



## Production of saffron plants free of saffron latent virus using meristem culture and thermotherapy

Maryam Rahimi<sup>1</sup> , Siamak Kalantari<sup>2</sup> , Akbar Dizadji<sup>3</sup> , Majid Shokrpour<sup>4</sup>

1. Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: [m\\_rahimy@ut.ac.ir](mailto:m_rahimy@ut.ac.ir)
2. Corresponding Author, Department Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: [kalantaris@ut.ac.ir](mailto:kalantaris@ut.ac.ir)
3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: [adizaji@ut.ac.ir](mailto:adizaji@ut.ac.ir)
4. Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: [shokrpour@ut.ac.ir](mailto:shokrpour@ut.ac.ir)

| Article Info                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Article type:</b><br>Research Article                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Saffron ( <i>Crocus sativus</i> L.) is one of the most valuable medicinal and spice plants globally and is significantly impacted by the <i>Saffron latent virus</i> (SaLV), a member of the <i>Potyvirus</i> genus ( <i>Potyviridae</i> family). In Iran, SaLV infects over 70% of saffron plants in cultivation fields. Saffron is a rich source of apocarotenoids, including crocetin esters, picrocrocin, and safranal, which are crucial for its medicinal and culinary value. This study evaluated two virus elimination methods- meristem culture (with meristem sizes of 0.3, 0.5, and 0.7 mm) and thermotherapy (at 50 °C for 60 min; at 40 °C for 60 min; and 28 °C for 21 days) - as well as their combination. SaLV presence was assessed using ELISA, RT-PCR, and RT-qPCR. The highest percentage of SaLV-free plants was achieved with a 0.3 mm meristem culture (83.73% and 81.30%) and thermotherapy at 50 °C for 60 min (71.36% and 66.36%), based on ELISA and RT-PCR, respectively. The combined treatment of 0.3 mm meristem culture and thermotherapy at 50 °C for 60 min resulted in 100% SaLV-free plants, as confirmed by all three detection methods. This study provides an effective strategy for developing virus-free saffron cultivars, supporting sustainable saffron production and propagation. |
| <b>Article history:</b><br>Received: 29 June 2025<br>Revised: 9 August 2025<br>Accepted: 20 August 2025<br>Published online: Autumn and Winter 2024                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Keywords:</b><br>ELISA,<br>RT-PCR,<br>RT-qPCR,<br>Virus elimination,<br>saffron latent virus.                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Cite this article:</b> Rahimi, M., Kalantari, S., Dizadji, A. & Shokrpour, M. (2024). Production of saffron plants free of saffron latent virus using meristem culture and thermotherapy. <i>Iranian Journal of Plant Protection Science</i> , 55 (2), 343-360. DOI: <a href="https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396499.1007077">https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396499.1007077</a> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | © The Author(s).<br>DOI: <a href="https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396499.1007077">https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396499.1007077</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Publisher: The University of Tehran Press.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

### Extended Abstract

#### Introduction

Saffron, often referred to as "Red Gold," is one of the most expensive medicinal plants globally, with a history of use spanning over 4,000 years. Iran is the leading producer of saffron, contributing more than 90% of the global supply. However, the emergence of *Saffron latent virus* (SaLV), a newly identified *Potyvirus* species, has severely impacted saffron cultivation in Iran, with infection rates exceeding 70%. SaLV compromises the quality and yield of saffron, necessitating effective virus elimination strategies. Common methods for producing virus-free plants include meristem culture, thermotherapy, chemotherapy, and their combinations. For instance, thermotherapy combined with meristem culture has successfully eliminated viruses such as bean yellow mosaic virus (BYMV) in gladiolus and apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in apple cultivars. This study explores the efficacy of meristem culture, thermotherapy, and their combination in eliminating SaLV from saffron plants.

### Material and Methods

A total of 530 leaf tissue samples were collected from saffron plants cultivated at the Horticulture Research Center, University of Tehran. Samples were screened for SaLV using a *Potyvirus* genus-specific antibody (RT-0573/1, DSMZ, Germany). Positive samples (absorbance  $>3\times$  healthy control at 405 nm) were subjected to meristem culture (0.3, 0.5, and 0.7 mm) and thermotherapy (50 °C for 60 min; 40 °C for 60 min; 28 °C for 21 days). Corm tissues from ELISA-positive plants were treated, while ELISA-negative corms were cultivated without treatment. Post-treatment, SaLV presence was assessed using ACP-ELISA, RT-PCR, and RT-qPCR. Data were analyzed using Tukey's test in R 4.3.2.

### Results

Totally, 420 out of 530 samples (80.7%) tested positive for SaLV. Meristem culture and thermotherapy significantly influenced the percentage of virus-free plants ( $p < 0.05$ ). Smaller meristem sizes yielded higher SaLV-free rates: 83.73% and 81.29% for 0.3 mm, compared to 38.5% and 30.91% for 0.7 mm, based on ELISA and RT-PCR, respectively. Thermotherapy at 50 °C for 60 min achieved the highest SaLV-free rate (71.36% and 66.36%), while 40 °C for 60 min yielded the lowest (50.98% and 46.47%). The combined treatment of 0.3 mm meristem culture and thermotherapy at 50 °C for 60 min resulted in 100% SaLV-free plants, as confirmed by ELISA, RT-PCR, and RT-qPCR.

### Conclusion

This study demonstrates that the combination of 0.3 mm meristem culture and thermotherapy at 50 °C for 60 min effectively eliminates SaLV from saffron plants. This approach provides a robust method for producing virus-free saffron cultivars, supporting sustainable saffron production and propagation. Future research should explore the scalability and economic feasibility of this method for large-scale applications.



## تولید گیاهان زعفران عاری از ویروس پنهان زعفران با بکارگیری کشت مریستم و گرمادرمانی

مریم رحیمی<sup>۱</sup> | سیامک کلانتری<sup>۲</sup> | اکبر دیزجی<sup>۳</sup> | مجید شکرپور<sup>۴</sup>

۱. گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: [m\\_rahimy@ut.ac.ir](mailto:m_rahimy@ut.ac.ir)  
 ۲. نویسنده مسئول، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: [kalantaris@ut.ac.ir](mailto:kalantaris@ut.ac.ir)  
 ۳. گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: [adizaji@ut.ac.ir](mailto:adizaji@ut.ac.ir)  
 ۴. گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: [shokrpour@ut.ac.ir](mailto:shokrpour@ut.ac.ir)

| اطلاعات مقاله                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>نوع مقاله:</b></p> <p>مقاله پژوهشی</p> <p><b>تاریخ دریافت:</b> ۱۴۰۴/۰۴/۰۸</p> <p><b>تاریخ بازنگری:</b> ۱۴۰۴/۰۵/۱۸</p> <p><b>تاریخ پذیرش:</b> ۱۴۰۴/۰۵/۲۹</p> <p><b>تاریخ انتشار:</b> پاییز و زمستان ۱۴۰۳</p> <p><b>کلیدواژه‌ها:</b><br/>                     الایزا، زعفران، ویروس زدایی، نقش مهمی ایفا نماید.<br/>                     RT-PCR RT-qPCR</p> | <p>زعفران (<i>Crocus sativus</i> L.) یکی از مهمترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای در سراسر جهان است. این گیاه منبع غنی آپوکاروتنوئیدها مانند استرهای کروتستین، پیکروکروسین و سافرانال است. ویروس پنهان زعفران (saffron latent virus; SaLV)، از جنس <i>Potyvirus</i> و خانواده <i>Potyviridae</i>، شایع‌ترین ویروس شناخته‌شده زعفران در ایران است که بیش از ۷۰ درصد گیاهان زعفران کشور را در مزارع آلوده نموده است. به منظور ویروس‌زدایی گیاهان آلوده زعفران از SaLV، در پژوهش حاضر دو روش کشت مریستم (با اندازه مریستم ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ میلی‌متر) و گرمادرمانی به کار برده شد. برای ردیابی ویروس از آزمون سرولوژی ELISA-ACP و مولکولی RT-PCR و RT-qPCR استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین درصد گیاهان عاری از ویروس بر اساس آزمون الایزا و RT-PCR به ترتیب با ۸۳/۷۳ و ۸۱/۲۹ درصد در تیمار انفرادی کشت مریستم با اندازه ۰/۳ میلی‌متر و به ترتیب با ۷۱/۳۶ و ۶۶/۳۶ درصد در تیمار انفرادی گرمادرمانی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه به دست آمد. بیشترین درصد گیاهان عاری از ویروس بر اساس آزمون‌های الایزا، RT-PCR و RT-qPCR در تیمار ترکیبی کشت مریستم با اندازه ۰/۳ میلی‌متر و گرمادرمانی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه، به میزان ۱۰۰ درصد بدست آمد. این مطالعه، یک روش موثر برای توسعه بنه‌های زعفران بدون ویروس ارائه می‌کند، به طوری که می‌تواند برای تکثیر گیاه عاری از ویروس و پایداری صنعت تولید زعفران، نقش مهمی ایفا نماید.</p> |

**استناد:** رحیمی، مریم؛ کلانتری، سیامک؛ دیزجی، اکبر و شکرپور، مجید (۱۴۰۳). تولید گیاهان زعفران عاری از ویروس پنهان زعفران با بکارگیری کشت مریستم و گرمادرمانی. نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۵ (۲)، ۳۶۰-۳۴۳. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396499.1007077>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396499.1007077>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

## مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) گران قیمت‌ترین ادویه جهان و یکی از ارزشمندترین گیاهان دارویی است. از اینرو، به آن «طلای سرخ» نیز گفته می‌شود (Leone et al., 2018). پیشینه کاربرد این گیاه در جوامع بشری بیش از ۴۰۰۰ سال است. در منابع طب سنتی بیشتر به عنوان یک عامل مقوی و داروی ضد افسردگی مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Shokrpour, 2019). کشور ایران با بیش از ۹۰ درصد کل تولید زعفران دنیا، به عنوان بزرگترین تولید کننده این محصول ارزشمند به شمار می‌آید (Moratalla-López et al., 2021). در اکثر گیاهان، بیماری‌های گیاهی می‌توانند محدودیت‌های تولید قابل توجهی از نظر عملکرد کمی و کیفی به‌ویژه تغییرات متابولیت‌های ثانویه ایجاد کنند (Ágoston et al., 2024). علاوه بر کاربردهای دارویی متابولیت‌های ثانویه، این متابولیت‌ها دارای عملکردهای متعددی در گیاهان از جمله مقاومت به بیماری هستند (Moratalla-López et al., 2021). مقاومت گیاه به آلودگی بیمارگر بیشتر با فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دفاعی از جمله ژن‌های مربوط به متابولیت‌های ثانویه مرتبط است. به عنوان مثال، القای گلیکوزیل ترانسفرازهای گیاهی (UGTs)، منجر به مرگ سلولی موضعی در محل آلودگی و محدودیت انتشار بیمارگر می‌شود (Lorenzo et al., 2023). با این حال، تأثیر ویروس‌ها بر متابولیسم ثانویه فقط به گیاهان مقاوم محدود نمی‌شود. وجود گونه‌های مختلف ویروس‌ها می‌تواند بیان ژن مربوط به متابولیسم ثانویه در میزبان را تغییر دهد، همانطور که برای گونه‌های مختلف گیاهان توتون آلوده به ویروس خراشک توتون (tobacco etch virus) گزارش شده است (Cervera et al., 2018). تاکنون، تأثیر عفونت ویروسی بر ترکیبات گیاهی در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی (tomato mosaic virus) (López-Gresa et al., 2012)، ریحان آلوده به ویروس موزاییک یونجه (alfalfa mosaic virus) (Bruni et al., 2016) و گیاه طالبی آلوده به ویروس موزاییک خیار (cucumber mosaic virus) (Shalitin & Wolf, 2000) گزارش شده است.

گونه‌ای ویروس از جنس *Potyvirus* با نام ویروس پنهان زعفران (*Potyvirus croci* (Saffron latent virus, SaLV) با بیش از ۷۰ درصد نرخ آلودگی از مزارع *C. sativus* ایران گزارش شده است (Parizad et al., 2018; Moratalla-López et al., 2021). همچنین این ویروس از *C. almehensis*، که به عنوان یک گونه وحشی و اندمیک در ایران می‌روید، شناسایی شد (Movi et al., 2022). آلودگی گیاه زعفران با ویروس پنهان زعفران منجر به کاهش معنی‌دار متابولیت‌های اصلی محصول زعفران (کلاله) می‌شود (Parizad et al., 2019). تکثیر زعفران از طریق بیه منجر به انتقال ویروس‌ها از نسلی به نسل بعد و افزایش شیوع و انتشار ویروس می‌شود. بنابراین، استفاده از مواد گیاهی سالم مناسب‌ترین و مؤثرترین راه مدیریت بیماری‌های ویروسی به شمار می‌رود. از جمله روش‌های رایج در تولید اندام‌های تکثیری عاری از ویروس می‌توان به کشت مریستم، گرمادرمانی، شیمی‌درمانی، کشت مریستم همراه با گرمادرمانی و الکترودرمانی اشاره کرد (Kwon et al., 2022). در روش گرمادرمانی، گیاهان برای یک دوره زمانی خاص در معرض دمای بالا قرار می‌گیرند (Panattoni et al., 2013). دمای بالا می‌تواند از تکثیر ویروس جلوگیری کند یا باعث تخریب آران‌ا ویروس شود (Miljanić et al., 2022). علاوه بر این، گرمادرمانی با سازوکار دفاعی ضد ویروسی به نام خاموشی آران‌ا مرتبط است (Kim et al., 2021). دماهای بالا باعث تولید آران‌ا مداخله‌گر کوچک مشتق از ویروس (vsiRNA) و مهار تجمع آران‌ا ویروسی می‌شود (Liu et al., 2016). برای افزایش کارایی حذف ویروس، اغلب ترکیب روش‌های گرمادرمانی با کشت مریستم به کار برده می‌شود. نوک مریستم شامل گنبد رأسی و تعداد محدودی پرموردیای برگ است و فاقد بافت آوندی است. مزیت کشت مریستم، توانایی حذف بیمارگرهای موجود در گیاهان مادر و پایداری ژنتیکی گیاه است (Miljanić et al., 2022). اندازه مریستم نقش مهمی در کارایی حذف ویروس دارد، زیرا مریستم‌های کوچکتر نرخ بقای کمتری دارند اما بیشترین راندمان حذف ویروس را دارند (Kwon et al., 2022).

## پیشینه پژوهش

زعفران گیاهی چندساله از تیره زنبق (Iridaceae) است که سازگاری خوبی به نواحی خشک و نیمه‌خشک دارد. زعفران به صورت رویشی از طریق تشکیل بنه‌های دختری از بنه مادری تکثیر می‌شود. نرخ پایین تکثیر بنه، همراه با آلودگی پاتوژن، تنش‌های زیستی و غیرزیستی و مدیریت ضعیف محصول، دسترسی به مواد کاشت زعفران را محدود می‌کند (Menia et al., 2018). تاکنون در دنیا تعدادی از ویروس‌های گیاهی متعلق به جنس‌های مختلف از زعفران گزارش شده است. این ویروس‌ها شامل ویروس موزاییک شلغم (*Potyvirus rapae* (turnip mosaic virus, TuMV) (Chen, 2000)، ویروس موزاییک نرگس (*Potexvirus narcissi* (narcissus mosaic virus, NMV) (Miglino et al., 2005)، ویروس موزاییک آرابیس (*Nepovirus arabis* (arabis mosaic virus, ArMV) (Parizad et al., 2018)، ویروس موزاییک توتون (*Tobravirus* (tobacco rattle virus, TRV) و ویروس جفجه توتون (*Tobamovirus tabaci* (mosaic virus, TMV) (Martinez-Fajardo et al., 2024)، ویروس موزاییک زرد لوبیا (*tabaci* (bean yellow mosaic virus, BYMV) (Parizad et al., 2018)، ویروس زرد غربی چغندر (*Potyvirus phaseoliteum* (soybean) (Zheng et al., 2018; Haseli et al., 2024) *Polerovirus BWYV* (BWYV iris mild) (*Potyvirus glycitessellati* (mosaic virus, SMV) (Chakraborty, 2016)، ویروس موزاییک خفیف زنبق (*Potyvirus iristenuis* (mosaic virus, IMMV) (Martinez-Fajardo et al., 2024) و ویروس موزاییک شدید زنبق (*Potyvirus iriseverum* (iris severe mosaic virus, ISMV) (Caiola and Faoro, 2011) می‌باشند. نتایج تحقیقات اخیر در ایران نیز منجر به گزارش ویروس‌های جدیدی مانند ویروس ایرانی زعفران (*saffron Iran virus*; SaIRV) و ویروس کوتولگی زعفران (*saffron dwarf virus*; SaDV) از گیاهان زعفران ایران شده است (Valouzi et al., 2025). در بین بیماری‌های گیاهی، ویروس‌های خانواده *Potyviridae* از نظر اقتصادی مهمترین گروه ویروس‌های گیاهی می‌باشند که سالانه خسارت زیادی به محصولات کشاورزی وارد می‌کنند (Petrov et al., 2024). تحقیقات مستمری از بیش از ۱۰ سال قبل به منظور بررسی ویروس‌های بیمارگر زعفران در ایران شروع شده که نتایج آن‌ها منجر به توصیف و معرفی گونه جدیدی از جنس *Potyvirus* در دنیا با نام ویروس پنهان زعفران (*Potyvirus croci* (saffron latent virus, SaLV) گردید. آلودگی زعفران به این ویروس باعث کاهش معنی‌داری در برخی متابولیت‌های ثانویه اصلی زعفران می‌شود، بطوری که مقادیر ترکیبات کروسین، سافرانال و پیکروکرو سین در زعفران‌های آلوده به SaLV نسبت به گیاه سالم کاهش معنی‌داری می‌یابد (Parizad et al., 2019). از نظر علائم، غالباً این ویروس در زعفران بدون علائم یا با علائم خفیف می‌باشد، لیکن در مواردی علائم موزاییک خطی و رنگ پریدگی در برگ‌ها مشاهده شده است. درخصوص علائم، نکته مهم این‌که به دلیل ریخت‌شناسی خاص گیاه زعفران و اندازه کوچک و باریک برگ‌های آن، تشخیص و مشاهده علائم بیماری ناشی از این ویروس کاری سخت بوده و غالباً قابل تشخیص نمی‌باشد. ویروس‌های پنهان زعفران به‌وسیله شته و بنه‌های آلوده منتقل می‌شوند، به علاوه بنه‌های آلوده امکان بقای ویروس در زمان خواب ظاهری و حقیقی بوته‌ها را فراهم می‌کنند. همچنین، تکثیر ارقام زعفران از طریق بنه باعث انتقال ویروس‌های گیاهی از جمله SaLV از نسلی به نسل بعد منتقل و باعث انتشار ویروس از سالی به سال دیگر و نیز در مناطق مختلف جغرافیایی می‌شود (Parizad et al., 2018; Movi et al., 2022). بنابراین، استفاده از مواد گیاهی سالم مناسب‌ترین و مؤثرترین راه مدیریت بیماری‌های ویروسی به شمار می‌رود، از جمله روش‌های رایج در تولید اندام‌های تکثیری عاری از ویروس کشت مرستم، گرمادرمانی، شیمی‌درمانی، کشت مرستم همراه با گرمادرمانی و الکترودرمانی است (Kazemi et al., 2019). ترکیب روش گرمادرمانی در دمای ۳۷-۴۰ درجه سلسیوس به مدت چهار هفته و کشت مرستم با اندازه ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌متر منجر به حذف ویروس لکه برگی سبزد سبب (*apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) و ویروس موزاییک سیب (*Trichovirus mali*, *Ilarvirus ApMV* (apple mosaic virus, ApMV) و ویروس ساقه شیاری

