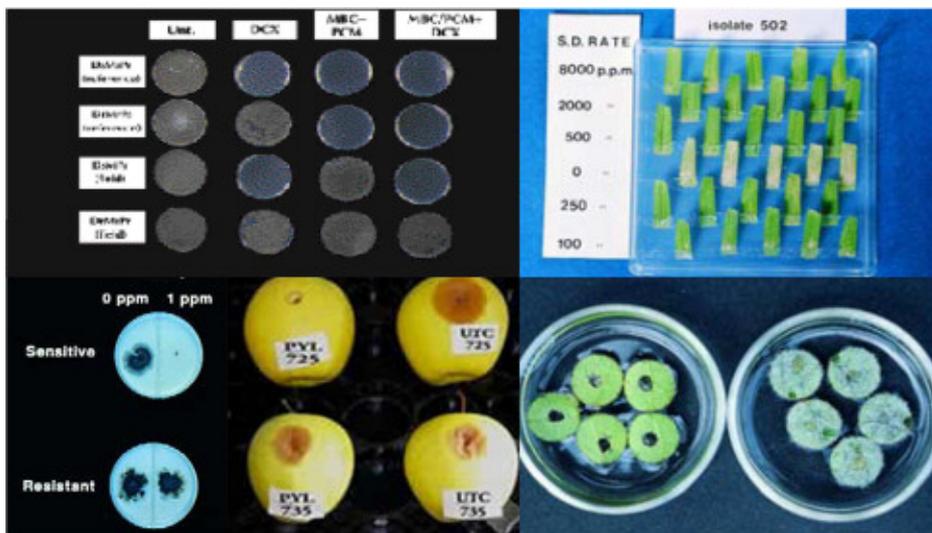


FRAC

植物病原菌の殺菌剤感受性 モニタリング方法



編集者：J FRAC モニタリング方法翻訳部会

木村 教男 住友化学株式会社
波多野 広幸 バイエル クロップサイエンス株式会社
中島 嘉秀 シンジェンタジャパン株式会社
田辺 憲太郎 日本曹達株式会社

翻訳者：J FRAC

荒木 智史 石原産業株式会社
伯野 史明 日本農薬株式会社
播本 佳明 ダウ・アグロサイエンス日本株式会社
蓮沼 奈香子 日産化学工業株式会社
川口 高志 北興化学工業株式会社
貴田 健一 クミアイ化学工業株式会社
久池井 豊 デュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社
三宅 泰司 株式会社クレハ
岡本 吉弘 三井化学アグロ株式会社
山下 慶晃 BASF ジャパン株式会社
および編集者

本冊子は、Fungicide Resistance Action Committee が作成した農業用殺菌剤の感受性モニタリング方法の概要を翻訳したものである。

原著：<http://www.frac.info/monitoring-methods>

目次

病原菌	対象殺菌剤の分類	試験の種類	ページ
コムギ紅色雪腐病菌	SBI 他	マイクロプレート試験	1
コムギ赤さび病菌	SBI 他剤	切葉試験	2
ムギ類赤かび病菌 他の <i>Fusarium</i> 属菌	SBI 他	マイクロプレート試験	4
ジャガイモ疫病菌	CAA 殺菌剤他	リーフディスク試験	5
ジャガイモ疫病菌 トマト疫病菌	CAA 殺菌剤	マイクロプレート試験	7
ジャガイモ疫病菌 トマト疫病菌	CAA 殺菌剤	切葉試験	9
ジャガイモ疫病菌 トマト疫病菌	QoI 殺菌剤	マイクロプレート試験	11
ジャガイモ夏疫病菌 トマト輪紋病菌	QoI 殺菌剤他	<i>In-vitro</i> 、 <i>in-vivo</i> 試験	13
ブドウうどんこ病菌	SBI	リーフディスク試験 (切葉法)	15
ブドウべと病菌	QoI 殺菌剤、 CAA 殺菌剤他	マイクロプレート試験	17
モモ灰星病菌	SDHI、 QoI 殺菌剤	マイクロプレート試験	20
リンゴ黒星病菌	アニリノピリミジン、 QoI 殺菌剤	<i>In-vivo</i> 試験	21
リンゴ黒星病菌	QoI 殺菌剤、 胞子発芽阻害剤	胞子発芽試験	22
灰色かび病菌	SBI クラス I および III	マイクロプレート試験	23

病原菌	コムギ紅色雪腐病菌（赤かび病） <i>Microdochium nivale</i>
対象殺菌剤の分類	SBI および他の殺菌剤
試験の種類	マイクロプレート試験
策定年月	2006年5月
試験系確立に用いた薬剤	プロチオコナゾール、テブコナゾール
本試験系に適した薬剤	SBIおよびQoI殺菌剤。 但し、各薬剤の特徴に応じて、試験方法を調整する。
著者	Andreas Mehl (Bayer CropScience AG)

方法:

1. *Microdochium nivale*の感染穂をランダムに20穂以上採取し、24時間風乾する。圃場内を対角線にサンプリングするのが望ましい。降雨後すぐの採取は避け、罹病穂を運ぶ場合は紙袋を使用する。

2. 罹病粒を2%次亜塩素酸ナトリウムで4分間の表面殺菌した後に滅菌水で2回（各5分）洗浄する。洗浄した罹病粒をPDA（ポテトデキストロース寒天培地）上に置き、ブラックライト下で10～15℃・6日間インキュベートする。顕鏡下で孢子の形状等から*Microdochium*の存在を確認後、さらに同じ条件で6日間インキュベートする。

3. 10-15℃で6日間、ブラックライト下で培養した後に、単コロニー由来の孢子を用いて検定を行う。

4. マイクロプレート法

「PDBに懸濁した孢子液（10,000 conidia / 3 ml）」および「140μl / 穴で所定濃度の薬液を滴下した96穴マイクロプレート」を準備する。

処理濃度の例（最終液量：200μl）

○プロチオコナゾール、テブコナゾール

: 0、0.03、0.1、0.3、1.0、3.0、10、30 mg / L (ppm)

濃度域は、薬剤の基礎活性および検定菌の感受性によって適宜修正する。

5. 孢子懸濁液60μlをマイクロプレートに滴下し（200 conidia / 穴）、緩やかに振とうさせながら20℃・5日間インキュベートする。その後、プレートリーダーを用いて620 nmの吸光度から、EC₅₀を計算する。

