استخدام اختبار اليزا للكشف السريع عن فيروس البطاطا واي (Potato virus Y) في حقول البطاطا في العراق

ميسر مجيد جرجيس
مركز اباء للابحاث الزراعية، ص.ب 39094، بغداد، العراق

الملخص

جرجيس، ميسر مجيد. 2000. استخدام اختبار إليزا للكشف السريع عن فيروس البطاطا واي (Potato virus Y) في حقول البطاطا في العراق. مجلة وقاية النبات العربية. 18: 46-50.

هدفت هذه الدراسة الى استخدام وتطبيق اختبار اليزا (ELISA) للكشف عن فيروس البطاطا واي (Potato virus Y) في حقول البطاطا في العراق وبالذات حقول التقاوي، حيث تم عزل وتعريف فيروس البطاطا واي من نباتات البطاطا المصابة بهذا الفيروس. وقد اعتمد في التشخيص على الأعراض التي يحدثها الفيروس على النباتات الدالة، والعوائل المضيفة، والثباتية في العصير الخام والاختبار المصلي/ السيرولوجي. وقد تمت تنقية الفيروس واستخدم المستحضر النقي في إنتاج المصل المضاد له. بينت النتائج قدرة وكفاءة اختبار اليزا في الكشف السريع والدقيق عن فيروس البطاطا واي حتى لو كان بتراكيز منخفضة. كما أمكن تطبيق اختبار اليزا وبنجاح تام للكشف عن فيروس البطاطا واي في العصير الخام للنباتات المصابة والتي جمعت من حقول البطاطا مما ساعد كثيراً برنامج إنتاج تقاوي البطاطا لتأكيد سلامة وخلو حقول التقاوي من هذا الفيروس من خلال إجراء اختبار وفحص أعداد كبيرة من العينات النباتية وخلال فترة زمنية قصيرة جداً.

كلمات مفتاحية: فيروس البطاطا واي ، اختبار اليزا، تقاوي البطاطا.

المقدمة

يعدّ فيروس البطاطا واي (Potato virus Y) من أهم الفيروسات التي تصيب محصول البطاطا في مناطق مختلفة من العالم، ينتقل هذا الفيروس بالعدوى الميكانيكية وبواسطة حشرات المنّ بالطريقة غير المستمرة (nonpersistent manner) (4، 8، 11، 17). ويعد هذا الفيروس واحداً من أهم الفيروسات التي تصيب محصول البطاطا في العراق (3). كما يعد فيروس البطاطا واي الفيروس الرئيسي على محصول البطاطا نظراً سهولة انتشاره وتأثيره الكبير في خفض الحاصل والذي قد يصل إلى اكثر من 80% أحياناً (8). ويتباين الفقد في الحاصل حسب صنف البطاطا المزروع وسلالة الفيروس السائدة. وقد تؤدي الإصابة بهذا الفيروس إلى تلف كامل للحاصل وبخاصة إذا كانت الإصابة مختلطة مع فيروسات أخرى مثل الإصابة بفيروس البطاطا A، فيروس البطاطا X وفيروس البطاطا S. وقد بينت الدراسات السابقة أن لهذا الفيروس ثلاثة مجاميع من السلالات التي تعد الأكثر أهمية وانتشاراً على محصول البطاطا في العالم وهي: مجموعة السلالات الشائعة (Common Strains (PVY^O))، مجموعة سلالات الخط المنقط (Stipple Streak Strains (PVY^C)) ومجموعة سلالات تنخر العروق (Necrotic Strains (PVY^N)) وتختلف الأعراض التي تسببها هذه السلالات على نباتات البطاطا وتتباين في شدة انتشارها والفقد في الإنتاجية الذي تسببه (9، 13، 19، 22).

لجأ الباحثون إلى استخدام طرائق عديدة للكشف عن الفيروسات ومن أهمها الاختبارات السيرولوجية (5، 7، 14، 15، 21)، ولعل أشهر الاختبارات السيرولوجية هو إختبار اليزا. وقد تمكن باحثون آخرون من تطوير طرائق أخرى تتسم بالدقة والسرعة للكشف عن فيروس البطاطا واي (16، 20، 23). ومن الجدير بالذكر أيضاً أن استعمال الطرائق السيرولوجية قد يخضع أحياناً لبعض التحديدات والتي منها: التركيز المنخفض للفيروسات في النبات المضيف، ووجود بعض المواد الضارة وغير المرغوب بها في المستخلصات النباتية إضافة إلى عدم توافر كميات كبيرة من الأمصال المضادة.

