



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN GERMOPLASMA DE  
AZAFRÁN (*CROCUS SATIVUS* L.) CULTIVADO EN ARGENTINA**

**LAURA CECILIA MITJANS VADELL**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL**

**DIRECTOR: Dr. RICARDO MASUELLI**

**2020**

# **EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN GERMOPLASMA DE AZAFRÁN (*CROCUS SATIVUS* L.) CULTIVADO EN ARGENTINA**

Laura Cecilia Mitjans Vadell

Ingeniera Agrónoma – Universidad Nacional de Cuyo

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Cuyo, durante el período comprendido entre 2014 y 2018, bajo la dirección del Dr. Ricardo Masuelli.

Nombre y firma del Doctorando

Nombre y firma del Director

Defendida: 02 de Marzo de 2020.

## *Agradecimientos*

*Me gustaría comenzar por Ricardo y Adriana que me han aconsejado y acompañado en todos estos años de búsqueda,*

*Agradecer a todo el grupo de trabajo de la Cátedra de Genética General y Aplicada: a los que pasaron y me dieron la oportunidad, y a los que llegaron y me acogieron. De todos he aprendido,*

*A Eliana, Juan y Leonardo por brindarme su amistad, complicidad y el valor del trabajo en equipo,*

*A mi familia en Mendoza y en Rosario por la contención y el apoyo incondicional*

*Agradecer especialmente a Ricardo T por elegir compartir su vida.*

*A mis padres (por todo)*

*Finalmente, agradecer por la Educación recibida*

*pública, gratuita y laica!*

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Origen e Historia.....	1
Taxonomía y Descripción .....	2
Actualidad y Problemática .....	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Procedencia de los materiales.....	8
Diseño experimental.....	8
Análisis estadísticos .....	11
RESULTADOS .....	15
Caracteres fenológicos y de producción .....	15
Inicio y fin de floración .....	15
Período de floración.....	15
Producción de Flores.....	17
Longitud de Estigmas .....	20
Producción de Cormos .....	21
Calidad de Hebras .....	27
Caracteres a nivel molecular .....	29
Correlación entre variabilidad agronómica y molecular .....	36
DISCUSIÓN.....	37
Variabilidad agronómica .....	37
Fenología.....	37
Producción de Flores.....	37
Producción de Cormos .....	38
Calidad de Hebras .....	39
Variabilidad a nivel molecular .....	40
CONCLUSIONES .....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXO .....	48
Modelos estadísticos utilizados.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de azafrán ( <i>Crocus sativus</i> L.) .....	3
Figura 2. Períodos de floración en el conjunto de los tres años.....	15
Figura 3. Períodos de floración por año .....	17
Figura 4. Floración total media en el conjunto de los tres años.....	18
Figura 5. Producción de flores por año.....	20
Figura 6. Media de número de cormos producidos.....	22
Figura 7. Proporciones de número de cormos producidos.....	23
Figura 8. Peso total (g) de cormos producidos.....	24
Figura 9. Distribución de la proporción de cormos producidos.....	25
Figura 10. Análisis de Componentes Principales.....	27
Figura 11. Perfiles de bandas de AFLP obtenidos en clones de <i>C. sativus</i> .....	30
Figura 12. Dendrograma según procedencias.....	31
Figura 13. Dendrograma de clones de <i>C. sativus</i> en Argentina.....	32
Figura 14. Análisis de Coordenadas Principales.....	33
Figura 15. Dendrograma de procedencias de la localidad FCA.....	34
Figura 16. Dendrograma de clones de <i>C. sativus</i> de la localidad FCA.....	35
Figura 17. Análisis de Coordenadas Principales de clones de la localidad FCA.....	36
Figura 18. Esquema de dinámica de floración y producción de cormos de acuerdo al tamaño de cormo de plantación en un ciclo de tres años.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clones evaluados molecularmente.....	9
Tabla 2. Adaptadores y combinaciones de cebadores.....	13
Tabla 3. Valores medios de la longitud de estigmas frescos por año.....	21
Tabla 4. Autovalores y autovectores de distribución de las variables en los componentes principales.....	26
Tabla 5. ANAVA de componentes químicos.....	28
Tabla 6. Absorbancia media de crocina, picrocrocina y safranal.....	28
Tabla 7. Resultados descriptivos de los perfiles de bandas de AFLP.....	29
Tabla 8. Análisis molecular de la varianza de entre y dentro 8 procedencias.....	30
Tabla 9. Análisis molecular de la varianza de la localidad FCA.....	33

## ABREVIATURAS

Procedencias de materiales:

**CBAA:** Procedencia Villa Allende, Córdoba

**FCA:** Facultad de Ciencias Agrarias, localidad Facultad de Ciencia Agrarias

**F-FCA:** Introducción F de la localidad Facultad de Ciencias Agrarias

**G-FCA:** Introducción G de la localidad Facultad de Ciencias Agrarias

**M-FCA:** Introducción M de la localidad Facultad de Ciencias Agrarias

**MZAM:** Procedencia Maipú, Mendoza

**R-FCA:** Introducción R de la localidad Facultad de Ciencias Agrarias

**SJ:** Procedencia Ciudad, San Juan

**SJR:** Procedencia Rawson, San Juan

Clasificaciones de cormos:

**P2:** Categoría de peso de cormos iniciales entre 2,5 y 5,4 g

**P5:** Categoría de peso de cormos iniciales entre 11,5 y 14,4 g

**P8:** Categoría de peso de cormos iniciales entre 20,5 y 23,4 g

Caracteres fenológicos y de producción evaluados:

**FI:** Fin de floración, número de días desde plantación a fin de floración

**IF:** Inicio de floración, número de días desde plantación a inicio de floración

**FL:** Floración total (número de flores)

**ICOG:** Índice de cormos grandes, cociente del peso de cormos grandes y el peso total de cormos por unidad experimental.

