

Evaluación de métodos para la producción *in vitro* de cormos de azafrán (*Crocus sativus* L.) en Tucumán, Argentina

Gabriel Ricardo Vellicce*

RESUMEN

El azafrán (*Crocus sativus* L.) es una planta perenne y bulbosa cuyo estigma constituye la especia. Es estéril y su única vía de propagación es la vegetativa, con baja tasa de multiplicación y problemas de infecciones. La micropropagación constituye una alternativa de producción de alto número de cormos de elevada sanidad. En este trabajo se logró la implantación *in vitro* de azafrán con tratamiento de carbexina + tiran asociado al agregado de antibióticos (cefotaxima y gentamicina). Se evaluaron tres medios de cultivo 1) ½ MS suplementado con tiazurón (TDZ, 4,4 mg/litro), Ácido Indol acético 1,75 mg/litro y 40 g/l de sacarosa. 2) MS 2 mg/l ácido indol 3-butírico 10 mg/l 6 benzilaminopurina y con 50 g/l de sacarosa. 3) MS con TDZ 0,5 mg/l y 30 g/l de sacarosa. La inducción de cormos se hizo en MS libre de hormonas con 60 g/l de sacarosa. La eficiencia global de implantación fue del 28,3%. La mayor tasa de multiplicación se alcanzó en el medio 3 (1:7) y la menor en el medio 2 (1:3). Si bien los tres medios fueron adecuados para la multiplicación *in vitro* de azafrán solo los explantes derivados del medio 2 diferenciaron cormos.

Palabras clave: biotecnología vegetal, micropropagación, especia.

ABSTRACT

Evaluation of methods for the *in vitro* production of saffron corms (*Crocus sativus* L.) in Tucumán, Argentina

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a perennial and bulbous plant, whose stigma constitutes the spice. Saffron is sterile and is propagated vegetatively, with low multiplication rate and infection problems. The micropropagation constitutes an alternative of production of high number of healthy corms. In this work, *in vitro* implantation of saffron was achieved with carbexine + tiran treatment associated with the addition of antibiotics (cefotaxime and gentamicin). Three culture media were evaluated: 1) ½ MS supplemented with thidiazuron (TDZ, 4.4 mg/l), Indole acetic acid 1.75 mg/l and 40 g/l sucrose. 2) MS 2 mg/l indole 3-butyric acid 10 mg/l 6 benzylaminopurine and with 50 g/l sucrose. 3) MS with TDZ 0.5 mg/l and 30 g/l of sucrose. The induction of corms was done in hormone-free MS with 60 g/l of sucrose. The overall implementation efficiency was 28.3%. The highest multiplication rate was reached in the medium 3 (1: 7) and the lowest in the medium 2 (1: 3). Although the three media were adequate for the *in vitro* multiplication of saffron, only explants derived from medium 2 differentiated corms..

Key words: plant biotechnology, micropropagation, spice.

Artículo recibido: y Aceptado: .

*Sección Biotecnología, EEAOC, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), gvellicce@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El azafrán (*Crocus sativus* L.) es una planta perenne y bulbosa uno de los primeros centros de producción se encuentra en las mesetas de Pampore, India, donde se ha cultivado azafrán desde 750 DC. El estigma es cosechado a mano de flores de color púrpura en otoño, por lo que su producción está normalmente favorecida en países con mano de obra barata como Irán y Azerbaiyán, pero la producción también se lleva a cabo en países como Grecia, España, Argentina o los EE.UU. con una producción global superior a las 200 t (Parray *et al.*, 2012).

En Argentina existe producción de azafrán en Córdoba, Mendoza y San Luis, principalmente de manera artesanal a baja escala. La mayoría de la especia que se consume en nuestro país se importa desde España e Irán, participando en una manera mucho menor Italia, India y Alemania. El mercado argentino importó azafrán por aproximadamente 10 millones de dólares en 2016, con un precio promedio FOB para ese período de 1580 U\$/kg, representando aproximadamente 6 toneladas de producto. Este precio alcanza al azafrán industrial (en polvo y de baja calidad), mientras que el azafrán en hebras de mediana calidad llega a 3000 U\$/kg y puede valer hasta 6000 U\$/kg (categoría 1, normas ISO 3632), de acuerdo a valores de crocina, picrocrocina y safranal.

Un detalle de las importaciones argentinas de azafrán entre 2000/2016 se muestra en el tabla 1.

