メロンえそ斑点ウイルス 3 系統の 3 種 ELISA 法による 検出と日本における発生分布

松尾 和敏*

Kazutoshi MATSUO* : Detection of Three Strains of Melon Necrotic Spot Virus by
Three ELISA Procedures and Their Distribution in Japan

Abstract

Three strains of melon necrotic spot virus, NH strain (MSNV-NH), NK strain (MSNV-NK) and S strain (MNSV-S), were detected by direct double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA), non-precoated indirect ELISA (Np-I-ELISA) and precoated indirect double antibody sandwich ELISA (P-I-ELISA) using the respective antiserum. The three methods of ELISA using these homologous antisera proved to be applicable for discriminating between healthy and infected melon (*Cucumis melo* L.), with detection end points ranging from 10^{-4} – 10^{-5} dilution of leaf extracts and $0.01 \mu\text{g/ml}$ of purified preparations. On the other hand, in heterologous reactants, the absorbance values on MNSV-NH and MNSV-NK, both were serologically identical, were almost the same as those in homologous reactants by the three methods of ELISA, and the two strains could be detected reciprocally with each heterologous antiserum. The two strains of serotype N and the strain of serotype S (MNSV-S) could be reciprocally detected by Np-I-ELISA, therefore Np-I-ELISA seemed to be the most useful for the diagnosis of field samples. However, the absorbance values on the serotype N strains and the serotype S strain in heterologous reactants by DAS-ELISA and P-I-ELISA were considerably lower than those in homologous reactants. Thus, two types of antisera to serotype N and serotype S were indispensable for the diagnosis of field samples by these two methods. Nevertheless, the two methods could distinguish the two serotypes of MNSV. All isolates of MNSV collected from various melon-cultivating areas in Japan were serotype N, MNSV-NH or MNSV-NK.

(Received April 30, 1992)

Key words: melon necrotic spot virus, strain, serotype, ELISA, melon, distribution.

緒 言

メロンえそ斑点病は 1959 年頃から静岡県で温室メロンに発生し⁴⁾, 1960 年ウイルス病であることが初めて報告された⁶⁾。その後、本病はメロンのハウス栽培の普及に伴って発生地域が拡大し、最近では北海道から沖縄県に至る各地のメロン栽培地で発生が認められ問題となっている^{9,14~16)}。また、海外においてもアメリカ⁵⁾, スウェーデン¹³⁾, オランダ²⁾ およびギリシア¹⁾ などで発生が報告されている。

病原ウイルスであるメロンえそ斑点ウイルス (melon necrotic spot virus, MNSV) は carmovirus

グループに属する直径 30 nm の球状ウイルスであり、前報¹¹⁾ において長崎県で分離した MNSV-NH と MNSV-NK は、静岡県での分離株 (MNSV-S) とはメロン子葉に生じる局部病斑の病徴や全身感染率などの病原性が異なるとともに、寒天ゲル内拡散法による血清試験でスパーを生じ血清学的にも異なる新たな二つの系統であることを明らかにした。

また、本病は発病時期や発病部位によって多様な病徴を発現し^{4,7,9)}, その病徴は *Mycosphaerella melonis* によるつる枯病やキュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, CMV) のラゲナリア系によるモザイク病¹²⁾ などの病徴と酷似しているので、肉眼観察に

* 長崎県総合農林試験場

Nagasaki Agricultural and Forestry Experiment Station, Isahaya, Nagasaki 854, Japan

Table 1. Sources of melon necrotic spot virus isolates collected from various melon-cultivating areas in Japan

