

ばれいしょのファイトアレキシンの抽出法について

誌名	北海道農業試験場研究報告 = Research bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station
ISSN	03675955
著者	佐藤, 章夫 松永, 旭 富山, 宏平 勝井, 信勝 正宗, 直
巻/号	113号
掲載ページ	p. 127-136
発行年月	1976年3月

ばれいしょのファイトアレキシンの抽出法について

佐藤章夫* 松永 旭** 富山宏平***
勝井信勝** 正宗 直**

Notes on the Extraction Method of Phytoalexins from Diseased Potato Tissues

Norio SATO, Akira MATSUNAGA, Kohei TOMIYAMA
Nobukatsu KATSUI, and Tadashi MASAMUNE

1. 緒 言

菌類の感染を受けた植物がその菌類に対して抵抗反応を示す際には、感染部に種々の抗菌性物質が生成、集積される。このうち、健全組織には存在せず、抵抗反応に伴って新たに生成される抗菌性物質を、MÜLLER ET AL.¹⁾はファイトアレキシンと名付けた。その後、多くの植物でファイトアレキシンの存在が明らかにされ、化学構造が決定された。ファイトアレキシンは宿主組織中の菌糸生長の抑制、阻止に重要な役割を果たしているものと考えられ^{2)9)20)~25)}、植物の病害抵抗性の機作の解明のために、その研究の進展が望まれている。しかし、種々の研究に必要な十分な量のファイトアレキシンを抽出分離することは、罹病組織中での含有量が少ないので、通常、極めて困難であり、研究の重要な隘路となっているが、これを打開するための大量抽出に関する研究報告は少ない。

著者らは先に、ばれいしょのファイトアレキシンの主成分を初めて分離してリシチンと命名し²⁶⁾、化学構造を明らかにした²⁷⁾。更に、最近、リシチンよりも含有量の著しく少ない数種のリシチン関連化合物を分離し、構造決定した²⁷⁾。一連の研究において、これらの化合物の大量抽出は研究の成否を左右する極めて重要な過程であり、方法の適否は化合物の収率に著しい影響を及ぼすところから、遂次、その改良に努めてきた。ここにこれらの経験を取りまとめ、ばれいしょのファイトアレキシンの大量抽出に当って有益と思われる基礎的知見、及び大量抽出の具体例について報告する。

本稿を草するに当り、北海道農業試験場病害第1研究室長柳田駿策氏をはじめ、各位の御指導御協力に対し、又、ばれいしょ品種の提供を賜わり、且つそれらの性質について有益な知見の御教示を頂いた畑作物第2研究室梅村芳樹技官に対し、深甚な感謝の意を表する。

2. 材料並びに方法

疫病抵抗性遺伝子を持つばれいしょの塊茎を薄層スライスとし、切断面に非親和性疫病菌を接種して、その病斑部に生成するファイトアレキシンを抽出した。

* 病理昆虫部 病害第1研究室

** 北海道大学理学部

*** 名古屋大学農学部

ばれいしょは、主として札幌市羊ヶ丘北海道農業試験場ほ場で生産された、疫病抵抗性遺伝子 R_1 を持ち、強いほ場抵抗性を示す品種「リシリ」の塊茎を用いた。

ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) は当场病害第1研究室保存のレース O の菌株を用い、罹病性品種「男爵薯」の塊茎スライスに培養して得た孢子から遊走子県濁液を調製し、接種源とした。

ファイトアレキシンの抽出には一連の有機溶剤を用い、精製にはシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Mallinckrodt, 100 メッシュ) とシリカゲル薄層クロマトグラフィー (和光純薬, B-5) を並用した。

3. 結 果

リシチンは、菌の侵入を受けて壊死した細胞の周辺健全細胞で生成され¹²⁾、その大部分は褐変物質と共に壊死細胞に集積され、褐変細胞から数細胞離れた健全細胞では、ほとんど検出されない程著しく局在している¹⁷⁾。リシチン関連化合物も恐らく同様の傾向を有するものと思われる。従って、可能な限り薄い塊茎スライスに、出来るだけ濃厚な接種をすることにより、ファイトアレキシン含有量の多い、抽出の容易な材料を得ることが出来る。以下に、その問題点を記す。