**ICOME:** Índice de cormos medianos, cociente del peso de cormos medianos y el peso total de cormos por unidad experimental.

**ICOPE:** Índice de cormos pequeños, cociente del peso de cormos pequeños y el peso total de cormos por unidad experimental.

**LE:** Longitud de estigmas frescos (mm).

**PEFLOR:** Período de floración (días)

**NCOR:** Número de cormos producidos por unidad experimental

**N10:** Índice de número de cormos pequeños producidos por unidad experimental

**N11:** Índice de número de cormos medianos producidos por unidad experimental

**N20:** Índice de número de cormos grandes producidos por unidad experimental

**PCOR:** Peso de cormos producidos por unidad experimental

Caracteres de calidad:

**CRC:**  $E_{1cm}^{1\%}$  440 nm es la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción para crocina

**PCR:**  $E_{1cm}^{1\%}$  257 nm es la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción para picrocrocina

**SFR:**  $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm es la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción para safranal

Tratamientos:

**F:P2:** Interacción entre introducción F de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P2

**F:P5:** Interacción entre introducción F de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P5

**F:P8:** Interacción entre introducción F de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P8

**G:P2:** Interacción entre introducción G de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P2

**G:P5:** Interacción entre introducción G de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P5

**G:P8:** Interacción entre introducción G de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P8

**M:P2:** Interacción entre introducción M de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P2

**M:P5:** Interacción entre introducción M de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P5

**M:P8:** Interacción entre introducción M de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P8

**R:P2:** Interacción entre introducción R de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P2

**R:P5:** Interacción entre introducción R de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P5

**R:P8:** Interacción entre introducción R de la localidad FCA y el tamaño de corno inicial P8

Otras abreviaturas:

**ACoP:** Análisis de Coordenadas Principales

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AFLP:** Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Amplificados

**AMOVA:** Análisis de Molecular de la Varianza

**ANAVA:** Análisis de la Varianza

**MDS:** Mínimas Diferencias Significativas

**MLGM:** Modelos Lineales Generalizados Mixtos

## RESUMEN

El azafrán (*Crocus sativus* L.) es una especie de gran valor comercial a nivel mundial. Caracterizada por su alto contenido de apocarotenoides conocidos por su actividad antioxidante, anticancerígena y antitumoral. Los componentes principales son: crocina, picrocrocina y safranal; responsables del color, del sabor amargo y el aroma, respectivamente.

La multiplicación se limita a la reproducción asexual a través de sus cormos, debido a la esterilidad originada por su triploidía que tiene como consecuencia una baja tasa de multiplicación natural. Esto enlentece el avance de la selección de nuevos cultivares.

Es un cultivo artesanal e intensivo con poca o nula mecanización. Bajos rindes y costos elevados originaron un cambio de uso de estas tierras; que ha provocado un proceso de erosión genética. Ante esta situación de emergencia de conservación de la especie, se torna de gran importancia la formación de colecciones de germoplasma con diferentes adaptaciones.

La Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo inició la formación de una colección con introducciones de distintas regiones de cultivo de la Argentina. Bajo el supuesto de la existencia de variabilidad genética en esta colección, se propuso incrementarla y evaluarla en distintos caracteres fenológicos, productivos, químicos y moleculares, con el objeto de caracterizar el germoplasma disponible para su utilización en un programa de mejoramiento genético.

Evaluaciones agronómicas a campo y la complementación a nivel molecular se han iniciado sobre esta colección de germoplasma. En un diseño factorial en bloques se plantaron cuatro introducciones de la colección: F, G, M y R de la localidad FCA con tres tamaños de cormos (**P2** = 2,5 - 5,4g; **P5** = 11,5 - 14,4g; **P8** = 20,5 - 23,4g), cuya combinación conformaron los tratamientos que fueron cultivados durante los años 2014, 2015 y 2016.

Los caracteres medidos fueron: a) fenológicos y productivos: período de floración, producción de flores, longitud de estigmas frescos, número de cormos, peso de los mismos y b) caracteres de calidad: crocina, picrocrocina y safranal. Se evaluaron a través de análisis de la varianza, por modelos lineales generalizados mixtos y de componentes principales.

A nivel molecular se analizaron por marcadores AFLP, con cinco combinaciones de cebadores, 46 clones de ocho procedencias, entre las que se incluyeron F, G, M y R de la

localidad FCA. Se realizó un análisis descriptivo de las bandas, análisis molecular de la varianza, de conglomerados y coordenadas principales.

En 10 de los 13 caracteres fenológicos y productivos se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamientos. El inicio y fin de floración no presentó diferencias significativas. Los tratamientos se agruparon en cuatro clases caracterizadas por: **I**: un índice de cormos grandes elevado, período de floración reducido, número y peso de cormos bajos, formado por tratamientos cuyo tamaños de corno inicial fue P2; **II**: índice de cormos pequeños bajo y con una proporción de cormos medianos y grandes elevada, formado por el tratamiento G:P5; **III**: un índice de cormos medianos superior a las otras clases, una mayor producción de flores y un período de floración más extenso, formado por los tratamientos F:P5, R:P5 y M:P5 y **IV**: un índice de cormos pequeños elevados, un mayor peso y número de cormos totales y período de floración más largo, formado por los tratamientos con cormos de iniciales P8; destacándose M:P8 por presentar el índice mayor de cormos pequeños. Los tamaños de cormos iniciales fueron relevantes en la conformación de estas clases.

Los caracteres de calidad resultaron influenciados por el ambiente detectándose diferencias ( $p \leq 0,05$ ) en la absorbancia de picrocrocina, crocina y safranal solamente entre años. En el año 2015 se obtuvieron los mayores valores para crocina y en el 2016 para picrocrocina y safranal.