Isolate	Locality		Cultivar	Year of collection
	Prefecture	City or town		
Ho-1	Hokkaido	Furano	Sapporo Red	1991
Ho-2	Hokkaido	Furano	Sapporo Red	1991
Ho-3	Hokkaido	Furano	Sapporo Red	1991
Ak-1	Akita	Hachiryu	Ams	1991
Ak-2	Akita	Hachiryu	Ams	1991
Ak-3	Akita	Hachiryu	Ams	1991
Ya-1	Yamagata	Yamagata	Earl's Knight	1989
Ya-2	Yamagata	Tachikawa	? ^{a)}	1991
Ti-1	Chiba	Tomitsu	Andes	1991
Ni-1	Nigata	Maki	Fukamidori	1991
Fi-1	Fukui	Fukui	?	1990
Ai-1	Aichi	Toyoake	Earl's Seinu Spring II	1990
To-1	Tottori	Hawai	Earl's Seinu Summer II	1990
Si-1	Shimane	Hirose	Ams	1991
Si-2	Shimane	Yasuki	Dericy	1991
Fu-1	Fukuoka	Shonai	Earl's Seinu Summer II	1991
Oo-1	Oita	Innai	Earl's Seinu Summer II	1987
Ku-1	Kumamoto	Kosa	Earl's Seinu Summer II	1991
Ku-2	Kumamoto	Ashikita	Quincy	1991
Mi-1	Miyazaki	Sadowara	Crest	1989
Mi-3	Miyazaki	Sadowara	?	?
Mi-4	Miyazaki	Shintomi	Earl's Seinu Spring I	1990
Ok-1	Okinawa	Yomitan	Earl's Seinu Summer III	1990
Ok-2	Okinawa	Yonagusuku	Earl's Seinu Summer III	1990

a) Not clear.

よる診断では防除法がまったく異なるこれらの病害と誤診しやすい。

本研究では、比較的迅速でかつ感度が高いウイルス病の診断法として近年多用されている各種の酵素結合抗体法 (ELISA 法) によって、MNSV 各系統間での血清反応の相違を明らかにし、圃場試料についての MNSV の検定とその系統の判別に本法が利用できるかを検討した。また、わが国各地から採取した分離株の血清型と系統を判別し、その発生分布を明らかにした。

実験材料および方法

供試ウイルスとその増殖 本ウイルスの NH 系 (MNSV-NH), NK 系 (MNSV-NK) および S 系 (MNSV-S) の 3 系統¹¹⁾ とわが国各地から採取した 24 分離株を用いた。MNSV-NH と MNSV-NK は長崎県で分離されたものであり、MNSV-S は静岡県で分離されたものを農業生物資源研究所日比忠明博士より分譲していただき、本研究室で継代保存しているものである。また、供試した各地の分離株は各県の農業試験場

等から分譲を受けた株あるいは送付して頂いた本病の発病株から分離したものである (Table 1)。

各系統ならびに各分離株はメロン (*Cucumis melo* L., 品種アールスセイヌ夏 II) の子葉に汁液接種して増殖し¹¹⁾、供試した。

罹病葉からの粗汁液の調製およびウイルスの純化 接種 4~5 日後に局部病斑が明瞭になったメロン罹病子葉を抗原試料の調製用緩衝液中で磨碎し、二重ガーゼでろ過したのちに同緩衝液で所定濃度に希釈して抗原試料とした。

MNSV の純化は罹病子葉を生葉のまま材料として用いて、古木⁹⁾の方法に準じて行った。

抗 γ -グロブリンの精製 MNSV-NH および MNSV-NK に対する抗血清は本研究室で作製して保存中のもの¹¹⁾ で、力価は重層法でそれぞれ 1,024 倍および 2,048 倍であった。また、抗 MNSV-S 血清は純化ウイルス 2.4 mg を 2 回に分けて家兎に免疫して作製した。その力価は 2,048 倍であった。

抗 γ -グロブリンはこれら抗血清から Clark and Adams⁹⁾の方法により精製し、供試するまで -80°C で

凍結保存した。

酵素標識抗体の調製 精製した γ -グロブリンの1 mgとアルカリフォスファターゼ(Sigma, type VII-S)の2 mgをグルタルアルデヒド1段階法³⁾により結合させた。得られた酵素標識抗体は1%牛血清アルブミンを添加して、供試するまで4°Cで保存した。