1) 疫病菌の培養

ジャガイモ疫病菌は種々の寒天培地上でも培養できるが、大量の孢子の採取には、生の塊茎スライスに培養するのが、極めて簡便であり優れている。培養には罹病性で、出来るだけ弱い品種を用い、掘取後数カ月以上貯蔵した塊茎を使うと良い。掘取後日の浅い塊茎のスライスでは、接種後数日して孢子形成を始めるころから、組織の褐変が起り、孢子形成が著しく阻害されることがある。又、塊茎スライスに疫病菌を接種する際には、その孢子濃度について十分注意する必要がある。スライスに多量の孢子を接種すると、組織中の菌糸密度が急速に高まり、スライスのバクテリアに対する抵抗力が失われ、急速に病敗し、孢子を採取できなくなる。希薄な接種を行い、20°C 以下で培養すると、バクテリアに対する抵抗力を比較的長く保持する。厚さ約 7 mm の塊茎スライスに 1 個の孢子が感染すると、接種の 4 日後にはわずかに孢子形成が始まり、6 日後には直径約 1.5 cm のコロニーを生じ、スライスの両面に多量の孢子を形成する。1 スライス当り 5-10 個のコロニーを生ずる程度の希薄な接種を行うと、腐敗するスライスは極めて少なく、多量の孢子を採取することが出来る。7 日後には、バクテリアにより腐敗し始め、孢子採取には不適當になる。

2) 孢子の間接発芽

孢子は間接発芽によって遊走子を生ずる。その適温は約 13°C で、20°C 以上では少なく、24°C では極めてまれである³⁾。間接発芽率とその速度は種々の要因によって変動しやすく、しばしばその低下によって必要とする濃度の遊走子県濁液を得ることに失敗する。孢子を採取し、そのままの県濁液を用いたり、孢子濃度が濃過ぎる場合は、間接発芽率は低下する。しかし、遠心分離して汚れを除き、適度の濃度に再び県濁しても、なおかつ、間接発芽率とその速度に著しい変動が見られる。その原因については、最近、佐藤によって次のようなことが明らかにされた¹⁸⁾。孢子はその発芽性質によって 3 型に分けられる。第 1 に、担子柄上に形成されてから時間が浅く、間接発芽能力を獲得していない孢子で、冷水中でも速やかに間接発芽できないもの、第 2 に、形成後ある時間が経過し、間接発芽能力を獲得した孢子で、冷水中ですぐに間接発芽を開始するもの。第 3 に、間接発芽できない条件下に長時間経過し、間接発芽能力

を失った胞子で、冷水中でも遊走子を生ずることはできないものの3型である。胞子県濁液はこれら3型の胞子の混合より成り、その比率は種々の要因によって変動するので、間接発芽率とその速度も変動する。温度は間接発芽能力獲得過程に影響を及ぼす主要な要因の一つと考えられる。疫病菌を18-20°Cで培養すると、間接発芽能力獲得胞子を高率に含む胞子が得られ、この温度より高くても低くてもその比率は急減する。又、間接発芽能力を獲得していない胞子は、県濁液とした後、水中でその能力を獲得するが、ここでも水温が影響し、18°Cが最適で、14-20°Cでは早く、それ以上及びそれ以下の温度では遅く、26°C以上では阻害される。

以上のような知見に基づき、発芽の整一な遊走子県濁液を得るには、胞子県濁液を不発芽温度の22°Cに1夜放置し、ほとんどの胞子が間接発芽能力を獲得するのを待ち、その後低温に移すと、胞子は一整に間接発芽して遊走子を生ずる。しかし、大量の液を逐次変温処理するのは作業的に繁雑になるので、便法として、胞子県濁液を24°Cで調整し、約4°Cの冷室に1夜放置してもよい。液温は徐々に低下し、間接発芽能力獲得及び間接発芽が徐々に進行し、翌朝までにはほとんどの胞子が遊走子を生じている。4°Cでは生じた遊走子は長時間泳ぎ続けることが出来、早くに生じて被のう化しても発芽管は短く、十分感染力を保持している。従って、この方法で多量の良好な接種源が得られる。

3) 抵抗性の強さとリシチン生成の関係

疫病菌の感染を受けた塊茎切断面組織の抵抗反応の強弱は種々の要因によって変動するが、接種濃度が一定であれば、用いる品種の強弱、切断面の空気にふれている時間の長短、スライスの厚薄の3つが主要な変動要因であり、これらの組合せによって様々な抵抗反応が現われ、それに対応して様々なリシチン生成の経過が見られる。まず品種について見ると、典型的な強、中、弱の抵抗性を示す品種を用い、切断後1時間以内に濃厚感染を受けた切断面組織の抵抗反応とリシチン生成の時間経過の関係を模式的に述べると次のようになる (Fig. 1)。強抵抗性品種「リシリ」では、リシチン生成は、接種後20時間目ごろに始まり、急増する。菌糸は1-3細胞を侵しただけで生長を阻止され、その後リシチンの増加は緩やかになり、停止し、やがて減少する。中程度の抵抗性品種「Sb 458/52」では、菌糸は侵入後しばらくの間、ほとんど抵抗を受けずに組織中を伸長する。数細胞を侵された後、宿主組織の抵抗反応が始まり、リシチンは急増するが、菌糸の勢力も強くなっているため、病斑の進展が停止するのはかなり遅れる。弱抵抗性品種「チエロキー」では、菌糸は組織中を自由に伸長し、リシチン生成は極めて少なく、切断面は腐敗する。中及び弱抵抗性品種の抵抗反応は不安定で、中程度の抵抗性品種でも時には抵抗反応が遅れ腐敗することがある。このような場合、リシチン生成は極めて少ない。又、弱抵抗性品種で、抵抗のきっかけをつかみ中程度の抵抗性を示すこともある。この

