 6) Martin, F. N. (1992) : *Pythium*. In "Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi" (ed. by Singleton, L. L., J. D. Mihail and C. M. Rush) . American Phytopathological Society, Saint Paul, 39-49.
- 7) Le' vesque, C. A. and A. W. A. M. de Cock (2004) : Molecular phylogeny and taxonomy of the genus

Pythium. Mycol. Res., 108, 1363-1383.

- 8) Sugita, T., A. Nishikawa, R. Ikeda and T. Shinoda (1999) : Identification of Medically Relevant *Trichosporon* Species Based on Sequences of Internal Transcribed Spacer Regions and Construction of a Database for *Trichosporon* Identification. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1985-1993.
- 9) Cother, E. J. and R. L. Gilbert (1993) : Comparative pathogenicity of *Pythium* species associated with poor seedling establishment in southern Australia The use of salt solutions to control fungus (*Saprolegnia*) infestations on salmon eggs. *Plant Pathol.*, 42, 151-157.
- 10) Stankevičienė, A. and A. Lugauskas (2003) : Micromycetes of the *Pythium* genus associated with pot-plants. *Botanica Lithuanica*, 9, 185-189.
- 11) Saunders, G. A., J. O. Washburn, D. E. Egerter and J. R. Anderson (1988) : Pathogenicity of fungi isolated from field-collected larvae of the western treehole mosquito, *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae) . *Journal of Invertebrate Pathology*, 52, 360-363.