El *C. sativus* es una especie triploide y estéril que se multiplica únicamente de manera vegetativa por producción de nuevos bulbos (cormos), a partir de las plantaciones comerciales. Normalmente se obtienen solo tres o cuatro cormos por temporada por cada cormo madre bajo condiciones de campo. Un cormo sobrevive solo una temporada, reproduciéndose a través de la división de cormos que finalmente dan lugar a nuevas plantas; por lo tanto, los cormos son indispensables para la propagación del azafrán (Husaini *et al.*, 2010a y Husaini *et al.*, 2010b). Además de la baja tasa de multiplicación de cormos, existen problemas sanitarios y las infecciones fúngicas restringen la disponibilidad de material de siembra adecuado, reduciendo por lo tanto drásticamente la productividad del cultivo. La producción promedio de azafrán en los últimos diez años fue de 4,4 kg/ha, considerablemente menor a la de décadas pasadas (5,3 kg/ha) y lejos del potencial de 10 kg/ha (Sheibani *et al.*, 2007).

Los estigmas de la flor del azafrán constituyen el producto comercial (Figura 1), que se utilizan en todo el mundo como especia, pero que además se usan como afrodisíaco, estimulante digestivo y tónico para la disentería, entre otras aplicaciones medicinales (Abdullaev and Frenkel, 1999).

Tabla 1. Resumen de las principales importaciones de azafrán en Argentina durante el período 2000-2016. Los valores están expresados en dólares americanos (FOB U\$). Fuente: datos tomados de AFIP e INTAL (Gentileza Lic. P. de Las Heras, Sidetec).

Año/País	España	Irán	Italia	India	Alemania	Total
2000	875.935	598.913	-	-	935	1.475.788
2001	970.088	879.999	-	-	321	1.850.409
2002	521.773	-	55.800	-	-	577.573
2003	464.694	360.815	31.000	-	199	856.708
2004	592.482	1.219.392	30.938	-	700	1.843.514
2005	601.412	684.003	-	-	-	1.285.415
2006	812.664	637.516	-	-	476	1.450.656
2007	1.072.226	1.327.481	57.882	-	470	2.458.071
2008	730.676	6.799.916	-	12.830	1.029	7.544.477
2009	3.423.359	8.329.388	-	-	-	11.752.747
2010	2.639.275	4.101.617	-	-	-	6.740.893
2011	1.129.843	3.930.330	-	-	-	5.060.173
2012	4.983.720	542.164	309	-	-	5.526.193
2013	7.573.013	-	642	-	-	7.573.655
2014	5.147.033	8.150	1.303	-	-	5.156.487
2015	7.146.794	4.384	-	-	-	7.151.179
2016	10.958.043	-	525	-	-	10.958.569
Total	49.643.037	29.424.074	178.402	1.283	4.132	79.262.515



Figura 1. Flor de *Crocus sativus* L. donde se observan los tres estigmas rojos que constituyen la especia. Escala en centímetros.

La esterilidad del azafrán limita la aplicación del mejoramiento genético convencional, mientras que el cultivo de tejidos vegetales ofrece un gran potencial para una producción sostenible. El primer estudio referente a micropropagación de azafrán se publicó en 1979 (Ding *et al.*, 1979) donde produjeron brotes a partir del cultivo de secciones superficiales de cormos de *Crocus sativus*. Estos mismos investigadores usaron medios de cultivo con MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 2,4-D (ácido 2,4, diclorofenoxiacético) KIN (Kinetina) y ANA (ácido nafatalén acético) para inducir callos y posteriormente plántulas (Ding *et al.*, 1981). Varios estudios posteriores se realizaron sobre diferentes aspectos de la micropropagación de azafrán, a través de calogénesis, embriogénesis y organogénesis. La inducción de callos fue lograda en numerosos trabajos, entre los que podemos mencionar los de Isa y Ogasawara (1988), George *et al.* (1992) e Ilahi *et al.* (1987), usando medios de cultivo con MS y diferentes reguladores de crecimiento como 2,4-D, BA (N6 Benzilaminopurina) y ANA. Ebrahimzadeh *et al.* (1996) cultivaron segmentos de cormos de *Crocus sativus*, *C. almehensis* y *C. gilanicus* en MS y LS (Linsmaier and Skoog 1965) con 2,4-D, ANA, BA, KIN (kinetina) y Zeatina. Observaron que, además de la formación de callos, se formaron estructuras similares a hojas y raíces. Algunos esfuerzos se realizaron para la obtención de cormos bajo condiciones *in vitro* (Homes *et al.*, 1987; Plessner *et al.*, 1990; Dhar y Sapru, 1993; Karaoglu *et al.*, 2007; Raja *et al.*, 2007; Sharma *et al.* 2008; Ahouran *et al.*, 2012; Parray *et al.*, 2012). En 1994, Agüero y Tizio obtuvieron una gran cantidad de brotes a partir de yemas marginales de cormos usando medio MS adicionado con BA; las yemas obtenidas fueron luego transferidas a medio MS con 60 g/l de sacarosa donde formaron cormos. Este trabajo constituye la primera experiencia en Argentina respecto a cultivo *in vitro* de azafrán. Otros trabajos estuvieron orientados a la