سیب (*Capillovirus mali* (apple stem grooving virus, ASGV) و ویروس ساقه گودکی سیب (apple stem pitting) *Foveavirus mali* (virus, ASPV) از رقم سیب Oregon Spur-II شده است (Vivek and Modgil, 2018). در آزمایشی دیگر به منظور حذف ویروس موزاییک یام (*Potyvirus yamtesseleti* (yam mosaic virus, YMV) از گیاه سیب زمینی ترکیب بهینه گرمادرمانی (۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ روز) و کشت مریستم باعث حذف حداکثری YMV (۳-۹۳/۱۰۰ درصد) شد (Gogile et al., 2019). در مطالعه‌ای به منظور حذف ویروس کوتولگی زرد پیاز (onion yellow *Potyvirus cepae* (dwarf virus, OYDV)، ویروس پنهان معمول سیر (*garlic common latent virus*، *Carlavirus latensallii* (GCLV)، ویروس پنهان موسیر (*Carlavirus shallot latent virus*, SLV) و آلکسی ویروس‌ها از گیاهان آلوده سیر از ترکیب کشت مریستم، گرمادرمانی و شیمی‌درمانی استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که درصد گیاهان عاری از SLV، GCLV، و OYDV به ترتیب بین ۶۵ تا ۱۰۰ درصد، ۵۵ تا ۱۰۰ درصد و ۱۳ تا ۱۰۰ درصد تعیین شد. ترکیب گرمادرمانی، شیمی‌درمانی و کشت مریستم موثرترین روش برای عاری سازی سیر از SLV، GCLV، و OYDV، با ۶۶/۰۶ درصد بود نکته جالب توجه این تحقیق اینکه، هیچ یک از تیمارهای بکار رفته منجر به عاری‌سازی آلکسی‌ویروس‌ها نگردید (Benke et al., 2023).

استفاده از روش گرمادرمانی توأم با کشت مریستم انتهای سبب حذف ویروس موزاییک زرد لوبیا (*bean yellow mosaic*)، *Potyvirus phaseoluteum* (BYMV) از گیاه گلایل (Sharifi et al., 2015) و حذف دو ویروس لکه برگی سبز و ساقه شیری درخت سیب (Wang et al., 2006) شده است. در مطالعاتی دیگر استفاده از روش الکترودرمانی توأم با کشت مریستم سبب حذف ویروس A سیب‌زمینی (*Potyvirus atuberosi* (potato virus A, PVA)، ویروس A انگور (*grapevine virus A*, GVA) (Bayati et al., 2011) *Vitivirus alphavitis* و ویروس ایکس سیب‌زمینی (*potato virus X*, PVX) *Potexvirus ecspotati* شده است (Gonzales et al., 2004). با توجه به تکثیر غیرجنسی زعفران از طریق بنه و انتقال و انتشار ویروس‌های زعفران از این طریق، این تحقیق با هدف امکان‌سنجی تولید گیاهان عاری از ویروس پنهان زعفران (SaLV) با استفاده از روش‌های کشت مریستم و گرمادرمانی بود.

## روش‌شناسی پژوهش

### مواد گیاهی و آزمون الایزا

تعداد ۵۳۰ نمونه برگی بطور تصادفی از گیاهان زعفران کشت شده در ایستگاه تحقیقات باغبانی گروه مهندسی علوم باغبانی دانشگاه تهران جمع‌آوری شد. به دلیل عدم وجود آنتی‌بادی اختصاصی SaLV، آلودگی آن‌ها به SaLV با استفاده از آنتی‌بادی تک همسانه‌ای جنس *Potyvirus* (RT-0573/1, DSMZ, Braunschweig, Germany) و به روش (antigen-coated) ACP-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) بررسی شدند (Richter et al., 1995). نمونه‌هایی با میزان جذب بیش از سه برابر جذب نمونه‌های سالم، به عنوان نمونه‌های آلوده به ویروس در نظر گرفته شدند. براساس نتایج آزمون الایزا، بنه گیاهان با واکنش مثبت جمع‌آوری و تیمارهایی جهت ویروس‌زدایی روی آن‌ها اعمال گردید. بنه‌های گیاهان با واکنش در آزمون الایزا بدون هیچ تیماری در گلدان کشت شدند.

### تیمارهای عاری‌سازی ویروس

به منظور بررسی تولید گیاهان عاری از ویروس پنهان زعفران (SaLV) تیمارهای کشت مریستم و گرمادرمانی به صورت فاکتوریل روی بنه گیاهان آلوده به ویروس (براساس نتایج آزمون الایزا) اعمال گردید. در تیمار کشت مریستم، ریز نمونه‌هایی با سه اندازه مریستم ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ میلی‌متر از مریستم‌های جانبی و انتهایی بوسیله سوزن انسولین و اسکالپل تهیه و در محیط کشت MS با نوع و غلظت‌های هورمونی مختلف (جدول ۱) کشت شدند. در آزمایش القای کالوس، عامل اسیدیته (pH) در دو سطح ۵/۸ و ۷/۵ و عامل هورمون در ۱۶ سطح (جدول ۱) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای تهیه محیط کشت

پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) ابتدا محلول‌های پایه عناصر پرمصرف، کم‌مصرف، ویتامین و آهن به صورت مجزا تهیه و برای جلوگیری از آلودگی و فساد، در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور اطمینان از عدم آلودگی سه الی چهار روز قبل از شروع کشت در دمای اتاق ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و در صورت مشاهده علائمی از آلودگی سطحی، محیط‌های کشت حذف شد. پس از کشت ریزنمونه‌ها (۱۰ ریزنمونه در سه تکرار)، هر یک از شیشه‌های کشت در داخل اتاقک رشد با میانگین دمای روزانه ۲۸ و شبانه ۲۴ درجه سلسیوس و فتوپریود در ۱۶ ساعت روشنایی (لامپ‌های فلورسنت با نور سفید با شدت نور ۴۰ میکرواینشتن بر مترمربع در ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی تنظیم شد. در تیمار گرمادرمانی، تیمارهای دمایی بر روی ۱۳۵ بنه در سه تکرار با سه سطح دمایی شامل ۱- دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت سه هفته در انکوباتور، ۲- غوطه‌وری بنه‌ها در آب ۴۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت و ۳- غوطه‌وری بنه‌ها در آب ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت انجام شد. در آزمایش حاضر، سطوح مختلف گرمادرمانی در ترکیب با سطوح مختلف اندازه مرستم به صورت فاکتوریل به کار برده شد. بعد از کالزایی، کالوس‌ها جهت تولید اندام هوایی و ریشه به محیط کشت حاوی هورمون دو میلی گرم بر لیتر TDZ و دو میلی گرم بر لیتر NAA انتقال داده شد. بعد از سبز شدن بنه‌های تیمار شده و گیاهان کشت بافتی، نمونه‌های برگ‌ی جهت بررسی آلودگی به SaLV از طریق آزمون‌های سرولوژیکی ACP-ELISA و مولکولی RT-PCR و RT-qPCR استفاده شد.

جدول ۱. نوع و غلظت‌های هورمونی محیط کشت MS در تیمارهای کشت مرستم زعفران به منظور ویروس‌زدایی

| شماره تیمار | 2-4,D <sup>۶</sup><br>(mg/l) | BAP <sup>۵</sup><br>(mg/l) | NAA<br>(mg/l) | TDZ<br>(mg/l) | GA <sub>۳</sub> <sup>۴</sup><br>(mg/l) | IBA <sup>۳</sup><br>(mg/l) |
|-------------|------------------------------|----------------------------|---------------|---------------|----------------------------------------|----------------------------|
| T1          | ۲                            | ۲                          | -             | -             | -                                      | ۱/۵                        |
| T2          | -                            | ۱                          | -             | -             | ۰/۰۱                                   | ۲                          |
| T3          | -                            | ۲                          | ۰/۵           | -             | -                                      | -                          |
| T4          | ۲                            | ۵                          | -             | -             | -                                      | -                          |
| T5          | -                            | ۲                          | -             | -             | -                                      | ۱                          |
| T6          | ۱                            | ۲                          | -             | -             | -                                      | -                          |
| T7          | ۲                            | ۲                          | -             | -             | -                                      | -                          |
| T8          | ۱                            | ۱                          | ۰/۵           | ۰/۰۳          | -                                      | -                          |
| T9          | ۱                            | ۰/۵                        | ۱             | -             | -                                      | -                          |
| T10         | ۰/۵                          | ۲                          | ۲             | -             | -                                      | -                          |
| T11         | -                            | ۰/۵                        | ۲             | -             | -                                      | -                          |
| T12         | -                            | ۱/۵                        | ۵             | -             | -                                      | -                          |
| T13         | ۱                            | ۳                          | ۲             | -             | -                                      | -                          |
| T14         | -                            | ۰/۵                        | -             | ۰/۵           | ۰/۰۱                                   | ۱                          |
| T15         | -                            | ۵                          | -             | -             | -                                      | ۲                          |
| T16         | ۴                            | ۲                          | ۱/۵           | -             | -                                      | -                          |

