

## التخلص من بعض فيروسات البطاطا باستخدام تقنيات العلاج الحراري وزراعة أطراف البراعم

مثنى عكيدي المعاضيدي، ميسر مجيد جرجيس وزبير نوري سلمان  
مركز إباء للأبحاث الزراعية، ص.ب. 39094، أبو غريب، بغداد، العراق.

### الملخص

المعاضيدي، مثنى عكيدي، ميسر مجيد جرجيس وزبير نوري سلمان. 2001. التخلص من بعض فيروسات البطاطا باستخدام تقنيات العلاج الحراري وزراعة أطراف البراعم. مجلة وقاية النبات العربية. 19: 35-39.

أجريت تجربتان مختبريتان منفصلتان لدراسة كفاءة العلاج الحراري في التخلص من بعض فيروسات البطاطا المهمة. اعتمد في إحداهما تعريض أربعة مجاميع من شتلات بطاطا صنف ديزيرية مصابة بفيروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV)، فيروس البطاطا Y (PVY)، فيروس البطاطا X (PVX) وفيروس البطاطا S (PVS) نماء على وسط غذائي صناعي داخل أنابيب اختبار لدرجات حرارة مرتفعة (40 °م) ومثالية (25 °م) لمدة 4 ساعات بشكل متبادل وبالتعاقب لفترة 15 يوماً. أما في التجربة الأخرى فقد استخدمت نموات خضريه ناتجة عن درنات مصابة بالفيروسات أنفة الذكر مزروعة في أصص وحضنت على درجة حرارة ثابتة (37 °م) للفترة نفسها (15 يوماً). أخذت أطراف البراعم (3-4 مم) من هذه النباتات لأغراض الزراعة النسيجية والحصول على نباتات بطاطا خالية من الفيروسات الأربعة. بينت النتائج إمكانية تقليل الإصابة بهذه الفيروسات بنسبة 100، 100، 100 و 91.67%، على التوالي عند استخدام طريقة الحرارة المتبادلة، في حين كانت النسبة 85، 82.5، 82.5 و 77.5% عند تحضين النباتات على درجة حرارة ثابتة 37 °م. وقد أظهر الصنف ديزيرية تحملاً حرارياً عالياً، إذ بلغت نسبة البقاء للشتلات بعد إجراء المعاملة 91.25%. وبعتماد تقنية اليزا في تحديد خلو النباتات الناتجة من الإصابة الفيروسية، تبين أن تعريض شتلات البطاطا لدرجات الحرارة المتبادلة قبل أخذ أطراف البراعم منها للإكثار كان أفضل من تحضين النباتات على درجة الحرارة الثابتة لإنتاج نباتات بطاطا خالية من الفيروسات المهمة والمستحصية منها بوجه خاص مثل فيروس البطاطا S.

كلمات مفتاحية: بطاطا، فيروسات، علاج حراري، زراعة نسيجية، استئصال.

### المقدمة

متبادلة وبشكل متعاقب ولكن أربعة من أصل الستة أصناف نفسها عند استخدام درجات حرارة ثابتة. كما أشاروا إلى أهمية الصنف في الاستجابة للمعاملات الحرارية سواءً من حيث نسبة استئصال الفيروس أو تحمل الصنف لدرجات الحرارة ونسبة بقاء الدرنات بعد المعاملة الحرارية.

هدف البحث إلى دراسة إمكانية الحصول على نباتات بطاطا صنف ديزيرية خالية من الإصابة بالفيروسات المهمة والشائعة عن طريق تعريض شتلات بطاطا نسيجية ونباتات مصابة بالفيروسات، فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا X، فيروس البطاطا S أو فيروس البطاطا Y لدرجات حرارة ولفترات معينة، كوسيلة للتخلص من هذه الفيروسات في الشتلات النسيجية.