obtención de estructuras similares a estigmas como Sano (1987); Himeno *et al.* (1988); Koyama *et al.* (1988); Hori *et al.* (1988); Sarma *et al.* (1990); Visvanath *et al.* (1990); Lu *et al.* (1992); Han y Zhang (1993); Yongjiong *et al.* (1996). Análisis químicos de esas estructuras demostraron la presencia de crocina y picrocina pero ausencia de safranal (Sarma *et al.*, 1990), mientras que los estudios de Visvanath *et al.* (1990) encontraron, además de crocina y picrocina, safranal en los mismos niveles que los estigmas secos. La embriogénesis somática fue desarrollada en los estudios de Ebrahimzadeh *et al.* (2000); Karamian (2004); Blazquez *et al.* (2004); Darvishi *et al.* (2007); Sheibani *et al.* (2007); Demeter *et al.* (2010). El uso de formulaciones de MS y LS adicionados con ANA, 2,4-D, BA y TDZ (Tidiazurón) solos o en combinaciones fueron los medios utilizados para lograr la proliferación de embriones somáticos en azafrán.

El presente trabajo tiene por objetivo general la puesta en marcha y evaluación de protocolos para la producción *in vitro* de cormos de azafrán; y en particular, evaluar los sistemas de desinfección de explantes y validar distintos medios de cultivo publicados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal. Cormos de *Crocus sativus* L. fueron obtenidos del campo en 2012 y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. En el mes de febrero de 2013 se retiraron de las bajas temperaturas y se mantuvieron a temperatura ambiente en placas de petri para evitar su desecación, hasta observar crecimiento de los brotes (Figura 2). En esta etapa se lavaron profusamente con agua corriente con Tween 20 al 0,1% y después se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se aplicaron diferentes tratamientos de desinfección: 1) se sumergieron los cormos en etanol 70% durante 1 minuto y seguidamente en hipoclorito de sodio al



Figura 2. Cormos de azafrán en brotación incipiente que fueron usados como fuente de ápices para iniciar el cultivo *in vitro*. Escala en centímetros.

1% durante 10 minutos: al finalizar esta etapa se hicieron tres lavados con agua destilada estéril y se sembraron brotes apicales (Fig. 3A y 3B). Se ensayaron otras variantes de desinfección como 2) desinfección (como en 1) y agregado de cefotaxima y gentamicina en el medio de implantación a 50 mg/l de cada uno; 3) luego del tratamiento como en 1, se sumergieron los cormos en una solución del fungicida Iprodiona (Rovral 10%) durante 10 minutos y luego se agregaron al medio de cultivo cefotaxima y gentamicina a 50 mg/l; 4) Idem a 3, reemplazando el fungicida por Captan 10%; 5) procedimiento como en 1 y luego agregado de 0,12 ml de Iprodiona al 5% al medio junto a cefotaxima y gentamicina en las concentraciones previamente descritas, 6) se sumergieron los cormos en una solución al 10% de carboxina + tiran durante 30 minutos y se procedió como en 1, agregando los antibióticos como en 2.

En el presente trabajo se ensayaron tres medios de cultivo diferentes:

Medio 1 (Parray et al., 2012): Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad suplementado con tidiázurón (TDZ, 4,4 mg/litro), Ácido Indol acético (IAA, 1,75 mg/litro) y con 40 g/l de sacarosa. Los explantes se cultivaron a 20°C.

Medio 2 (Sharma et al., 2008): Medio MS suplementado con ácido indol 3-butírico (IBA) a 2 mg/litro, 6 benzilaminopurina (BA) a 10 mg/litro y con 50 g/l de sacarosa. Los explantos se cultivaron a 20°C.

Medio 3 (Sheibani et al., 2007): Medio MS suplementado con TDZ 0,5 mg/litro y 30 g/l de sacarosa. Los explantes se cultivaron a 25°C.

Medio de inducción de cormos: Medio MS libre de hormonas con 60 g/l de sacarosa (Agüero y Tizio 1994).

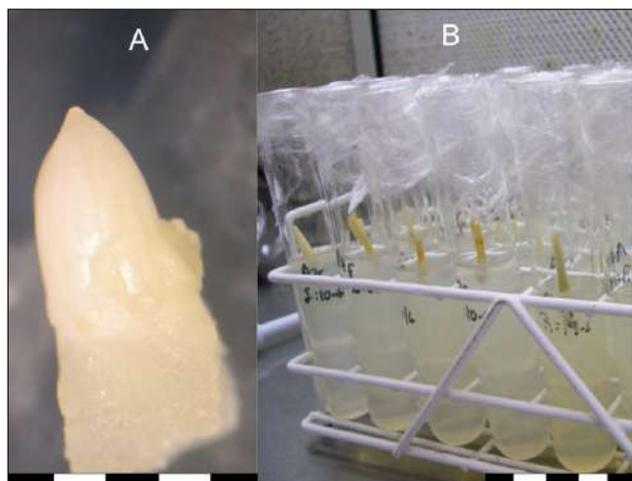


Figura 3. Detalle de ápice extraído de cormo de azafrán escala en milímetros (A) y vista general de un ensayo de implantación en su fase inicial, escala en centímetros (B).

