

Pythium ultimum の卵胞子の発芽とそれに起因する病害発生の様相

小 倉 寛 典

(農学部 植物病理学研究室)

Germination of oospores of *Pythium ultimum* and aspect of disease occurrence caused by its oospores.

Hirosuke OGURA

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture

Abstract: (Germination of oospores of *Pythium ultimum* and aspect of disease occurrence caused by its oospores. Hirosuke OGURA, Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture.) It is sure that the disease by *Pythium ultimum* starts by oospores of this fungus in soil. The present paper is studied on germination of oospores of *P. ultimum* and on disease appearance of cucumber seedlings by them. The oospores turn to germinable state from selfresting state after 5 weeks or more in soil extract solution, though they can not germinate in it. However some of them still continue resting state even after 9 weeks. On the contrary the oospores turned to germinable are very few in distilled water. The oospores need to use organic nutrients such as amino acids, sugars or exudates from living roots for their germination, but not need specific substances or exudates from host. The rate of germination of the oospores, however, is different in rhizosphere soil with each plant tested, because these soils might have different fungistasis or some other reasons. One hundred oospores per 1 g of soil are enough to attack cucumber seedlings in favorable condition like as sterilized soil, but 1000 spores or more are necessary to attack them in natural soil. Moreover the disease is not appeared in self-resting period even in too enough on number of oospores. The damage of seedlings is not always directly proportional to increase of oospores in soil, but it occurs with phased or and uncontinuous aspect in continuous increase of oospores. From these results it is considered that the fact, which the oospores do not wake simultaneously, might be opportune to maintain this species. Another remarkable point for occurrence of damage is as follow: it relates with the age of oospores and the number of active germinable ones.

Pythium ultimum は被害作物残渣あるいは土壤中で卵胞子を形成し、翌年の発生の第1次伝染源となる。この菌の生活は宿主根内部や新鮮な残渣など他の競合微生物の存在しない場所に限定されている^{1), 2)}。それ故、この菌の動向は腐生的生存の持続よりも長期間の不利な環境に耐える耐久体の残存が重要視される。

この菌は耐久体として分生胞子と卵胞子を形成するが、前者は比較的短い期間の耐久型であり、後者は長期間の耐久型である。一方、圃場でこの菌による病害が発生すると短期輪作によっては本病害を阻止し得ない。この菌は腐生能力の劣る菌であるにも拘らず被害が長期にわたるのは種族の維持に占める卵胞子の役割が大きいためであろう。

本研究は卵胞子の発芽の条件とくに生物的条件と、それに続く被害の発生の様相について検討した。

実験材料

供試した *P. ultimum* は当研究室所属の圃場においてキュウリ苗立枯病罹病植物から分離した菌株 (P506) である。

供試した土壌はキュウリの栽培歴のない圃場から採取した埴壤土である。

供試したキュウリの品種は四葉である。

実験方法および結果

1. *P. ultimum* の卵胞子の休眠覚醒

P. ultimum の卵胞子の採取は次の操作によった。殺菌したペトリ皿にV8ジュース培地*を10ml入れ、本菌を接種し25Cに静置した。7日後に菌そうを流水にて洗滌し、土壌抽出液**10mlを入れたペトリ皿に移し、さらに7日間25Cに静置した。菌そうは部分的に溶菌現象を示すが、この菌そうを取出して流水にて洗滌後、ホモジナイザーで細く砕いた。この懸濁液をガーゼ2枚で濾過して大きい菌体を除去し、遠沈した。沈澱物は卵胞子、胞子のうおよび菌糸片である。これをV8ジュース液体培地に加え、24時間25Cに放置し、発芽した胞子あるいは菌糸片より伸長した菌糸体

Table 1. Germinable abilities of oospores of *P. ultimum*

| Submerge in | Submerged period (Weeks) | Rate of germination* (%) | |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------|
| | | 2 hrs. | 4 hrs. |
| Soil extract solution | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 |
| | 3 | 1 | 3 |
| | 4 | 7 | 13 |
| | 5 | 11 | 41 |
| | 6 | 34 | 55 |
| | 7 | 39 | 60 |
| | 8 | 42 | 61 |
| Distilled water | 9 | 67 | 72 |
| | 1 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 |
| | 4 | 1 | 2 |
| | 5 | 0 | 4 |
| | 6 | 1 | 7 |
| | 7 | 1 | 7 |
| | 8 | 1 | 8 |
| 9 | 4 | 22 | |