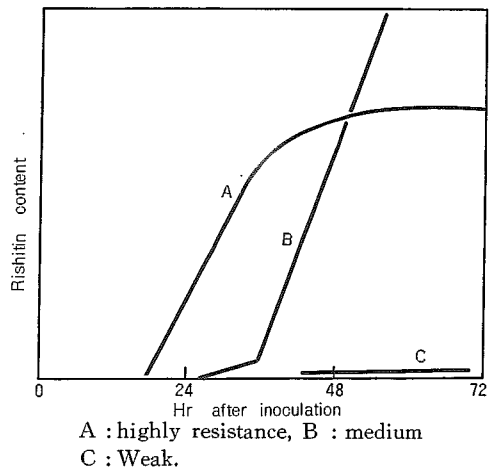


Fig. 1. Diagrammatic representation of the relation among time courses of reshitin accumulation and different grades of resistance of potato tissues against the invasion of hyphae of phytophthora infestans

ような場合、リシチンは多量に生成される。このようにリシチン生成は抵抗反応と密接な関連を有するので、抽出材料の調製には、出来るだけ強抵抗性を示す薄層スライスを用いることが肝要である。

4) 薄層スライスの抵抗性の変動

宿主組織抵抗反応を発現するには、被侵入細胞に隣接して、十分な数の健全細胞が存在することが必須の条件である。塊茎をスライスとして疫病菌を接種すると、その厚さが薄くなる程抵抗性が弱くなり、強抵抗性品種の「リシリ」でも、0.5 mm 以下の厚さではほとんど抵抗性を失う⁸⁾¹⁴⁾。

又、切断面は一般に、切断直後には抵抗性が弱く、空気にふれる時間が長くなると著しく抵抗性を増す²¹⁾。弱抵抗性品種の切断面を 24 時間空気にさらした後接種すると、中程度以上の抵抗性を示し、中程度の抵抗性品種の切断面を同様に処理すると強抵抗性を示し、強抵抗性の品種の切断面は同様の処理で、より一層強い抵抗反応を示すようになる。

以上のような知見に基づき、薄層スライスの調製を次のように行ったところ良好な結果が得られた。弱抵抗性品種では、スライスの厚さを約 2 mm とし、1 夜放置後片面接種を行い、中程度の抵抗性の品種では、同様の処理で両面接種を行い、強抵抗性品種では、厚さ約 1.5 mm のスライスとし、1 夜または数時間放置後両面接種を行った。

5) 接種菌量とインキュベーションの時間

強い抵抗性を持つ塊茎の薄層スライスに疫病菌を接種した場合、1 個の遊走子から生じた菌糸の侵す細胞は少数に止まるので、接種には 3×10^5 個/ml 程度の濃厚な遊走子濁液を用い、十分接種する必要がある。又、接種後のインキュベーションの時間は Fig. 1 に示すように、ファイトアレキシンの生成量に大きな関係がある。スライスの抵抗性と接種条件によって異なるが、「リシリ」の薄層スライスではリシチン生成は接種後 20 時間目ごろから始まり、次第に増加する。4 日以上置くのは腐敗の危険があるので、リシチンを抽出の主な対象にする場合は、3 日間インキュベーションした。又、関連化合物についての最適インキュベーション時間については不明であるが、一応 2 日程度と考え材料を調製した。

6) 抽出と分離の方法

リシチンは比較的安定な化合物で、褐変スライスを通風乾燥して、粉末にした材料からでも抽出されるが、ルビミン等の不安定なファイトアレキシンや中間代謝産物等の未知の化合物を抽出する際には、もっと穏やかな方法をとる必要がある。初め生の褐変スライスのみキサーにかけ、メタノールで抽出していたが、この方法は、糖類等の不要な物質が多量に溶け出し、後の分離精製を困難にした。その後、パーコレーターに褐変スライスとメタノールを入れ、組織を摩砕せずにファイトアレキシンを十分に抽出できることがわかり、この方法に切り変えた。メタノール抽出液は多量の水を含んでおり、ロータリーエバポレーターでは、濃縮に比較的高い温度と長時間を要し、不安定な化合物では収量が落ちた。これに対して、フィルムエバポレーターを用いると、比較的低温 (25-30°C) で、しかも極めて早く濃縮出来るので、不安定な化合物でも収量よく得ることが出来た。