ELISA法 (1) 直接二重抗体法(direct double antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA) 本法はClark and Adams³⁾の方法に準じて行い、一次抗体(γ -グロブリン)および酵素標識抗体は前項で記述した方法で調製したものをを用いた。反応の程度はマイクロプレート光度計(Corona, MTP-100)を用いて、波長405 nmでの吸光度(A_{405})を測定して表示した。

(2) 抗原吸着間接法(non-precoated indirect ELISA, Np-I-ELISA) 本法はKoenig⁸⁾の方法に準じて行い、一次抗体(γ -グロブリン)は次のような方法で健全葉成分と反応するものを吸収したのちに供試した。メロンの健全葉を10倍量の0.02 Mリン酸緩衝液, pH 7.4(0.15 M塩化ナトリウム, 0.02%窒化ナトリウム, 0.05% Tween20を含む, PBS-T)中で磨砕し、二重ガーゼでろ過後5,000×g, 5分間遠心分離して得た上清液をPBS-Tでさらに10倍希釈した液で γ -グロブリンの希釈を行った。希釈後、室温下で2時間静置してから用いた。

なお、このとき沈殿物の除去のための遠心分離は行わなかった。また、酵素標識抗体はアルカリフォスファターゼを標識したアフィニティ精製抗体(ヤギ抗ウサギIgG血清, Sigma)を供試した。

(3) 間接二重抗体法(precoated indirect double antibody sandwich ELISA, P-I-ELISA) 本法はKoenig⁸⁾の方法に準じたが、一次抗体(γ -グロブリン)はNp-I-ELISAと同様に健全葉成分と反応するものを吸収したのちに供試した。ただし、健全葉の磨砕ならびに希釈には0.05 M炭酸緩衝液, pH 9.6(0.02%窒化ナトリウムを含む)を用いた。また、二次抗体(γ -グロブリン)および酵素標識抗体はNp-I-ELISAで用いた抗体と同じである。

なお、3種ELISA法で試料の調製に用いた各緩衝液だけの場合の吸光度は、基質添加60分後0.165～0.185、また、120分後0.171～0.203であり、各検定結果はこれらの値を引いて示した。

血清型および系統の判別 血清型はDAS-ELISAにより、N型とS型¹¹⁾の抗体との吸光度の差を利用して判別した。N型の抗体としてはMNSV-NKに対するもの、S型としてはMNSV-Sに対するものをを用い、

供試した γ -グロブリンの濃度は両者とも2 μ g/ml、酵素標識抗体は前者が1,000倍、後者が4,000倍希釈した液であった。なお、本法により血清型の判別が明らかでない分離株については、罹病葉から古木⁴⁾の方法に準じて1回の分画遠心操作を行い部分純化した試料を用いて寒天ゲル内拡散法¹¹⁾で判別した。

系統の判別はメロン子葉における局部病斑型を用いる判別法¹⁰⁾、すなわち第1本葉展開直前のメロン子葉に各分離株をカーボランダム法で汁液接種し、局部病斑の発現までに要する期間やその病徴によって判別した。

実験結果

1. ELISA法での至適検出条件

DAS-ELISAでは供試抗原として3系統の罹病葉と対照とする健全葉のそれぞれ100倍希釈粗汁液を用いて検討し、罹病葉粗汁液に対して十分な反応が得られ、健全葉粗汁液に対して非特異反応が少ない抗体(γ -グロブリン、酵素標識抗体)の濃度を至適条件とした。その結果、MNSV-NHの γ -グロブリン濃度は2 μ g/ml、酵素標識抗体は1,000倍が適当と判断され、MNSV-NKではそれぞれ2 μ g/ml, 2,000倍、MNSV-Sでは2 μ g/ml, 8,000倍と判断された。

Np-I-ELISAではそれぞれの10倍希釈粗汁液を供試抗原として検討した結果、3系統とも γ -グロブリンは1,000倍、酵素標識抗体は2,000倍が至適濃度であった。

P-I-ELISAでも10倍希釈粗汁液を供試抗原として検討したところ、3系統とも1次の γ -グロブリンの至適濃度は1,000倍、2次の γ -グロブリンは1,000倍と判断された。また、酵素標識抗体の濃度は2,000倍を至適条件とした。