A nivel molecular, las ocho procedencias analizadas se diferenciaron ( $p \leq 0,05$ ) entre ellas pero la mayor variación se encontró entre clones dentro de cada una. Las procedencias más distantes fueron M-FCA, Rawson y Ciudad (de la provincia de San Juan) y Maipú (de la provincia de Mendoza). Se conformaron 12 agrupamientos de clones entre los 46 analizados. Situación similar se encontró en la localidad FCA en particular, con la conformación de seis grupos de clones.

Estos resultados en complementación con los agronómicos confirmaron la existencia de variabilidad genética entre los clones analizados de la colección de germoplasma cultivados en la Argentina.

Palabras clave: *AFLP, caracteres agronómicos, clones*

## **ABSTRACT**

### **Evaluation of genetic variability in saffron (*Crocus sativus* L.) germplasm cultivated in Argentina**

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a spice of high commercial value. The multiplication is limited to the asexual reproduction through its corms, due to the sterility caused by its triploidy origin which results in a low rate of multiplication. This is the major cause of the poor advance in the selection of new cultivars. With the main objective of characterizing the germplasm available for a breeding program in our region we studied at agronomic and molecular level a collection composed by clones of different provenance. The characters analyzed were: a) phenological and productive: flowering period, production of flowers, length of fresh stigmas, number of corms and weight of them, b) quality characters: crocin, picrocrocin and safranal and c) AFLP markers. The experimental design was in completely randomized blocks with two factors: introduction and initial corm size. The treatments were grouped into four classes according to the production rates of corms and flowering period. In 10 of 13 phenological and productive characters, differences were detected ( $p \leq 0.05$ ) between treatments. From the total molecular variance, the largest percentage was due to variation between clones within the same provenance. In conclusion, these results show the existence of genetic variability among clones grown in Argentina.

*Key words: AFLP, agronomic traits, clones*

# INTRODUCCIÓN

## ORIGEN E HISTORIA

El azafrán, la especia derivada del secado de los estigmas de *Crocus sativus L.* tiene registros de uso de miles de años anteriores a Cristo; desde la Era de Bronce a través del Arte Egeo y las tablas de arcilla de escritura Lineal B encontradas en Knosos hacia el año 1900 por Sir Arthur Evans (Day, 2011a). En Akrotiri, yacimiento arqueológico ubicado en las Cícladas meridionales, particularmente en la isla de Thera, se encontraron frescos con la representación de mujeres durante las labores de cosecha de flores en paisajes rocosos y cerámicas adornadas con motivos florales (Dewan, 2015). También se realza la importancia del azafrán en la industria textil usado como colorante, en perfumería y medicina (Day, 2011b; Dewan, 2015; Ferrence y Bendersky, 2004). En Egipto fue usado en prácticas de embalsamado o para teñir las telas que envolvían los cuerpos (Basker y Negbi, 1983).

La aparición de ideogramas de flores de azafrán con los largos estigmas sobresalientes en las tablas de escritura Lineal evidencian una gran importancia en la sociedad y la economía (Day, 2011a). Flores con rojos y prominentes estigmas aparecen como decoración de la vestimenta y accesorios de diversas figuras humanas y de divinidades en los murales de Knosos, Akrotiri y en la villa residencial de Hagia Triada (Creta). Por diversas interpretaciones se ha observado una fuerte asociación entre el azafrán y la mujer debido a la prolificidad de registros en los que aparecen juntos así como la asociación del color amarillo proveniente del azafrán con el bienestar y la divinidad; entendido como un regalo de los dioses a la humanidad (Dewan, 2015; Ferrence y Bendersky, 2004).

Aparecen referencias del azafrán en la Biblia (Cantar de los Cantares 4:14) como planta aromática y realce de la belleza del ser amado (Basker y Negbi, 1983).

Los descubrimientos en 1960 en Akrotiri sumaron gran cantidad de objetos con motivos similares a los encontrados en Knosos que produjeron el aumento de interés por las flores y la especia de azafrán y el estudio de su papel en estas antiguas civilizaciones (Day, 2011b). Negbi (1999), postuló la posibilidad de que la recolección del azafrán fue primero de *C. cartwrightianus* Herb. y que luego su mutante *C. sativus L.* se seleccionó por sus estigmas y se domesticó inicialmente en Grecia, más específicamente en la isla de Creta. Considerándose su Centro de Origen y diversidad en la Península Balcánica y Asia Menor,

distribuyéndose desde el Oeste de Europa y Norte de África al Oeste de China (Harpke *et al.*, 2013; Petersen, 2008). Los romanos lo introdujeron en Gran Bretaña y los árabes en España (Kumar *et al.*, 2009).

### TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN

El género *Crocus* tiene una taxonomía compleja y en constante actualización. En los últimos años se han incorporado a este género nuevas especies. Contiene alrededor de 100 especies de diversas características.

Este género pertenece al Orden *Liliales*, Familia *Iridaceae*. Mathew (1982), dividió en dos subgéneros:

I. Subgénero *Crocus* con dos Secciones:

Sección *Crocus* contiene seis Series, entre ellas la Serie *Crocus*:

- ~**C. sativus**
- ~*C. pallasii*
- ~*C. thomasii*
- ~*C. cartwrightianus*
- ~*C. moabiticus*
- ~*C. oreocreticus*
- ~*C. asumniae*
- ~*C. hadriaticus*
- ~*C. mathewii* [\*]
- ~*C. naqabensis* [\*]

Sección *Nudiscapus* contiene nueve Series.

II. Subgénero *Crociris* con una Serie de una sola especie.

[\*] Agregados más tarde (Petersen *et al.*, 2008)

La clasificación está en continua revisión con las técnicas modernas para el estudio de la filogenia.

Fitogeográficamente se inserta en la región florística Mediterránea, caracterizada por inviernos fríos y veranos muy cálidos, con un régimen de lluvia que va de otoño a primavera (Erol *et al.*, 2014).