### مواد البحث وطرقه

#### 1. المادة النباتية

حضرت النباتات التي استخدمت في الزراعة النسيجية بهدف إجراء عملية العلاج بدرجات حرارة متبادلة عن طريق زراعة أربعة مجاميع من الدرنات المصابة بالفيروسات، فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y، فيروس البطاطا X أو فيروس البطاطا S، تم الحصول على هذه الدرنات من نباتات مصابة بهذه الفيروسات من الموسم السابق. وتم التأكد من إصابة هذه الدرنات عن طريق اختبار عينات ورقية قمية منها باتباع اختبار الامتصاص المناعي للأنزيم

يتعرض محصول البطاطا للإصابة بالعديد من الفيروسات في جميع مناطق زراعته في العالم والتي تنقل معظمها عبر الدرنات المستخدمة كتقاوي في المواسم اللاحقة مسببة تدهوراً في الإنتاج ودرجات متفاوتة اعتماداً على صنف البطاطا المزروع وسلالة الفيروس (4، 6، 13). لذا بات من الضروري إيجاد أو تطوير تقنيات فعالة تهدف إلى التخلص من الإصابة بالفيروسات في تقاوي البطاطا، وعند اقترانها مع طرق تصديق البذور الأخرى يمكن إنتاج تقاوي بطاطا عالية الجودة وخالية من الإصابة الفيروسية.

يعد الاستخدام الأول لتقنية زراعة الطرف المرستيمي من قبل Martin و Morel (12) في إنتاج نباتات أضاليا (Dahlia) خالية من الفيروس وكذلك المعاملة الحرارية لدرنات البطاطا من قبل الباحث Kassanis (9) لتخليصها من الإصابة بفيروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV) دافعاً للكثير من الباحثين لتبني هذا الاتجاه وبشكل واسع للحصول على نباتات خالية من الإصابة الفيروسية (1، 7، 8، 10، 11، 16، 18، 20).

أشار Quak (15) إلى صعوبة استئصال الفيروسين، فيروس البطاطا X (PVX) وفيروس البطاطا S (PVS) عن طريق زراعة الطرف المرستيمي والعلاج الحراري، على التوالي، في حين تمكن آخرون (17) من الحصول على نباتات بطاطا خالية من فيروس البطاطا S ولخمس من أصل ستة أصناف عند استخدام درجات حرارة

المرتبطة (ELISA) (3) بعد تثبيتها على وسط عضوي (Peat moss) معقم في أطباق بلاستيكية قياس  $6 \times 28 \times 53$  سم.

## 2. المعاملات الحرارية

أ. نظام التبادل الحراري: تمت زراعة الدرنات في غرفة نمو تحت ظروف درجة حرارة  $22-28^{\circ}\text{C}$  وشدة إضاءة 1000 لوكس ولفترة شهرين قبل فصل أجزاء خضره بطول 5-10 مم حاوية على برعم إبطي واحد. زرعت الأجزاء المذكورة داخل أنابيب اختبار ذات قطر 2 سم وطول 15 سم حاوية على وسط غذائي صناعي، كما نشر سابقاً (14). بعد ثلاثة أسابيع من التحضين تحت ظروف 14 ساعة تعريض يومي لشدة إضاءة 1000 لوكس ودرجة حرارة تتراوح  $25-28^{\circ}\text{C}$ ، نقلت أنابيب الزراعة الحاوية على شتلات البطاطا إلى حاضنات نمو بهدف تعريضها لدرجات حرارة  $40^{\circ}\text{C}$  لفترة 4 ساعات تليها 4 ساعات على درجة حرارة  $25^{\circ}\text{C}$  وبشكل متبادل ومتعاقب لمدة 15 يوماً.

ب. نظام الحرارة الثابتة: زرعت مجاميع درنات البطاطا آنفه الذكر المصابة بالفيروسات، فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y، فيروس البطاطا X أو فيروس البطاطا S وبشكل منفصل في خليط تربة معقمة في أصص بلاستيكية ذات قطر 15 سم وحفظت بدرجات حرارة  $28^{\circ}\text{C}$  داخل بيت بلاستيكي محكم الغلق. عرضت النباتات بعد بزوغها فوق سطح التربة لدرجة حرارة ثابتة ( $37^{\circ}\text{C}$ ) في ظلام للتحفيز على فقدان اليخضور وللفترة السابقة نفسها (15 يوماً).

