

LA BIOTECNOLOGÍA EN LA MEJORA DEL AZAFRÁN (*CROCUS SATIVUS*)

María Luisa González Castañón

Unidad de Tecnología en Producción Vegetal; Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA), Avda. Montañana 930; 50059 Zaragoza.
(mlgonzalez@aragon.es)

1. Introducción

1.1 Características y problemática de la planta del azafrán

Crocus sativus que significa crocus cultivado no se ha encontrado en forma silvestre ni naturalizado. En los lugares que se abandona el cultivo degenera y muere. De esta forma la extinción de un amplio número de variedades de azafrán supone para su investigación la pérdida de unos genes que posiblemente aportarían cualidades agronómicas importantes.

Las flores del *Crocus sativus* contienen estigmas que una vez secos se conocen como azafrán. Se utilizan como condimento para colorear y dar sabor y aroma a los alimentos. El componente más importante de estos estigmas es la crocina, un pigmento amarillo que se utiliza como colorante natural en la alimentación y al que se le atribuyen otras muchas propiedades. Los pigmentos carotenoides responsables del color son la crocina y crocetina, también contienen sustancias incoloras, safranal, que es el que da un olor característico. La picrocrocina es el componente responsable del gusto amargo del azafrán.

El azafrán es una planta triploide y por lo tanto estéril, que el agricultor reproduce a través de su cormo.

La reproducción vegetativa conserva indefinidamente el genotipo. Por lo que la vía de la selección clonal está mermada, al haber desaparecido el cultivo en muchas zonas y no existir clones genéticamente diversos en los que buscar genotipos de interés.

Tampoco existen colecciones o bancos de germoplasma de azafrán, y además, no resulta fácil el intercambio de material de élite.

Los nuevos genotipos en el azafrán han de conseguirse necesariamente por técnicas *in vitro*. Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido incorpora-

das con éxito a los programas de mejora en plantas con propagación vegetativa.

Es posible que se hayan producidos variaciones en el azafrán pero estas son difíciles de detectar en un genotipo triploide. Las mutaciones no se distribuyen entre cormos porque no existe multiplicación sexual por semillas. A lo largo de los años se fueron acumulados en poblaciones y fueron guardadas por los agricultores de los distintos países.

La selección clonal y la combinación con especies afines silvestres es el futuro.

Por lo tanto los nuevos genotipos y su detección han de conseguirse por técnicas de cultivo *in vitro* en las que se consigan individuos haploides en los que puedan manifestarse los caracteres recesivos de interés.

1.2 Descenso en la producción por problemas económicos

- Mano de obra.
- Problemas de mercados.
- Competencia con otros Países.

Se corre el riesgo de que no sólo se pierda la hegemonía en Europa para venta del azafrán con fines culinarios sino que otros países aprovechen el vacío actual de un desarrollo del producto para la industria farmacéutica y usos médicos.

1.3 Descenso en la producción por Problemas agronómicos

Entre las causas se pueden citar.

- el estado de los cormos con diversas infecciones internas,
- el uso inadecuado de tierras,
- las enfermedades propias del cultivo,
- la competencia con otros cultivos.

2. Mejora del cultivo

Para mejorar la producción del azafrán se necesitaría actuar en varios campos.

- Dentro de la propia planta:
 - Incrementando el número de flores por planta,
 - Aumentando el tamaño del estigma en longitud y espesor.
- Aumentando el porcentaje de colorante y aromas.
- En la elección de los cormos sanos y más vigorosos.
- Obteniendo un proceso de multiplicación eficaz.

2.1 La biotecnología en la mejora del azafrán

La elección de los cormos sanos y más vigorosos para realizar las nuevas plantaciones es el factor más importante para mantener un cultivo productivo.

Se necesita un proceso de multiplicación eficaz poniendo a disposición de los agricultores el material de plantación en un periodo más corto que el utilizado tradicionalmente (ciclos de tres o cuatro años).

El cultivo de tejidos *in vitro* es una herramienta apropiada para lograrlo.

2.2 Para incentivar el cultivo se propone

Una propagación masiva y eficaz de cormos libres de patógenos. Obteniendo cormos saneados utilizando el cultivo de meristemos y ovarios *in vitro*.