*Crocus sativus* L. es una especie triploide ( $3x = 24$ ), de manera que la única vía de reproducción posible es la agámica a través de la multiplicación de sus cormos (Álvarez Ortí, 2003; Mathew, 1977; Rios *et al.*, 1996). Es una especie geófita, herbácea y perenne. Se cultiva en suelos calizos y con buen drenaje. Los cormos poseen una yema principal que brota formando una bráctea que llegará a la superficie llevando internamente la flor y simultáneamente las hojas (fenómeno de sinantia) o sólo la flor y más retrasado en el tiempo emergerán las hojas (fenómeno de histerantia). El cormo, en su interior, es blanco, macizo, con los nudos marcados cubierto por catáfilas fibrosas de protección, características de la especie. Los cormos poseen yemas laterales secundarias y dos tipos de raíces. En la parte basal del cormo crecen raíces adventicias con la funcionalidad de nutrir la planta y una raíz contráctil de tipo pivotante cuya función es la de enterrar a mayor profundidad el cormo de renuevo. (Kerndorff *et al.*, 2015; Negbi *et al.*, 1989). Sus flores están conformadas por un perigonio de dos verticilos con tres tépalos de color lila a morado, tres anteras extrorsas con sus filamentos unidos a los tépalos internos, el estilo es largo y blanco hasta llegar a la superficie y pasar por una transición de color amarillo hasta el rojo anaranjado (Figura 1.a y 1.b) (Negbi *et al.*, 1989).

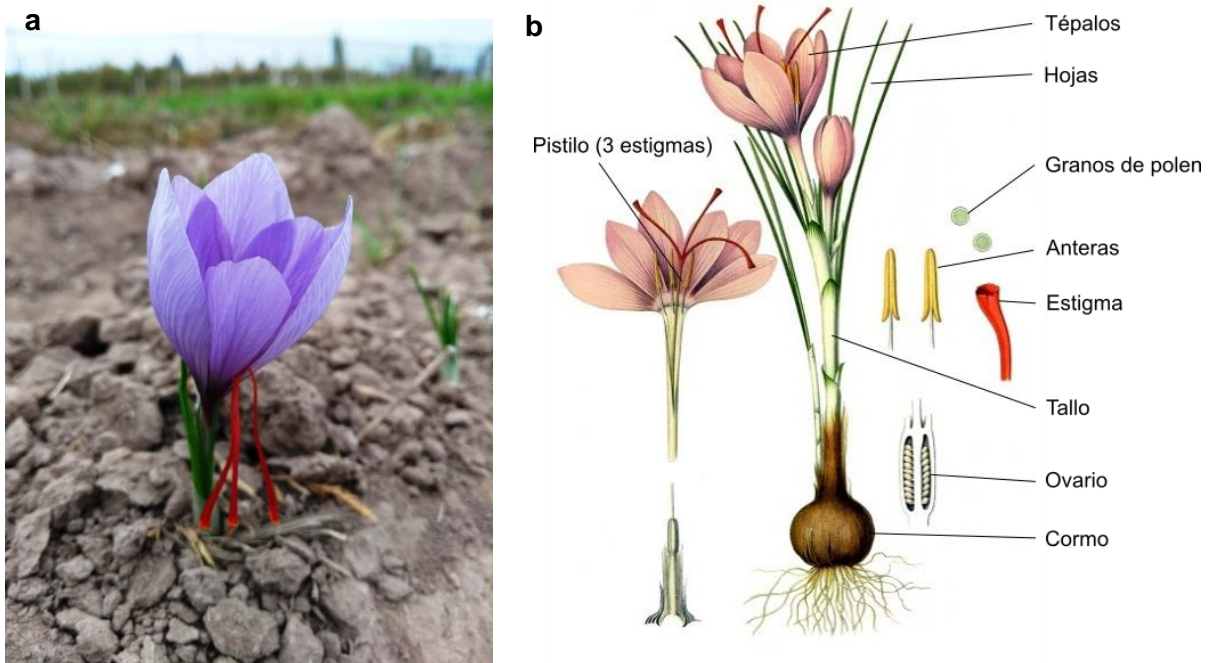


Figura 1. Flor de azafrán (*Crocus sativus* L.), **a** Flor en la parcela experimental. Se observa bráctea protectora, hojas y la flor completa con los tres estigmas sobresaliendo. **b** Esquema morfológico de la planta con sus partes

## ACTUALIDAD Y PROBLEMÁTICA

La producción mundial anual estimada de azafrán es de 301 t, de los cuales Irán produce el 90% del total, luego Grecia, India, Marruecos y España (Ghorbani y Koocheki, 2017). El precio del kilogramo a granel en 2017 al productor varió de €3.000 (DOP Castilla – La Mancha) a €700 (Irán, Marruecos, Grecia) y el valor al consumidor fue de €60.000 y €3.000, respectivamente. El gramo se vendió en promedio a €20 (<https://azafran.especie.com/precio/>). Por su parte en Argentina, la producción de 2017 superó los 12 kilogramos a un precio de \$350.000 sin impuestos, el kilogramo (Comercio y Justicia, 2018). Particularmente en Mendoza se puede conseguir a \$300 el gramo directo del productor. Estos precios elevados son consecuencia del sistema de cultivo artesanal cuyo mayor insumo es la mano de obra y la falta de mecanización (Agayev *et al.*, 2009; Basker y Negbi, 1983).

La producción de azafrán ha disminuido en algunos países donde es tradicional este cultivo y como consecuencia se ha producido una pérdida de la biodiversidad de esta especie. A raíz de esta situación en Europa se creó el CROCUSBANK, institución destinada a la colección, conservación y estudio del género *Crocus* a través del proyecto SAFFRON con financiamiento de la Unión Europea (Alonso Díaz-Marta y Sánchez Gómez, 2007).

En Argentina, el cultivo de azafrán es incipiente y se realiza en diversas zonas agroclimáticas entre las que incluye Mendoza, Catamarca, La Rioja, San Juan, Córdoba, Buenos Aires, Neuquén y Río Negro (Comercio y Justicia, 2018).