7) 大量抽出の具体例

以上の成績や経験を基にして行った大量抽出の具体例を示すと次の通りである (Fig. 2)。

遊走子濁液の調製 15 kg の「男爵薯」を厚さ約 7 mm のスライスに切り、水洗する。水で濡らし、古新聞を敷き、細いガラス棒を並べた木製の接種箱 (40×30×6 cm) にスライスを

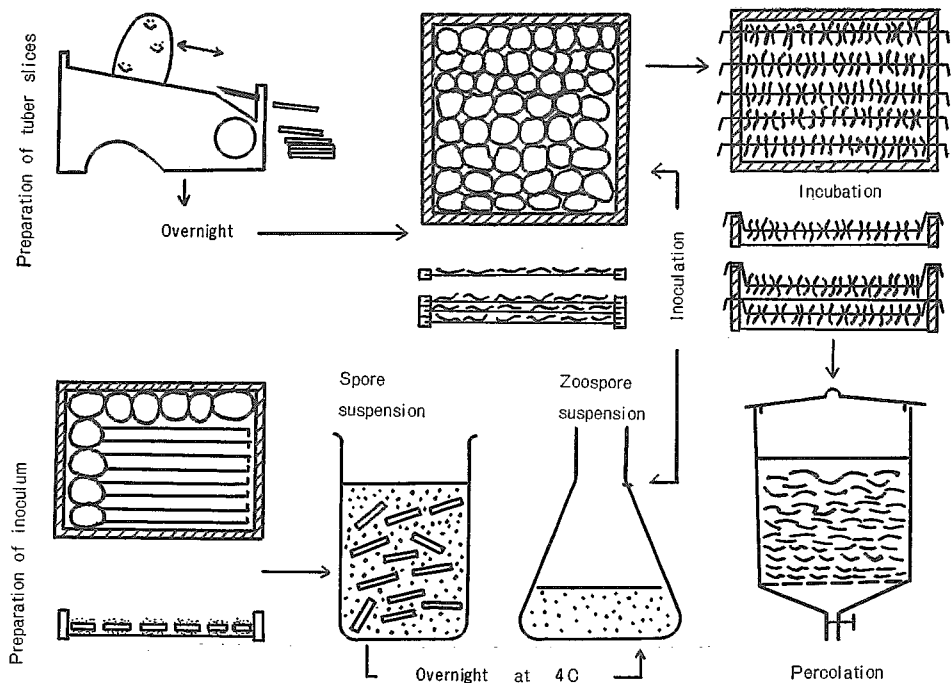


Fig. 2. Preparation of potato-tuber slices and extraction of phytoalexins and related compounds

並べ、疫病菌の希薄な孢子浮遊液を噴霧接種する。その濃度は顕微鏡（ $\times 150$ ）の視野の中で1個より少なめとする。接種した箱は積重ね、ビニールシートで覆って、 $18-20^{\circ}\text{C}$ で6日間培養する。孢子を形成したスライスを 24°C の水に投入して、攪拌して孢子を落とし、ガービでろ過し、遠心分離（ 1000 rpm 、1分）して汚れた水を捨て、底に沈んだ3箱分の孢子をもつて 1.5 l の 24°C の水に県濁する。15箱分のスライスから約 7.5 l の孢子県濁液を得た。これを約 4°C の冷室に一夜放置し、翌朝、濃厚な遊走子県濁液を得た。なお、孢子を汚れた水の中に長時間放置したり、遠洗管の底にペレット状のまま放置することは発芽に悪影響を及ぼすので、孢子県濁液の調整は手早く行う必要がある。

塊茎薄層スライスの調製 品種「リシリ」の 50 kg の塊茎を料理用スライサーを用いて厚さ約 1.5 mm の薄層スライスとする。1-2時間スライスを水洗し、水浸しておく、スライスは湾曲する。これをプラスチック製の大型の籠に移し、ビニールシートで覆って乾燥を防ぎ、1夜または数時間放置後、接種に供した。

接種とインキュベーション 50 枚の薄い網枠（モール枠に防虫網を張ったもの、 $40\times 40\text{ cm}$ ）を用い、これにスライスを並べ、ガラス製噴霧器と小型のエアコンプレッサーを用いて遊走子県濁液を噴霧接種した。片面の接種が終わったら網枠ごと反転し、反対面にも接種した。接種を終えたスライスを長さ約 50 cm の細い針金に重ねて刺し通し、水で濡らした木枠（ $40\times 30\times 6\text{ cm}$ ）にそれぞれ4-5本ずつ掛けて積重ね、ビニールシートで覆って、 $18-20^{\circ}\text{C}$ に保った。24時間後には淡く褐変し始め、48時間後には濃い褐変スライスとなった。これを取り出し、直ちに -30°C で貯蔵した。なお、スライスどうしが密着していると、呼吸が阻害され、抵抗力を失って腐敗するので、スライスは出来るだけ湾曲させ、針金に刺し通す際には過密にならない