* Rate of germination was tested in V-8 juice drop

* 遠沈したV8ジュースの上澄液200mlに蒸留水800mlを加え、CaCO₃2.5gを添加

** 土壌1gを100mlの殺菌水に加え、25Cで3日間静置したのちろ紙2枚で濾過した。これを1%土壌抽出液として使用した。

をガーゼ4枚で濾過し、卵胞子懸濁液を得た。これを遠沈し、さらに殺菌水を加えて遠沈することにより養分を除去した。このようにして得た卵胞子を土壤抽出液 10 ml を入れた管びんに入れ、一定期間後発芽試験に供するまで25Cに放置した。対照として土壤抽出液の代りに殺菌蒸留水を使用した。卵胞子の発芽はスライドグラス上に滴下した卵胞子懸濁V8 ジュースで観察した。V8 ジュースは細菌の増殖を防ぐためペントレックス 1000 ppm を添加した。上記スライドグラスを25Cの温室に保ち、2時間、4時間後に検鏡した。卵胞子は採取後9週間まで毎週ごとにその発芽を観察した。

P. ultimum の卵胞子の発芽の経時的増加は第1表に示す。検鏡によれば、本菌の卵胞子は厚膜を有するが、数週間後には一部の卵胞子は厚膜が消失し、発芽可能な状態に変化する。発芽可能な卵胞子は養分を与えると早いものは1時間以内に発芽しはじめ、4時間後には菌糸は分枝して生長を続ける。土壤抽出液中に保存した卵胞子は養液中に移すと保存3週間後の胞子はわずかながら発芽し、6週間以降は50%以上が発芽する。さらに日数の経過とともに発芽の割合は増加し、発芽開始時間も縮小される。しかし、未発芽の卵胞子は厚膜化したままのものが多く、20週間保存した卵胞子では発芽率は84%に達するがなお10%は厚膜化した休眠型の卵胞子であった。第1表は1%の土壤抽出液であるが、濃度10%にすると、保存8週間で72%の発芽率を示し、その後次第に発芽率は低下する。一方、養分を加えない蒸留水中に保存すると発芽率は低く、9週間を過ぎても全卵胞子の1/3程度が発芽するにすぎず、未発芽卵胞子の多くは厚膜化した休眠型のままであった。

2. 植物根浸出物および有機物による *P. ultimum* 卵胞子の発芽促進

上記の実験から、卵胞子の発芽には養分を必要とすることを知ったが、土壤中の養分源としての生活根や残渣の影響について調査した。卵胞子は休眠型として土壤抽出液浸漬2週間のもの、発芽可能型として土壤抽出液浸漬8週間のものをそれぞれ供試した。生活根浸出物はトウモロコシ、エンバク、スズメノカタビラ、インゲン、ダイズ、クローバ、キュウリ、トマト、ダイコンから得た。

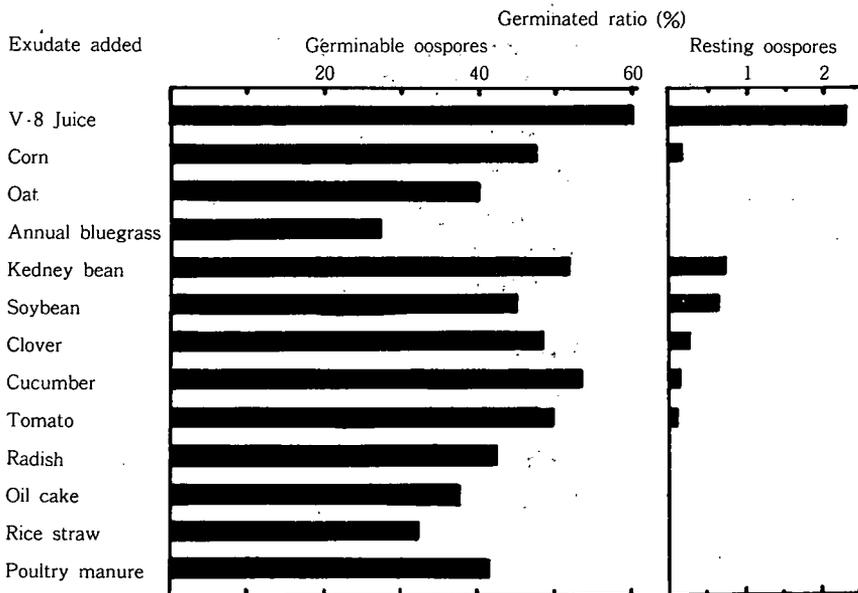


Fig. 1. Germination of oospores of *P. ultimum* in solution added exudate of living root or organic fertilizer.