別法：典型的な病徴を示している茎を使っても評価可能。表面殺菌後に1 mm 切片をPDA上に置く。その後は上記と同様に検定を行う。

原本：mongni-microtiter-monitoring-method-bcs-2006-v1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/mongni-microtiter-monitoring-method-bcs-2006-v1.pdf?sfvrsn=7f9a419a_4

病原菌	コムギ赤さび病菌 <i>Puccinia triticina</i> (<i>P. recondita</i>)
対象殺菌剤の分類	SBI および他の殺菌剤
試験の種類	切葉試験
策定年月	2006年5月
試験系確立に用いた薬剤	プロチオコナゾール、テブコナゾール
本試験系に適した薬剤	他のSBIおよび他の作用機作の薬剤。 但し、各薬剤の特徴に応じて、試験方法を調整する。
著者	Dr. F.G. Felsenstein (EpiLogic GmbH)
備考	本法はDr. F.G. Felsensteinのご厚意により提供された。

方法:

1. a) 孢子トラップ（移動式又は固定式）やb)ランダムにサンプリングした病葉から、試験に用いる夏孢子又は冬孢子を得る。代表的なデータを得るために異なる集団のさび病菌を用いる。

a) 孢子トラップによるサンプリング

35ppmベンゾイミダゾール系殺菌剤含有寒天（0.6%寒天）上に高度感受性品種の第一葉の切片を置き、夏孢子または冬孢子をトラップする。

サンプリングは出来る限り、さび病発生のピーク時に実施する。トラップした孢子は単コロニーになるように、人工気象室（18 ° C, 10-20 μmol/m²s 照明下）で培養する。その後、単コロニーを上記寒天上の新しい葉の切片に接種し、試験前まで管理する。

b) 罹病葉からのサンプリング

採取した罹病葉の夏孢子または冬孢子をa) で記載した寒天上に準備した第一葉の切片上に移す。その後は試験前まで管理する。

2. 単孢子由来のさび病菌を用いたSBIに対する感受性検討

葉の切片を作成する1日前に、播種10日後のコムギ（1-2葉期）に供試薬剤を十分量（散布液が滴り落ちる量）散布する。殺菌剤の処理濃度は、EC₅₀値が算出出来るように、対数的に濃度勾配を設定する（処理濃度は各々の供試薬剤の効果に合わせて設定）。

処理濃度の例

○ プロチオコナゾール

: 0, 0.64, 1.28, 2.56, 5.12, 10.24, 20.48, 40.96, 81.92, 163.84 mg/L

○ テブコナゾール

: 0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 2.56, 5.12, 10.24, 20.48 mg/L

異なる薬剤、異なる濃度で処理されたコムギは、ベーパーアクションの影響（ガス効果）をさけるために、十分な距離を保って厳密に管理する。薬剤処理1日後に葉の切片を作成する。ベーパーアクションの影響をさけるために、各処理濃度の葉の切片は、処理濃度別に使い捨てのシャーレ内に並べる。各々のシャーレの中には、同一薬剤、同一濃度で処理された別々の植物の葉の切片を数枚並べる。従って、1菌株用の1薬剤10濃度の試験セット（含：無処理）は、10枚のシャーレ

から構成される。

3. 試験に用いるシャーレは、接種時に限っては横に並べる。単孢子由来の接種源を空気で葉の切片に接種する（乾燥条件で実施—孢子懸濁液は用いない）。

4. 10日間発病を促した後（人工気象室条件：18 ° C、10-20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 、照明下）、各処理区の発病面積率を無処理と比較しながら達観で調査する。その後、プロビット解析を用いて、各試験菌株に対する EC_{50} 値を算出する。

原本： puccre-leaf-segment-monitoring-method-epil-2006-v1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/puccre-leaf-segment-monitoring-method-epil-2006-v1.pdf?sfvrsn=599a419a_4

病原菌	ムギ類赤かび病菌 <i>Fusarium graminearum</i> (<i>Gibberella zeae</i> ,)、他の <i>Fusarium</i> 属菌
対象殺菌剤の分類	SBI および他の殺菌剤
試験の種類	マイクロプレート試験
策定年月	2006年5月
試験系確立に用いた薬剤	テブコナゾール、プロチオコナゾール
本試験系に適した薬剤	SBI。他の殺菌剤については薬剤の特性に合わせて試験法を調整する。
備考	本法はマイクロプレート試験の設備を持つラボで有効である。記載されていない有効成分については本法の有効性を慎重に確認する必要がある。

方法：

1. 採取

赤かび病菌等のフザリウム属菌に感染したムギ類の穂（赤色の病斑が赤かび病の典型的な病徴）を圃場から無作為に複数採取する。サンプリングは降雨直後には行わない。圃場の対角線上から20個以上サンプリングすることが好ましい。尚、罹病穂は紙の袋に入れて輸送する。

2. 採取サンプルの表面殺菌

採取した罹病粒は、次亜塩素酸ナトリウム(2%)で4分間殺菌し1回5分間の滅菌水洗浄を2度行う。殺菌した罹病粒をPDA培地に置き、ブラックライト下で20℃、6日間培養する。顕微鏡で菌糸や胞子の形態を観察し、*Fusarium* 属菌であることを確認した後、同一条件でさらに6日間培養して菌叢を大きくする。

3. 病原菌の単離

培養後、単コロニー由来の胞子を回収し、以後の試験に使用する。

4. マイクロプレート試験の方法

PDB培地で孢子懸濁液 (2,500 conidia / 3 ml) および96穴マイクロプレートを準備する。各ウェルあたり200 µlの容量で試験する場合は、所定濃度の薬剤を含むPDB培地140 µlをマイクロプレートに入れる。供試濃度の設定の際は各殺菌剤の抗菌活性や病原菌の薬剤に対する感受性を考慮する。テブコナゾール、プロチオコナゾールを試験する場合は、供試濃度は0, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30 mg/Lに設定すると良い。

5. マイクロプレート試験の培養、調査方法

所定濃度の薬液140 µlに4. で調製した孢子懸濁液60 µl (50 conidia / 穴) を入れ、緩やかに振とうさせながら20℃、4日間培養する。マイクロプレートリーダーを用いて620 nmの波長で菌の生育を測定し、EC₅₀を算出する。