ونظراً لاتساع وزيادة المساحة المزروعة بمحصول البطاطا في العراق في السنوات الأخيرة ولقيام برامج لإنتاج تقاوي البطاطا محلياً، فقد بات من الضروري البحث عن طريقة سريعة لتشخيص الفيروسات تمتاز بالدقة والكفاءة العالية بهدف تقويم عمل برامج إنتاج التقاوي بصورة دقيقة وإنتاج التقاوي وفق المعايير العلمية والقياسية. لذلك فقد تم القيام بهذه الدراسة والتي استهدفت أساساً تكييف وتطبيق اختبار اليزا للكشف عن فيروس البطاطا واي في حقول إنتاج تقاوي البطاطا والذي يعدّ واحداً من أهم الفيروسات التي تحدد إنتاج التقاوي في العراق.

مواد البحث وطرائقه

تشخيص الفيروس وثباتيته في العصير

جمعت عينات من نباتات بطاطا يشك بإصابتها بفيروس البطاطا واي وأجريت العدوى الميكانيكية على نبات الزربيح (*Chenopodium amaranticolor*) الذي يعتبر أحد النباتات الدالة لهذا الفيروس. ومن ثم تم عزل الفيروس من البقع الموضعية المتكونة على الأوراق المعدية لهذا النبات.

وللتعرف على فيروس البطاطا واي، اعتمدت عدة طرق مكملة لبعضها هي: دراسة الأعراض الموضعية والجهازية على بعض النباتات الدالة، ثباتية الفيروس في العصير الخام، والاختبار

السيرولوجي، وقد استخدم في الاختبارات السيرولوجية الأمصال التالية: PVY، PVA، PVS، PVM و PVX وجميع هذه الأمصال من شركة Bioreba.

تنقية الفيروس

أكثرت عزلة الفيروس التي تم الحصول عليها في نباتات التبغ عن طريق إعدائها ميكانيكياً. بعد 2–3 أسابيع من العدوى جمعت الأوراق وقطعت إلى قطع صغيرة، ثم طحنت بمحلول سترات الصوديوم تركيزه 0.1 مولر ودرجة حموضته 7.5، ويحتوي على 0.5% ميركابتوايثانول (2-Mercaptoethanol) وبنسبة 1:4 (أنسجة: محلول منظم). مرر المستخلص خلال طبقتين من قماش الململ (الشاش) ثم مزج الراشح مع نصف حجمه من الكلوروفورم ورج في جهاز هزاز لمدة 20 دقيقة. أجري للمزيج طرد مركزي بطيء على سرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقيقة بالمثقلة من نوع Sorval وباستخدام الرأس الدوار GSA . أجريت للطفاوة المائية/ الرائق عملية طرد مركزي فائق السرعة على سرعة 27000 دورة/دقيقة ولمدة 60 دقيقة باستخدام المثقلة من نوع Beckman والرأس الدوار Spinco 30. تم إعادة تعليق الراسب بإضافة 1–2 مل من محلول منظم البورات تركيزه 0.05 مولر ودرجة حموضته 8.2.

وللحصول على مستحضر للفيروس أكثر نقاوة، كررت عمليتا الطرد المركزي البطيء والسريع لدورة أخرى. ومن ثم تم اذابة الراسب المتحصل عليه بـ 2 مل من محلول منظم البورات ذي التركيز 0.05 مولر ودرجة حموضة 8.2. تم تقدير تركيز الفيروس باستخدام قياس الضوء الطيفي حيث سجلت الكثافة الضوئية (Optical density) على طول موجه مقدارها 260 نانومتر ثم قسم على معامل الانطفاء (Extinction Coefficient) لهذا الفيروس والتي تبلغ قيمته 2.9 (11، 18).