上記各作物を径 9 cm の腰高ペトリ皿に入れた有機物を除去した砂 150 ml に播種し、25Cの陽光恒温器に入れ、土壤湿度を60% (v/v) に保った。トウモロコシ、ダイズなどの大型種子は10粒、エンバク、キュウリなどの中型種子は25粒、ダイコンなどの小型種子は50粒を用いた。但し、スズメノカタビラ、クローバーは圃場に自生するものを採集した。各植物は発芽7日後に根を痛めぬよう抜き取り、流水で付着する砂あるいは土を洗滌後 10 ml の殺菌水に根をひたして25Cで24時間放置したのち植物を除去し加圧蒸気殺菌して植物浸出液とした。また、有機物として油粕、稲わら、鶏糞を用いた。各 200 mg を 100 ml の水に加え、加圧蒸気殺菌して浸出液を得た。なお、対照としてV8 ジュース培地を用いた。発芽率は前記と同様にスライドガラス上に滴下した各浸出液中で処理4時間後に調査した。

発芽可能の卵胞子はいずれの浸出液に対しても発芽は促進されるが、作物により発芽率には多少の差異が認められる(第1図)。スズメノカタビラを除いては作物根は有機物よりも発芽促進効果は大きい。休眠打破の進んでいない卵胞子ではV8 ジュース浸漬でも発芽はわずかであり、次いでマメ科植物浸出物が多少発芽を促進する以外は殆んど発芽を促進しない。また、有機物浸出物は全く発芽しない。この結果は、休眠の覚醒は周囲の養分と殆んど関係はないが、発芽可能になった卵胞子の発芽は植物の種類や有機物の質的差異とは関係なく起こるものと思われる。

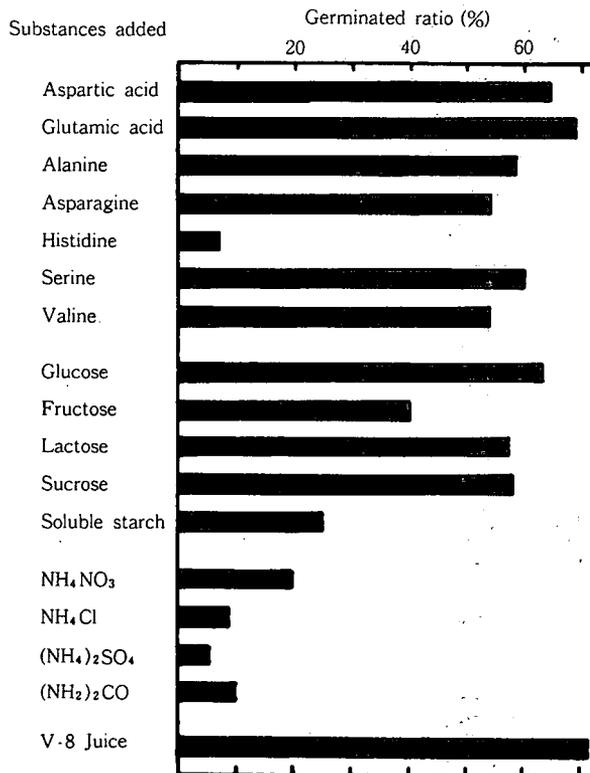


Fig. 2. Germination of oospores of *P. ultimum* in solution added sugars or nitrogen compounds.

3. 糖および窒素化合物による *P. ultimum* の卵胞子の発芽促進

Kraft and Erwin³⁾ は mung bean の幼苗根から浸出するアミノ酸や糖を報告しているが、そのうちから多量に浸出するアミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン、ヒスチジン、セリン、バリンを、糖としてグルコース、フルクトース、ラクトース、シュクロース、可溶性澱粉を選んだ。また、一般に使用する窒素肥料として硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素を選んで本実験に供試した。これらの物質の 2000 ppm 溶液を pH 5.0~6.0 に調整し卵胞子の発芽を上記の方法により観察した。供試した卵胞子は採取後 9 週間のものである。

供試した有機物は特定のものを除き無機物よりも *P. ultimum* の卵胞子の発芽を促進する (第 2 図)。対照として供試した V 8 ジュースは発芽に最適であるが、アミノ酸はヒスチジンを除いては供試胞子の 50% 以上の発芽が認められ、糖でも可溶性デンプン以外は発芽は良好である。これに比べて無機態のアンモニア化合物は発芽を促進することは少なく、硝酸アンモニウムでも 20% に満たない。このことは、卵胞子の発芽には有機態化合物とくに窒素を含む有機物が有利であると思われる。