En todos los casos el pH de medio se ajustó a 5,7; se agregaron 7 g/litro de agar-agar y se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron con un fotoperíodo de 16:8 hs luz:oscuridad y 2000 lux de intensidad lumínica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un primer ensayo, el 20 febrero de 2013, se desinfectaron 13 cormos de azafrán como se describe en Materiales y Métodos (procedimiento 1) y se implantaron 13 yemas en los medios 1, 2 y 3 de manera proporcional. A los 10 días de cultivo se observó la aparición de contaminaciones bacterianas y fúngicas en todas las yemas implantadas, denotando los problemas sanitarios de los cormos procesados.

A partir de estos resultados se ensayaron diferentes fungicidas y antibióticos para contrarrestar las contaminaciones observadas. El 9 de abril de 2013 se realizó la desinfección de 35 cormos como se describe en la sección Materiales y Métodos (procedimiento 2). Una vez aisladas las yemas se cultivaron en los medios 1, 2 y 3 en manera proporcional. A los 10 días de cultivo se observó contaminación fúngica en todas las yemas procesadas, pero en ningún caso se observó proliferación bacteriana, resultando efectiva la combinación de antibióticos para su control.

El 9 de mayo de 2013 se realizó un tratamiento de 45 cormos siguiendo el procedimiento 3 de desinfección (ver Materiales y Métodos). Una vez aisladas las yemas se cultivaron en los medios 1, 2 y 3. A los 10 días de cultivo se observó contaminación fúngica en todas las yemas procesadas, pero en ningún caso se observó proliferación bacteriana.

En un cuarto ensayo, el día 22 de mayo de 2013, se procesaron 10 cormos de azafrán realizando el tratamiento 4 de desinfección. Sin embargo, a los 10 días de cultivo aparecieron nuevamente las contaminaciones fúngicas observadas anteriormente.

En un quinto ensayo, el 10 de junio de 2013, se procesaron 13 cormos de azafrán mediante desinfección con procedimiento 5. A los 10 días de cultivo solo tres yemas mostraron contaminaciones fúngicas; sin embargo a los 20 días de cultivo aparecieron hongos sobre el material vegetal cultivado que empezaba a proliferar. Este material contaminado fue analizado en la Sección Fitopatología de la EEAOOC identificando a *Fusarium* spp como contaminante en todos los tubos analizados.

Durante el año 2013 se sembraron en total 116 yemas provenientes de cormos de azafrán pero no se logró establecer cultivos asépticos para su micropropagación y no se continuaron los ensayos por falta de material de partida.

En el año 2014 se retomaron los ensayos con cormos nuevos cosechados en la campaña 2013. En el mes de abril se procesaron 60 cormos de azafrán para su implantación *in vitro*. En este caso se sumergió los cormos durante 30 minutos en una solución al 10% de una mezcla de carboxina

Descripción y registro de la variedad de caña TUC 97-8

+ tiran indicada para el control de *Fusarium* spp. para bulbos de ajo y cebolla (procedimiento 6). Se implantaron 20 yemas en cada uno de los medios 1, 2 y 3, respectivamente. A los 10 días de cultivo se observó contaminación en solo cinco tubos (8,3%), manteniendo a los 20 días posteriores todos los cultivos asépticos. En el caso de los ápices cultivados en medio 3, a 25°C, se observó oxidación del material y falta de respuesta. Mientras que los explantos cultivados en medios 1 y 2, mantenidos a 20°C, no manifestaban oxidación y empezaban a proliferar activamente. En este punto se decidió cultivar los ápices en medio 3 también a 20°C. Se transfirieron todos los ápices mensualmente a medio nuevo hasta el mes de septiembre, cuando se evaluó la respuesta a los diferentes medios de cultivo (Tabla 2).