<sup>۱</sup> Thidiazuron<sup>۲</sup> Naphthylacetic acid<sup>۳</sup> Indole 3 butyric acid<sup>۴</sup> Gibberellin<sup>۵</sup> Benzylaminopurine<sup>۶</sup> 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

## ردیابی ویروس در گیاهان

در گام اول، گیاهان حاصل از تیمارهای مختلف به روش ACP-ELISA بررسی شدند. در گام دوم، گیاهان با واکنش منفی در آزمون الایزا، با روش ترانویسی معکوس-واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (SaLV-q-R:5'-CATGCTGGCAGTCAAGATGA-3') و (SaLV-q-F:5'-CGGTTCTGTGCATCAACTCTTTACT-3') که بخش انتهایی ناحیه رمزکننده Nib ژنوم ویروس به طول ۲۳۲ باز را تکثیر می‌کند، بررسی شدند. از ژن 18S rRNA (R: 5'-TCGTTTCCTCCAAAATCTCG-3' و F: 5'-ATCATTGTCGAGACCCGAAC-3') به عنوان ژن مرجع استفاده شد (Ahrazem *et al.*, 2016). استخراج آران‌ا کل، ساخت دی‌ان‌ا مکمل و RT-PCR به روش Movi و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد. به طور خلاصه، استخراج آران‌ا کل با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکلون، تهران، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از بافت برگ گیاهان زعفران انجام شد. پس از ساخت cDNA با استفاده از آغازگر معکوس SaLV-q-R (در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت)، PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به وسیله دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems, California, USA) با چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه: واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به الگو در ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، و مرحله نهایی گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد. به منظور تایید نتایج آزمون RT-PCR، در گام سوم، نمونه‌های عاری از SaLV بر اساس نتایج RT-PCR، به روش ترانویسی معکوس-واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (RT-qPCR) با استفاده از جفت آغازگر فوق انجام شد. در این آزمایش، برای هر نمونه از سه تکرار بیولوژیکی و دو تکرار فنی استفاده شد. در هر یک از آزمایشات RT-PCR و RT-qPCR، شاهد مثبت (گیاه آلوده) و شاهد منفی (گیاه سالم و واکنش بدون آران‌ا) مورد استفاده قرار گرفت.

## تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های مربوط به RT-qPCR با استفاده از نرم‌افزار Rest© (version 2) و تجزیه واریانس داده‌ها در آزمایش القای کالوس و آزمایش عاری‌سازی از ویروس به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. کلیه تحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از برنامه آماری R 4.3.2 انجام گردید.

## یافته‌های پژوهش و بحث

از ۵۳۰ نمونه برگ زعفران جمع‌آوری شده، ۴۲۰ نمونه در آزمون الایزا واکنش مثبت نشان دادند که بنه تعدادی از گیاهان آلوده برای اعمال تیمارهای گرما درمانی و کشت مرستم و ترکیب آنها، مورد استفاده قرار گرفت. بنه گیاهان منفی در آزمون الایزا بدون هیچ تیماری در گلدان کشت شدند. نتایج حاصل از القای کالوس (شکل ۱) نشان داد که اثر متقابل pH در غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشدی معنی‌دار است (جدول ۲).

نتایج متفاوت در pH های مختلف می‌تواند به این دلیل باشد که برخی گونه‌های گیاهی سازگار با خاک‌های قلیایی ممکن است در pH بالاتر (مانند ۷/۵) پاسخ بهتری نشان دهند، اما این موارد کاملاً خاص هستند و نیاز به بهینه‌سازی دقیق دارند. بطور مثال کشت بافت خرما (*Phoenix dactylifera*) گاهی در pH ۷/۲ موفق گزارش شده، اما حتی در این مورد نیز بعد از بررسی‌های زیاد روی ارقام مختلف خرما عنوان شده است که pH اسیدی (مثلاً ۶) نتایج قابل اطمینان‌تری دارد (Shabala *et al.*, 2012) بنابراین با توجه به اینکه برخی ارقام زعفران (پوشالی و خزر) شرایط رشد در pH قلیایی را دارند بنابراین ایجاد



نتایج متفاوت در این محدوده pH دور از انتظار نیست ولی بدلیل اینکه این مورد تنها تحقیق در گیاه زعفران است با این مقدار pH، نیاز به تکرار جهت توصیه دارد. اما همچنان pH اسیدی ۵/۸ استاندارد مناسبی است. در ترکیب تیماری pH ۵/۸ و غلظت‌های نیم، دو و دو میلی گرم بر لیتر 2,4-D، BAP و NAA هیچ گونه کالوس‌زایی رخ نداد بلکه بعد از گذشت ۱۵-۲۰ روز از انتقال بر روی این تیمارها، ریزنمونه‌های کشت شده شروع به تغییر و متورم شدن نمودند و بدون تشکیل کالوس اندازه آنها تا یک و نیم برابر بیشتر شد. دلیل بزرگ شدن سریع سلول‌ها احتمالا ناشی از حضور تنظیم کننده‌های رشدی اکسین در محیط کشت بوده است. اولین پاسخ‌های کالوس‌زایی بعد از ۳۵ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت مشاهده گردید. بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار پنج و دو میلی گرم بر لیتر BAP و IBA با ۶۰ درصد کالوس‌زایی در pH ۵/۸ مشاهده شد. نتایج حاصل از القا کالوس در pH ۷/۵ نشان داد اولین پاسخ‌های کالوس‌زایی ۴۶ روز پس از کشت ریز نمونه‌ها در محیط کشت مشاهده گردید. بیشترین درصد کالوس‌زایی در تیمارهای دو میلی گرم بر لیتر 2,4-D همراه با پنج میلی گرم بر لیتر BAP (۷۵ درصد)، پنج میلی گرم بر لیتر BAP همراه با دو میلی گرم بر لیتر IBA (۷۵ درصد) و چهار میلی گرم بر لیتر 2,4-D همراه با دو میلی گرم بر لیتر BAP و یک و نیم میلی گرم بر لیتر NAA (۷۰ درصد) مشاهده شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که در غلظت نیم و دو میلی گرم بر لیتر 2,4-D BAP همراه با دو میلی گرم بر لیتر NAA هیچ کالوس‌زایی مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱. کالوس‌زایی ریزنمونه مرستم گیاه زعفران تحت سطوح مختلف هورمونی

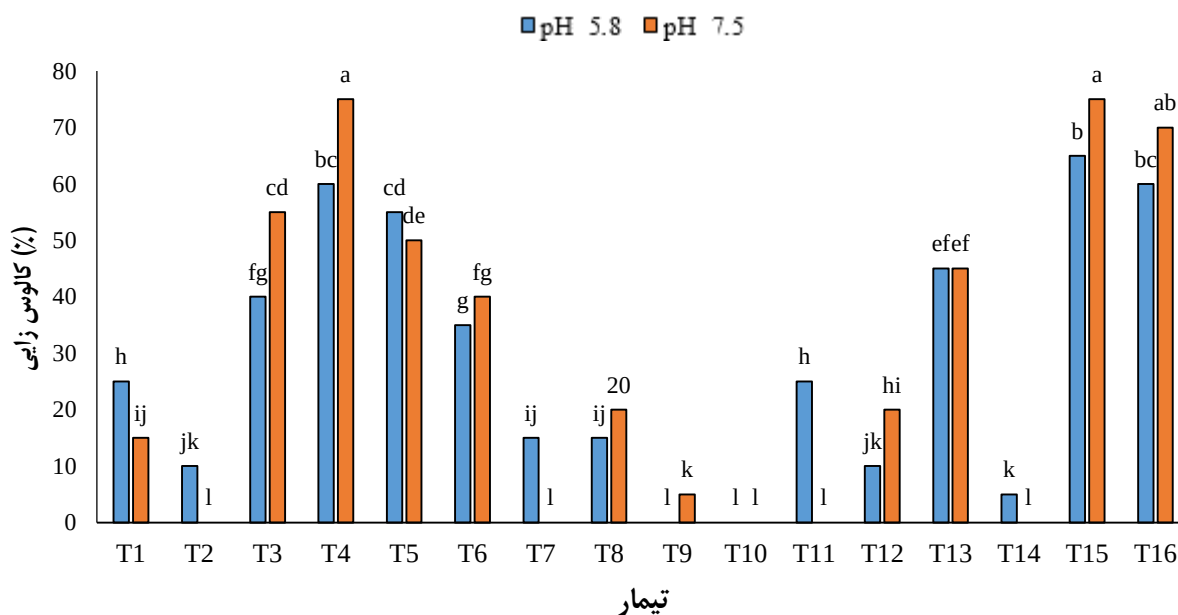
(به ترتیب از راست به چپ تیمار ۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر BAP و IBA با ۶۰ درصد کالوس‌زایی در pH برابر ۵/۸ و ۷/۵)

جدول ۲. تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی ریزنمونه مرستم گیاه زعفران در سطوح مختلف هورمونی (تیمارهای هورمونی در