## 3. زراعة أطراف البراعم

زرعت في الوسط الغذائي المذكور سابقاً أطراف البراعم (بطول 3-4 مم) التي أخذت من النباتات المعرضة إلى كل من درجات الحرارة المتبادلة والثابتة، وحضنت لفترة ثلاثة أسابيع تحت ظروف درجات الحرارة وشدة الأضاءة التي تمت الإشارة إليها آنفاً في زراعة شتلات البطاطا الأصل. اختبرت الشتلات الناتجة بشكل انفرادي مصلياً باتباع اختبار اليزا عندما تطورت النموات الخضرية والجزرية لها وأصبحت ذات طول 12-15 سم، وأعيد اختبار العينات التي أظهرت تفاعلاً سالباً مرتين (إذ تمت عملية إعادة زراعتها على الوسط الغذائي مرتين، وأجريت عملية اختبارها في كل مرة) وبذلك تكون قد اختبرت ثلاث مرات للتأكد من سلامتها، تلاه نقل هذه الشتلات إلى تربة معقمة بالفورمالين (5) في أصص ذات قطر 10 سم داخل بيت زجاجي وغطيت بغطاء بلاستيكي بهدف الحفاظ على رطوبة نسبية عالية وتحت درجات حرارة وشدة الإضاءة مشابهة لتلك الخاصة بالزراعة النسيجية، واستمرت هذه الظروف لفترة 15 يوماً بعد النقل (فترة أقلمة)، تم رفع الغطاء البلاستيكي بعد انقضاء فترة الأقلمة لكي تأخذ الشتلات طريقها في النمو الطبيعي.

## 4. الأمصال المضادة المستخدمة

تم في هذا البحث استخدام أمصال مضادة عديدة الكلون للفيروسات، فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y، فيروس البطاطا X وفيروس البطاطا S من إنتاج شركة Bioreba، سويسرا.

## النتائج

### 1. التحمل الحراري ونسبة البقاء

حددت نتائج التحمل الحراري ونسبة البقاء سواء كانت خاصة بصنف البطاطا أو المادة النباتية المستخدمة في الدراسة، ليس على القابلية لتحمل المعاملة الحرارية فقط بل كذلك على قابلية النموات الباقية على إعطاء براعم نابثة. وبناءً على عدد البراعم النامية المتطورة والتي عزلت من تلك الأفراد الباقية، حسبت نسبة البقاء والقدرة على التحمل الحراري، فقد أظهر الصنف ديزيرية تحملاً حرارياً عالياً بشكل عام على مستوى كافة المعاملات، حيث تراوحت نسبة البقاء للبراعم النابتة بين 90 - 100 %، كما يلي:

أ. نظام التبادل الحراري: أظهرت النتائج أن نسبة بقاء البراعم النابتة بلغت 91.25 % عند معاملة الشتلات النسيجية المصابة بالفيروسات، فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y، فيروس البطاطا X، أو فيروس البطاطا S لدرجات حرارة بشكل متبادل، في حين بلغت نسبة البقاء للشتلات النسيجية التي عرضت لهذه المعاملة الحرارية بشكل مباشر 84 %، كما تم الحصول على 146 شتلة بطاطا من أصل 120 شتلة (جدول 1).

ب. نظام الحرارة الثابتة: أوضحت البيانات في الجدول 2 أن نسبة بقاء البراعم النابتة والمزولة من نباتات البطاطا التي عرضت لدرجة حرارة ثابتة  $37^{\circ}\text{C}$  وللفترة نفسها التي استخدمت في العلاج الحراري السابق قد بلغت 97.2 %، إلا أنه من الجدير بالذكر، أن نسبة بقاء نباتات البطاطا التي عرضت لهذه المعاملة الحرارية بشكل مباشر كانت أقل من تلك النسبة الخاصة بالشتلات النسيجية للمعاملة السابقة، إذ بلغت 76.6 %، ورغم ذلك فقد أمكن الحصول على 174 شتلة بطاطا من أصل 60 نبات بطاطا معرض لدرجة حرارة ثابتة وللفترة نفسها. امتازت أغلب شتلات البطاطا الناتجة بنمو جذري وخضري جيد عند نهاية فترة المعاملة الحرارية، إذ بلغ معدل طول الشتلات بين 10-15 سم واحتوت الواحدة منها على 4-5 براعم إبطية.

### 2. تأثير المعاملات الحرارية في الحصول على نباتات بطاطا خالية

#### من الإصابة بالفيروسات

أظهرت دراسة المعاملات الحرارية المختلفة لشتلات ونباتات البطاطا صنف ديزيرية النتائج التالية :

أ. نظام التبادل الحراري: أدت عملية تعريض شتلات البطاطا الحاوية على فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y، فيروس

فيروس البطاطا X أو فيروس البطاطا S من أصل 120 شتلة مصابة بهذه الفيروسات (جدول 1).