原本: gibbze-microtiter-monitoring-method-bcs-2006-v1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/gibbze-microtiter-monitoring-method-bcs-2006-v1.pdf?sfvrsn=659a419a_4

病原菌	ジャガイモ疫病菌 <i>Phytophthora infestans</i>
対象殺菌剤の分類	CAA 殺菌剤および他の殺菌剤
試験の種類	リーフディスク試験
策定年月	2007年12月
著者	Dominique Edel, Helge Sierotzki (Syngenta Crop Protection)
備考	マイクロプレートの試験が可能な実験室で実施可能

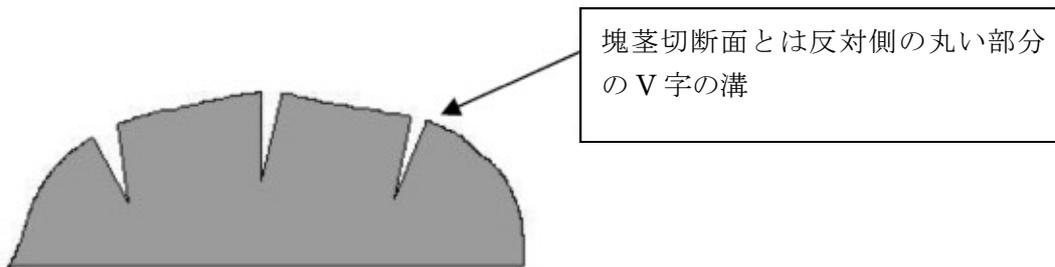
方
法：
1. サ
ンプ
リン
グ方

法

一つの圃場内で孢子形成した罹病葉を複数の場所よりサンプリングする。サンプリングした葉を二つに切断した塊茎で挟み込む（感受性の高い品種を推奨）。このようにすることでラボに送るまで菌株を維持することができる。一箇所につき5サンプルを採取する。このサンプルを送付用の段ボール箱に入れて速やかに実験室に送付する。

2. 培養

送付期間も含めて3日間以上は維持することで塊茎への菌の感染が成立する。実験室に送付されてきたサンプルは、まず塊茎を二つに分け、罹病葉を取り除き、切断面とは反対側の丸い側の1~3箇所にV字の溝を切り込む。その後、切断面を下にして乾いた紙を下に敷いたペトリ皿に置き、19°Cの暗所で培養する。5~7日後に溝部分に生育した菌糸を滅菌した白金耳でかきとり、RDA+A+PCNB 培地に移植し、19°Cの暗所で培養する。



<RDA+A+PCNB 培地>

- ・ライムギ種子 200g
- ・D-グルコース 5g
- ・バクトアガー (Difco) 20g

- (1) 約800mlの滅菌水でライムギ種子をオートクレーブにて滅菌する（121°C、30分）
- (2) オートクレーブした液を濾し、ライムギ種子を取り除き、滅菌水にて1Lにメスアップし、所定量のバクトアガーとD-グルコースを入れる。
- (3) オートクレーブにて再度滅菌する（121°C、30分）
- (4) 約50°Cまで冷ました後に下記の抗生物質を所定の濃度になるように添加する。
 - ・ピマリシン 10 ppm
 - ・アンピシリン 125ppm (2mlの滅菌水に希釈する)
 - ・リファンピシン 10ppm (2mlのエタノールに希釈する)
 - ・PCNB (Pentachloronitrobenzene) 100ppm (2mlのアセトンに希釈する)

各菌株はコンタミが無くなるまで上記培地で継代する。コンタミが無くなった後、RDA 培地（抗生物質無添加）に移植し、19°Cの暗所で15-21日培養し、感受性検定に供試する。

3. リーフディスク検定法

検定は24穴プレートで実施する。

供試薬剤：マンジプロパミドをDMSOで10000 mg a. i. /Lに調整：0、0.1、0.3、1、3、10ppm

試験にはマイクロプレート用分注機(Tecan-Genesis-automated equipment)を使用する。最初に1.5mlの0.2%寒天液(Difco製)を各穴に入れる。4週間温室で生育させたジャガイモより新鮮な葉(先端から3~5葉目)を採取しリーフディスク(15mm径)をコルクボーラーで作成する。リーフディスクは葉の表面が寒天液にふれるように各穴に入れる。

10 μ Lの薬剤希釈液を下記の手順に従いそれぞれの穴に散布する。

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						
	0	0.1	0.3	1	3	10

1菌株に対する24穴プレートのマンジプロパミドの濃度を上図のように調整する

4. 接種源の準備

15~21日培養したシャーレに滅菌水7mlを入れ、遊走子のうをかき集め、遊走子のう懸濁液を作成する。その後、この懸濁液をガーゼでこすことで菌糸を取り除き、 2×10^4 個/mlの遊走子のう懸濁液に調整する。これを各リーフディスクの中央にピペットを用いて30 μ L滴下し、各プレートをインキュベータ内(19 $^{\circ}$ C、湿度85%)で6~8日培養する。

また各試験には対照として感受性菌株を同時に供試する。

5. 評価

試験はそれぞれのリーフディスク上の病斑面積率を調査することで評価する。EC₅₀値はプログラムを使用して算出する。

原本：PHYTIN in vivo method Syngenta 2007 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-in-vivo-method-syngenta-2007-v1.pdf?sfvrsn=499a419a_4

病原菌	ジャガイモ疫病菌、トマト疫病菌 <i>Phytophthora infestans</i>
対象殺菌剤の分類	CAA 殺菌剤
試験の種類	マイクロプレート試験
策定年月	2006年5月
試験系確立に用いた薬剤	ジメトモルフ
本試験系に適した薬剤	他のCAA殺菌剤。 但し、各薬剤の特徴に応じて、試験方法を調整する。
著者	Dr. Gerd Stammler (BASF AG)

方法:

1. 孢子採取

孢子形成しているジャガイモ葉或いはトマト葉を1カ所あたり10~20枚程度採取する。紙に採取葉をはさみ、新聞紙で包んで、できれば冷蔵で速やかに実験室に送付する。

2. 疫病菌の分離

ジャガイモ疫病に感受性の高い品種の塊茎の皮をむき、エタノールで表面殺菌する。塊茎を滅菌水で洗い、半分に切る。孢子形成したジャガイモ葉或いはトマト葉を、半分に切った塊茎の断面に挟み込み、テープで固定し、それを湿室16°Cで2日間培養する。塊茎表面に形成された菌糸を抗生物質含有のPDAに移植する。