تحضير المصل المضاد

استخدم حيوان مختبري (أرنب) لتحضير المصل المضاد لفيروس البطاطا واي. وقد تم سحب 10 مل من دم الحيوان قبل بدء عملية الحقن بمستحضر الفيروس لغرض استعماله لاحقاً كمصل عياري. وقد جرت عملية حقن مستحضر الفيروس في الأرنب أسبوعياً ولمدة ستة أسابيع وبمعدل 1 مغ في كل حقنة. تم حقن الحقنة الأولى في وريد الأذن ولمرة واحدة فقط، في حين حقنت باقي الحقنات إما في عضلة الفخذ أو تحت الجلد أو الإثنين معاً. وعند إجراء الحقن تحت الجلد وعضلة الفخذ، مزج مستحضر الفيروس مع زيت فرويند غير كامل (Incomplete Freund’s Adjuvant) وبنسبة 1:2. تم سحب الدم بعد مدة أسبوعين من آخر عملية حقن واستمرت عمليات السحب لمدة 13 أسبوعاً. كان يحقن الأرنب حقنات داعمة خلال فترة سحب الدم بمستحضر الفيروس بمعدل حقنة واحدة بعد كل ثلاثة سحبات دم، كانت تعطى بالفخذ أو تحت الجلد.

تم الحصول على الأجسام المضادة من نوع جاماجلوبيولين (IgG) بشكل نقي، ومن ثم ربطها بإنزيم الفوسفاتاز القلوي باستخدام الطريقة الموصوفة سابقاً (10).

وتم تقدير العيارية (Titer) للمصل المضاد المحضر باتباع الطريقة المشار إليها سابقاً (1).

اختبار اليزا

أجري الكشف عن فيروس البطاطا واي في مستحضر الفيروس النقي وكذلك في المستخلص الخام لأوراق نباتات تبغ مصابة وسليمة وذلك بسحق أوراق النباتات في محلول استخلاص منظم فوسفاتي عياريته 0.2 مولر ودرجة حموضته 6. بالإضافة إلى ذلك، تم اختبار 240 عينة من أوراق نباتات البطاطا جمعت عشوائياً من الحقول، و 240 عينة جمعت من أوراق نباتات بطاطا يشك بإصابتها بفيروس البطاطا واي من حقول مختلفة، و 120 عينة جمعت من أوراق نباتات بطاطا نامية في البيت الزجاجي، و 120 عينة أخرى أخذت من نباتات نسيجية (Tissue Culture Plants) مزروعة في أنابيب الزراعة النسيجية و 150 درنة بطاطا محفزة على الإنبات.

تم اختبار جميع العينات السابقة بتقنية اختبار إليزا تبعاً للطريقة الموصوفة مسبقاً من قبل Clark & Adams (10)، وقد استخدمت الأجسام المضادة δ(IgG) بتركيز 1 مايكروغرام /مل والأجسام المضادة المرتبطة بالإنزيم بتخفيف 1/1000. تمت قراءة الأطباق بعد 30 دقيقة من وضع المادة الكاشفة (substrate). ثم قدرت شدة التفاعل على طول موجة 405 نانومتر باستخدام جهاز الطيف الضوئي Pyeunicom.

النتائج والمناقشة

تشخيص الفيروس وثباتيته في العصير

عند إعداء نباتات الزربيح (*Chenopodium amaranticolor*) بالفيروس ظهرت أعراض الإصابة بشكل بقع موضعية بعد 2–4 أيام من العدوى. وقد تم إعادة إجراء العدوى الميكانيكية على النبات نفسه وباستخدام البقع الموضعية كمصدر للإلقاح وقد أمكن الحصول على عزلة نقية من هذا الفيروس. كما ظهرت أعراض البقع الموضعية المتنخرة (Necrotic Local Lesion) على نباتات: الرغيلة (*C. quinoa*) ، المنطاد (*Physalis floridana*) ، وعرف الديك (*Amaranthus retroflexus*). كما ظهرت أعراض جهازية متمثلة بشفافية العروق (Vein clearing) ثم تطورت الى تبرقش على نباتات: التبغ (*N. rustica*) وعنب الذيب (*Solanum nigrum*) .