ب. نظام الحراري الثابتة: اختبرت 40 شتلة (لكل فيروس وبشكل منفصل) من تلك الشتلات الناتجة عن زراعة البراعم بعد انتهاء المعاملة بالحرارة الثابتة 37 °س بالاعتماد على الاختبار المصلي في تقييم الإصابة الفيروسية، وأوضحت الدراسة أن نسبة إزالة الفيروسات، فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y، فيروس البطاطا X أو فيروس البطاطا S في هذه المعاملة كانت أقل من سابقتها إذ بلغت 85، 82.5، 82.5 و 77.5%، على التوالي. وبذلك تم التمكن من الحصول على 161 شتلة بطاطا سليمة من أصل 60 نبات بطاطا مصاب بالفيروسات آنفة الذكر عند تعريضها لدرجة حرارة ثابتة 37 °س لفترة 15 يوماً (جدول 2).

البطاطا X أو فيروس البطاطا S لدرجات حرارية معتدلة (25 °س) ومرتفعة (40 °س) وبشكل متبادل وبالتعاقب لفترات محددة إلى نتائج إيجابية في اختزال نسبة الإصابة أو إزالتها (جدول 1)، وبدى ذلك واضحاً بالنسبة للفيروسات، فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y، فيروس البطاطا X بعد 15 يوماً من التحضين، إذ بلغت نسبة الشتلات التي اختزلت فيها الإصابة بهذه الفيروسات 100% في حين بلغت 91.69 % بالنسبة للشتلات المصابة بفيروس البطاطا S حيث أظهر الاختبار المصلي تفاعلاً سالباً بالنسبة لكافة الشتلات الناتجة في نهاية هذه المعاملة باستثناء ثلاثة شتلات من أصل 36 مصابة بفيروس البطاطا S. وبهذا يكون قد تم الحصول على 143 شتلة بطاطا خالية من الإصابة بالفيروسات، فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y،

جدول 1. تأثير درجات الحرارة المتبادلة في بقاء شتلات البطاطا النسيجية وتثبيت فيروسات البطاطا: فيروس التفاف الأوراق (BLRV)، فيروس البطاطا Y، فيروس البطاطا X أو فيروس لبطاطا S.

Table 1. Effect of alternating temperatures on the Survival of potato plantlets in tissue culture and the elimination of the viruses PLRV, PVY, PVX, or PVS.

تثبيت الفيروس % Elimination	عدد الشتلات المصابة/ عدد الشتلات المختبرة No. of plantlets tested positive by ELISA/ Total No. of plantlets tested	عدد البراعم النابتة/ عدد البراعم المزروعة No. of growing Buds/ No. of buds used in tissue culture after treatment	عدد الشتلات الباقية/ عدد الشتلات المعاملة No. of survived plantlets/ No. of treated plantlets	الفيروس Virus
100	36/0	40/36	30/30	فيروس التفاف أوراق البطاطا Potato leaf roll virus (BLRV)
100	36/0	40/36	30/21	فيروس البطاطا Y Potato virus Y (PVY)
100	38/0	40/38	30/30	فيروس البطاطا X Potato Virus X (PVX)
91.67	36/3	40/36	30/20	فيروس البطاطا S Potato virus S (PVS)
97.95	146/3	160/146	120/101	المجموع Total

جدول 2. تأثير درجة حرارة ثابتة (37 °س) وظلام على بقاء نباتات البطاطا وتثبيت الفيروسات: فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y، فيروس البطاطا X أو فيروس البطاطا S في الزراعة النسيجية.

Table 2. Effect of incubation at constant temperature (37 °C) and darkness on the survival of potato plant and elimination of potato viruses PLRV, PVY, PVX, or PVS in tissue culture.

تثبيت الفيروس % Elimination	عدد الشتلات السليمة/ عدد الشتلات المختبرة No. of plantlets tested negative/ Total No. of plantlets tested	عدد البراعم النابتة/ عدد البراعم المزروعة No. of growing Buds/ No. of buds used in tissue culture after treatment	عدد النباتات الباقية/ عدد النباتات المعاملة No. of survived plants/ No. of treated plants	الفيروس Virus
85	40/34	50/47	15/13	فيروس التفاف أوراق البطاطا Potato leaf roll virus (BLRV)
82.5	40/33	43/42	15/10	فيروس البطاطا Y Potato virus Y (PVY)
82.5	40/33	46/45	10/10	فيروس البطاطا X Potato Virus X (PVX)
77.5	40/31	40/40	20/13	فيروس البطاطا S Potato virus S (PVS)
81.8	160/131	179/174	60/46	المجموع Total