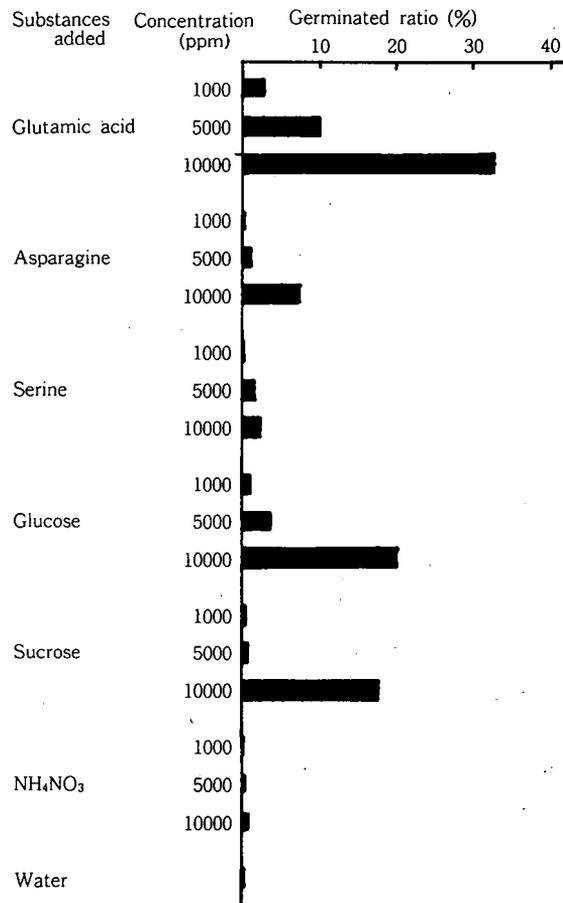


Fig. 3. Germination of oospores of *P. ultimum* in soil added substances with different concentration.

4. 土壌中の *P. ultimum* 卵胞子の発芽

土壌は静菌作用をもち、発芽可能の状態になった *P. ultimum* の卵胞子も休眠を強いられている。この現象は養分の添加により打破されると云われているが、本実験では有機物添加あるいは生活根の存在による卵胞子の発芽について検討した。

(1) 有機物添加 グルタミン酸、アスパラギン、セリン、グルコース、シュクロース、硝酸アンモニウムをそれぞれ 1000, 5000, 10000 ppm の割合で土壌に加え、卵胞子の発芽を観察した。採集後 8 週間を経た卵胞子懸濁液をスライドグラス上に一面に噴霧し、乾いたのち直ちに径 2.5 cm のファンティゲムセルを置き、当研究室所属の圃場より採取し、径 2 mm 以下に篩別した土壌 2.5 ml をつめ、上記物質の溶液を加え、土壌湿度を 60% (v/v) に調整した。このスライドグラスを 25°C に 6 時間静置したのち発芽胞子を検鏡した。すなわち、スライドグラスを取り出して軽く火焰固定し、静水中で土壌粒子を除去したのち、ローズベンガルで菌体を染色して発芽の有無を調査した。この場合、一部の胞子は発芽した菌糸を欠損していたが、胞子内容物の消失の程度から発芽を推測した。

土壌に有機物を加えても低濃度の場合には卵胞子の発芽はあまり促進されず、高濃度の添加により促進が認められる (第 3 図)。グルタミン酸、グルコース、シュクロースは濃度が高くなれば土壌静菌作用の解消、卵胞子の発芽促進に有利に作用するが、アスパラギンやセリンは静菌打破には至らない。硝酸アンモニウムは静菌打破、発芽促進のいずれにも作用しないと思われる。

(2) 生活根浸出物: キュウリ、トマト、ダイコン、ダイズ、インゲン、トウモロコシ、エンバクの根圏土壌による *P. ultimum* の卵胞子の発芽を調査した。上記の畑土壌を入れた 3 号鉢にダイズ、インゲン、トウモロコシは 10 粒ずつ、キュウリ、エンバクは 20 粒ずつ、ダイコン、トマトは 30 粒ずつを播種し、ガラス室内に置き、各作物本葉が 2~3 枚展開した時期に抜き取り、それぞれの根圏土壌を集めて供試土壌とした。卵胞子の発芽は上記の方法によりスライドグラス上に卵胞子を噴霧したのちそれぞれの土壌を盛り、6 時間後の発芽を検鏡により調査した。

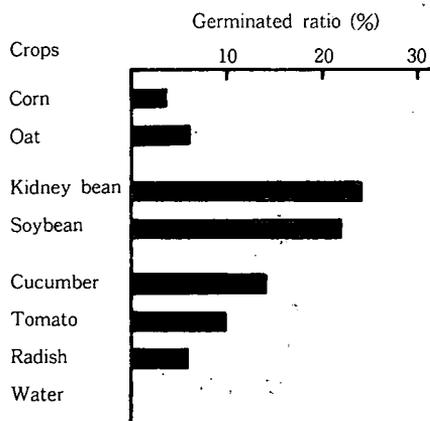


Fig. 4. Germination of oospores of *P. ultimum* in rhizosphere soil of different crops.