よう注意する。

抽出と分離 上記の作業工程を反復して得られた、凍結した 338 kg の褐変スライスを、大型のパーコレーターに入れて、メタノールで1週間ずつ3回抽出した。合計 550 l のメタノール抽出液をフィルムエバポレーター (25-30°C, 30-60 mmHg) で、約 24 時間で濃縮し、水分の多い 200 l の残液を、クロロホルムと 1:1 で振り、クロロホルム層にファイトアレキシンを移した。この際に生ずるエマルジョンは 800 rpm, 10 分の遠心分離で除いた。クロロホルム抽出液を 20-25°C でロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、得られた油状物質を 1.2 l のアセトンに溶かし、沈澱をろ過して除いたあと、濃縮した。次に、その残渣を 1.2 l のヘキサン

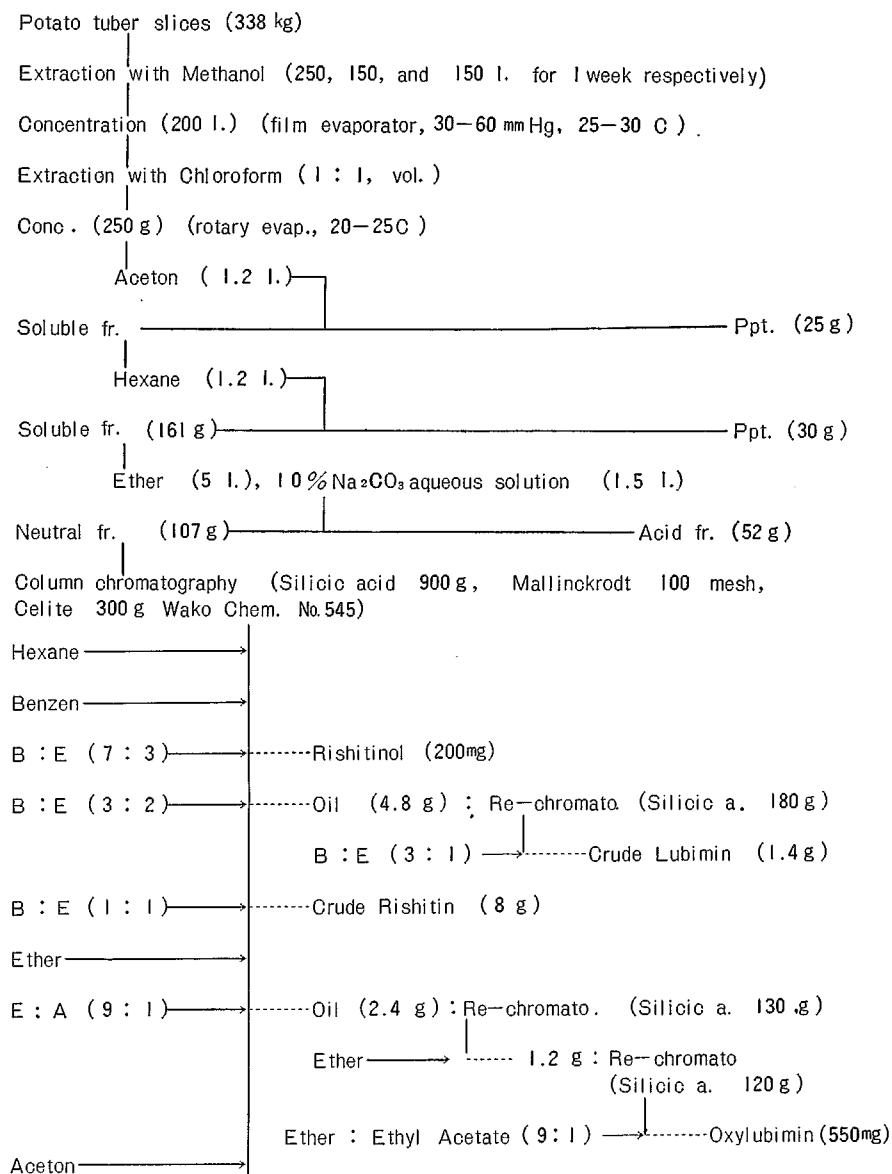
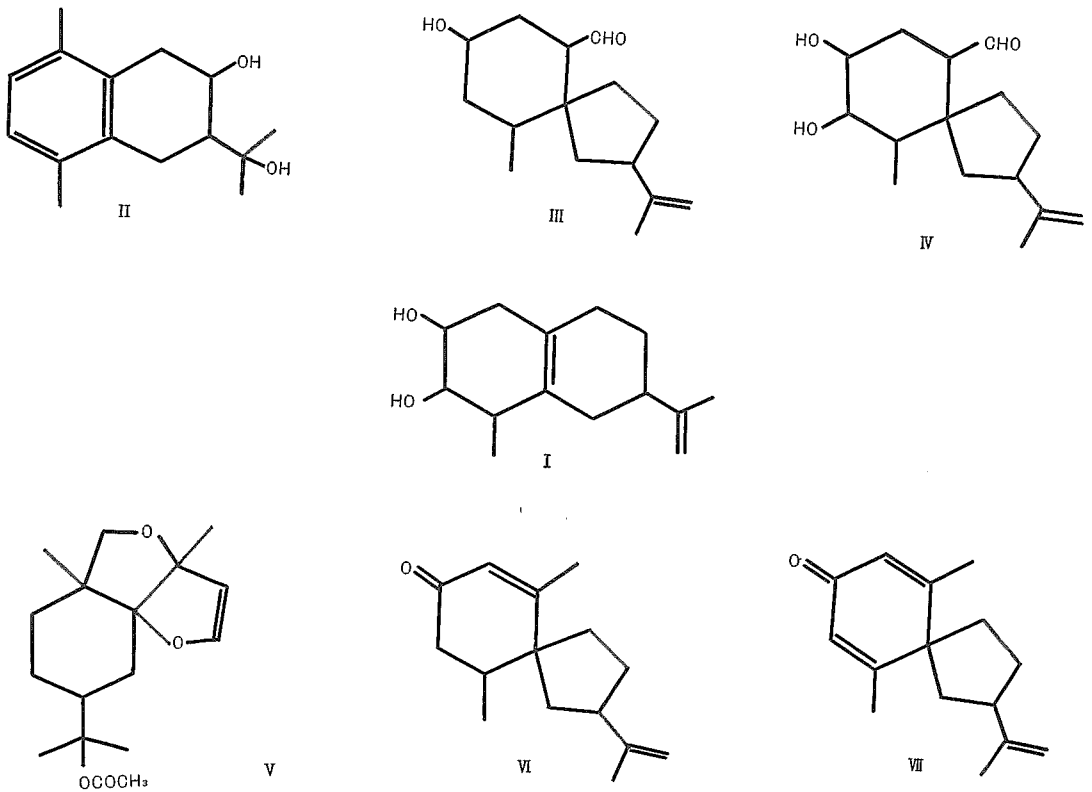