3. 孢子の増殖

分離した菌株はエンドウマメ培地に移植し、16°C暗黒下で2週間培養する。培地に形成された孢子を室温で5mlの培養液(2倍に濃縮したエンドウマメ煮汁溶液)で洗い取り、その孢子懸濁液をガーゼで濾過し、孢子濃度 2×10^4 個/mlに調整する。

4. 感受性試験

原体をDMSOに溶かし、孢子懸濁液と混用する直前に滅菌脱イオン水で濃度調整をする。96穴のマイクロプレートの各穴に50 μ lの殺菌剤溶液と50 μ lの孢子懸濁液を混用する。ジメトモルフの推奨最終濃度は、0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10ppmとする。1菌株で供試濃度は3反復とする。殺菌剤+エンドウマメ煮汁溶液のblankも同様に3反復用意する。マイクロプレートは乾燥を防ぐためビニール袋に入れ、18°C暗黒下で培養する。5日間培養後に生育を405nmで測定する。測定値はblankと比較して補正し、EC₅₀値を計算する。計算したEC₅₀値を感受性の標準菌株の数値と比較する。

エンドウマメ培地 (Pea agar)

150g 冷凍エンドウマメ

沸騰させた1000mlの蒸留水(2段)1時間煮込み、濾過する

5g グルコース

20g 寒天粉末

純水を加えて1000mlに調整

2倍に濃縮したエンドウマメ煮汁溶液

300g 冷凍エンドウマメ

沸騰させた1000mlの蒸留水（2段）で1時間煮込み、瀘過する

10g グルコース

純水を加えて1000mlに調整

原本： PHYTIN microtiter method sporangia BASF 2006 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-microtiter-method-sporangia-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=479a419a_4

病原菌	ジャガイモ疫病菌またはトマト疫病菌 <i>Phytophthora infestans</i>
対象殺菌剤の分類	CAA 殺菌剤
試験の種類	切葉試験
策定年月	2006年5月
試験系確立に用いた薬剤	ジメトモルフ
本試験系に適した薬剤	CAA殺菌剤。 但し、各薬剤の特徴に応じて、試験法を調整する。
著者	Dr. Gerd Stammler (BASF-AG)
備考	ジメトモルフのために確立された試験方法。 ジメトモルフ以外の化合物については、有効な結果を確実にするために、試験法を調整する。

方法:

1. 孢子採取

孢子形成しているトマトあるいはバレイショ葉を1カ所あたり10~20枚程度採取する。紙に1採取葉をはさみ、新聞紙で包んで、可能であれば保冷箱に入れ、できるだけ速やかに実験室へ運ぶ。

2. 採取した罹病葉からの疫病菌の分離

疫病菌に感受性品種のバレイショ品種の塊茎の皮をむき、エタノール液で表面滅菌する。塊茎を滅菌水で洗い、2つに切り分ける。

バレイショあるいはトマト罹病葉を2つに分けたバレイショ塊茎の間にはさみ、テープで固定後、16°Cの湿室内に2日間静置する。

塊茎表面から出現した菌糸を抗生物質入りのPDA培地(1)に移植する。

3. 殺菌剤の処理

温室で2週間育成したトマトを供試作物とする。

供試薬剤を所定の濃度（ジメトモルフの場合は、0、0.375、0.75、1.5、3、6、12 ppm）に調整し、トマトに散布処理する。

散布1日後に各トマトの上位2葉を採取し、0.6%素寒天培地上に置床する。

4. 孢子形成および接種

分離菌をライムギ培地(2)上で2週間・16°C・暗黒下で培養する。

5mlの冷水(4°C)をシャーレに加え、生育旺盛な菌叢から洗浄しながら孢子を回収する。

孢子懸濁液を4重のガーゼでろ過し、孢子濃度 2×10^4 個/mlに調整する。

孢子懸濁液は、冷蔵庫内に2時間静置し、遊走子の放出を促す。

遊走子懸濁液をエアブラシで噴霧接種する(500 μ l/シャーレ)。

5. 評価

シャーレは、18°Cで5日間(明期 12時間、暗期 12時間)静置する。

病斑面積を調査し、各濃度の発病阻害率を算出する。

計算式

発病阻害率 (%) = ((無処理の発病面積率 - 各処理区の発病面積率) / (無処理の発病面積率))
× 100

ED50値を算出し、感受性菌の値と比較する。

(1) PDA培地の組成

Potato dextrose agar 39g

寒天 10g

蒸留水を加えて、1000mlに調整して、加圧滅菌処理。

45℃まで温度が下がった後に、以下の抗生剤を添加する。

アンピシリン 200mg

リファンピシン 20mg

ピマリシン 10mg

(2) ライムギ培地の組成

ライムギ 200g

1000mlの蒸留水で1時間煮込んで、ガーゼでろ過する。

5gのグルコースと20gの寒天を加えて、1000mlに調整。

原本: PHYTIN in vivo method BASF 2006 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-in-vivo-method-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=4a9a419a_4

病原菌	ジャガイモ疫病菌またはトマト疫病菌 <i>Phytophthora infestans</i>
対象殺菌剤の分類	QoI 殺菌剤
試験の種類	マイクロプレート試験
策定年月	2005年
試験系確立に用いた薬剤	ファモキサドン
本試験系に適した薬剤	他のQoI殺菌剤にも適用可能であるが、各薬剤の特徴に応じて、試験方法を調整する。
著者	Jean-Luc Genet, Grazyna Jaworska (Du Pont Crop Protection)
備考	プレートリーダー（波長405nm）がある実験室で実施可能な方法

方法:

1. サンプルング

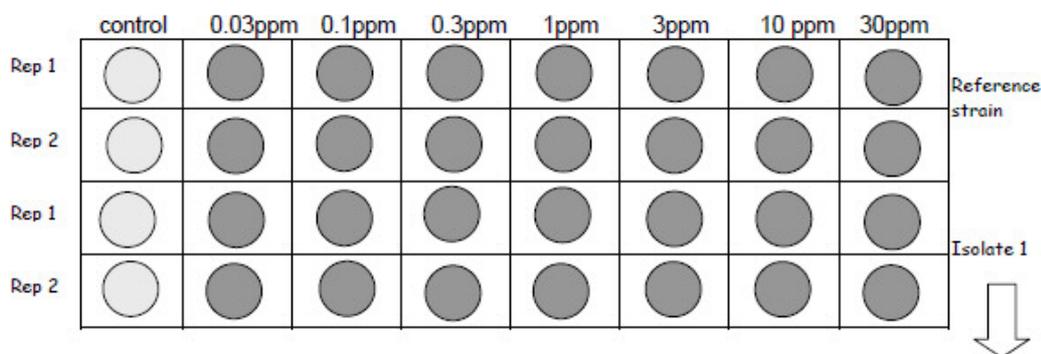
代表的なサンプルを得るためには、10-15枚のジャガイモ疫病菌またはトマト疫病菌に罹病した葉を採取する。抗生物質含有ライムギB寒天培地を用いて、少なくとも5-6の菌株を分離する。次いで、ジャガイモ疫病菌またはトマト疫病菌を暗条件下19-20℃、ライムギB寒天培地で培養し、分離菌株は滅菌水中に菌糸塊で保存する。

2. 病原菌の調整

約3週間の培養後、6mlの冷却した滅菌済のエンドウ抽出グルコース培養液でシャーレを洗い流して、分離菌株の遊走子のうを得る。遊走子のう懸濁液を2重ガーゼでろ過し、 2×10^4 個/mlに調整する。

3. アッセイプレートの調整

96穴マイクロプレートを用いての感受性検定を実施する。0.1% (v/v) DMSO溶液50 μ lをマイクロプレートに添加し対照とする（2反復）。0.06, 0.2, 0.6, 2.0, 6.0, 20.0および60.0 μ g/mlの供試薬剤50 μ lを穴に添加する（2反復）。最終的には、すべての穴のDMSOの濃度は同じにする。次いで、すべての穴に遊走子のう懸濁液50 μ lを添加する。感受性菌株を対照として加える。



4. 培養

マイクロプレートをつたで覆い、暗条件下で19-20℃にて培養する。

5. 測定

培養0日目と7日目に、Biotechプレートリーダーを用いて405nm吸光度で測定する。コンピューターソフトウェアのGrafit 5.0 (Erythacus社)を用いて、各菌株のEC₅₀値を求める。

原本: PHYTIN microtiter plate method DuPont 2006 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-microtiter-plate-method-dupont-2006-v1.pdf?sfvrsn=459a419a_4

病原菌	ジャガイモ夏疫病菌、トマト輪紋病菌 <i>Alternaria solani</i>
対象殺菌剤の分類	QoI 殺菌剤およびその他の殺菌剤
試験の種類	<i>In-vitro</i> 試験および <i>in-vivo</i> 試験
策定年月	2006年3月
試験系確立に用いた薬剤	アゾキシストロビン
本試験系に適した薬剤	QoI殺菌剤およびSBI。 但し、各薬剤の特徴に応じて、試験方法を調整する。
著者	Dr. Helge Sierotzki, Gilberto Olaya (Syngenta Crop Protection)

I. *In-vitro* 検定法

1. アゾキシストロビン原体はアセトンに溶解し、最終濃度がそれぞれ 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 および 10 mg/L となるように素寒天培地 (1L の蒸留水と 20g バクト agar で作製) に添加する。
2. SHAM (salicylhydroxamic acid) は 100mg/L となるようにメタノールに溶解した後に、培地に添加する。
(コントロール区の素寒天培地にはアセトンと SHAM を添加する。また、SHAM を添加せず、アセトンのみ添加したコントロール区を設ける。)
3. 単孢子分離した *A. solani* 株を V8 ジュース培地で培養。シャーレに 10-15 mL の滅菌蒸留水を加え、滅菌したガラス棒でゆっくりと表面をこすって胞子をかきとる。(胞子発芽を防止するため、胞子懸濁液は冷蔵庫内 (4-5°C) に入れておく。)
4. 胞子懸濁液は濃度が 1×10^4 個/mL となるように調整し、滅菌したコンラージ棒等で胞子懸濁液 50 μ L を検定用の培地上に広げる。
5. 26°C で 4 時間培養したのち、各培地における 50 個における発芽胞子数を計測する (各 2 反復)。
「発芽管の長さが胞子サイズより長いもの」、「発芽管の先に付着器を形成しているもの」、「複数の発芽管が認められるもの」を発芽胞子としてカウントする。
6. 胞子発芽の比率を以下の数式で計算し、得られたデータをもとに胞子発芽の 50% 抑制濃度 (EC₅₀ 値) を算出する。
「胞子発芽の比率」= 「殺菌剤添加培地での発芽率」 \times 100 / 「殺菌剤を添加していない培地での発芽率」

11. *In-vivo* 検定法

In-vivo 検定では、接種 24 時間前に薬剤を予防的に処理するが、罹病性の高いトマト品種を使用することで、トマト輪紋病だけでなくバレイシヨ夏疫病菌も本法で検定が可能。

1. トマトの罹病性品種を温室内で 3 週間生育させる。第一本葉が完全展開すれば試験開始は可能。
2. トマトにアゾキシストロビン製剤（またはアゾキシストロビン原体をアセトンに溶解し、0.05% Tween 20 を添加したもの）を、アゾキシストロビン濃度が 0, 0.01, 0.1, 1, 10 および 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように希釈し散布する（最低でも各濃度 3 植物体を準備する）。
3. V8 ジュース培地で 12-14 日間培養した *A. solani* から孢子懸濁液 (1×10^5 個/mL) を調整し、薬剤散布 24 時間後のトマト植物体に噴霧接種する。接種後 24 時間は、22-24°C に設定したグローブチャンバー内に静置する。
4. その後温室に移動し、水を含ませたマット上においておく。温室内の平均気温は約 24°C に保ち、湿度を高くするため 1 日 2 回水を噴霧する。
5. 7-14 日後には病斑が認められたら、第一本葉における発病を面積率 (%) によって調査する。
6. 発病面積率をもとに EC_{50} 値を算出する（*In-virto* 検定法の 6 を参照）。

原本： ALTESO monitoring method Syngenta 2006 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/alteso-monitoring-method-syngenta-2006-v1.pdf?sfvrsn=619a419a_4