各作物の根圏土壌は無栽培土壌に比べて明らかに卵胞子の発芽を促進させるに至る物質を蓄積すると思われる (第 4 図)。しかし、発芽の割合は各作物により異なり、インゲンやダイズは発芽率が高く、次いでキュウリ、トマトで、イネ科作物やダイコンでは効果は低い。但し、この実験では各作物の根量、浸出物の質と量を調査していないので卵胞子の発芽を左右する要因については不詳

である。

5. 土壌中の *P. ultimum* 卵胞子とキュウリ幼苗立枯病の発生

一般に土壌病害の発生は土壌中の病原菌量と関係があると云われている。*P. ultimum* の耐久器官である卵胞子は前述のように自発休眠期間があり、必ずしも菌数だけで病害発生の様相を確認出来ない。本実験は卵胞子の齡と苗立枯病の発生について検討した。

土壌を過湿状態に保つと *Pythium* は遊走子による伝播があり、また菌糸が地表を伸長し作物間の距離が狭く、また抵抗性の弱い苗床では被害が急激に増加するので、本実験では3号鉢に直接灌水せずガラス室内の砂床に埋めて砂床に灌水することにより鉢内の土壌を常時湿度50~60% (v/v) になるよう調整した。前記の通りに採集保存した *P. ultimum* の卵胞子を所定の時期に所定の菌量に2mmに篩別した畑土壌に混ぜ上記の3号鉢に入れた。1週間後に催芽させたキュウリ種子(品種:四葉)を各鉢10粒播種し、1週間後に発病の有無を確認した。キュウリ播種時における卵胞子の齡は採取後1, 2, 3, 5, 7, 9週である。また土壌1g中の卵胞子数は大略1, 10, 100, 500, 1000, 2000とした。供試土壌は蒸気殺菌あるいは無殺菌のまま使用した。キュウリの被害は立枯症状を示すものおよび苗を抜き取り主根の被害のはげしいものを罹病個体とし、百分率で示した。

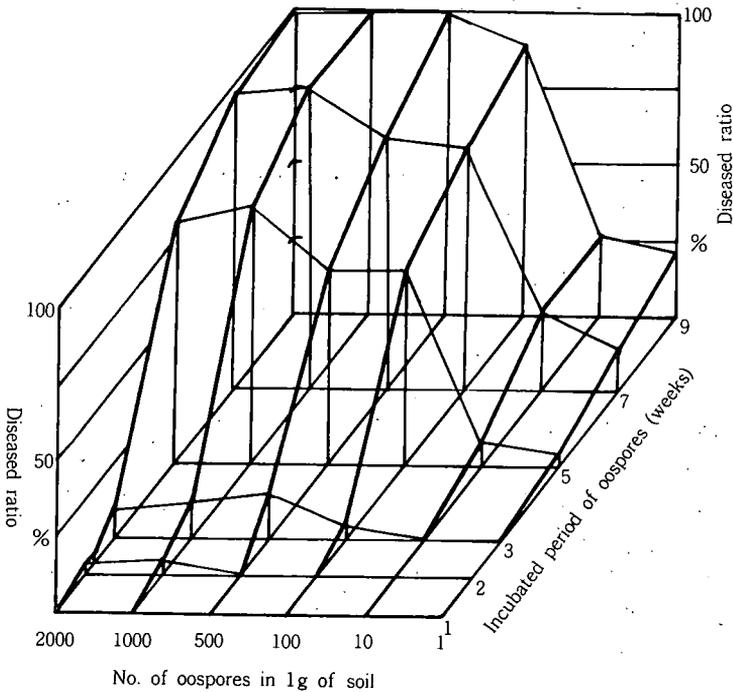


Fig. 5. Diseased ratio of cucumber seedlings by *P. ultimum* related with incubated period and number of oospores in sterilized soil.

第5図は殺菌土壌に接種した卵胞子によるキュウリの苗立枯率、第6図は無殺菌土壌に接種した卵胞子による苗立枯率を示している。殺菌土壌では接種菌量が少なくても5週間齡の卵胞子はキュウリに被害を与え、胞子数が土壌1g当たり100を越えるとその被害は急速に増大する。無殺菌土