Existen asociaciones de productores con unidades productivas independientes pero con una matriz comercial en conjunto. La Cooperativa de Productores de Azafrán de Córdoba, nacida en la provincia de Córdoba cuenta con asociados de otras provincias, suma más de 200 productores (Comercio y Justicia, 2018). En Mendoza un grupo de ocho productores asociados en la marca “Azafrán Mendoza”, surgida a partir del programa Cambio Rural de INTA, tienen un esquema similar.

Los estigmas secos y tostados del azafrán tienen un gran valor por sus cualidades culinarias y medicinales (Álvarez Ortí, 2003; Gresta *et al.*, 2009). El color anaranjado intenso de los estigmas es un indicador de su naturaleza medicinal, correlacionado con compuestos carotenoides (crocinas) (Ahmad *et al.*, 2011).

El uso medicinal de la especia se ha realizado desde tiempos ancestrales. En la actualidad muchos investigadores han intensificado su estudio por sus cualidades

promotoras de la salud. Entre los compuestos más destacados, las crocetas, con su componente principal la crocina, picrocrocina y safranal son considerados los bioactivos medicinales más importantes. En ensayos *in vitro* e *in vivo* en animales y personas, se ha detectado una correlación positiva con la disminución de enfermedades que incluyen: desórdenes de aprendizaje, desórdenes gástricos, síndrome premenstrual, depresión, insomnio, ansiedad, enfermedades coronarias y distintos tipos de cánceres (Abdullaev y Espinosa-Aguirre, 2004; Abe y Saito, 2000; Bolhassani *et al.*, 2014; Geromichalos *et al.*, 2014). Los compuestos carotenoides hidrofílicos, como la crocina, constituyen del 6 al 16% de la materia seca del azafrán dependiendo de la variedad, condiciones de crecimiento y los métodos de procesamiento. Este compuesto es un excelente colorante y antioxidante (Melnik *et al.*, 2010). El segundo compuesto más abundante de la materia seca es la picrocrocina que representa del 1 al 13% y es el responsable del sabor del azafrán. La deshidratación y tostado de los estigmas produce la deglicosilación de la picrocrocina derivando en otro compuesto químico, el safranal, responsable del aroma (Melnik *et al.*, 2010).

Se han llevado a cabo diversos intentos de mejoramiento del cultivo pero existen dificultades a través de la selección clonal. Las plantaciones generalmente están compuestas por poblaciones de clones con diferentes edades y tamaños de cormos, esto hace muy difícil discernir si las diferencias que se observan se deben a componentes genéticos o ambientales (Ali *et al.*, 2013).

Agayev *et al.* (2009), elaboraron distintos índices de selección y encontraron diferencias entre clones en los atributos número de flores totales y tamaño de cormos de cuarta generación e indicaron que dichas diferencias fueron principalmente de origen genético.

La influencia de la pluviometría, temperatura y densidad de plantación se evaluó sobre la fenología, el rendimiento en estigmas y la calidad medida a través de sus componentes químicos (ésteres de croceta y picrocrocina). En dichos estudios se concluyó que los factores ambientales tienen un fuerte efecto sobre la producción y calidad de los estigmas. Los ambientes de menor temperatura resultan en una alta producción de flores, pero con baja calidad (Gresta *et al.*, 2009).

Baghalian *et al.* (2010), evaluando ocho poblaciones en un período de dos años encontraron una significativa interacción entre poblaciones y años para caracteres relacionados con la floración (número de flores, peso de estigmas secos, longitud de estigmas), mientras que esa interacción no fue significativa para caracteres fitoquímicos

(contenido de crocinas, picrocrocinas y safranal). Estimaron heredabilidades en sentido amplio de 0,97 para caracteres relacionados con la floración y correlaciones genéticas altas y significativas entre peso seco de estigmas con número de hojas y de flores.

La tasa de multiplicación natural de *Crocus sativus* L. es muy baja, lo que hace oneroso el costo de los cormos (Ali *et al.*, 2013). El cultivo de tejidos es un método útil para la producción a gran escala de cormos sanos y libres de patógenos (Ahmad *et al.*, 2014). La plantación de cormos infectados disminuye el rendimiento en número de flores, en el peso de los estigmas y produce la pérdida de los mismos. Existen protocolos de desarrollo de cormillos generados a partir de brotes provenientes del cultivo *in vitro* de yemas (Agüero y Tizio, 1994; Ilahi *et al.*, 1987; Plessner *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 2008).

En estudios de biología reproductiva se observó que la meiosis de la microspora es defectuosa produciéndose gametas desbalanceadas por raras segregaciones, no reducidas, cromosomas retrasados y hasta puentes cromatídicos (Ghaffari, 1986). En estudios previos observaron que la germinación de los granos de polen de *C. sativus* L. en autopolinizaciones y en polinizaciones cruzadas e interespecíficas con otras especies del género *Crocus* como *C. cartwrightianus* y *C. thomasii* presentaron anomalías variadas (Chichiriccò y Grilli-Caiola, 1984; Chichiriccò y Grilli-Caiola, 1982). Sin embargo, en cruzamientos recíprocos, los estigmas de *Crocus sativus* fueron receptivos y los óvulos fueron fecundados por el polen de estas mismas especies emparentadas obteniéndose frutos y semillas viables (Grilli-Caiola y Canini, 2010).

En estudios cariológicos se observaron 7 triplete de cromosomas, un par y un cromosoma solitario. A estos últimos se los reúne en el triplete número 5 pero no tienen una forma y tinción homogénea (Agayev, 2002; Chichiriccò y Grilli-Caiola, 1984; Ghaffari, 1986). Tal como menciona Agayev (2002), el parecido morfológico y tamaño de los cromosomas no son garantía de su homología.