病原菌	ブドウうどんこ病菌 <i>Uncinula / Erysiphe necator</i>
対象殺菌剤の分類	SBI
試験の種類	リーフディスク試験（切葉法）
策定年月	2006年5月
試験系確立に用いた薬剤	テブコナゾール、スピロキサミン、トリアジメノール
本試験系に適した薬剤	SBI および QoI 殺菌剤にも適用可能であるが、殺菌剤の特性によって試験法を調整する。
著者	Dr. F. G. Felsenstein (EpiLogic GmbH)
備考	Dr. F. G. Felsenstein のご厚意により提供。

方法

1. 孢子採取

孢子採集トラップ（移動式または固定式）(a)、または罹病葉のランダムサンプリング (b) によって分生孢子を得る。

- a) 素寒天プレート（0.6%寒天、35 mg/L ベンゾイミダゾール系殺菌剤）に置床した高感受性品種の新鮮葉を用いて、分生孢子をトラップする。散布した殺菌剤の影響が減少して、大気中の孢子濃度が最大となる生育期の最終段階まで採取可能である。採取した分生孢子を単一コロニーとして生育させ（人工気象器：22°C、25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 、12h /12 h 明暗条件、70%相対湿度）、素寒天プレート上の新鮮葉に接種する。
- b) a) で述べた素寒天プレート上の新鮮葉で、葉から採取した分生孢子を増殖させる。

2. 感受性試験

菌株ごとに分生子鎖を取り、表面殺菌した新鮮葉 2-3 枚に接種して増殖させる。ビニール袋を被せてあるブドウ葉に殺菌剤溶液を十分量散布する。処理 1 日後に、リーフディスク（直径 14 mm）を作成する。最適な EC_{50} 値を得るために、殺菌剤の処理濃度段階は 2-3 倍くらいを目安に設定する（殺菌剤により異なる）。

例) :

- ・テブコナゾール：0, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 mg/L
- ・スピロキサミン：0, 3, 10, 30, 100, 300 mg/L
- ・トリアジメノール：0, 0.05, 0.25, 1.25, 6.25, 31.25, 156.25 mg/L

有効成分の揮発による影響を避けるために、試験区ごとに厳密に分けて管理する。処理濃度の異なるリーフディスクごとに、別のプラスチック製シャーレを使用する。シャーレ 1 枚あたりに同濃度を処理した 4 枚のリーフディスク（別々の 4 枚の葉から作製）を入れる。1 菌株を検定する場合、例えば 6 濃度で試験するのであれば 6 シャーレを 1 試験セットとする。

3. 接種と管理

各試験セットのシャーレは互いに隣合わせに配置し、約 60 秒間（リーフディスクが分生孢子に曝露されている時間）、セットリングタワー（settling tower）*の下に置いて接種する。すなわち、十分に分生孢子を形成している葉から風圧によって分散させることにより、上部より各試験セットに接種する。一般的には、接種密度を約 200-300 個/ cm^2 の分生孢子に調製する。

人工気象器（22°C、25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 、12/12 h 明暗条件、70%相対湿度）に 14-16 日間、シャ

ーレを静置する。処理濃度の異なるリーフディスクを入れたシャーレは、有効成分の揮発による影響を避けるために分けて管理する。

4. 培養期間が終了後、無処理区に対する発病面積を数値化する。プロビット分析によって分離株の EC_{50} 値を算出する。

原 本 : UNCINE leaf disc monitoring method EpiL. 2006 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/uncine-leaf-disc-monitoring-method-epil-2006-v1.pdf?sfvrsn=a599419a_4

病原菌	ブドウべと病菌 <i>Plasmopara viticola</i>
対象殺菌剤の分類	QoI 殺菌剤、 CAA 殺菌剤および他の殺菌剤
試験の種類	マイクロプレート試験
策定年月	2003年12月
試験系確立に用いた薬剤	アゾキシストロビン、マンジプロパミド
本試験系に適した薬剤	QoI殺菌剤やCAA殺菌剤、および他の作用機作の薬剤。但し、各薬剤の特徴に応じて、試験方法を調整する。
著者	Dr. Helge Sierotzki, Noemy Kraus (Syngenta Crop Protection)

方法：

1) 植物

*Plasmopara viticola*は絶対寄生菌であることから、新鮮な植物を用いて1週間ごとに継代する。

- ・ ブドウ品種：罹病性品種
- ・ 生育ステージ：5-6週苗
- ・ 使用する葉：茎頂から数えて3枚目と4枚目の葉
- ・ その他：うどんこ病(*Uncinula necator*)防除のために1週間に2回、硫黄剤を処理する。

2) 殺菌剤

10,000ppmのアゾキシストロビンとマンジプロパミドのDMSO溶液

3) 病原菌

3.1 接種方法

- ・ *P. viticola* は葉1枚を用いて継代する。接種する葉は乾燥を防ぐために、含水ろ紙を敷いたシャーレ中に置く。
- ・ 感染葉をビーカーに入れ、約5mLの滅菌したイオン交換水を加え、ボルテックスで攪拌し、遊走子の懸濁液を調整する。顕微鏡で遊走子の濃度をカウントするが、継代が目的であれば、正確に遊走子の濃度を調整する必要は無い。噴霧器を用いて葉の裏面に遊走子の懸濁液を噴霧する。懸濁液の水滴を葉の表面に十分に付着させることが重要である。

3.2 接種

100%の湿度を維持するために、接種した葉を入れたシャーレを、含水ろ紙を敷いたプラスチックボックス内に入れ、人工気象器内で培養する。人工気象器での培養条件は下記のとおり。

- ・ 温度 19度
- ・ 光条件：12時間明期、12時間暗期
- ・ 湿度：70%

3.3 保存

*P. viticola*は-20°Cで凍結することで長期間の保存が可能である。新鮮な遊走子形成葉を採取、新しいシャーレ中に置き、クリーンベンチ内で余分な水滴を乾燥させる。その後、シャーレの蓋をパラフィルムで密封しディープフリーザー中で保存する。この方法で保存したサ