وبينت نتائج الدراسة أن مميزات الفيروس كانت كالآتي : درجة الحرارة المميتة للفيروس 60–65 °س، ودرجة التخفيف النهائية هي: 10^{-2} -10^{-3} ومدة التعمير في العصير الخام على درجة حرارة الغرفة هي 3–4 أيام. وتتوافق هذه النتائج مع صفات فيروس البطاطا واي الموصوفة سابقاً (3، 8، 11).

بينت نتائج الاختبار السيرولوجي (اختبار إليزا) وجود تفاعل موجب مع المصل المضاد لسلالة تنخر العروق لفيروس البطاطا واي مما يدل على وجود سلالة الفيروس المذكورة (PVY^N) في عصارة النباتات التي تم اختبارها وهي النباتات نفسها التي أظهرت تفاعلاً موجباً في الاختبار الأحيائي (Bioassay) في حين كان التفاعل سالباً عند إجراء الاختبار على عصارة النبات السليم (الشاهد).

يستخلص من النتائج التي تم الحصول عليها بأن الفيروس الذي تم عزله من نباتات البطاطا المزروعة في العراق هو فيروس البطاطا واي سلالة تنخر العروق حيث أن صفاته وخواصه تشابه ما وصف مسبقاً (11، 12).

تنقية الفيروس وإنتاج المصل المضاد

أمكن الحصول على مستحضر نقي من فيروس البطاطا واي وقد بلغ معدل كمية الفيروس المتحصل عليها من وزن 100 غ من أوراق نباتات التبغ المصاب بالفيروس ما مقداره 1.05 مغ من الفيروس النقي والذي استعمل في تحضير المصل المضاد.

تم الحصول على الجاماجلوبيولين النقي بتركيز 5.32 مغ من 1 مل مصل مضاد. وقد أظهرت نتائج تقدير عيارية المصل المضاد وجود تفاعل موجب متمثلاً بتكون راسب أبيض اللون بين تخفيفات المصل المضاد المنتج ومستحضر الفيروس النقي، وقد تناسبت كمية الراسب المتكون عكسياً مع درجة تخفيف المصل المضاد، وقد وصلت نقطة التخفيف النهائية له 1024/1 في حين لم يظهر مثل هذا الراسب بين تخفيفات المصل الإعتيادي (Normal serum) ومستحضر الفيروس النقي، وكان المصل المنتج ذا نقاوة عالية حيث بلغت نسبة الإمتصاص E280/E250 2.2–2.7 وتتشابه هذه النتيجة مع ما وصف سابقاً (10).

اختبار إليزا

أظهرت نتائج اختبار إليزا أن المصل المضاد المحضر في هذه الدراسة والمصل المقترن بإنزيم الفوسفاتيز قد أثبتا نجاحاً وكفاءة عالية في الكشف عن فيروس البطاطا واي في المستحضرات النقية من هذا الفيروس وفي مستخلصات أنسجة النباتات المصابة. على حد سواء. ويوضح الجدول 1 قيم الإمتصاص للمستحضر النقي ولعصير نباتات التبغ المصابة، كما يوضح أيضاً قدرة اختبار إليزا على الكشف عن التراكيز المنخفضة من الفيروس سواء أكان في المستحضر النقي أو في عصير النباتات المصابة بهذا الفيروس.كما تشير قيم الإمتصاص على طول موجة 405 نانومتر إلى الدقة والكفاءة العالية لهذا الإختبار وجودة المصل المضاد المحضر بهذه الدراسة، إذ تناسبت هذه القيم طرداً مع تركيز الفيروس في المستحضر النقي وعكسياً مع تخفيفات عصير النباتات المصابة فضلاً عن كونها أعلى نسبياً لمستحضر الفيروس النقي مما هي عليه لقيم الإمتصاص للنباتات المصابة، إضافة إلى إنخفاض قيم الإمتصاص في حفر طبق اختبار إليزا التي تحتوي على عينات من عصير النباتات السليمة (المقارنة) مما يؤكد حساسية هذا الإختبار في تمييز العينات الحاملة لتراكيز منخفضة جداً من الفيروس عن تلك العينات الخالية منه. وتتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه سابقاً العديد من الباحثين (2، 5، 6).