جدول ۱. آمده است) در pHهای مختلف

| منبع تغییرات     | درجه آزادی | میانگین مربعات |
|------------------|------------|----------------|
| pH               | ۱          | ۸۷/۶۲**        |
| سطوح هورمونی (H) | ۱۵         | ۱۵۴/۲۵**       |
| pH×H             | ۱۵         | ۴۵۰/۵۴**       |
| خطا              | ۶۴         | ۱۳/۳۵          |
| ضریب تغییرات (%) | -          | ۱۰/۴۱          |

\*\* نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد



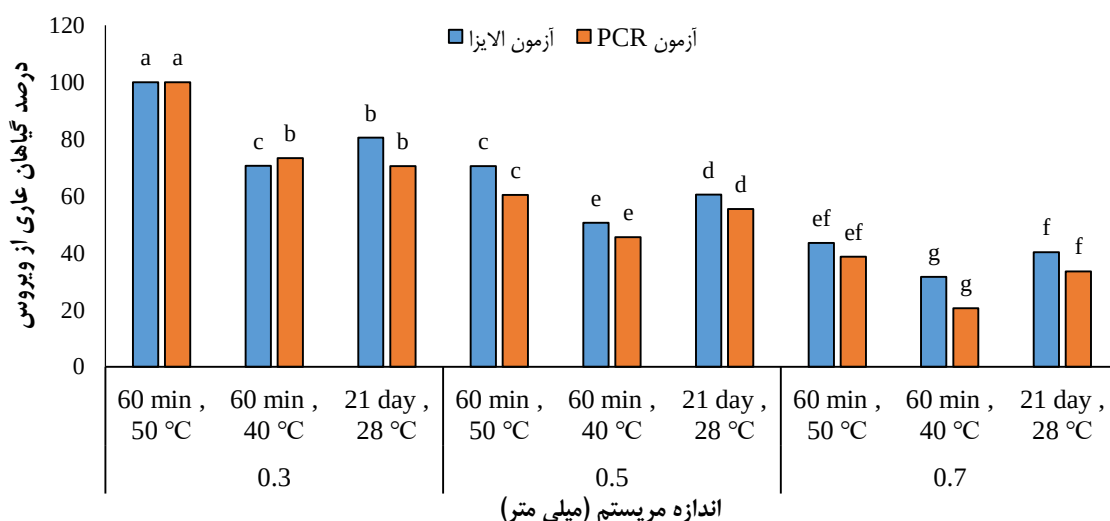
شکل ۲. درصد کالوس‌زایی ریزنمونه مریستم گیاه زعفران در غلظت‌های مختلف هورمون‌ها (تیمارهای هورمونی در جدول ۱ آمده است) در pH 5.8 و pH 7.5. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری براساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان از معنی‌داری اثر اصلی کشت مریستم، گرمادرمانی و اثر متقابل آن‌ها بر درصد عاری سازی گیاهان زعفران از ویروس بر اساس نتایج آزمون الایزا و RT-PCR داشت (جدول ۳). مقایسه میانگین بین عامل کشت مریستم بر درصد گیاهان عاری از ویروس پنهان زعفران بر اساس آزمون الایزا و RT-PCR نشان داد که هر چه اندازه مریستم کوچکتر باشد درصد گیاهان عاری از ویروس بیشتر خواهد بود. به طوریکه بیشترین درصد گیاهان عاری از ویروس بر اساس آزمون الایزا و RT-PCR به ترتیب با ۸۳/۷۳ و ۸۱/۲۹ درصد در کشت مریستم با اندازه ۰/۳ میلی‌متر و کمترین میزان آن به ترتیب با ۳۸/۵ و ۳۰/۹۱ درصد در کشت مریستم با اندازه ۰/۷ میلی‌متر به دست آمد. تاثیر روش‌های مختلف گرمادرمانی بر میزان درصد گیاهان عاری از ویروس پنهان زعفران نشان داد که بیشترین درصد گیاهان عاری از ویروس در ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه بر اساس آزمون الایزا و RT-PCR (به ترتیب با ۷۱/۳۶ و ۶۶/۳۶ درصد) و کمترین میزان آن در ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه (به ترتیب ۵۰/۹۸ و ۴۶/۴۷ درصد) به دست آمد. تأثیر ترکیب تیماری گرمادرمانی و کشت مریستم بر درصد گیاهان عاری از ویروس پنهان زعفران نشان داد که در تیمار کشت مریستم با اندازه ۰/۳ میلی‌متر و گرمادرمانی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه، ۱۰۰ درصد گیاه زعفران عاری از ویروس بر اساس آزمون الایزا و RT-PCR تولید شد. در حالیکه که کمترین درصد گیاهان عاری از ویروس پنهان زعفران (۳۱/۶۴ و ۲۰/۵۴ به ترتیب بر اساس آزمون الایزا و RT-PCR) در تیمار کشت مریستم با اندازه ۰/۷ میلی‌متر و گرمادرمانی ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه به دست آمد (شکل ۳). در تیمار کشت مریستم به اندازه ۰/۱ میلی‌متر، تیمار گرمادرمانی در دمای ۴۳ درجه سلسیوس و ۳۷ درجه سلسیوس گیاهی بازایی نشد.

جدول ۳. تجزیه واریانس درصد گیاهان زعفران عاری از SaLV با تیمار کشت مرستم توام با گرمادرمانی

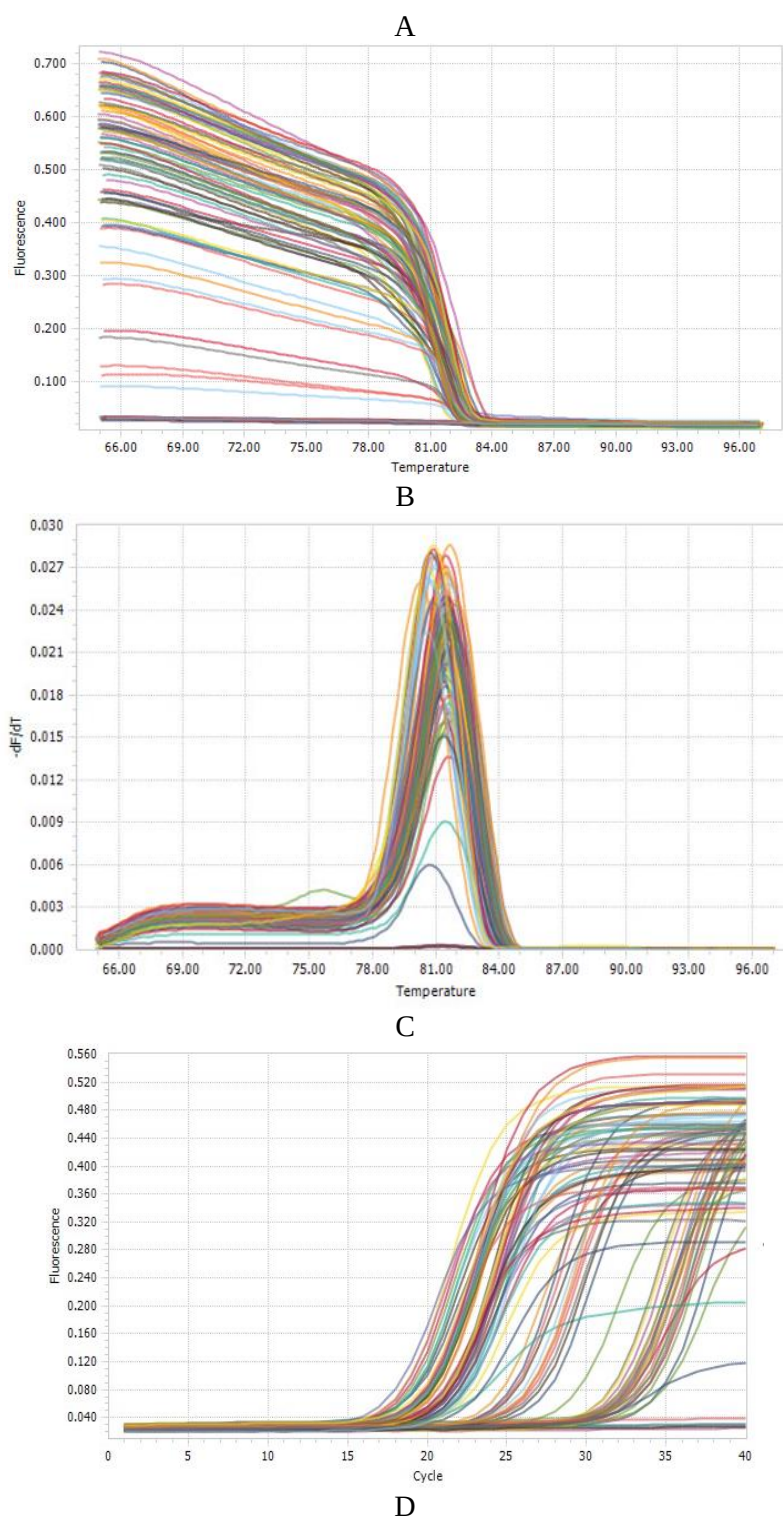
| منبع تغییرات     | درجه آزادی | آزمون الایزا | آزمون RT-PCR | آزمون RT-qPCR |
|------------------|------------|--------------|--------------|---------------|
| اندازه مرستم (M) | ۲          | ۱۴۳۱/۶۴**    | ۹۵۴/۳۸**     | ۱۳۲/۵۴**      |
| گرمادرمانی (T)   | ۲          | ۹۴۳/۶۵**     | ۸۶۵/۹۳**     | ۵۳/۷۴**       |
| M×T              | ۴          | ۱۴۳/۵۲*      | ۲۰۰/۶۵*      | ۳۴/۸۶*        |
| خطا              | ۱۸         | ۴۱/۳۲        | ۵۱/۷۶        | ۱۰/۷۵         |
| ضریب تغییرات     | -          | ۵/۸۵         | ۷/۶۵         | ۱۵/۸۷         |

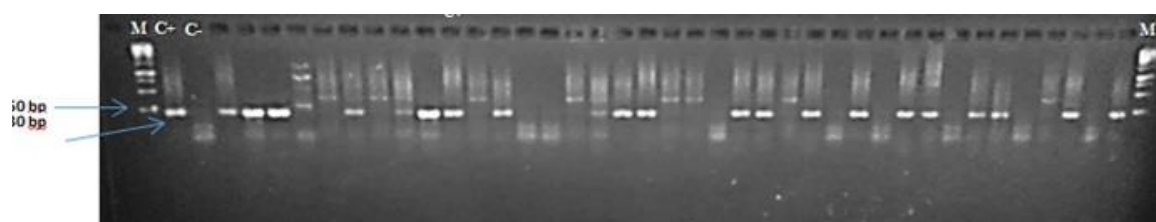
\* و \*\* به ترتیب نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد می باشد.