2. ELISA法の検出感度

検出感度については純化ウイルス液、罹病葉粗汁液および健全葉粗汁液の10倍段階希釈液を抗原として用い、前項で明らかにした至適検出条件下で検討した。その結果、検出限界は3法とも純化ウイルス液では0.01 μ g/ml、粗汁液では $10^4 \sim 10^5$ 倍で同じであった。

3. MNSV3系統間の相互血清反応

DAS-ELISAにより、MNSV3系統の抗体(γ -グロブリン、酵素標識抗体)を用いて、濃度が10 μ g/mlから0.01 μ g/mlまで10倍段階希釈した3系統の純化ウイルス液をそれぞれに検出した結果、抗体と抗原がhomologousな場合もheterologousな場合もすべて反応した。しかし、Fig. 1に示したように抗原と抗体

Fig. 1. Detection of three strains of melon necrotic spot virus (MNSV) in purified preparations by direct double antibody sandwich ELISA using homologous and heterologous to (a) NH strain (MNSV-NH), (b) NK strain (MNSV-NK) and (c) S strain (MNSV-S).

Fig. 2. Detection of three strains of melon necrotic spot virus (MNSV) in crude extracts (1/100 dilution) from infected melon leaves by direct double antibody sandwich ELISA using homologous and heterologous antisera to NH strain (MNSV-NH), NK strain (MNSV-NK) and S strain (MNSV-S).

Fig. 3. Detection of three strains of melon necrotic spot virus (MNSV) in purified preparations (1 μ g/ml) by three methods of ELISA (DAS: direct double antibody sandwich ELISA, Np-I: non-precoated indirect ELISA and P-I: precoated indirect ELISA). : NH strain (MNSV-NH), : NK strain (MNSV-NK), : S strain (MNSV-S).

の組合せによって反応の程度に明らかな差が認められ、MNSV-NHとMNSV-NKに対する抗体を用いた場合、これら2系統間ではheterologousな場合もhomologousな場合とほぼ同じ吸光度を示したが、これら2種類の抗体でMNSV-Sを検出すると、約6分の1の吸光度であった。一方、MNSV-Sに対する抗体を用いた場合、heterologousなMNSV-NHとMNSV-NKはhomologousなMNSV-Sの2分の1程度の吸光度を示した。

また、それぞれの系統のメロン罹病葉粗汁液を用いて検討した結果、Fig. 2に示すように純化ウイルス液を用いた試験結果と同様に、抗原と抗体の組合せによって反応の程度に差が認められた。

Np-I-ELISAでも、抗体と抗原がheterologousな場合もhomologousな場合もすべて反応し、Fig. 3に示

Table 2. Serotype and strain of melon necrotic spot virus (MNSV) isolates distinguished by direct double antibody sandwich ELISA and lesion type

Isolate	Antiserum ^{a)}		Ratio of absorbance values ^{c)}	Serotype	Strain ^{d)}
	Type N	Type S			
Ho-1	1.315 ^{b)}	0.502	2.62	N	MNSV-NK
Ho-2	0.670	0.677	0.99	N ^{e)}	MNSV-NH
Ho-3	1.256	0.537	2.39	N	MNSV-NK
Ak-1	1.089	0.425	2.56	N	MNSV-NK
Ak-2	0.980	0.385	2.55	N	MNSV-NK
Ak-3	1.313	0.445	2.95	N	MNSV-NK
Ya-1	0.687	0.293	2.34	N	MNSV-NK
Ya-2	1.916	0.892	2.15	N	MNSV-NH
Ti-1	1.806	0.944	1.91	N	MNSV-NH
Ni-1	1.132	0.420	2.70	N	MNSV-NK
Fi-1	1.172	0.459	2.55	N	MNSV-NK
Ai-1	2.200	0.978	2.25	N	MNSV-NH
To-1	1.492	0.826	1.81	N	MNSV-NH
Si-1	0.836	0.342	2.44	N	MNSV-NK
Si-2	0.738	0.346	2.13	N	MNSV-NK
Fu-1	1.014	0.359	2.82	N	MNSV-NK
Oo-1	1.498	0.596	2.51	N	MNSV-NK
Ku-1	0.975	0.328	2.97	N	MNSV-NK
Ku-2	0.702	0.248	2.83	N	MNSV-NK
Mi-1	0.682	0.208	3.29	N	MNSV-NK
Mi-3	2.355	0.775	3.04	N	MNSV-NH
Mi-4	0.244	0.110	2.22	N	MNSV-NK
Ok-1	1.526	0.450	3.39	N	MNSV-NK
Ok-2	1.472	0.530	2.78	N	MNSV-NK
MNSV-NH	2.017	0.774	2.61	N	
MNSV-NK	0.599	0.195	3.07	N	
MNSV-S	0.375	0.983	0.38	S	