Fig. 3. Extraction and isolation of phytoalexins and related compounds

に溶かして不溶部を除いた後、再び濃縮し、161 g の油状物質を得た。これを 5 l のエーテルに溶かし、1.5 l の 10%炭酸ソーダ水溶液と振り、酸性部分を除去したあと濃縮し、107 g の中性物質を得た。これをシリカゲルクロマトグラフィーで分画し、粗リシチン 8 g, 粗リシチノール 200 mg, 粗ルビミン 1.4 g, 粗オキシルビミン 550 mg 等のセスキテルペン化合物を得た (Fig. 3)。

4. 論 議

MÜLLER ET AL¹¹⁾によりファイトアレキシンの説が提唱されてから、多くの植物でファイトアレキシンの存在が確認され、化学構造が決定されてきた。又、その代謝過程についても研究が行われている¹²⁾¹³⁾。これらの研究上の主要なあい路は、実験に必要な多量の純品を入手することが極めて困難なことである。著者らは、一連のばれいしょのファイトアレキシンの研究の過程で、大量抽出の方法に逐次改良を行ってきた。その結果、含有率 1 ppm 程度の化合物まで比較的容易に得ることが出来るようになった。但し、この方法には、疫病菌の取扱いに慣れるのに経験を必要とすること、その培養に 18-20°C の比較的大きな空間を必要とすること、ジャガイモの一般栽培品種に強抵抗性のもが無く、原料薯の入手が困難なこと等の制約がある。これらの制約を除去し、どこでも容易に大量抽出が出来るようにするには、今後、疫病菌を使わないでファイトアレキシンを誘起する方法の開発が望まれる。幸い、ばれいしょは、疫



I: rishitin, II: rishitinol, III: lubimin, IV: oxylubimin, V: phytuberin, VI: solavetivone, VII: solavetivenone

Fig. 4. Phytoalexines and related compounds of potato

病抵抗性の有無に関係なく、ファイトアレキシン生成能力を持っているので¹⁶⁾、菌体摩砕汁や化学薬品処理等によって、疫病菌と同じ位ファイトアレキシン生成を誘起することは可能なものと考えられる。