جدول 1. قيم اختبار اليزا في مستحضر فيروس البطاطا واي النقي وعصير نباتات التبغ المصابة بنفس الفيروس.

Table 1. ELISA values obtained for different concentrations of PVY preparation and different dilutions of the crude sap from infected plants.

تركيز الفيروس (مغ/مل) Virus concentration (mg/ml)	قيمة الامتصاص Absorbance at 405 nm	تخفيف عصير النبات Dilution of plant sap	قيمة الامتصاص Absorbance at 405 nm
4.2	1.48	غير مخفف	0.98
0.1	1.36	10:1	0.87
0.01	0.73	100:1	0.77
0.001	0.67	1000:1	0.70
0.0001	0.40	10000:1	0.34
محلول منظم (شاهد) Buffer	0.01	شاهد سليم Control	0.01

استطاع اختبار إليزا الكشف عن 16، 2، 2، 9 و 171 عينة مصابة بفيروس البطاطا واي عند اختبار 240 عينة بطاطا جمعت من حقول متعددة عشوائياً، 120 عينة بطاطا جمعت من البيت الزجاجي، 120 عينة بطاطا جمعت من أنابيب زراعة الأنسجة، 150 درنة بطاطا محفزة على الإنبات و 240 عينة بطاطا جمعت من حقول متعددة تظهر أعراض الإصابة، على التوالي. وقد أكدت نتائج الإلقاح الميكانيكي على نباتات الإختبار النتائج ذاتها المتحصل عليها من اختبار اليزا .

تشير نتائج هذه الدراسة إلى أنه بالإمكان تطبيق اختبار إليزا وبكفاءة عالية للكشف عن عزلة فيروس البطاطا واي المنتشرة في حقول البطاطا في العراق ولأعداد كبيرة من العينات وفي وقت وجهد قليلين مع تشخيص نوعي دقيق وباستخدام كمية قليلة جداً من المصل المضاد. وقد ساعد ذلك كثيراً في تسهيل عمل البرنامج الوطني لإنتاج تقاوي البطاطا في العراق لما لأهمية فحص ومراقبة إنتاج تقاوي البطاطا في كافة مراحل إنتاج التقاوي وبرتبها المختلفة. وهذا ما هدفت إليه هذه الدراسة.

Abstract

Jarjees, M. M. 2000. Aplication of Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Rapid Detecting of Potato Virus Y in Iraq. Arab J. Pl. Prot. 18: 46-50.

This study was conducted to evaluate the use of enzyme-linked immounosorbent assay (ELISA) for rapid detection of potato virus Y (PVY) in potato fields, particularly seed potato fields, in Iraq. The virus was isolated from naturally infected potato plants and identified according to symptoms produced on diagnostic hosts, host range, sap stability and serological test. The virus was purified and used for antiserum production. Results showed that ELISA can detect PVY rapidly even at low concentration in purified preparation as well as in sap of infected plants. The application of ELISA was used sucessufully for detecting PVY in crude sap of infected plants collected from potato fields. The use of ELISA test can be adopted to facilitate the work of the national seed potato program through its practical applicability for testing basic stocks and for assessing the suitability of field – grown materials for use in the following season and as a tool for certification schemes. The technique was very sensitive and can be used for processing a large number of samples in a very short time.

Key Words: Potato virus Y (PVY), ELISA, seed potato.