a) Type N : Antiserum to MNSV-NH, Type S : Antiserum to MNSV-S.

b) Absorbance value at 405 nm, A_{405} .c) A_{405} obtained against antiserum of type N/ A_{405} obtained against antiserum of type S.

d) Distinction by lesion type on melon cotyledons.

e) Distinction by double diffusion test in agar gel.

すように DAS-ELISA に比べ heterologous な場合の吸光度の差がきわめて小さく, MNSV-NH と MNSV-NK に対する抗体を用いた場合は 3 系統ともほとんど同じ吸光度を示した。

P-I-ELISA では DAS-ELISA と同様な検出パターンを示したが, heterologous な場合の吸光度の差が DAS-ELISA に比べ小さい傾向にあり, MNSV-S に対する抗体を用いて検出した場合は 3 系統ともほとんど同じ吸光度を示した。

4. 各地から採取した分離株の血清型と系統の判別

24 分離株の血清型は DAS-ELISA による N 型と S 型の血清型間の吸光度の差を利用して検討した。その結果, Table 2 に示したとおり分離株 Ho-2 を除く 23 株は N 型抗体と S 型抗体を用いた場合の吸光度の比

から, 明らかに N 型と判断された。しかし, Ho-2 は 2 血清型の抗体に対してほぼ同じ吸光度を示し判定不能であったので, 寒天ゲル内拡散法で検討したところ, N 型と判明した。

次に, メロン子葉における局部病斑型によって系統の判別を行った結果, 24 分離株中 18 株は MNSV-NK, 6 株が MNSV-NH であり, わが国ではこれら 2 系統が混在して発生していた。

考 察

DAS-ELISA, Np-I-ELISA および P-I-ELISA の 3 種類の ELISA 法により, MNSV-NH, MNSV-NK および MNSV-S の 3 系統とそれらに対する抗体を用いて相互に検出試験を行い, ELISA 法が MNSV の診断

や系統判別に利用できるかを検討した。その結果、抗原と抗体の組合せが homologous な場合、3 法とも MNSV の 3 系統の検出限界は純化ウイルスでは 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 、粗汁液では $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 倍できわめて鋭敏であり、圃場試料の病原ウイルスの検定に十分利用できることと判断された。また、MNSV の 3 系統のウイルスと抗体を heterologous に組合せて検出を行うと、血清型が同じ MNSV-NH と MNSV-NK は 3 法のいずれでも heterologous な場合も homologous な場合とほぼ同様な反応をして相互に検出が可能であった。しかし、血清型が N 型のこれら 2 系統と異なる S 型の MNSV-S は、DAS-ELISA と P-I-ELISA により heterologous な組合せで検出を行うと、両者とも homologous な場合に比べて吸光度が大きく低減するので、検定試料のウイルス濃度が低い場合、異なる血清型の抗体を用いて検定するとこれらを検出できないおそれがある。したがって、DAS-ELISA と P-I-ELISA による圃場試料についての検定では、N 型と S 型の両血清型に対する 2 種類の抗体を用いる必要があるが、両 ELISA 法では本ウイルスの血清型の判別が可能である。