上述の大量抽出法によって、著者等は、ばれいしょのファイトアレキシン及びその関連化合物を多量に入手し、主成分のリシチンの他に、リシチノール⁶⁾、ルビミン⁷⁾、オキシルビミン⁷⁾の化学構造を決定した。この他、関連化合物として、フィチュベリン⁴⁾、ソラベチボン¹⁾ソラベチベノン¹⁾が知られている (Fig. 4)。これら各成分の生成の比率等に関する詳細な研究はほとんど無いが、品種と方法の違いによって、各成分に著し変動が見られる。著者らの用いた品種「リシリ」の褐変スライスでは、リシチンが主成分であり、ルビミンはその5-10分の1程度分離され、フィチュベリンは分離されない。これに対し、VARNS ET AL²⁶⁾は「ケネベック」、「チエロキヤ」等の品種を用いて、比較的少量のフィチュベリンを検出している。又、METLITSKIKH ET AL¹⁰⁾は塊茎切断面を凹型にくり抜き、遊走子県濁液を満たして、その液中に浸出するファイトアレキシンを抽出する方法により、リシチンと同等か、それ以上のルビミンを検出している。更に、リシチンがトマト¹⁵⁾にも見出され、ルビミンがナスとヨウシュチョウセンアサガオにも見出され²⁰⁾、トウガラシのファイトアレキシンのカプシドール¹⁹⁾がリシチンの近縁化合物であること等、近縁植物間で類似のファイトアレキシンが生成されることも興味深い現象である。これら一連の化合物とその代謝が次第に明らかにされることにより、植物の病害抵抗性の機作が、漸次、物質レベルで解明されていくものと考えられる。

5. 摘 要

- 1) ジャガイモ疫病菌を大量に培養し、胞子を採取し、遊走子県濁液を調製する際に必要な種々の知見について述べた。
- 2) 濃厚な接種に耐えて強い抵抗反応を示し、多量のファイトアレキシンを生成する塊茎薄層スライスの調製法を示した。
- 3) 大量抽出のための材料調製及び抽出精製の具体例を示した。
- 4) 大量抽出により、リシチノール、ルビミン、オキシルビミン等の微量成分の構造決定が可能になった。

引 用 文 献

- 1) COXON, D. T., PRICE, K. R., HOWARD, B., OSMAN, S. F., KALAN, E. B. and ZACHARIUS, R. M. (1974): Two new vetispirane derivatives: Stress metabolites from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Tetrahedron Letters* 34, 2921-2924.
- 2) CROSIER, W. (1934): Studies in the Biology of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Memoir, 155, 1-40.
- 3) CRUICKSHANK, I. A. M. (1963): Phytoalexins. *Annual Review of Phytopathology* 1, 351-374.
- 4) HUGES, D. L. and COXON, D. T. (1974): Phytuberin; Revised structure from the X-ray crystal analysis of Dihydrophytuberin. *Chemical Communications* 1974, 822-823.
- 5) KATSUI, N., MURAI, A., TAKASUGI, M., IMAIZUMI, K., MASAMUNE, T. and TOMIYAMA, K. (1968): The structure of Rishitin, a new antifungal compound from diseased potato tubers. *ibid.* 1968, 43-44.
- 6) KATSUI, N., MATSUNAGA, A., IMAIZUMI, K., MASAMUNE, T. and TOMIYAMA, K. (1971): The