ンプルの生存期間は1年以内である。

3.4 サンプル調整

検定に用いる株の調整方法として以下の手順で行う。30枚から40枚の感染葉から病斑をハサミで切り取り、含水ろ紙を入れた高湿度の箱に静置、病斑切片に噴霧器を用いて滅菌水を噴霧する。箱の蓋を閉め、遊走子のうを形成するまで培養する。培養期間は状況に応じて24時間から3日以内とする。葉の表面に新鮮な遊走子のう形成が観察されたら直ぐに、遊走子のうを滅菌水で洗い流して回収し、遊走子のう懸濁液を新たなブドウ葉に接種する。前記と同じ培養条件で遊走子のうが観察されるまで培養し、検定まで-20℃で保存する。

4) 感受性検定

各分離株は以下の方法を用いて、2回の独立した試験で感受性検定を行う。

4.1 病原菌の調整

冷凍庫に保存している検定用サンプルを取り出す。接種源の調整手順は前述の感染葉からの方法と同様に行う。凍結により感染能が無くなる遊走子のうもあることから、遊走子のう濃度を調整することは不可能である。このため、サンプルの継代は供試前の1度だけとする。接種源の質に応じて孢子形成が確認されるまで、2-3日は培養期間を延長することが可能。

4.2 リーフディスクアッセイ

- ・ 感受性検定は24穴プレートで行う。
- ・ 各穴に0.5%の素寒天を1ml加える。
- ・ 第3葉と第4葉から15mm径のリーフディスクを切り抜く。
- ・ 1反復に4枚の異なる葉から調整したリーフディスクを用い、葉表面を下にして寒天上に静置する。

control	0.1ppm	1ppm	3ppm	10ppm	100ppm	
rep1						leaf 1
rep2						leaf 2
rep3						leaf 3
rep4						leaf 4

4.3 薬剤処理

- ・ 接種1日前に薬剤を処理する。
- ・ 10,000ppmの薬剤溶液(原体をDMSOに溶解)から散布用の希釈系列を作成する。
- ・ 処理は処理器具(10 μ l/穴)または絵筆による塗布で行う。
- ・ 翌日、リーフディスクをクリーンベンチ中で乾燥させる。

4.4 接種

- ・ 接種源は、使用時に調整、1回のみとする。

- ・ 遊走子の濃度は50,000個/mlに調整する。
- ・ 遊走子の懸濁液をリーフディスクに接種する際には、均一に接種できるようにプレートの反対方向からも注意して噴霧する。
- ・ 各試験では、感受性の対照株も用いる。

4.5 培養

- ・ 24穴プレートの蓋を閉じる。
- ・ 24穴プレートは直接培養チャンバーに入れる。100%の湿度を保つために、さらにプラスチックボックスに入れる必要はない。
- ・ 6日間培養する。

4.6 評価

- ・ 達観により病斑面積率を評価する。
- ・ データはデータベースに入力する。
- ・ EC_{50} 値を算出する。

原 本 : PLASVI microtiter

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/plasvi-microtiter.pdf?sfvrsn=409a419a_4

病原菌	モモ灰星病菌 <i>Monilinia laxa</i> , <i>Monilinia fructigena</i>
対象殺菌剤の分類	SDHI および QoI 殺菌剤
試験の種類	マイクロプレート試験
策定年月	2009年1月
試験系確立に用いた薬剤	ボスカリド、ピラクロストロビン
本試験系に適した薬剤	SDHI、QoI殺菌剤。但し各薬剤の特徴に応じて、試験方法を調整する。
著者	Dr. Gerd Stammler (BASF)

方法

1. 圃場からの *Monilinia* spp. の採取と分離

感染した果実、花芽または小枝に発生した病斑より胞子を回収し、200ppmのストレプトマイシンを含む2%麦芽寒天培地上に移植する。その後、胞子または菌糸を継代培養して菌分離を行う。

2. 胞子形成

M. laxa はV8寒天培地上、*M. fructigena* は2%麦芽寒天培地にて培養を行う。胞子形成を促すために18°C（明期白色光下：12時間、暗期：12時間）にて10~12日間培養を行う。2倍濃度に調整したYBA培地（5ml）で培地上を洗い流しながら胞子を回収する。胞子懸濁液は2層のカーゼにて濾過を行い、胞子濃度を 2×10^4 / mlに調整する。

3. 感受性検定

ボスカリドまたはピラクロストロビン原体をDMSOに溶解させる。その後、胞子懸濁液は試験直前に滅菌水と混和して最終調整する。50 μ lの殺菌剤溶液と50 μ lの胞子懸濁液を96穴のマイクロプレートにて混合する。ボスカリドとピラクロストロビンの最終濃度は0, 0.0025, 0.01, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5, 10 ppmに調整する。各試験は3反復にて試験を実施する。マイクロプレートは乾燥を防ぐためにプラスチックバッグに入れて、18°C暗条件下で培養する。培養5日後に菌糸生育を以下の5段階にて目視で評価する。

0, 生育なし; 1, 無処理比で50%以上の生育抑制 2, 無処理比で50%程度の生育抑制 3, 無処理対比で50%未満の生育抑制; 4, 生育抑制なし。

最小阻止濃度(MIC)を菌株毎に決定する。濃度別の菌糸生育およびMIC値を感受性菌株と比較する。SDHIの存在下では、菌株によっては発芽管の伸長はある程度認められるが、その後の菌糸伸長は抑制されることに留意する。

原本: MONISP germ tube elongation test BASF 2009 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/monisp-germ-tube-elongation-test-basf-2009-v1.pdf?sfvrsn=779a419a_

病原菌	リンゴ黒星病菌 <i>Venturia inaequalis</i>
対象殺菌剤の分類	アニリノピリミジンおよびQoI殺菌剤。
試験の種類	<i>In-vivo</i> 試験
策定年月	2006年5月
試験系確立に用いた剤	ピリメタニル
本試験系に適した薬剤	アニリノピリミジン、QoI殺菌剤および他のグループの殺菌剤。試験方法は殺菌剤の特性に合わせて調整する。
著者	Dr. Gerd Stammler, Dr. Kristin Klappach, BASF-AG,

方法:

1. 黒星病の病斑採取

孢子形成のあるリンゴ葉を1カ所あたり20枚くらいまで採取する。採取した葉を紙の間にはさんだ後に新聞紙で包み、出来るだけ早く研究室に持ち込む。クールボックスの使用が望ましい。宅配便などで送付する場合は、風乾後の葉を新聞紙の間にはさむ。