En base a las líneas establecidas al 17 de septiembre podemos calcular el éxito de implantación en cada medio analizado. En el caso del medio 1, se observaron tres contaminaciones a los 10 días de implantados los ápices, mientras que proliferaron dos ápices denominados líneas 10 y 11; el resto de los ápices si bien no se contaminaron no mostraron respuesta y murieron en los repiques sucesivos, siendo la tasa de éxito con este medio del 17,6%. Para el caso del medio 2 no se observaron contaminaciones y al momento de evaluación se registraron cinco líneas

establecidas (12, 17, 18, 19 y 20) siendo la tasa de éxito de implantación del 25%. En el caso del medio 3, se contaminaron dos ápices y se establecieron exitosamente 10 líneas, alcanzando una tasa de éxito del 55%, la más alta de todos los medios testeados. La tasa global de implantación, considerando los tres medios utilizados, fue del 28,3%.

Las tasas de multiplicación a partir del quinto repique (septiembre de 2014) fue variable en cada medio pero en promedio rondó entre 3-7 explantos por ciclo. En la Figura 4

Tabla 2. Resumen de líneas de azafrán establecidas *in vitro* al 17 de septiembre de 2014. Medio 1 (Parray *et al.*, 2012). Medio 2 (Sharma *et al.*, 2008) y Medio 3 (Sheibai *et al.*, 2007). Cada frasco en multiplicación con 5-7 explantos.

Medio	N.º Línea	Nº Frascos en multiplicación
1	10	8
	11	4
	12	4
2	18	2
	19	4
	20	1
	17	1
	3	3
3	2	9
	1	8
	6	1
	9	7
	7	2
	8	1
	23	2
	5	1
	4	1
	Total	17

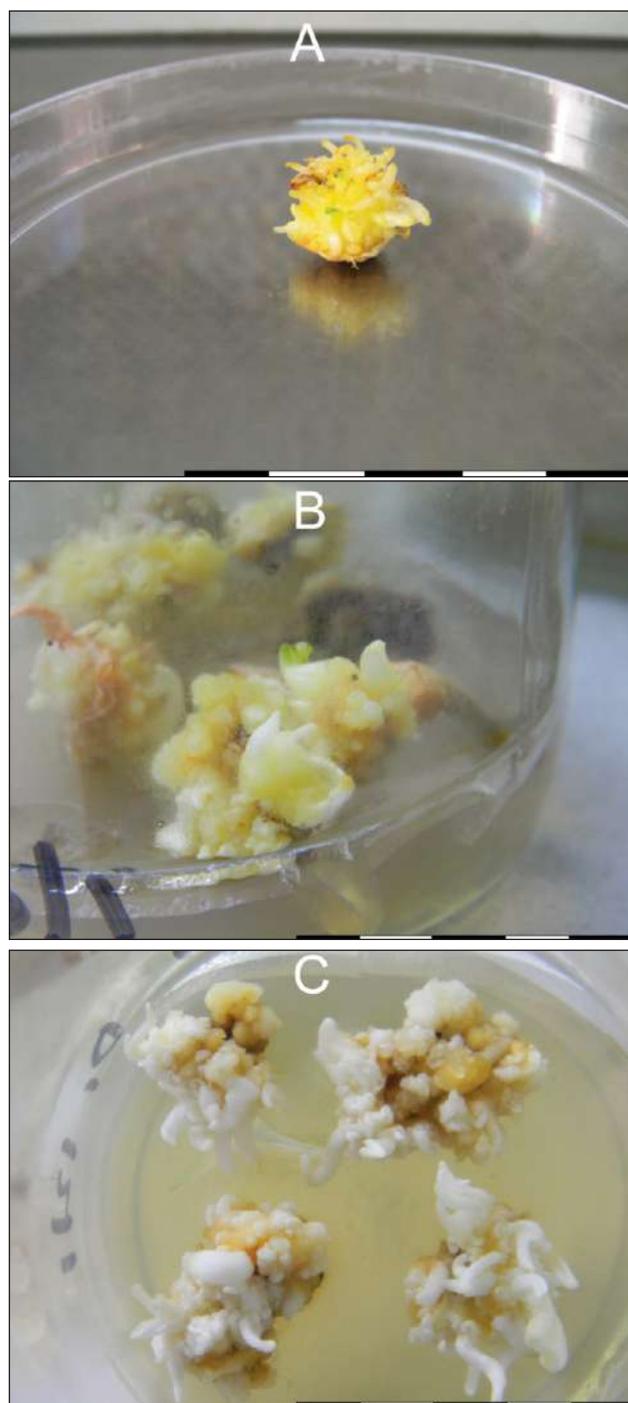


Figura 4. Aspecto de los explantos de azafrán cultivados en medio 1 (A), medio 2 (B) y medio 3 (C). Escala en centímetros.