- structure and synthesis of Rishitinol, a new sesquiterpene alcohol from diseased potato tubers. *Tetrahedron Letters* 2, 83-86.
- 7) KATSUI, N., MATSUNAGA, A. and MASAMUNE, T. (1974): The structure of Lubimin and Oxylubimin, antifungal metabolites from diseased potato tubers. *Tetrahebron Letters* 51/52, 4483-4486.
 - 8) KITAZAWA, K. and TOMIYAMA, K. (1973): Role of underlying healthy tissue in the hypersensitive death of a potato plant cell infected by an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 39, 85-89.
 - 9) KUC, J. (1972): Phytoalexins. *Ann. Rev. Phytopath.* 10, 207-232.
 - 10) METLITSKII, L. V., OZERETSKOVSKAYA, O. V., VULFSON, N. S. and CHALOVA, L. I. (1971): Effect of Lubimin on potato resistance to *Phytophthora infestans*. and its chemical identification. *Mikol. Fitopatol topatol.* 5, 439-440.
 - 11) MÜLLER, K. O. and BÖRGER, H. (1940): Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanstalt. Land-u. Forstwirtschaft., Berlin*, 23, 189-231.
 - 12) NAKAJIMA, T., TOMIYAMA, K. and KINUKAWA, M. (1975): Distribution of rishitin and lubimin in potato-tuber tissue infected by an incompatible race of *Phytophthora infestans* and the site where rishitin is synthesized. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 41, 49-55.
 - 13) OGUNI, I. and URITANI, I. (1971): Participation of Farnesol in the biosynthesis of Ipomeamarone. *Plant and Cell Physiology* 12, 507-515.
 - 14) SAKUMA, T. and TOMIYAKA, K. (1967): The role of phenolic compounds in the resistance of potato tuber tissue to infection by *Phytophthora infestans*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 33, 48-58.
 - 15) SATO, N., TOMIYAMA, K., KATSUI, N. and MASAMUNE, T. (1968): Isolation of Rishitin from Tomato Plants. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 34, 344-345.
 - 16) SATO, N., TOMIYAMA, K., KATSUI, N. and MASAMUNE, T. (1968): Isolation of Rishitin from tubers of interspecific potato varieties containing different late-blight resistance genes. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 34, 140-142.
 - 17) SATO, N. and TOMIYAMA, K. (1969): Localized accumulation of Rishitin in the potato tuber tissue infected by an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *ibid.* 35, 202-207.
 - 18) 佐藤章夫 (1975): ジャガイモ疫病菌遊走子のうの発芽性質に関する研究, I, 遊走子のうの成熟について (講演要旨), *日植病報*, 41, 127.
 - 19) STOESSL, A., UNWIN, C. H. and WARD, E. W. B. (1972): Postinfectious inhibitors from plants. I. Capsidol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. *Phytopath. Z.*, 74, 141-152.
 - 20) STOESSL, A., STOTHERS, J. B. and WARD, E. W. B. (1974): Lubimin: A phytoalexin of several Solanaceae, Structure revision and biogenetic relationships. *Chemical Communications* 1974, 709-710.
 - 21) TOMIYAMA, K. (1960): Some factors affecting the death of hypersensitive potato plant cells infected by *Phytophthora infestans*. *Phytopath. Z.*, 39, 134-148.
 - 22) TOMIYAMA, K., SAKUMA, T., ISHIZAKA, N., SATO, N., KATSU, N., TAKASUGI, M. and MASAMUNE, T. (1968): A new antifungal substance isolated from resistant potato tuber tissue infected by pathogens. *Phytopathology*, 58, 115-116.
 - 23) 富山宏平 (1970): ファイトアレキシン, 植物の化学調節, 5, 105-115.
 - 24) 富山宏平 (1974): 感染植物における過敏反応の生化学, *化学と生物*, 12, 778-782.
 - 25) 富山宏平 (1974): 作物の耐病性機構—ジャガイモ疫病を中心として—, *植物防疫*, 28, 3-8.
 - 26) VARNIS, J. L., KUĆ, J. and WILLIAMS, E. B. (1971): Terpenoid accumulation as a biological response of the potato tuber to *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 61, 174-177.

Summary

Notes on the Extraction Method of Phytoalexins from Diseased Potato Tissues

Norio SATO, Akira MATSUNAGA, Kohei TOMIYAMA
Nobukatsu KATSUI, and Tadashi MASAMUNE

To obtain a large quantity of pure phytoalexins and related compounds, the authors devised a method for their extraction from potatoes as shown in the figures 2 and 3.

1. Preparation of inoculum: Fifteen kg of potato-tubers of the cultivar "Irish Cobbler" having no resistance genes, were cut into slices about 7 mm in thickness. The slices were washed with water, placed on slender glass rods in wooden inoculation boxes, and then sprayed with a spore suspension of *Phytophthora infestans* race 0 in a concentration of one spore or less per one microscopic field ($\times 150$, without the cover glass), because it was difficult to keep the slices healthy for 6 days without being rotted by bacteria, when the slices were inoculated with a denser concentration of the sporangia than this. After incubation at from 18 to 20°C for 6 days, the spores were washed out from the mycelial mat into water, centrifuged (1000 rpm, for 1 min.), and then resuspended in water at 24°C (apr. 1×10^5 sporangia/ml). The spore suspension was kept overnight at 4°C, and finally apr. 7.5 liters of high concentration of zoospore suspension was obtained the next morning, and used as the inoculum.

2. Preparation of potato-tuber slices: Fifty kg of potato-tubers of the cultivar "Rishiri" having the R_1 -gene and a high level of field resistance, were cut into slices about 1.5 mm in thickness. The slices were washed and immersed in water for from 1 to 2 hours, transferred into large baskets and kept either overnight or for a few hours under a moist condition. Generally, the resistance of the cut surface tissues of potato-tubers against the attack of the fungus are markedly reduced when they are inoculated soon after cutting, but their resistance increased greatly after a long exposure to the air. Thus, by exposing the slices to the air overnight, we can successfully use even potato cultivars which have R-genes but are weak in their field resistance as materials.

3. Inoculation and incubation: The thin potato tuber slice were placed on the inoculation nets, and sprayed with the zoospore suspension by using a small compressor. After inoculation of both sides, they were thrust through with slender iron-wires, hung in wooden boxes and incubated at from 18 to 20°C for 2 days. The inoculated slices which became brown were stored in the refrigerator (-30°C) until they were used for extraction. These processes were repeated and a large amount of materials was obtained.

4. Extraction and isolation: To protect the phytoalexins and related compounds from destruction, the extraction process was carried out under low temperature and speedily, as far as possible, as shown in Figure 3.