Tal es así que el origen filogenético y de la triploidía sigue incierto. Muchas investigaciones al respecto se han inclinado hacia la autotriploidía proveniente de una especie diploide, *C. cartwrightianus* (Brighton, 1977; Chichiriccò y Grilli-Caiola, 1984; Frizzi *et al.*, 2007; Ghaffari, 1986; Nematí *et al.*, 2018), motivo por el cual se explicaría la escasa o nula variabilidad genética (Fernández, 2007; Zubor *et al.*, 2004); y el alto grado de heterocigosis podría explicarse por los diferentes genotipos de *C. cartwrightianus* que le dieron origen (Nematí *et al.*, 2018).

Asimismo, no se ha encontrado polimorfismo molecular en poblaciones de diferentes sitios de cultivo a través de diferentes marcadores como RAPD, ISSR, SSR, IRAP, AFLP

(Alsayied *et al.*, 2015; Busconi *et al.*, 2015; Grilli-Caiola *et al.*, 2004; Rubio-Moraga *et al.*, 2009), lo que ha llevado a especular que en el mundo sólo existe un cultivar (Grilli-Caiola *et al.*, 2004; Sheikh *et al.*, 2014; Siracusa *et al.*, 2012; Zubor *et al.*, 2004).

En contradicción a estos antecedentes, desde que se estudia esta especie se han observado en el campo variabilidad morfológica, fenológica y agronómica. Investigaciones recientes han comunicado alto grado de determinación genética o heredabilidad en sentido amplio (valores mayores a 0,60) para caracteres como número de cormos hijos por cormo madre, número de flores por cormo, peso medio de cormos hijos por peso de cormo madre, entre otros (Baghalian *et al.*, 2010; Sheikh *et al.*, 2014). En este sentido, Khansarinejad *et al.* (2015) y Mir *et al.* (2015) entre otros, han encontrado variabilidad genética a través de marcadores moleculares RAPD, ISSR. Otros autores han encontrado resultados que suponen un origen aloploiploide de esta especie (Ali *et al.*, 2013; Harpke *et al.*, 2013; Tsafaris *et al.*, 2011).

Debido al modo de reproducción, la fuerte presión de selección (Alavi-Kia *et al.*, 2008) y al abandono de cultivos en sitios de larga tradición en esta especie, se habría producido un importante proceso de erosión genética (Fernández, 2007).

Ante estos procesos de erosión genética se torna de gran importancia la formación de una colección de material cultivado con diferentes adaptaciones y su respectiva caracterización. Estas colecciones constituyen la base para el inicio de cualquier programa de mejoramiento.

Ante los resultados contrarios en cuanto al nivel de variabilidad genética encontrado, sumado a las evidencias fenotípicas, postulamos la hipótesis de existencia de variabilidad genética en el azafrán. Como objetivo general de esta investigación se plantea evaluar la variabilidad genética disponible de los materiales cultivados en diferentes sitios de la República Argentina con vistas de iniciar un programa de mejoramiento. Para ello, se debe formar e incrementar una colección de germoplasma con introducciones de zonas de cultivo distintas, para aumentar la variabilidad de los clones. En estos materiales, se evaluará la variabilidad genética en caracteres de producción, fenológicos, químicos y moleculares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PROCEDENCIA DE LOS MATERIALES

La Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la UNCuyo formó una colección de germoplasma de *Crocus sativus* con un número superior a 100 introducciones provenientes de cinco sitios de cultivo de Argentina. De este germoplasma se analizaron 46 clones (Tabla 1). Los ingresos nombrados como F-FCA, G-FCA, M-FCA y R-FCA (grupos de cormos con diferente procedencia y con gran cantidad de años cultivados en la FCA) se multiplicaron en el campo experimental de la Cátedra (33°00'24,23" latitud S, 68°52'21,71" longitud O, y altitud de 939 msnm) durante más de 15 años; las restantes fueron de reciente adquisición provenientes de Villa Allende en la provincia de Córdoba (CBAA); de Rawson (SJR) y de Ciudad (SJ) de San Juan y Maipú de la provincia de Mendoza (MZAM).

Cada cormo de las últimas introducciones se plantó individualmente para la formación de su respectivo clon.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la evaluación agronómica se diseñó un ensayo a campo en bloques, completamente aleatorizados con tres repeticiones y con arreglo factorial de las cuatro introducciones (**F-FCA, G-FCA, M-FCA y R-FCA**); con tres tamaños de cormos diferentes clasificados por su peso de acuerdo a una escala arbitraria con 16 categorías con intervalos de tres gramos: **P2** = 2,5 - 5,4g; **P5** = 11,5 - 14,4g; **P8** = 20,5 - 23,4g. El ensayo fue plantado en febrero de 2014 y cosechado en diciembre de 2016. Se plantaron ocho cormos por unidad experimental (tratamiento) a 0,20 m de profundidad, con una separación entre surcos de 0,50 m y entre plantas de 0,35 m para su distinción individual. No se realizó fertilización y se aplicó riego de manera superficial, por surco con una frecuencia aproximada de 10 a 15 días durante el ciclo vegetativo dependiendo de la pluviometría.

Tabla 1. Clones evaluados molecularmente. Procedencias e indicación (x) de clones para prueba de Mantel.