البطاطا، فيروس البطاطا Y أو فيروس البطاطا X من شتلات بطاطا نسيجية، في حين أشارت دراسة سابقة إلى اعتماد التقنية نفسها في إزالة فيروس البطاطا S فقط (17). كما أشارت دراسات أخرى إلى استخدام طرق مختلفة من المعاملات الحرارية في إزالة فيروسات البطاطا التي شملها البحث (2، 7، 16، 20)، لذا قد تعد هذه الطريقة جيدة للتخلص من فيروس التفاف أوراق البطاطا، فيروس البطاطا Y أو فيروس البطاطا X. وتشير النتائج التي تم التوصل إليها إلى أهمية ضرورة إجراء المزيد من الدراسات التي يمكن عن طريقها تحديد مدى الاستجابة لمثل هذه المعاملات الحرارية والعوامل المؤثرة مثل صنف البطاطا المستخدم، الظروف البيئية، نوع الوسط الغذائي ومحتوياته وحجم الجزء النباتي المستخدم في الزراعة النسيجية.

من المهم أن يؤخذ بعين الاعتبار أن البطاطا لا تتحمل درجات الحرارة العالية، وأن النباتات التي تضمنتها الدراسة كانت مصابة بأحد الفيروسات المستعصية التي يصعب إزالتها (17)، لذلك توفر هذه الدراسة طريقة بديلة لمكافحة الفيروسات والحصول على مادة نباتية تكاثرية خالية من الإصابة الفيروسية، فضلاً عن أنها وسيلة يمكن بواسطتها الحفاظ على نقاوة التركيبة أو البنية الوراثية للنبات.

دللت النتائج أن كلتا الطريقتين كانتا فعاليتين في الحصول على نباتات بطاطا خالية من الفيروس، ولكن نسبة إزالة الفيروس كانت أفضل عند المعاملة بدرجات حرارة متبادلة ومتناوبة، خصوصاً بالنسبة لفيروس البطاطا S الذي يعد من فيروسات البطاطا التي يصعب التخلص منها خلال عمليات العلاج الحراري وأنه يسبب فقداً في حاصل الدرناات يبلغ حوالي 20% (15، 19). تتفق هذه النتيجة مع ماتوصل إليه العديد من الباحثين المهتمين بمجال مكافحة أمراض البطاطا الفيروسية والحد منها (1، 2، 11، 17).

اتضح من هذه الدراسة أن التحمل الحراري لنباتات البطاطا المعرضة لدرجات الحرارة 37°س وظلام بشكل مستمر لفترة 15 يوماً كان أقل من تحمل شتلات البطاطا داخل أنابيب الاختبار عند تعريضها لدرجات حرارة مرتفعة 40°س ومعتدلة 25°س للفترة نفسها، وأنه أمكن الحصول في المعاملة الأولى (نظام التبادل الحراري) على عدد من شتلات بطاطا خالية من الفيروس أكثر من المعاملة الثانية (نظام الحراري الثابتة).

لم تشر الدراسات السابقة المتاحة إلى استخدام معاملات حرارية مشابهة لتلك التي تضمنتها هذه الدراسة في إزالة فيروس التفاف أوراق

### Abstract

Al-Muathidi, M.E., M.M. Jarjess and Z.N. Selman. 2001. Elimination of Some Viruses from Potato Plants by Thermotherapy and Shoot Tip Culture. Arab J. Pl. Prot. 19: 35-39.

Two separate experiments were conducted to study the possibility of producing virus-free tissue cultured plants from sprouts of infected potato plantlets and sprouted tubers (cv. Desiree), by using heat therapy. In the first experiment, four groups of plantlets infected with *Potato leaf roll virus* (PLRV), *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX), and *Potato virus S* (PVS) were exposed to alternating temperatures of 40°C and 25°C for a duration of 4 hours each and for a period of fifteen days. The second experiment involved etiolated shoots incubated at constant temperature of 37 °C for the same period prior to isolation of shoot tips (3-4 mm) for the purpose of producing virus-free plants. Exposing infected potato plantlets to fluctuating temperatures resulted in 100% elimination of PLRV, PVY, PVX and 91.7% of PVS, as determined by ELISA tests. Incubation at a temperature of 37°C resulted in 85, 82.5, 82.5 and 77.5% reduction of infection with the four viruses, respectively. Potato plantlets were able to tolerate high temperatures under the conditions of the experiment with a survival rate of 91.3%. Thus, the use of fluctuating temperature regimes were very effective, compared to constant temperature, in controlling economically important viruses affecting the potato crop, especially PVS.