شکل ۳. میانگین اثر متقابل کشت مرستم × گرمادرمانی بر درصد عاری سازی گیاهان زعفران از SaLV

ستون‌هایی دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی داری براساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد ندارند. براساس داده‌های فلورسنس محصولات RT-qPCR، میزان نشانگر فلورسنس در منحنی ذوب ذوب در محدوده ۸۲-۸۴ درجه سلسیوس کاهش شدیدی نشان داد (شکل ۴A) و تنها یک نقطه اوج در منحنی نقطه اوج ذوب (شکل ۴B) مشاهده شد که تکثیر اختصاصی فقط یک قطعه با جفت آغازگر SaLV-q-F/R با نقطه ذوب خاص بود. منحنی تکثیر با جفت آغازگر SaLV-q-F/R نیز سیگموئیدی (شکل ۴C) بود. برای مشاهده محصول RT-qPCR، از الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد استفاده گردید که وجود یا عدم وجود باند DNA به ترتیب نشان دهنده آلودگی یا عدم آلودگی به ویروس می باشد (شکل ۴D). به منظور تایید نهایی گیاهان عاری از SaLV، گیاهانی که بر اساس آزمون الایزا و RT-PCR عاری از ویروس بودند با آزمون RT-qPCR نیز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مربوط به آستانه چرخه (Ct) تیمارهای ترکیبی کشت مرستم توأم با گرمادرمانی برای گیاهان آلوده زعفران به SaLV بر اساس آزمون RT-qPCR در جدول ۴ آمده است. با توجه به اینکه مقدار آستانه چرخه برای گیاهان شاهد منفی (عاری از ویروس) برابر ۳۰/۶ و برای گیاهان شاهد مثبت (آلوده به ویروس) برابر ۲۴/۷ بود، تیمارهایی با آستانه چرخه بالای ۳۰، به عنوان عاری سازی شده از ویروس و تیمارهایی با آستانه چرخه کمتر از ۳۰، به عنوان آلوده به ویروس ثبت شدند. بر اساس نتایج این آزمون، در تیمار ترکیبی کشت مرستم با اندازه ۰/۳ میلی متر و گرمادرمانی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه، ۱۰۰ درصد گیاهان عاری از SaLV بودند زیرا تمام تکرارهای این تیمار دارای دامنه آستانه چرخه ۳۲/۳-۳۸/۶ (بیش از ۳۰) بودند.





**شکل ۴.** منحنی ذوب (A)، منحنی نقطه اوج ذوب ( $-\Delta F/\Delta T$ ) (B)، منحنی تکثیر (C) و الگوی الکتروفورز افقی محصول RT-qPCR ویروس پنهان زعفران (D) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SaLV-q-F/R، طراحی شده برای تکثیر قطعه ۲۳۳ جفت باز ناحیه Nib به روش RT-PCR. M: نشانگر اندازه DNA ۵۰ جفت باز (DM1160). C-: کنترل منفی. C+: کنترل مثبت. راهکهای بدون نام محصول تیمارهای مختلف آزمایش را نشان می‌دهد که وجود یا عدم وجود باند DNA ۲۳۳ جفت بازی به ترتیب نشان‌دهنده آلودگی یا عدم آلودگی نمونه گیاهی آن تیمار به SaLV می‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان از معنی‌داری اثر اصلی اندازه مرستم و گرمادرمانی در سطح احتمال یک درصد و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال پنج درصد بر درصد گیاهان عاری از SaLV بر اساس آزمون RT-qPCR داشت (جدول ۳). مقایسه میانگین بین سطوح مختلف اندازه مرستم بر درصد گیاهان عاری از SaLV بر اساس آزمون RT-qPCR نشان داد که بیشترین درصد گیاهان بدون SaLV با ۸۰/۳ درصد در کشت مرستم با اندازه ۰/۳ میلی‌متر و کمترین درصد گیاهان عاری از SaLV با ۳۳/۲ درصد در کشت مرستم با اندازه ۰/۷ میلی‌متر به دست آمد (جدول ۵). تاثیر گرمادرمانی بر سطح تجمع نسبی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه به دست آمد (جدول ۵). مقایسه میانگین اثر متقابل کشت مرستم × گرمادرمانی بر درصد گیاهان عاری از SaLV بر اساس آزمون RT-qPCR در گیاه زعفران نشان داد که در تیمار مرستم با اندازه ۰/۳ میلی‌متر و گرمادرمانی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه گیاهان ۱۰۰ درصد عاری از SaLV بودند (جدول ۵).

**جدول ۴.** مقایسه آستانه چرخه (Ct) تیمارهای ترکیبی کشت مرستم توأم با گرمادرمانی برای گیاهان آلوده زعفران به SaLV بر اساس آزمون RT-qPCR

| تیمار      | اندازه مرستم (میلی‌متر)   |           |           |
|------------|---------------------------|-----------|-----------|
|            | ۰/۷                       | ۰/۵       | ۰/۳       |
| گرمادرمانی | ۲۴/۳-۳۱/۶                 | ۲۶/۳-۳۲/۴ | ۳۲/۳-۳۸/۶ |
|            | ۲۳/۳-۳۰/۹                 | ۲۴/۰-۳۳/۳ | ۲۷/۴-۳۶/۳ |
|            | ۲۲/۳-۳۱/۸                 | ۲۲/۲-۳۲/۸ | ۲۸/۱-۳۶/۵ |
|            | ۶۰ min , 50 °C            |           |           |
|            | ۶۰ min , 40 °C            |           |           |
|            | 21 day , 28 °C            |           |           |
|            | -                         | -         | ۳۰/۶      |
|            | -                         | -         | ۲۴/۷      |
|            | شاهد بدون آلودگی به ویروس |           |           |
|            | شاهد با آلودگی به ویروس   |           |           |

**جدول ۵.** مقایسه میانگین اثر متقابل کشت مرستم × گرمادرمانی در تیمارهای ترکیبی بر درصد عاری‌سازی گیاهان زعفران از SaLV بر اساس آزمون RT-qPCR

| تیمار      | اندازه مرستم (میلی‌متر) |         |         |
|------------|-------------------------|---------|---------|
|            | ۰/۷                     | ۰/۵     | ۰/۳     |
| گرمادرمانی | ۶۸/۷ a                  | ۶۵/۶ c  | ۱۰۰ a   |
|            | ۴۵/۶ c                  | ۴۵/۵ d  | ۶۵/۵ c  |
|            | ۵۰/۸ b                  | ۴۳/۶ de | ۷۵/۴ b  |
|            | ۶۰ min , 50 °C          |         |         |
|            | ۶۰ min , 40 °C          |         |         |
|            | 21 day , 28 °C          |         |         |
|            | -                       | ۳۳/۲ c  | ۵۱/۵۶ b |
|            | -                       | -       | ۸۰/۳ a  |
|            | میانگین                 |         |         |

حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۵٪ بر اساس آزمون توکی می‌باشد.