Provincia	Localidad	Procedencia	Clon	Provincia	Localidad	Procedencia	Clon					
MENDOZA	FCA	F-FCA	134	MENDOZA	FCA	M-FCA	53/26	X				
		F-FCA	52/4			X	M-FCA	53/27	X			
		F-FCA	52/7			X	R-FCA	51/2	X			
		F-FCA	52/11			X	R-FCA	51/4	X			
		F-FCA	52/12			X	R-FCA	51/5	X			
		F-FCA	52/13			X	R-FCA	51/6	X			
		F-FCA	52/14			X	R-FCA	51/7	X			
		F-FCA	52/18			X	R-FCA	51/10	X			
		G-FCA	140				R-FCA	51/12	X			
		G-FCA	50/2			X	MAIPU	MZAM	46/4			
		G-FCA	50/6			X		MZAM	46/5			
		G-FCA	50/9			X		MZAM	46/7			
		G-FCA	50/10			X		MZAM	46/8			
		G-FCA	50/11			X		MZAM	46/10			
		M-FCA	53/4			X		SAN JUAN	RAWSON	SJR	44/4	
		M-FCA	53/5			X				SJR	44/5	
		M-FCA	53/7			X	SJR			44/9		
		M-FCA	53/9			X	CIUDAD		SJ	43/3		
		M-FCA	53/13			X			SJ	43/6		
		M-FCA	53/17			X			SJ	43/9		
		M-FCA	53/22			X			SJ	43/10		
		M-FCA	53/24			X	CORDOBA	VILLA ALLENDE	CBAA	45/5		
		M-FCA	53/25			X				45/9		

## CARACTERES EVALUADOS

a) **CARACTERES FENOLÓGICOS Y DE PRODUCCIÓN:** medidos por unidad experimental fueron:

- 🌸 **Inicio de Floración (IF):** registrado como el número de días transcurridos desde la fecha de plantación hasta el día de aparición de la primera flor para cada año de cultivo.
- 🌸 **Período de Floración (PEFLOR):** registrado como el número de días transcurridos desde el día que apareció la primera flor hasta la última por año de cultivo.
- 🌸 **Fin de Floración (FF):** registrado como el número de días transcurridos desde la fecha de plantación hasta el último día de floración para cada año de cultivo.

- ✿ **Producción de Flores (FL):** determinado como la suma de flores totales producidas en cada año.
- ✿ **Longitud de Estigmas Frescos (LE):** la longitud (mm) se midió desde el extremo superior de los estigmas hasta el punto donde los mismos cambian de color naranja a amarillo. Para su medición se utilizó un calibre digital, y se realizó durante los años 2014 y 2015.

Los cormos producidos luego de tres años de cultivo (2014, 2015 y 2016) se clasificaron en tres categorías según su peso:

- cormos grandes: peso  $\geq 20$  g
- cormos medianos: peso entre 11 y 19,9 g
- cormos pequeños: entre 1 y 10,9 g

En base a esta clasificación se registraron en cada unidad experimental:

- ✿ **Número de Cormos Producidos (NCOR):** número de cormos hijos.
- ✿ **Peso de Cormos Producidos (PCOR):** peso total de cormos hijos (g).

En base al número y peso de cormos producidos se estimaron los siguientes índices en cada unidad experimental:

- ✿ **Índice de Número de Cormos Grandes Producidos (N20):** cociente entre el número de cormos hijos de tamaño grande y el total de cormos producido.
- ✿ **Índice de Número de Cormos Medianos Producidos (N11):** cociente entre el número de cormos hijos de tamaño mediano y el total de cormos producido.
- ✿ **Índice Número de Cormos Pequeños Producidos (N10):** cociente entre el número de cormos hijos de tamaño pequeño y el total de cormos producido.
- ✿ **Índice de Cormos Grandes (ICOGGR):** cociente entre el peso de cormos grandes y el peso total de cormos producidos.
- ✿ **Índice de Cormos Medianos (ICOME):** cociente entre el peso de cormos medianos y el peso total de cormos producido.
- ✿ **Índice de Cormos Pequeños (ICOPE):** cociente entre el peso de cormos pequeños y el peso total de cormos producido.

## b) CARACTERES DE CALIDAD

Los compuestos indicadores de la calidad de las hebras de azafrán fueron medidos en soluciones extraídas de las mismas durante los años 2015 y 2016; en 2014 la producción fue demasiado escasa para realizar la medición. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro Cary 50 UV/Vis (Agilent Technologies, USA) como lecturas de absorbancia a distintas longitudes de onda, de acuerdo al protocolo de la norma internacional ISO 3632-2 (2010).

- ✿ **Crocina (CRC):**  $E_{1cm}^{1\%}$  440 nm es la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción para crocina.
- ✿ **Safranal (SFR):**  $E_{1cm}^{1\%}$  330 nm es la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción para safranal.
- ✿ **Picrocrocina (PCR):**  $E_{1cm}^{1\%}$  257 nm es la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción para picrocrocina.

Las mediciones se realizaron en cada introducción y repetición, sin tener en cuenta el tamaño de corno inicial.

Previo a la medición de estos compuestos se realizó la cosecha de flores, desbrizne y secado de las hebras según el protocolo de Poggi (2011). Posteriormente se conservaron las hebras secas en condiciones de oscuridad a -80°C para evitar la degradación de los compuestos a medir.

Los caracteres de producción se refieren tanto a la especia como al material de propagación.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos de los caracteres fenológicos, producción y calidad se evaluaron a través de análisis de la varianza (ANAVA) y métodos exploratorios multivariados y por modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) (Anexo), utilizando el programa Infostat versión 2016p (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Las comparaciones de medias en MLGM se realizaron por la prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) (Balzarini *et al.*, 2008).

Con los índices N20, N11 y N10, se graficaron las proporciones acumuladas por tratamiento y se compararon los tratamientos dentro de cada índice. También se graficó el peso de la producción de cormos a través los índices ICOGR, ICOME e ICOPE. Los tratamientos se compararon dentro de cada índice.

La LE se analizó por ANAVA (Anexo) y las comparaciones de medias se realizaron por Diferencias Mínimas Significativas (DMS).

Los caracteres fenológicos y agronómicos se evaluaron en forma conjunta por un análisis de componentes principales (ACP) en base a la correlación entre las variables y la distancia euclídea de los individuos.

Los caracteres relacionados con la calidad de las hebras se midieron por introducción, en dos ciclos de cultivo. La evaluación se realizó por ANAVA (Anexo), y la comparación de medias de los compuestos se realizó por DMS.