puede observarse el aspecto de los explantos en los diferentes medios de cultivo. Se realizaron tres ciclos de multiplicación adicionales y se transfirieron todos los explantos a medio de cultivo libre de hormonas y adicionado con 60 g/l de sacarosa, en febrero de 2015, a fin de inducir la formación de cormos *in vitro*. Se mantuvieron a 4°C en oscuridad durante un mes y se transfirieron a cámara de cultivo bajo las mismas condiciones descritas para la fase de implantación/multiplicación (ver Materiales y Métodos) en el mes de marzo de 2015. A los tres meses se evaluó la formación de bulbos y se observó que solamente los explantos derivados del medio 2 fueron capaces de diferenciar cormos, mientras que los materiales derivados de los medios 1 y 3 diferenciaron brotes (Figura 5). Los explantos se mantuvieron en el mismo medio hasta el mes de octubre, pero no hubo cambios en la fisonomía de los mismos.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo son similares a los informados en publicaciones de referencia. Si comparamos los resultados de Parray *et al.* (2012), podemos mencionar que el medio recomendado en esta publicación, MS a la mitad suplementado con TDZ, 4,4 mg/l, AIA, 1,75 mg/l y 40 g/l de sacarosa, fue exitoso para la implantación y multiplicación de azafrán (Figura 4a). Sin embargo, no se diferenciaron cormos en medio MS libre de hormonas, aunque no se siguió el procedimiento recomendado en esa publicación por tal fin (Figura 5a). En cuanto a los resultados alcanzados por Sharma *et al.* (2008), podemos mencionar que obtuvimos respuestas similares; en medio MS suplementado con IBA 2 mg/l, BA 10 mg/litro y 50 g/l de sacarosa se logró implantar cultivos *in vitro* de azafrán y multiplicarlos satisfactoriamente (Figura 4b). A pesar de usar diferentes medios de cultivos en la última fase, también en este trabajo se logró la diferenciación de cormos en medio MS libre de hormonas (Figura 5b). Sheibani *et al.* (2007) fueron capaces de inducir callos embriogénicos usando TDZ, siendo la concentración óptima la de 0,5 mg/l para la diferenciación de embriones globulares. Con las concentraciones recomendadas en dicha publicación se obtuvieron embriones somáticos en el presente trabajo (Figura 4c). Sin embargo, a pesar de que se logró la maduración de los embriones globulares después de la incubación a 4°C en oscuridad en medio MS libre hormonas, no se observó el desarrollo de cormos, posiblemente por falta de tiempo de cultivo (Figura 5c). En otros reportes se obtuvieron embriones somáticos usando reguladores de crecimiento como AIA (ácido indol acético) combinado con KIN logrando su maduración por cultivo en MS adicionado con AG3 (ácido giberélico) y posterior diferenciación en plántulas mediante uso de ANA y KIN adicionado con ácido ascórbico o ANA y BA (George *et al.*, 1992; Ebrahimzaedh *et al.*, 2000, respectivamente). Dhar y Sapru (1993) indujeron la proliferación de callos embriogénicos usando KIN y 2,4-D que transferidos a medio MS con ANA y KIN fueron capaces de diferenciar cormos y estructuras similares a flores.