## بحث

سلول‌ها و بافت‌های گیاهی به یک مقدار pH بهینه برای رشد و توسعه در محیط‌های کشت نیاز دارند. pH نه تنها بر جذب مواد غذایی تأثیر می‌گذارد بلکه فعالیت‌های آنزیمی و هورمونی گیاهان را نیز متأثر می‌سازد (Rashid et al., 2018). سطح بهینه pH، فعالیت سیتوپلاسمی را که بر تقسیم سلولی و رشد ریزنمونه‌ها تأثیر می‌گذارد، تنظیم می‌کند و عملکرد غشای سلول را تخریب نمی‌کند. تغییرات در pH خارجی تأثیر کوتاه‌مدتی بر pH سیتوپلاسمی دارند، اما سلول‌ها به سرعت به pH اصلی خود تنظیم می‌شوند. بنابراین، تأثیر pH خارجی بر سیتوپلاسم به مدت طولانی موثر نمی‌ماند. با این حال، این تغییر ممکن است بر رشد گیاهان تأثیر داشته باشد (Bhatia et al., 2005). کاهش سطح ATP باعث کاهش رشد گیاه می‌شود و قرار گرفتن سلول‌ها در معرض pH بسیار پایین می‌تواند منجر به تبدیل فسفات غیرآلی به فسفات آلی در مناطق بیرونی سلول گردد (Bhatia et al., 2005). تغییرات pH، به همراه عوامل دیگر، می‌تواند ناشی از جذب اختصاصی نیتрат یا آمونیوم از محیط رشد گیاه باشد یا از انبساط پروتون‌ها یا یون‌های هیدروکسی ناشی از این جذب باشد. جذب  $\text{NO}_3^-$  منجر به تغییر به سمت pH بازی می‌شود، در حالی که جذب  $\text{NH}_4^+$  منجر به افزایش اسیدیته می‌شود. جذب یون‌های منفی (آنیون) در شرایط اسیدی مزیت دارد، در حالی که جذب یون‌های مثبت (کاتیون) هنگام افزایش pH به بهترین شکل انجام می‌شود (Rashid et al., 2018). pH بالاتر از ۶ باعث ایجاد یک محیط بسیار سفت می‌شود، در حالی که pH کمتر از ۵ منجر به ایجاد محیطی کمتر جامد می‌شود. بنابراین، ضروری است که سطح pH برای ایجاد کالوس و باززایی بهینه شود زیرا pH تأثیر مستقیمی بر باززایی و کالوس‌زایی دارد (Rashid et al., 2018). سطح pH نقش مهمی در فعالیت‌های آنزیمی و محرک رشد ایفا می‌کند که تأثیری بر عملکرد سلول‌ها و رشد کلی گیاهان دارد. به عبارت دیگر، نتایج این آزمایش نشان داد که این سطح pH ۵/۸ متناسب یک محیط کشت پایه برای تولید کالوس در گیاه زعفران فراهم می‌کند.

نتایج نشان داد که ترکیب کشت مرستم با اندازه ۰/۳ میلی‌متر و گرمادرمانی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه می‌تواند به طور موثری منجر به حذف ویروس پنهان زعفران (SaLV) از مواد گیاهی شود. به گفته Křižan و همکاران (۲۰۰۹)، گرمادرمانی در شرایط طبیعی (in vivo) نسبت به شرایط آزمایشگاهی (in vitro) توصیه می‌شود زیرا زحمت کمتری دارد و مدت کوتاه‌تر کشت in vitro خطر تغییرپذیری سوماکلونال را کاهش می‌دهد (Wang et al., 2008). ویروس‌زدایی گیاهان از طریق کشت نوک مرستم و گرمادرمانی در مورد گیاهان متعددی توصیه شده است (Nesi et al., 2009). به منظور افزایش راندمان حذف، ترکیب این روش‌ها، به خصوص در موارد آلودگی‌های مخلوط یا توأم گیاهان با چند ویروس، باید انجام گیرد (Miljanić et al., 2022).

ترکیب گرمادرمانی با کشت مرستم برای بهبود ریشه‌کشی ویروس در گیاهان مختلف انجام شده است، اما این تیمارها بقای مرستم و رشد مجدد ساقه را کاهش می‌دهند (Wang et al., 2018). Ramírez-Malagón و همکاران (۲۰۰۶) دریافتند که ۳۴ تا ۴۲ درصد از مرستم‌های بدون گرمادرمانی زنده ماندند، در حالی که ۲۷ تا ۳۷ درصد از مرستم‌های تیمار شده با حرارت در دو رقم سیر زنده ماندند. نتایج مشابهی نیز در سیر «جوناس» توسط Vieira و همکاران گزارش (۲۰۱۵) شده است. این نتایج، با نتایج پژوهش اخیر همراستا می‌باشد. سطوح کاهش یافته رشد مجدد ناشی از ترکیب گرمادرمانی با کشت مرستم به تعداد کمتری از گیاهان بازسازی شده برای غربالگری گیاهان عاری از ویروس نسبت به کشت مرستم بدون گرمادرمانی نیاز داشت. این تغییرات بافت‌شناسی و درون سلولی نشان داد که گرمادرمانی باعث ایجاد استرس یا آسیب به سلول‌ها می‌شود و در نتیجه باعث کاهش بقای مرستم و رشد مجدد ساقه می‌شود (Wang et al., 2021). مهار ویروسی تحت تیمار با گرما به طور بالقوه انتقال ذرات ویروسی را به مرستم راسی کاهش می‌دهد (Hu et al., 2015)، و ناحیه غیر عفونی را در نوک ساقه گسترش می‌دهد، که بنابراین عاری از ویروس است. طول تیمار گرمادرمانی کلید استقرار موفقیت‌آمیز سیستم روش ریشه‌کشی ویروس است. هنگامی که درمان حرارتی خیلی کوتاه باشد، تعداد زیادی از پیکره‌های ویروس در گیاه باقی

می ماند، بنابراین از ریشه کنی کامل جلوگیری می شود، اما اگر گرمادرمانی برای مدت طولانی انجام شود، مقاومت در برابر حرارت شاخه ها شروع به کاهش می کند (Wang et al., 2018). Tan و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که تیمار ترکیبی گرمادرمانی به مدت ۳۵ روز (در دمای ۳۷ درجه سلسیوس) و کشت مریستم گیاهان گلایی بدون ASGV و ACLSV را از نوک ساقه به طول یک میلی متر تولید کند. دمای بالا از تکثیر ویروس جلوگیری کرده و باعث تخریب آران و ویروس با سازوکار دفاعی ضد ویروسی به نام خاموشی آران مرتبط می شود (Kim et al., 2021; Miljanić et al., 2022). اندازه مریستم نقش مهمی در کارایی حذف ویروس دارد، زیرا مریستم های کوچکتر نرخ بقای کمتری دارند اما بالاترین راندمان حذف ویروس را دارند. استفاده از روش گرمادرمانی توأم با کشت مریستم انتهایی سبب حذف ویروس موزاییک زرد لویا از گیاه گلایل (Sharifi et al., 2015) و حذف دو ویروس لکه سبز برگ سیب و ساقه شیری سیب (Wang et al., 2006) شده است. در مطالعه ما، محدود کردن مدت مرحله کشت در شرایط آزمایشگاهی از طریق گرمادرمانی *in vivo* و باززایی گیاه از مریستم ها، خطر بی ثباتی ژنتیکی را کاهش داد. علاوه بر این، میزان موفقیت حذف با استفاده از گرمادرمانی ترکیبی و کشت نوک مریستم روشی امیدوارکننده است.

### نتیجه گیری و پیشنهادها

این مطالعه دو روش ویروس زدایی زعفران از ویروس پنهان زعفران، یعنی کشت مریستم و گرمادرمانی را مورد بررسی قرار داد و نشان داد که ترکیب کشت مریستم با اندازه ۰/۳ میلی متر و گرمادرمانی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه می تواند به طور موثر ویروس پنهان زعفران (SaLV) را حذف کند. این مطالعه یک روش درمانی موثر برای توسعه مواد تکثیری (بنه) زعفران عاری از ویروس ارائه می کند. علاوه بر این، پیشنهاد می گردد تحقیقات بیشتری به منظور بررسی تأثیر سایر روش ها مانند الکترودرمانی و شیمی درمانی در حذف این ویروس در گیاه زعفران و نیز تأثیر ویروس زدایی روی متابولیت های ثانویه زعفران صورت گیرد.

### منابع

شکرپور، مجید، عابدی، زینب، کلانتری، سیامک و سلامی، سید علیرضا. (۱۳۹۵). بررسی تنوع ژنتیکی برخی نمونه های زعفران ایران با استفاده از نشانگرهای ملکولی RAPD و ISSR. *زراعت و فناوری زعفران*، ۴ (۴)، ۲۵۷-۲۶۷.  
<https://doi.org/10.22048/jsat.2016.38672>

### REFERENCES

- Ágoston, J., Almási, A., Pinczés, D., Sáray, R., Salánki, K., & Palkovics, L. (2024). First report of saffron latent virus in *Crocus sativus* from Hungary. *Plant Disease*, 108(2), 540. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-23-1765-PDN>
- Ahrazem, O., Argandoña, J., Castillo, R., Rubio-Moraga, A., & Gómez-Gómez, L. (2016). Identification and cloning of differentially expressed SOUL and ELIP genes in saffron stigmas using a subtractive hybridization approach. *PloS One*, 11(12), e0168736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168736>
- Bayati, S., Shams-Bakhsh, M., & Moini, A. (2011). Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(3), 442-450. In Persian. <https://doi.org/20.1001.1.16807073.2011.13.3.2.9>
- Benke, A. P., Krishna, R., Khandagale, K., Gawande, S., Shelke, P., Dukare, S., ... & Mahajan, V. (2023). Efficient elimination of viruses from garlic using a combination of shoot meristem culture, thermotherapy, and chemical treatment. *Pathogens*, 12(1), 129. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010129>
- Bruni, R., Bellardi, M. G., & Parrella, G. (2016). Change in chemical composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil caused by alfalfa mosaic virus. *Journal of Phytopathology*,