一方、Np-I-ELISA では、Koenig⁸⁾ も報告しているように DAS-ELISA と P-I-ELISA に比べて血清型間の反応差が小さく、MNSV の 3 系統間の抗体と抗原が heterologous な場合も homologous な場合とほぼ同様に検出できた。したがって、Np-I-ELISA は 1 種類の抗体だけを用意すれば本ウイルスの 3 系統が検出できることから、他の 2 種の ELISA 法より簡便であり、圃場試料が MNSV であるかどうかの検定法として有用であると思われる。しかし、本ウイルスの 3 系統の判別にはいずれの方法も不可能であった。

MNSV の系統はメロン子葉における局部病斑型によって判別できる¹⁰⁾ が、MNSV-NH と MNSV-S は病斑が類似しているため接種条件によっては判別しにくい病斑を生じる。したがって、まず DAS-ELISA における血清型間の反応特異性を利用して、N 型系統 (MNSV-NH, MNSV-NV) と S 型系統 (MNSV-S) に分け、次いで、N 型系統株をメロン子葉に接種して局部病斑型で判定すれば、より明確に系統の判別ができると考える。

本研究では、この方法によってわが国各地から採取した MNSV 分離株の系統判別を行ったところ、MNSV-S は検出されず、MNSV-NH と MNSV-NK が検出され、血清型はすべて N 型であった。この結果から、最近わが国に発生している MNSV は MNSV-

NH と MNSV-NK が主体であり、また、これらの発生分布に一定の傾向は認められず、各地に混在して発生していると思われた。MNSV-S は温室栽培のメロンから最初に分離されたものであり、温室栽培では本病の発生後、栽培ベッドを蒸気消毒し、種子は確実に無病な株から自家採取して用いるなど、本ウイルスの防除が徹底的に実施されたことにより、MNSV-S は静岡県から他地域へ広がることがなかったと思われる。一方、本実験で系統の判定を行った各地からの分離株は、すべて血清型 N 型の系統であったが、本病に対して感受性の高いハウス栽培のアールスメロン系品種からおもに分離されている。これらの品種はハウス栽培の普及に伴って全国に広がっており、これらの種苗の移動が N 型系統の全国的な分布に関与しているとも考えられる。

また、DAS-ELISA や P-I-ELISA により血清型が異なる系統を検出した場合、S 型の抗体では homologous あるいは heterologous な組合せ間には顕著な吸光度の差は認められなかったが、N 型の抗体では heterologous な組合せのときは homologous のときに比べて吸光度に大きな差が認められた。この結果から、MNSV の血清型 N 型は S 型とは異なる抗原決定基をもった S 型の変異株ではないかと推定されるので、MNSV の抗原解析は本ウイルスの系統の分類上検討すべき課題と考えられる。

今後、各系統に対するモノクローナル抗体の作製により抗原決定基の解析を行い、各系統に特異的なモノクローナル抗体や 3 系統にすべて反応するモノクローナル抗体が作製されれば、さらに的確で迅速な MNSV の検出や系統判別が可能になるとと思われる。

なお、本研究を行うにあたり、農業生物資源研究所日比忠明博士には MNSV-S を分譲いただき、各県農業試験場等の関係機関の方々には MNSV の分離株および本病の発病株を送付していただいた。また、佐賀大学教授佐古宣道博士ならびに長崎県総合農林試験場太田孝彦博士には数々のご助言と本校のご校閲をいただいた。ここに記して厚くお礼申し上げる。

摘 要

メロンえそ斑点ウイルス (MNSV) の NH 系 (MNSV-NH)、NK 系 (MNSV-NK) および S 系 (MNSV-S) の 3 系統とこれらに対する抗体を用いて、直接二重抗体法 (DAS-ELISA)、抗原吸着間接法 (Np-I-ELISA) および間接二重抗体法 (P-I-ELISA) の 3 種類の酵素結合抗体法 (ELISA 法) により、3 系統の