**Keywords:** Potato, Viruses, Thermotherapy, Tissue culture, Elimination.

**Corresponding author:** Muthana E. Al-Muathidi, IPA Agriculture Research Center, Abou Ghreib, P.O. Box 39094, Baghdad, Iraq.

### References

1. Al-Muathidi, M.O., M.M. Jargess, and R.A. Al-Ani. 1999. Physio and chemotherapy for eradication of Alfalfa Mosaic Virus. IPA J. of Agric. Res., 9(1):103-116.
2. Brown, C.R., S. Kwiatkowski, M.W. Martin and P.E. Thomas. 1988. Eradication of PVS from Potato clones through excision of meristems from *in Vitro*, heat-treated shoot tips. American Potato Journal, 65:633-638.
3. Clark, M. F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34:475-483.
4. deBokx, J.A. and J.P.H. Van der Want. 1987. Viruses of potatoes and seed potato production. Center for

- agricultural publishing and documentation (PUDOC), Wageningen, The Netherland. 259 pp.
5. Hassan, M.A.A. 1986. Interactions between nitrogen fertilizer and partial soil sterilization on the growth and yield of potatoes. A thesis submitted for the degree of doctor of philosophy. University of Reading, UK. 304 pp.
6. Hooker, W.J. 1981. Compendium of potato diseases. The American phytopathological Society, Paul, Minnesota, USA. 125 pp.
7. Kaiser, W.J. 1980. Use of thermotherapy to free potato tubers of alfalfa mosaic, potato leaf roll, and tomato black ring viruses. Phytopathology, 70: 1118-1122.
8. Kaiser, W.J. 1984. Thermotherapy of Russet Burbank potato tubers and plants infected with alfalfa mosaic virus. Plant Disease, 68:887-890.

9. **Kassanis, B.** 1949. Potato tuber freed from leaf roll virus by heat. *Nature* 164:881. Cited by W.J. Kaiser, 1984. Thermotherapy of Russet Burbank potato tubers and plants infected with alfalfa mosaic virus. *Plant Disease*, 68:887-890.
10. **Li, C.** 1990. Meristem culture for elimination of viruses from potato plants. Beijing (People's Republic of China,). CAAS. CIP Region VIII. pp 84-91.
11. **Lozoya-Saldana, H., J.F., Abello and de la R.G. Garica.** 1996. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. *American Potato Journal*, 73:149-154.
12. **Morel, G. and G. Martin.** 1952. Guerison de dahlias atteinte d'une maladie a virus *Comptes rendus des seances de L'Academie des Sciences Paris*, 235:1324-1325.
13. **Mughal, S.M., S., Khalid, T., Shaheen and A. Devaux.** 1988. Detection of potato viruses in Pakistan. Asian Potato Association (APA). Plenary papers and abstracts kunming (People's Republic of China,). pp 189-190.
14. **Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
15. **Quak , F.** 1987. Therapy of individual plants, pp 151-161. In:Viruses of Potatoes and seed- potato production. J.A. De Bokx and J.P.H. Van der Want (Editors). Center for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, The Netherlands.
16. **Sajid, G.M., A. Quraishi and M. Salim.** 1986. Thermotherapy and meristem tip culture of *Solanum tuberosum* for elimination of potato viruses X , S and Y. *Pakistan Journal of Botany*, 18 :249-253.
17. **Saldana, H.L. and W.O. Dawson.** 1982. The use of constant and alternating temperature regimes and tissue culture to obtain PVS-free Potato. *American Potato Journal*, 59:221-230.
18. **Walkey, D.G.A.** 1976. High temperature inactivation of cucumber and alfalfa viruses in *Nicotinea rustica* cultures. *Ann. Appl. Biol.* 84:183-192.
19. **Wetter, C.** 1971. Potato virus S. Descriptions of Plant viruses. C.M.I./ A.A.B. Description, No. 60.
20. **Wright, N.S.** 1988. Assembly, quality control and use of a Potato cultivar collection rendered virus- free by heat therapy and tissue culture. *American Potato Journal*, 65:181-198.