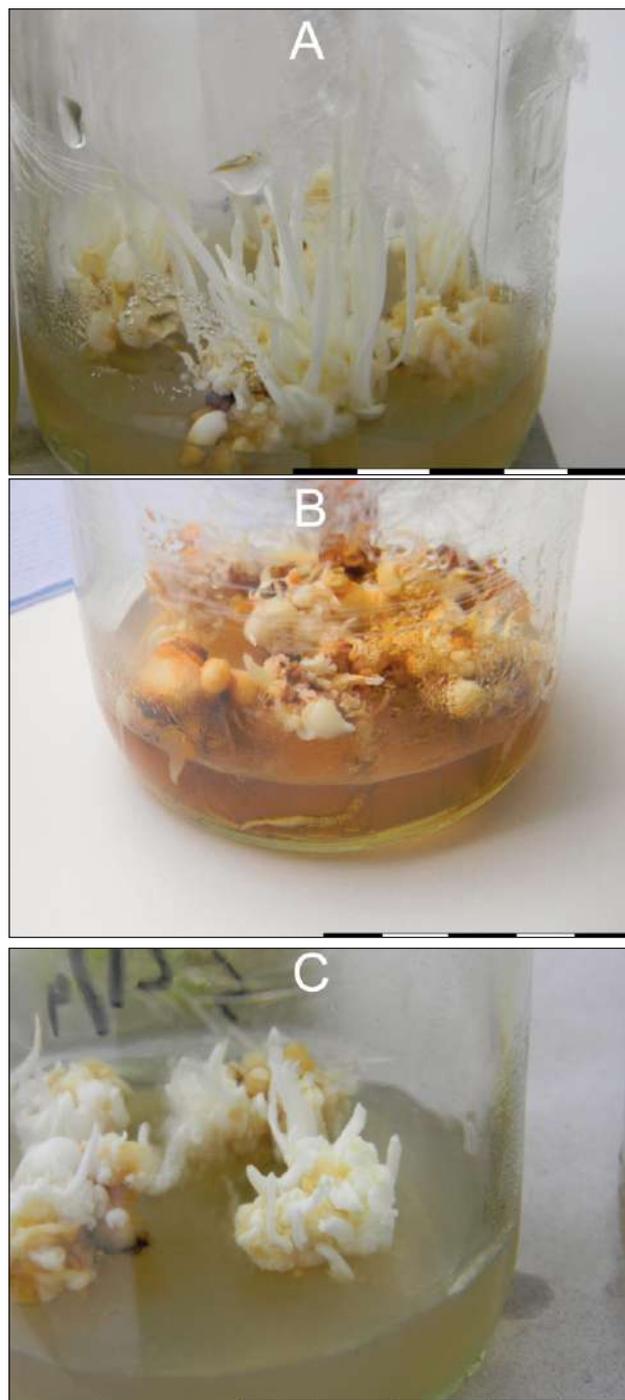


Figura 5. Detalle del estado de los explantos a octubre de 2015. (A) Brotes diferenciados a partir de explantos cultivados en medio 1. (B) Microcormos obtenidos de explantos derivados de cultivos en medio 2 y (C) materiales vegetales cultivados en medio 3. Escala en centímetros.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Ing. José Domingo y al Sr. Rafael Silvester por suministrar los cormos de azafrán que se usaron como material de partida para el presente estudio. Al