- 164(3), 202-206. <https://doi.org/10.1111/jph.12410>
- Caiola, M. G., & Faoro, F. (2011). Latent virus infections in *Crocus sativus* and *Crocus cartwrightianus*. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(2), 175-182.
- Cervera, H., Ambrós, S., Bernet, G. P., Rodrigo, G., & Elena, S. F. (2018). Viral fitness correlates with the magnitude and direction of the perturbation induced in the host's transcriptome: the tobacco etch potyvirus—tobacco case study. *Molecular Biology and Evolution*, 35(7), 1599-1615. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy038>
- Chakraborty, S. (2016). Transcriptome from saffron (*Crocus sativus*) plants in Jammu and Kashmir reveals abundant soybean mosaic virus transcripts and several putative pathogen bacterial and fungal genera. *BioRxiv*, 079186. <https://doi.org/10.1101/079186>
- Chen, J. (2000). Occurrence and control of mosaic disease [turnip mosaic virus] in saffron (*Crocus sativus*). *Zhejiang Nongye Kexue*, 3, 132-135.
- Gogile, A., Markos, T., Kebede, M., Kidanemariam, D., & Abraham, A. (2024). Elimination of yam mosaic virus from yam using an optimized combination of meristem culture and thermotherapy. *Australasian Plant Pathology*, 53(2), 185-197. <https://doi.org/10.1007/s13313-024-00965-9>
- González-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F. A., Barajas, D., Vargas, M., ... & Díaz-Ruiz, J. R. (2004). Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with potato virus X. *Molecular Plant Pathology*, 5(1), 29-35. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00202.x>
- Haseli M., Valouzi H. & Dizadji A. (2024). Beet western yellows virus frequently infects *Crocus sativus* in Iran. *Australasian Plant Disease Notes*, 19(1). <https://doi.org/10.1007/s13314-024-00538-1>
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F., & Zhou, J. (2015). Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121, 435-443. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0714-6>
- Kazemi, N., Habashi, A. A., & Asadi, W. (2019). Evaluation of combined treatments of thermotherapy and apical meristem culture efficiency on virus elimination from in vitro shootlets of Red Flash Apple (*Malus pumila* Mill.). *Journal of Horticultural Science*. 33(3), 499-509. <https://doi.org/10.5555/20203567082>
- Kim, Y., Kim, Y. J., & Paek, K. H. (2021). Temperature-specific vsiRNA confers RNAi-mediated viral resistance at elevated temperature in *Capsicum annuum*. *Journal of Experimental Botany*, 72(4), 1432-1448. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa527>
- Křižan, B., Ondrušiková, E., Holleínová, V., Moravcova, K., & Blahova, L. (2009). Elimination of Grapevine fanleaf virus in grapevine by in vivo and in vitro thermotherapy. *Horticultural Science*, 36(3), 105-108. <https://doi.org/10.17221/37/2008-HORTSCI>
- Kwon, Y. H., Choi, W. I., Kim, H. K., Kim, K. O., Kim, J. H., Huh, Y. S., & Park, W. T. (2022). Efficacy of virus elimination from '*Rehmannia glutinosa*' using simultaneous thermotherapy, chemotherapy, and meristem culture. *Plant Omics*, 15(1), 6-12. <https://doi.org/10.21475/POJ.15.01.22.p3527>
- Leone, S., Recinella, L., Chiavaroli, A., Orlando, G., Ferrante, C., Leporini, L., & Menghini, L. (2018). Phytotherapeutic use of the *Crocus sativus* L. (Saffron) and its potential applications: A brief overview. *Phytotherapy Research*, 32(12), 2364-2375. <https://doi.org/10.1002/ptr.6181>
- Liu, J., Zhang, X., Yang, Y., Hong, N., Wang, G., Wang, A., & Wang, L. (2016). Characterization of virus-derived small interfering RNAs in Apple stem grooving virus-infected in vitro-cultured *Pyrus pyrifolia* shoot tips in response to high temperature treatment. *Virology Journal*, 13, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0625-0>
- Lorenzo, C., Shadmani, G., Valouzi, H., Moratalla-López, N., Bahlolzada, H., Sánchez-Gómez, R., ... & Alonso, G. L. (2023). Saffron Stigmas Apocarotenoid Contents from Saffron Latent Virus (SaLV)-Infected Plants with Different Origins and Dehydration Temperatures. *Horticulturae*, 9(8), 933. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080933>
- Martinez-Fajardo, C., Navarro-Simarro, P., Morote, L., Rubio-Moraga, Á., Mondéjar-López, M.,



- Niza, E., ... & López-Jiménez, A. J. (2024). Exploring the viral landscape of saffron through metatranscriptomic analysis. *Virus Research*, 345, 199389. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199389>
- Miglino, R., Jodłowska, A., & Van Schadewijk, A. R. (2005). First report of Narcissus mosaic virus infecting *Crocus* spp. cultivars in the Netherlands. *Plant Disease*, 89(3), 342-342. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0342C>
- Miljanić, V., Rusjan, D., Škvarč, A., Chatelet, P., & Štajner, N. (2022). Elimination of eight viruses and two viroids from preclonal candidates of six grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) through in vivo thermotherapy and in vitro meristem tip micrografting. *Plants*, 11(8), 1064. <https://doi.org/10.3390/plants11081064>
- Moratalla-López, N., Parizad, S., Habibi, M. K., Winter, S., Kalantari, S., Bera, S., ... & Alonso, G. L. (2021). Impact of two different dehydration methods on saffron quality, concerning the prevalence of Saffron latent virus (SaLV) in Iran. *Food Chemistry*, 337, 127786. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127786>
- Movi, S., Dizadji, A., Parizad, S., & Zarghani, S. N. (2022). Biological characteristics and genetic variation analyses of saffron latent virus (SaLV) based on genomic P1-Pro and P3 regions. *European Journal of Plant Pathology*, 164(2), 299-312. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02561-3>
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473—497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nesi, B., Trinchello, D., Lazzereschi, S., Grassotti, A., & Ruffoni, B. (2009). Production of lily symptomless virus-free plants by shoot meristem tip culture and in vitro thermotherapy. *HortScience*, 44(1), 217-219. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.1.217>
- Panattoni, A., Luvisi, A., & Triolo, E. (2013). Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(1), 173-188. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2013111-3201>
- Parizad, S., Dizadji, A., Habibi, M. K., Winter, S., Kalantari, S., Movi, S., ... & Moratalla-Lopez, N. (2019). The effects of geographical origin and virus infection on the saffron (*Crocus sativus* L.) quality. *Food Chemistry*, 295, 387-394. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.116>
- Parizad, S., Dizadji, A., Koochi Habibi, M., Winter, S., Kalantari, S., Movi, S., ... & Ayllón, M. A. (2018). Description and genetic variation of a distinct species of potyvirus infecting saffron (*Crocus sativus* L.) plants in major production regions in Iran. *Annals of Applied Biology*, 173(3), 233-242. <https://doi.org/10.1111/aab.12456>
- Petrov, N. M., Stoyanova, M. I., & Gaur, R. K. (2024). Characterization and management of economically important viruses on sweet pepper cultivars in Europe. In *Pepper Virome* (pp. 445-475). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15576-5.00010-1>
- Ramírez-Malagón, R., Pérez-Moreno, L., Borodanenko, A., Salinas-González, G. J., & Ochoa-Alejo, N. (2006). Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 103-110. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9102-6>
- Shabala, S. (2012). *Plant stress physiology*, CABi Publishing, (Shabala, S., & Bose, J. 2012: 91–126).
- Shalitin, D., & Wolf, S. (2000). Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiology*, 123(2), 597-604. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.597>
- Sharifi Nezamabad, P., Koochi Habibi, M., Dizadji, A., & Kalantari, S. (2015). Elimination of Bean yellow mosaic virus through thermotherapy combined with meristem-tip culture in gladiolus corms. *Journal of Crop Protection*, 4(4), 533-543. <https://doi.org/20.1001.1.22519041.2015.4.4.10.8>
- Shokrpour, M. (2019). Saffron (*Crocus sativus* L.) breeding: opportunities and challenges. In

- Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops*, edited by Al-Khayri, J., Jain, S., Johnson, D.. Springer, Cham. : Volume 6, 675-706. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8_17)
- Tan, R., Wang, L., Hong, N., & Wang, G. (2010). Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101, 229-235. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9681-0>
- Valouzi, H., Dizadji, A., Golnaraghi, A., Salami, S.A., Selmi, I., Fontdevila Pareta, N. *et al.* (2025) First detection of saffron dwarf virus, wheat dwarf virus, wheat dwarf virus-associated alphasatellite and a new putative potyvirus species in saffron in Iran. *New Disease Reports*, vol.51, e70022. <https://doi.org/10.1002/ndr2.70022>
- Vieira, R. L., da Silva, A. L., Zaffari, G. R., Steinmacher, D. A., de Freitas Fraga, H. P., & Guerra, M. P. (2015). Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1733-3>
- Vivek, M., & Modgil, M. (2018). Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar 'Oregon Spur-II'. *Virus Disease*, 29, 75-82. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0437-5>
- Wang, L., Wang, G., Hong, N., Tang, R., Deng, X., & Zhang, H. (2006). Effect of thermotherapy on elimination of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic leaf spot virus for in vitro-cultured pear shoot tips. *HortScience*, 41(3), 729-732. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.3.729>
- Wang, M. R., Cui, Z. H., Li, J. W., Hao, X. Y., Zhao, L., & Wang, Q. C. (2018). In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant methods*, 14, 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>
- Wang, M. R., Hamborg, Z., Blystad, D. R., & Wang, Q. C. (2021). Combining thermotherapy with meristem culture for improved eradication of onion yellow dwarf virus and shallot latent virus from infected in vitro-cultured shallot shoots. *Annals of Applied Biology*, 178(3), 442-449. <https://doi.org/10.1111/aab.12646>
- Wang, Q., Cuellar, W. J., Rajamaki, M. L., Hirata, Y., & Valkonen, J. P. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 237-250. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x>
- Zheng, H. Y., Wu, X. Y., Han, K. L., Chen, Z. Q., Song, X. J., Peng, J. J., ... & Han, K. L. (2018). First Report of Beet western yellows virus Infecting *Crocus sativus* in China. *Plant Disease*, 102(7), 1471-1471. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1579-PDN>