References

المراجع

1. **العاني، رقيب عاكف وبالي راشي.** 1984. فيروسات النبات، أساسيات التجارب العملية. كلية الزراعة، جامعة بغداد، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. 274 صفحة.
2. **المعاضيدي، مثنى عكيدي عبد وميسر مجيد جرجيس.** 1993. الكشف عن فيروس إكس البطاطا باستخدام اختبار اليزا في العراق. مجلة العلوم الزراعية العراقية. المجلد 24: 197.-191
3. **خماس، نهاد عزيز.** 1983. عزل وتشخيص بعض الفيروسات التي تصيب البطاطا في محافظة نينوى. رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق. 166 صفحة.
4. **Ahmed, M. and W. Ahmed.** 1995. Detection of major potato viruses from different potato growing localities of Punjab. National seminar, Islamabad, Pakistan Agricultural Research Council (PARC) 23-25 April 1995. pp. 175-179.
5. **Bar-Joseph, M. and S. M. Garnsey.** 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): principles and applications for diagnosis of plant viruses. Pages: 35-59. In: Plant Diseases and Vectors: Ecology and epidemiology. By K. Maramorosh and K. F. Harris. Academic Press-New York. 368 pp.
6. **Bar-Joseph, M., S. M. Garnsey, D. Gonsalves, M. Moscovits, D. E. Pureifull, M. F., Clark, and M. Loebenstin.** 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citurs tristeza virus. Phytopathology, 69:190-194.
7. **Baulcombe, D. C. and E. N. Fernandez-Nortcote.** 1988. Detection of strains of potato virus X and of a broad spectrum of potato virus Y isolates by nucleic acid spot hybridization (NASH). Plant Disease, 72:307-309.
8. **Beemster, A.B.R. and J. A deBokx.** 1987. Survey of properties and symptoms. Pages 84-113 in: Viruses of Potatoes and seed-potato production. J. A. deBokx and J. P. H. Vam der Want, eds. Center for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, The Netherlands.
9. **Canto, T., P., Ellis, G. Bowlet and D. Lopez-Abella.** 1995. Production of monoclonal antibodies to potato virus Y helper component – protease and their use for strain defferentiation. Plant Disease, 79:234-237.
10. **Clark, M.F. and A.N. Adams.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34:457-783.
11. **De Boks, J.A.** 1981. Potato virus Y. No. 242 in: Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst. (CMI). Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England. 5 pp.
12. **De Boks, 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 Netherlands. 259 pp.
13. **Dedic, P. and J. Ptacek**. 1986. The reaction of Czech potato cultivars to PVY-NTN. 13. Triennial Conference of the European Association for Potato Research (EAPR). Wageningen, Netherlands. 14-19 Jul, 1996. PP. 298-299.
14. **Ellis, P., R. Stace-Smith and G. de. Villiers.** 1997. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y. Plant Disease, 81:481-484.
15. **Fernandes-Northcote, E.N. and P. Gugerli.** 1987. Reaction of a broad spectrum of potato virus Y isolated to monoclonal antibodies in ELISA. Fitopatologia, 22(1): 33-36.
16. **Goodwin, P.H. and E.E. Banttary.** 1984. Increased sensitivity of ELISA for potato viruses S, X and Y by polystyrene pretreatments, additives, and a modified assay procedure. Plant Disease, 68:944-947.
17. **Hooker, W.J**. 1981. Potato virus Y in: Compenduim of potato diseases. The American Phytophological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 125 pp.
18. **Huttinga, H. and D.Z. Maat.** 1987. Physical and Chemical properties. Pages 33-44. In: J. A. deBokx and J. P. H. Van der Want, eds. Viruses of potatoes and seedpotato production. Center for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, the Netherlands.
19. **Kaczmarek, U. and J. Wydzialkowska.** 1996. The spread of PVY strains in potato plants in Poland. 13. Thriennial conference of the European Association for Potato Research (EAPR). Wageningen, Netherlands. 14-19 Jul. pp. 304-305.

20. **Lee, M.A.** 1996. A RT-PCR method for PVY detection potato not requiring the isolation of nucleic acid : Assessment of this method for estimating PVY infection. Sveriges Vtsadesforenings Tidskrift, 106: 69-73.

21. **Lizarrage, C. and E.N. Fernandez-Northcote.** 1989. Detection of potato viruses X and Y in Sap extracts by a modified indirect enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose memberanes (NCM-WLISA). Plants Disease, 73:11-14.

22. **McDonald, J.G., and R.P. Singh.** 1996. Host range, Symptomatology, and Serology of isolates of potato virus Y (PVY) that share properties with both the PVY^{N} and PVY^{O} strain groups. American Potato Journal, 73:309-315.

23. **Singh, M. and R. P Singh.** 1995. Digoxigenin-lablled c DNA probes for the detection of potato virus Y in dormant potato tubers. Journal of Virological Methods, 52:133-143.