Lic. Pablo de Las Heras por los datos económicos y a la Ing. Victoria González por el análisis fitopatológico de los hongos contaminantes. Al Sr. Matías Castro y la Srta. Cecilia Brito por la colaboración en los ensayos de implantación de yemas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abdullaev, F. I. and G. D. Frenkel. 1999.** Saffron in Biological and Medical Research In: Saffron, *Crocus sativus* (Moshe Negbi, ed.). Harwood Publications, Singapore 103-111.
- Agüero, C. and R. Tizio. 1994.** *In vitro* mass bulbification as a preliminary contribution to saffron (*Crocus sativus* L.) micropropagation. *Biocell*; 18: 55-63.
- Ahouran, M.; R. Hosseini and R. Zarghami. 2012.** Corms as a source of explants for the successful clonal propagation of *Crocus cancellatus* R. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 15: 47.
- Blazquez, S.; E. Olmos; J. Hernandez; E. Hellin; J. Fernandez and A. Piqueras. 2004.** Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.): morphological differentiation and the antioxidant enzymatic system. *Acta Hort.* 650: 261-267.
- Darvishi, E.; R. Zarghami; C. Mishami and M. Omid. 2007.** Effects of different hormone treatments on nonembryogenic and embryogenic callus induction and time term enzymes treatments on number and viability of isolated protoplast in saffron (*Crocus sativus* L.). *Acta Hort.* 739: 279-284.
- Demeter, Z.; G. Suranyi; V. Molnar; G. Sramko, D. Beyer; Z: Konya, G. Vasas; M. Hamvas and C. Mathe. 2010.** Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 100: 349-353.
- Dhar, A. K. and R. Sapru. 1993.** Studies on saffron (*Crocus sativus*) in Kashmir. III. *In vitro* production of corm and shoot like structures. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 53: 193-196.
- Ding, B.; S. H. Bai; Y. Wu and X. P. Fang. 1981.** Induction of callus and regeneration of plantlets from corms of *Crocus sativus* L. *Acta Bot. Sin.* 23:419-420.
- Ding, B.; S. H. Bai; Y. Wu and B. K. Wang. 1979.** Preliminary report on tissue culture of corms of *Crocus sativus*. *Acta Bot. Sin.* 21: 387.
- Ebrahimzadeh, H.; R. Karamian and D. Mouri. 2000.** Somatic Embryogenesis and regeneration of plantlet in saffron, *Crocus Sativus* L. *J. Sci. Republic of Iran* 11 (3): 169-173.
- Ebrahimzadeh, H.; R. Karamian and M. R. Noori-Daloi. 1996.** *In vitro* Regeneration of shoot and corm from the different explants of *Crocus sativus* L. *J. Sci Islamic Republic of Iran* 7: 1-7.
- George, P.; S. Visvanath, G. Ravishankar and L. Venkataraman. 1992.** Tissue culture of saffron (*Crocus sativus* L.): somatic embryogenesis and shoot regeneration. *Food Biotechnol.* 6: 217-223.
- Himeno, H.; H. Matsushima and K. Sano. 1988.** Scanning electron microscopic study on the *in vitro* organogenesis of saffron stigma and style-like structures. *Plant Science* 58 (1): 93-101.
- Han, L. and X. Zang. 1993.** Morphogenesis of style-stigma-like structures from floral explants of *Crocus sativus* L. and identification of the pigments. *Acta Bot. Sin.* 35:157-160.
- Homes, J.; M. Legros and M. Jaziri. 1987.** *In vitro* multiplication of *Crocus sativus* L. *Acta Hort.* 212: 675-676.
- Hori, H.; K. Enomoto and M. Nakaya. 1988.** Induction of callus from pistils of *Crocus sativus* L. and production of colour compounds in the callus. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 5: 72-77.
- Husaini, A. M.; B. Hassan; M. Y. Ghani, Jj. a. Teixeira da Silva and N. A. Kirmani. 2010b.** Saffron (*Crocus sativus* L. Kashmirianus) cultivation in Kashmir: Practices and problems. *Functional Plant Science and Biotechnology*; 4: 108-115.
- Husaini, A. M.; A. N. Kamili; M. H. Wani; J. A. Teixeira da Silva and G. N. Bhat. 2010a.** Sustainable Saffron (*Crocus sativus* L. Kashmirianus) Production: Technological and Policy Interventions for Kashmir. *Functional Plant Science and Biotechnology*; 4: 116-127.
- Ilahi, M.; N. Jabeen and M. Firdous. 1987.** Morphogenesis with Saffron Tissue Culture. *J. of Plant Physiol.* 128 (3): 227-232.
- Isa T. and T. Osagawara. 1988.** Efficient regeneration from the callus of saffron *Crocus sativus*. *Jap. J. of Breeding* 38: 371-4.
- Karamian, R. 2004.** Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus*. *Acta Hort.* 650: 253-259.
- Karaoglu, C.; S. Cocu; A. Ipek; I. Parmaksiz; S. Uranbey and E. Sarihan. 2007.** *In vitro* micropropagation of saffron. *Acta Hort.* 739: 223-7.
- Koyama, A.; Y. Ohmori; N. Fujioka; H. Miyagawa; K. Yamasaki and H. Kohda. 1988.** Formation of stigma-like structures and pigment in cultured tissues of *Crocus sativus*. *Planta Medica* 54 (4): 375-376.
- Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1965.** Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Lu, W., X. Tong; Q. Zang and W Gao. 1992.** Study on *in vitro* regeneration of stigma-like structure in *Crocus sativus* L. *Acta Bot.* 34: 250-256.
- Milyaeva, E. L.; N. S. Azizbekova; E. N. Komarova and D. D. Akhundova. 1995.** *In vitro* formation of regenerant corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *Russ. J. Plant Physiol*; 42: 112-119.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*; 15: 473-97.
- Parray, J. A.; A. N. Kamili; R. Hamid and A. M. Husaini. 2012.** *In vitro* cormlet production of saffron (*Crocus sativus* L. Kashmirianus) and their flowering response under greenhouse. *GM crops & food* 3(4): 289-295.
- Plessner, O.; M. Ziv and M. Negbi. 1990.** *In vitro* corm production in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 20: 89-94.
- Raja, W.; G. Zaffer and S. A. Wani. 2007.** *In vitro* micro corm formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Acta Hort.* 739 (2):291-6.
- Sano, K. and H. Himeno. 1987.** *In vitro* proliferation of saffron (*Crocus sativus* L.) stigma. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 11: 159.
- Sarma, K. S.; K. Maesato; T. Hara and Y. Sonoda. 1990.** *In vitro* production of stigma-like structures from stigma explants of *Crocus sativus* L. *J. Exp. Bot.* 41: 745-748.
- Sharma, K. D.; R. Rathour; R. Sharma; S. Goel; T. R. Sharma and B. M. Singh. 2008.** *In vitro* cormlet development in *Crocus sativus*. *Biologia Plantarum* 52(4), 709-712.
- Sheibani, M.; S. H. Nemati; G. H. Davarinejad; A. V. Azghandi and A. A. Habashi. 2007.** Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron (TDZ). *Acta Hort.* 739: 259-267.
- Visvanath, S.; G. A. Ravishankar and L. V. Venkataraman. 1990.** Induction of crocin, crocetin, picrocrocin, and safranal. Synthesis in callus cultures of saffron -*Crocus sativus* L. *Biotechnology and applied biochemistry* 12: 336-340.
- Wani, B. A. and F. A. Mohiddin. 2009.** Micropropagation of genus *Crocus* -a review. *African Journal of Agricultural Research*; 4:1545-8.
- Yongjiong, J.; C. Fang; L. Hongui, C. Youlong; L. Ying and W. Shui. 1996.** Induction of style stigma like structure and regeneration of plantlets from corm of *Crocus sativus in vitro*. *Sichuan Daxue Xuebao (Ziran Kexueban)* 33: 747-750.