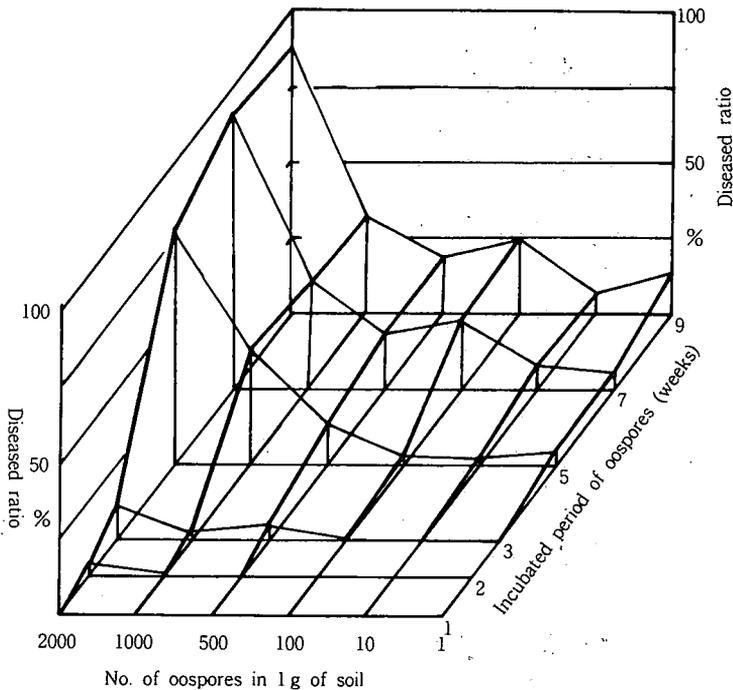


Fig. 6. Diseased ratio of cucumber seedlings by *P. ultimum* related with number and incubated period of oospores in natural soil.

壤では接種孢子数の少ない場合には7週齢の卵孢子により被害を生じるが、孢子数が500を起えると5週齢でも被害が生じる。さらに孢子数が1000を越えると被害発生時期も早く、被害も増大する。土壤の殺菌の有無に係わらず5週齢以後の卵孢子は土壤中での賦活は容易であると推測される。

各孢子数ごとのキュウリ苗立枯病の発生を調査すると、殺菌土壤では土壤1g当り100以上で立枯苗率は50%を越える。5週齢以上の卵孢子は容易にキュウリを侵す活性を保持していると思われる(第7図)。無殺菌土壤では苗立枯率が20%を越えるには土壤1g当り1000の卵孢子が必要である。また、5週齢以上の卵孢子はキュウリを侵すが、キュウリへの到達の遅延あるいは侵害に要する菌量の減少のため、本調査を行なった播種後7日にはキュウリを倒伏させるには至らず、主根の一部あるいは側根の一部を侵すに止まる。この現象は7週齢以上の卵孢子で接種孢子量100, 500, 1000の区に生育したキュウリ苗に多く認められる(第8図)。

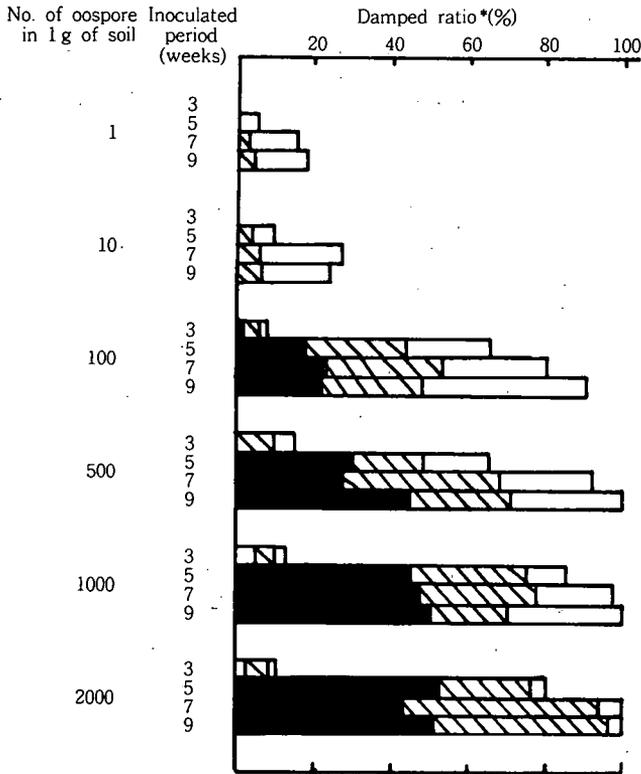


Fig. 7. Degree of damages on diseased cucumber seedlings by *P. ultimum* in sterilized soil at Fig.5
 * ■ Preemergence damping-off, ▨ Post-emergence damping-off, □ main root rot.