2. 接種源の作製

切り取った病斑40~60枚を蒸留水ですすぎ、4重ガーゼでろ過、分生子懸濁液を得る。分生子濃度を 5×10^5 個/mlに調整する。

3. リンゴ実生苗の準備

3-6℃の砂の中でリンゴ種子（品種：ゴールデンデリシャス）を2-3ヶ月静置して、春化处理する。3週間生育させて発芽した実生苗を温室に移し、20-24℃、相対湿度70-75%、18時間の光周期で3週間栽培する。うどんこ病防除のため、夜間3-5時間硫黄を燻煙する。

4. 分生子増殖方法

無処理の実生苗の最も若い展開葉の表側に、分生子懸濁液を散布する。散布後の実生苗を暗下、相対湿度99%の接種箱内に24時間静置する。その後、約70%の相対湿度、22℃、12時間明期/12時間暗期の温室内で管理する。接種13-20日後、多数の孢子を形成した感染葉を乾燥させた後に保管する。

5. 感受性検定

登録濃度とは異なる処理濃度を設定する（例えば、0, 100, 300 ppm ピリメタニル）。使用直前に水希釈した殺菌剤を十分量散布する。各濃度に対して、3-5の実生苗を使用する。散布24時間後に、最も若い完全展開葉（葉の先端を切除して処理葉の目印とする）に接種する。接種および管理方法は、上述の方法と同様。

6. 調査

接種13-15日後、孢子形成をしている病斑面積率を調査する。ピリメタニル300 ppmで孢子形成している病斑がある場合は、低感受性菌が存在することを示す。

原本: VENTIN in vivo-AP BASF 2006 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/ventin-in-vivo-ap-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=a299419a_4

病原菌	リンゴ黒星病菌 <i>Venturia inaequalis</i>
対象殺菌剤の分類	QoI 殺菌剤および胞子発芽を阻害する殺菌剤 (BCM, SBI およびアニリノピリミジンには使用できない)
試験の種類	胞子発芽試験
策定年月	2006年5月
試験系確立に用いた薬剤	クレソキシムメチル、ピラクロストロビン
本試験系に適した薬剤	他のQoI殺菌剤にも適用可能であるが、有効成分によって試験方法を調整する。
著者	Dr. Gerd Stammler, Dr. Krish Klappach
備考	上記の有効成分について確立した試験方法。記載のない有効成分に適用する場合は検証が必要。

方 法 :

1. 胞子採取

胞子形成しているリンゴ葉を1カ所あたり20枚程度採取する。紙に採取葉をはさみ、新聞紙で包んで(望ましくは冷蔵で)、出来る限り早く実験室に送付する。実験室に到着後、風乾、新聞紙にはさんで保管する。

2. 接種源の準備

リンゴ葉から40~60の病斑部を切り取り、蒸留水で洗浄しながら胞子を集める。4重ガーゼで洗浄水をろ過、胞子濃度は約 5×10^5 個/mlに調整する。

3. 寒天培地

50℃以下の2%素寒天培地(20ml/シャーレ)に、殺菌剤溶液を加える。殺菌剤の希釈は、寒天培地の準備が終わる直前に行う。殺菌剤の最終濃度は、0および2ppmとする。使用するまで最低24時間寒天培地を放置する。この寒天培地は6-8℃で4週間保管できる。

4. 接種

寒天培地上に10μlの胞子懸濁液を滴下する。滴下した場所にマジックで印をつける。接種後、18-20℃暗下に24時間静置する。

5. 評価

接種24時間後、滴下した場所ごとに100胞子について発芽胞子数を数え、発芽率を求める。耐性菌胞子率は以下の式で求める。

$$\text{QoI 殺菌剤耐性菌胞子率} = 100 \times (\text{2 ppm 培地での発芽率} / \text{0 ppm 培地での発芽率})$$

原 本 : VENTIN spore germination BASF 2006 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/ventin-spore-germination-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=be99419a_4

病原菌	灰色かび病菌 <i>Botrytis cinerea</i>
対象殺菌剤の分類	SBI クラス I および III
試験の種類	マイクロプレート試験
策定年月	2006年5月
試験系確立に用いた薬剤	フェンヘキサミド
本試験系に適した薬剤	SBI。但し、各薬剤の特徴に応じて、試験方法を調整する。
著者	Andreas Mehl (Bayer CropScience AG)

方 法 :

1. 灰色かび病罹病ブドウ果実またはイチゴ果実を圃場からランダムに 20 個以上採取する。降雨直後のサンプル採取は避ける。蒸れないように側面上部に空気穴が開いているプラスチック容器に、採取した果実を入れて速達で郵送する。
2. 新鮮な灰色かび病菌胞子を得るため、罹病果実を入れたプラスチック容器を人工気象器（暗黒 10°C 条件）に約 1 週間放置する。プラスチック容器から、胞子形成を確認できる果実をピンセットで注意深く取り出し、素寒天培地がセットされたペトリ皿上でやさしく菌叢に息を吹きかけて胞子を培地上に落とす。その後、24 時間（18°C、ブラックライト）で胞子発芽を促す。素寒天培地を切り分けて、単胞子コロニーを PDB 培地に接種、20°C、150rpm 条件下で培養したものを検体とする。
3. 3 日間培養後、ミキサーで摩砕して菌糸懸濁液を得る。
4. マイクロプレート法 :
所定濃度の（0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 及び 3 $\mu\text{g a. i.}/\text{ml}$ ）フェンヘキサミドを含有した PDB 培地を 140 μl /穴滴下した 96 穴マイクロプレートを準備する。
5. 菌糸懸濁液 60 μl をマイクロプレートに滴下し、ゆっくりと振とうさせて 20°C・3 日間培養する。その後、プレートリーダーを用いて 620 nm の吸光度から、 EC_{50} を計算する。

サンプル採取は別方法として綿棒でも可能で、滅菌した綿棒で発病果実の表面をこすり付けて（果実ごとに 1 綿棒）別包装で研究室に送付する。研究室では、綿棒に付着した胞子を培地に直接接種して、*Botrytis* 個体群を得る。その後は同様の方法。

原本: BOTRCI microtiter monitoring method BCS 2006 V1

http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/botrci-microtiter-monitoring-method-bcs-2006-v1.pdf?sfvrsn=7d9a419a_4