Incrementar la tasa de multiplicación mediante técnicas de cultivo *in vitro*, en concreto la embriogénesis somática.

Diversificar la utilidad de los productos extraídos del azafrán para usos en parafarmacia y medicina con la producción de crocina sobre callos y estigmas crecidos *in vitro*.

3. Multiplicación de *Crocus sativus*

- *Crocus sativus* sólo se multiplica vegetativamente.
- Cada año nuevos cormos hijos se desarrollan encima del cormo madre.
- El índice de multiplicación es de 3-4 cormos por cormo madre y por año.



Figura 1 A. Cormo de azafrán mostrando por dónde va a dividirse. B. Tres cormos hijos sobre cormo madre ya seco.

4. Trabajos realizados

4.1 Ciclo del azafrán

Se ha estudiado el desarrollo y funcionamiento de esta especie

- La formación de los cormos hijos comienza durante el periodo de crecimiento vegetativo de noviembre a abril.
- La brotación de los nuevos cormos requiere un periodo de maduración que tiene lugar durante el verano.

Se puede resumir en el esquema siguiente

- noviembre — marzo — junio — agosto — octubre.
- Periodo vegetativo Periodo generativo Letargo Floración

4.2 Factores climáticos y floración

- La oscuridad constante no impidió la floración. En condiciones de oscuridad y a 9 °C los cormos florecieron a las cuatro semanas de su plantación
- La iluminación constante inhibió la floración.
- Temperaturas constantes de 25 °C inhibieron la floración.

4.3 El sustrato y la floración

La iniciación floral resultó independiente del sustrato utilizado (figura 2)



Figura 2 A. Flores de *Cr. sativus* en perlita. B. flores en vermiculita.

4.4 Selección de cormos según el número de tallos, flores y hojas

- Existe una gran variabilidad entre cormos de una misma especie tanto para número de tallos como para número de hojas. (Tabla 1)
- Dentro de cada especie, el número de tallos está relacionado con el diámetro del cormo de partida y refleja el número de cormos hijos.
- Sobre 16 *C. sativus* seleccionados, el número medio de cormos hijos obtenidos fue $3,56 \pm 0,7$ variando de 3 a 5.

Tabla 1 Número de tallos, flores y hojas por cormo obtenidos al año de cultivo

Especie	nº cormos	Tallos/ cormo	Flores/ cormo	Hojas/ tallo
<i>C. cartwrightianus</i> "Albus"	20	$1,9 \pm 0,9$	$3,3 \pm 0,6$	$15,2 \pm 7,5$
<i>C. sativus</i>	60	$4,4 \pm 1,6$	$5,7 \pm 0,7$	$19,8 \pm 5,5$
<i>C. sativus</i> selección	44	$2,7 \pm 1,4$	$3,2 \pm 0,9$	$14,3 \pm 13,1$

4.5 Obtención de cormos saneados utilizando el método de micro propagación in vitro

Embriogénesis somática.

Se estableció un protocolo para la clonación, vía embriogénesis, de los cormos seleccionados.

El material utilizado fue:

- Ovarios de cormos antes de la apertura floral.
- Ovarios de cormos después de la apertura floral.

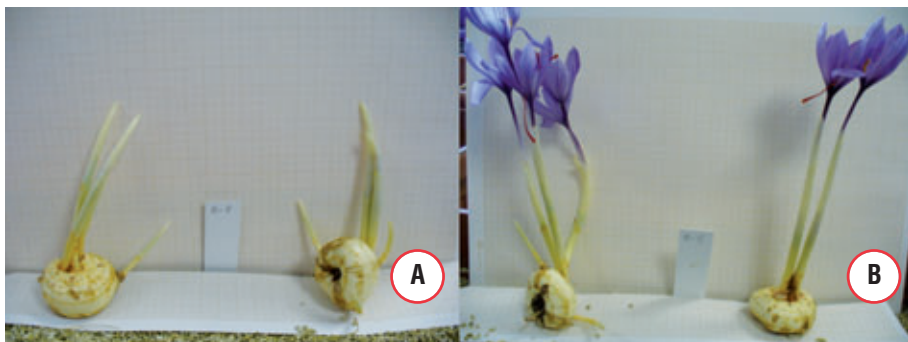


Figura 3 A. Cormos de azafrán antes de la apertura floral. B. cormos de azafrán con flores abiertas.