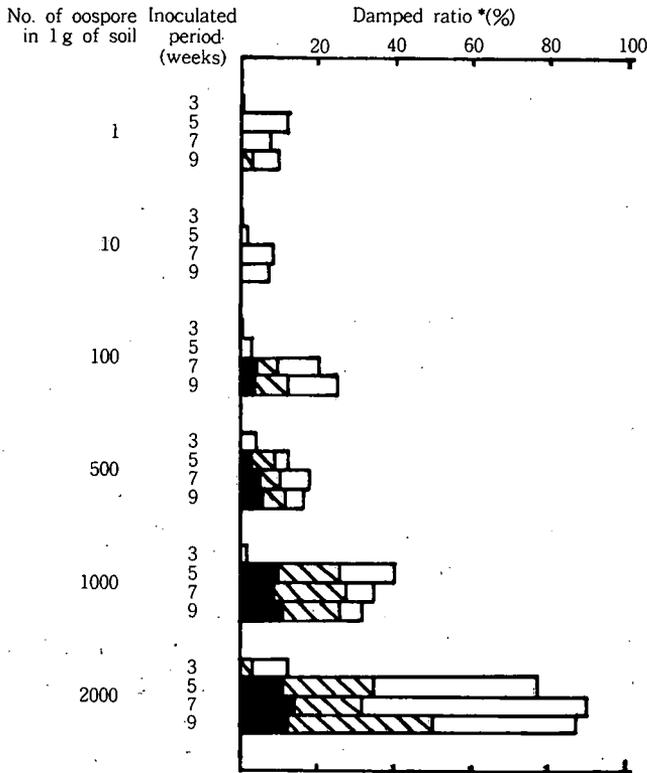


Fig. 8. Degree of damages on diseased cucumber seedlings by *P. ultimum* in natural soil at Fig.6
 * ■ Preemergence damping-off, ▨ Post-emergence damping-off, □ Main root rot.

考 察

P. ultimum は土壤中では分生胞子や遊走子で短期間の生存あるいは移行するが、長期間の生存は卵胞子による。

Stanghellini and Burr⁶⁾ は卵胞子の発芽には養分の添加が必要であると述べているが、厚膜化した卵胞子は養分を与えても発芽しない。Ayers and Lumsden⁴⁾ はその理由として休眠性を挙げている。土壤抽出液中に厚膜化卵胞子をおくと、3週間以降で厚膜は消失し、発芽可能の状態になる。しかし、4ヶ月を経てもなお一部の卵胞子は厚膜が消失せず休眠を継続する。すなわち、種の残存が保障されていると解すべきであろう。蒸留水中に保存した卵胞子は2ヶ月を過ぎてもその多くは休眠残存する。Pythium が長期にわたって生存し、病害の発生が認められること^{5,6,7)} は卵胞子の休眠と発芽の不斉一によると考えられる。

本菌の卵胞子の発芽がV8 ジュースのほか供試したすべての植物根浸出物、有機肥料材料浸出物、特定物質を除く多くのアミノ酸や糖で促進されることは、本菌卵胞子の発芽が寄主植物の特定生産物質と密接な関係をもつとは考えられない(第1, 2図)。

土壤中の微生物の胞子は静菌作用をうけ、発芽を阻止される。その原因は活性微生物の生産する発芽阻害物質と発芽必要養分の奪取である⁸⁾。土壤に本菌卵胞子の発芽促進物質を加えるとグルタミン酸、グルコース、シュクロースは添加量に応じて発芽数が増加する。これら物質は本菌の静菌作用打破に有利に作用する。しかし、アスパラギンやセリン、とくに後者は静菌作用打破に必ずしも有利ではない。この物質自体は本菌の活性を助長するが、土壤微生物相内では本菌よりもむしろ他の微生物に有利に利用されると思われる。無機態窒素はそれのみでは本菌の発芽も助長しないし、静菌作用打破にも関与しない(第2, 3図)。植物根の浸出物は卵胞子の発芽を助長するが、浸出物を含む根圏土壤中では必ずしも卵胞子の発芽は促進されず、マメ科植物の根圏では有利であるが、イネ科植物やダイコンでは発芽率は低い。各作物根圏に構成される微生物相の差異、各作物の根量と物質生産の差異など検討すべき点は多い(第1, 4図)。

Baker and Cook⁹⁾ は土壤生息病原菌による作物の被害は土壤中の菌量に左右され、発芽した耐久態が2次胞子を形成する場合には発病に要する菌量は少ないと述べた。宇井¹⁰⁾ は土壤病に関する報告を総説して *P. ultimum* の発病菌量は土壤1g当り100~350とした。実験5において土壤湿度を60% (v/v) 以下とすると、卵胞子が発芽して分生胞子のうを形成しても土壤湿度の関係上遊走子を形成することは困難であると推測される。本菌の卵胞子は土壤抽出液あるいは土壤中で5週間も経過すると多くは発芽可能になり、キュウリ苗の存在は発芽を促がし、その結果キュウリは罹病する。殺菌土壤中では土壤1g当り100胞子を越えると発病率は急激に増加する。無殺菌土壤中では1000胞子を越えないと発病率は増加しない。Pythium による病害の発生の場合には土壤中の菌量とともに休眠覚醒の有無に留意する必要がある(第1表, 第5, 6図)。