ウイルスの検出をそれぞれ試みた。抗原と抗体の組合せが homologous な場合、3 法とも MNSV の 3 系統の検出限界は純化ウイルスでは $0.01 \mu\text{g/ml}$ 、メロン罹病葉の粗汁液では $10^4 \sim 10^5$ 倍できわめて鋭敏であり、健全と罹病メロンの判別が可能であった。一方、抗原と抗体の組合せが heterologous な場合、血清型が同じ MNSV-NH と MNSV-NK 間では、3 法のいずれでも homologous な場合とほぼ同じ吸光度を示し、相互に検出することができた。また、血清型が N 型のこれら 2 系統と異なる S 型の MNSV-S 間では、Np-I-ELISA による検出で血清型間の反応差が小さく 3 系統相互に

検出することが可能であり、本法は圃場試料の検定法として最も有用であった。しかし、DAS-ELISA と P-I-ELISA では、血清型が異なると heterologous な場合は homologous な場合に比べて吸光度が大きく低減したため、圃場試料の検定では、N 型と S 型の両血清型に対する 2 種類の抗体を用いる必要性が認められた。しかしながら、両 ELISA 法では本ウイルスの血清型の判別ができるという利点があった。わが国各地から採取した MNSV の 24 分離株は、血清型がすべて N 型で、MNSV-S は検出されず、MNSV-NK 18 株と MNSV-NH 6 株が各地に混在して検出された。

引用文献

1. Avgelis, A.D. (1989). Watermelon necrosis caused by a strain of melon necrotic spot virus. *Plant Pathology* 38 : 618-622.
2. Bos, L., van Dorst, H.J.M., Huttinga, H. and Maat, D.Z. (1984). Further characterization of melon necrotic spot virus causing severe disease in glasshouse cucumbers in the Netherlands and its control. *Neth. J. Pl. Path.* 90 : 55-69.
3. Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* 34 : 475-483.
4. 古木市重郎 (1981). メロンえそ斑点病の伝染病学的研究. 静岡農試特別報告 14 : 1-94.
5. Gonzalez-Garza, R., Gumpf, D.J., Kishaba, A.N. and Bohn, G.W. (1979). Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of melon necrotic spot virus. *Phytopathology* 69 : 340-345.
6. 岸 國平 (1960). マスクメロンのバイラス病に関する研究 俗称“点々病”の病原について. 日植病報 25 : 237-238 (講要).
7. 岸 國平 (1966). メロンえそ斑点病. 日植病報 32 : 138-144.
8. Koenig, R. (1981). Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* 55 : 53-62.
9. 松尾和敏 (1991). メロンえそ斑点病の発生生態と防除に関する研究 第1報 発生分布と発生様相. 長崎総農林試研報 (農業) 19 : 1-21.
10. 松尾和敏 (1992). メロンえそ斑点病の発生生態と防除に関する研究 第2報 媒介菌の同定と病原ウイルスの性状. 長崎総農林試研報 (農業) 20 : 1-40.
11. Matsuo, K., Kameya-Iwaki, M. and Ota, T. (1991). Two new strains of melon necrotic spot virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 57 : 558-567.
12. 松尾和敏・早田栄一郎・馬場重博・太田孝彦 (1991). 長崎県のハウスメロンにおけるキュウリモザイクウイルス-ラゲナリア系によるモザイク病の発生. 九病虫研会報 37 : 32-34.
13. Ryden, K. and Persson, P. (1986). Melon necrotic spot—a new virus disease in Sweden. *Vaxtskyddsnotiser* 50 : 130-132.
14. 斉藤泰彦・藤巻伸一・加茂川良弘・小島 誠 (1989). 新潟県におけるメロンえそ斑点病の発生. 北陸病虫研報 37 : 27-30.
15. 吉田幸二・根本正康・後藤忠則 (1976). メロンのウイルス病に関する研究; 北海道, 東北におけるメロンえそ斑点病の発生. 日植病報 42 : 93 (講要).
16. 吉田幸二・後藤忠則・根本正康・土崎常男 (1980). 北海道のメロン (*Cucumis melo* L.) より分離された 5 種類のウイルス. 日植病報 46 : 339-348.