Obtención de cormos in vitro.

Se utilizaron cormos de 0,8 -1,0 cm de diámetro.

Se estudian tres especies: *C. sativus*, *C. cartwrightianus* “Albus” y *C. serotinus* (azafrán serrano).Figura 4

Los medios de cultivo utilizados contenían auxinas y citoquininas.

El material sembrado se mantuvo en oscuridad a 8-10 ° C.

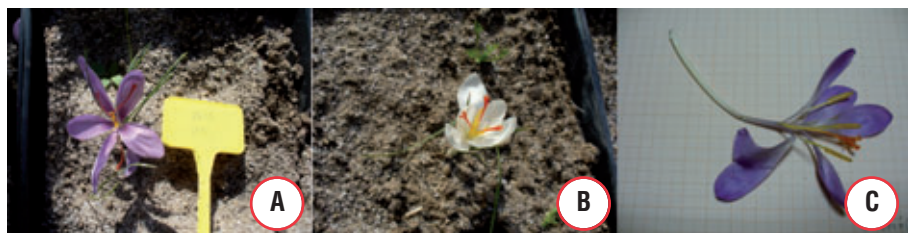


Figura 4 A. *C. sativus*, B. *C. cartwrightianus* “Albus”, y *C. C. serotinus* (azafrán serrano).

4.5.1 Resultados

Embriogénesis somática

- Un 3% de los ovarios sembrados y tomados de flores antes de abrir produjeron callos embriogénicos, Figura 5A
- Sólo se obtuvieron 1,5% de callos embriogénicos cuando los ovarios se tomaron de flores abiertas.

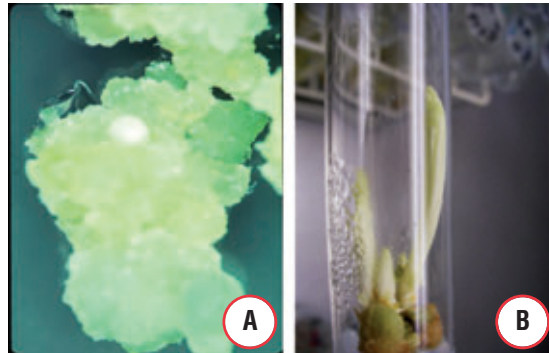


Figura 5 A. Callos cormogénicos B. Cormos con tallos de *Crocus serotinus*.

Multiplicación de cormos in vitro.

- 32 cormos, de los 130 sembrados desarrollaron cormos hijos a los tres meses de cultivo.
- En la figura 5 B se muestran los obtenidos de *C. serotinus*.

4.5.2 Ventajas de la micropropagación

- La técnica de micropropagación ofrece una alternativa que permitiría la producción de cormos de material seleccionado en ciclos más rápidos de 3-4 meses. El material obtenido será homogéneo y saneado desde el punto de vista fitosanitario.
- El crecimiento de callos *in vitro* ofrece la posibilidad de obtener material de *Crocus sativus* y de otros *Crocus* afines para la extracción de crocina.

4.6 Recolección de otras especies de *Crocus* afines al azafrán *Crocus sativus*

En la tabla 2 se recogen los lugares y número de cormos recolectados.

Tabla 2 Especies de *Crocus* recolectadas y multiplicadas

Espece	Nº cormos	Lugar	Fecha	Multiplicado
<i>C. nudiflorus</i>	7	Asturias	Oct.2008	si
<i>C. serotinus</i>	10	Cantabria, Asturias	Set 2010	no
<i>C. vernus</i> Subsp. <i>albiflorus</i>	5	Huesca	Junio 2010	no

Agradecimientos

A D. Jose Antonio Fernández por su amable suministro de material vegetal de cormos de *Crocus sativus* seleccionados de su colección de Castilla La Mancha.