土壤病の発生と土壤中の病原菌量との間には連続的相関はなく、むしろ非連続的に段階的な被害の増加が認められることを小倉ら¹¹⁾ は報告した。この関係は本実験でも認められ、被害を苗立枯率に限定すると土壤殺菌の有無に関らず顕著に示される。殺菌土壤では苗立枯病は孢子数1~10, 100, 500~1000, 2000の3群に分けられる。発芽前立枯病は1~10, 100~500, 1000~2000の3群に分けられる。但し、卵胞子の齢によりこの発病段階は多少前後するのは休眠型厚膜卵胞子の存在によると考えられる。無殺菌土壤の場合にも卵胞子数1~10, 100~500, 1000~2000に大別されるが、一部の区分が前後にずれるのは休眠型卵胞子の存在によると考えるのが妥当であろう(第5, 6, 7, 8図)。

P. ultimum による病害の発生はまず耐久型の卵胞子による第一次伝染から始まると考えられ、

次いで菌糸の伸展による隣接域への伝染と遊走子による伝染とが加わって急激に被害が増大するものと推察される。

要 約

Pythium ultimum に起因する病害の初期発生は長期の残存に耐える卵胞子によると思われる。本報告は卵胞子の発芽とそれに続くキュウリ苗立枯病の発生について検討した。

P. ultimum の卵胞子は土壤溶液中では発芽しないが、この溶液中に浸漬すると胞子は次第に薄膜化し4週間後には自発休眠から発芽可能な状態になる。5週間後には半数近くが発芽可能であるが静菌作用による発芽抑制をうける。新たに養分が供給されるとこの卵胞子は数時間で発芽する。蒸留水中では卵胞子の厚膜は崩壊せず、9週間を経てもなお発芽可能胞子は1/3にも満たない。しかし、発芽好適条件下でも若干の卵胞子は厚膜のまま存在し、自発休眠の打破は不斉一であり、これが本菌の病害発生が長期にわたり起る一因になると思われる。

卵胞子の発芽は生活根生産物や糖、アミノ酸を必要とし、特定有機物あるいは特定作物生産物を必要としないが、無機態窒素化合物は効果がない。しかし、作物の種類により根圏効果は異なり、発芽に難易が認められる。

キュウリ苗立枯病は土壤中の卵胞子数および休眠覚醒の時期と関連があり、本菌自体は土壤1gあたり5週間の休眠ののち100胞子を境にして急激に被害を起こす活性をもつ。しかし、自然土壤中では微生物環境により1000胞子以上で発病は激しくなり、発病に要する胞子齢もおそくなる。発病は菌密度とは連続的に比例せず、非連続的に段階状に生じる。

以上の結果から、*P. ultimum* の卵胞子は土壤中では休眠覚醒ののち、作物根の浸出物の影響をうけて発芽し、作物根を侵すが、胞子齢により侵害時期はおくれ、卵胞子の存在が即発病要因とはならない。

文 献

- 1) Hendrix, F. F. and Campbell, W. A. Ann. Rev. Phytopath. 11: 77-98 (1973)
- 2) Stanghellini, M. E. and Burr, T. J. Phytopathology 63: 1493-1497 (1973)
- 3) Kraft, J. M. and Erwin, D. C. Ibid 57: 866-868 (1967)
- 4) Ayers, W. A. and Lumsden, R. D. Ibid 67: 1094-1100 (1977)
- 5) Munnecke, D. E. and Moore, B. J. Ibid 59: 1517-1520 (1969)
- 6) Stanghellini, M. E. and Russell, J. D. Ibid 61: 1324 (1971)
- 7) Lumsden, R. D., Ayers, W. A., Adams, P. B., Dow, R. L., Lewis, J. A., Papavizas, G. C. and Kantzes, J. G. Ibid 66: 1203-1209 (1976)
- 8) Lockwood, J. L. Biology and control of soil borne plant pathogens. 194-202 ed. Bruehl, G. W. Am. Phytopath. Soc. St Paul, U. S. A (1975)
- 9) Baker K. F. and Cook, R. J. Biological control of plant pathogens. 433 Freeman Co. LosAngels, U. S. A. (1974)
- 10) 宇井格生. 土の微生物 201-262 土壤微生物研究会編 博友社, 東京 (1981)
- 11) 小倉寛典・森本徳右衛門・池田弘, 高知大学研報18: 67-75 (1969)

(昭和59年9月29日受理)

(昭和60年1月28日発行)