### **c) CARACTERES A NIVEL MOLECULAR**

#### **RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Se tomaron trozos de hojas jóvenes por duplicado de cada uno de los 46 clones, e inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido para su instantáneo congelamiento y evitar daño y degradación del ADN (Ácido desoxirribonucleico). Luego se mantuvieron los materiales en frío a -80°C hasta su procesamiento.

#### **EXTRACCIÓN DE ADN Y VERIFICACIÓN DE CALIDAD**

Las hojas refrigeradas se molieron en nitrógeno líquido obteniendo alrededor de 15 mg. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo según el protocolo de Dellaporta (1983).

La calidad del ADN se evaluó a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% a 90 V por 30 minutos. Se realizó tinción con Bromuro de Etidio 0,8 µg/ml durante 20 minutos y se reveló en fotodocumentador transiluminador con luz UV (Bio-Rad, EE.UU.). La imagen fue analizada con el software Molecular Analyst 1,5 (Bio-Rad, EE.UU.) que permitió comprobar la integridad del ADN extraído.

#### **REACCIONES DE AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)**

La reacción de AFLP requirió 250 ng de ADN. La concentración del mismo se midió a través de espectrofotometría (Gene Quant) en diluciones 1:10 de las extracciones

originales. Las soluciones de trabajo utilizadas fueron de 50 µg/ml. El protocolo seguido fue el de Vos *et al.* (1995). El ADN genómico se fragmentó con dos enzimas de restricción, una de corte frecuente (Msel) y otra de corte raro (EcoRI). Posteriormente los fragmentos del ADN genómico se unieron a los adaptadores de las enzimas de restricción y se realizó una preamplificación con Msel y con EcoRI con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Luego se llevaron a cabo las amplificaciones selectivas de los 46 clones con 5 combinaciones de cebadores (Tabla 2). Cada uno de estos pasos se verificó con electroforesis en geles de agarosa al 4% y tinción con Bromuro de Etidio. Las reacciones se resolvieron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6% y tinción con plata (Benbouza *et al.*, 2006).

Para la corroboración de la técnica se realizaron cuatro réplicas de amplificación de muestras distintas en cada combinación de cebadores.

Tabla 2. Adaptadores y combinaciones de cebadores

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencias</b>	<b>Número de fragmentos</b>
<b>Adaptadores</b>		
EcoRI	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-5'	
Msel	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-5'	
<b>Cebadores de preamplificación</b>		
EcoRI + A	5'-AGACTGCGTACCAATTCA	
Msel + C	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAAC	
<b>Cebadores de amplificación selectiva</b>		
(A) EcoRI + ACA / Msel + CTG		93
(B) EcoRI + AAA / Msel + CAA		76
(C) EcoRI + ACA / Msel + CAA		94
(D) EcoRI + AGC / Msel + CAA		40
(E) EcoRI + ACC / Msel + CTC		64
	<b>Total</b>	<b>367</b>

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los análisis se realizaron por separado en dos conjuntos; uno donde se incluyeron los 46 clones de la tabla 1 y otro con 32 clones pertenecientes a las siguientes procedencias: M-FCA, F-FCA, R-FCA y G-FCA. Esta división se realizó para identificar los reales agrupamientos de clones entre estas introducciones.

En base a los geles de poliacrilamida se elaboraron matrices binarias, donde se computó la ausencia de banda con 0 (cero) y la presencia con 1 (uno) cuando fue inequívocamente distinguible para cada uno de los alelos. Con estas matrices se realizó un análisis descriptivo de las bandas observadas y uno molecular de varianza (AMOVA), con el programa InfoGen versión 2016 (Balzarini y Di Rienzo, 2003).

Las matrices binarias también se analizaron por los métodos: Conglomerados y de Coordenadas Principales (ACoP) con distancias calculadas en base al coeficiente de similitud de DICE y el método de ligamiento promedio sin ponderación, con el programa InfoGen versión 2016 (Balzarini y Di Rienzo, 2003).

El Índice de Polimorfismo se determinó en base a los datos descriptivos de los alelos visualizados como cociente entre el número de alelos polimórficos y el total de alelos considerados.

## **CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES AGRONÓMICAS Y MOLECULARES**

Las matrices para la correlación entre variables agronómicas y moleculares se obtuvieron a partir de los clones de los cuales se registraron tanto variables agronómicas como moleculares. La significación de la correlación entre las matrices de las variables moleculares y agronómicas se determinó a través de la prueba de Mantel. Los caracteres agronómicos, registrados para los mismos clones evaluados molecularmente, fueron: FL, NCOR clasificados por peso (grande, mediano y pequeño: con pesos  $\geq 20$  g, entre 19,9 y 11 g, y  $\leq 10,9$  g respectivamente), PCOR (NCOR y PCOR evaluados al momento de la cosecha); PEFLOR, IF y FI por cada uno de los tres años cultivados. Se correlacionaron las matrices de distancias de las variables moleculares y agronómicas de 30 clones (Tabla 1) de la colección pertenecientes a la localidad FCA con el programa InfoStat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

# RESULTADOS

## CARACTERES FENOLÓGICOS Y DE PRODUCCIÓN

### INICIO Y FIN DE FLORACIÓN

Estos caracteres se ajustaron a una distribución de Poisson. No se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre introducciones, tamaño y tratamientos (introducción\*tamaño) en los años evaluados.

### PERÍODO DE FLORACIÓN

En el análisis conjunto de la información de los tres años se estimaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre introducciones, tamaños y tratamientos (introducción\*tamaño). Las introducciones M y F de la localidad FCA presentaron los períodos de floración más extensos (Figura 2.a). Los cormos descritos como tamaño P8 florecieron durante un tiempo más prolongado que los descritos como P5 y P2 (Figura 2.b). Sin embargo al existir interacción entre introducciones y tamaños es válido remarcar sólo los tratamientos. Entre ellos M:P8, G:P8 y F:P5 se diferenciaron ( $p \leq 0,05$ ) de los restantes por un período de floración más prolongado y R:P2 por un período más reducido (Figura 2.c).

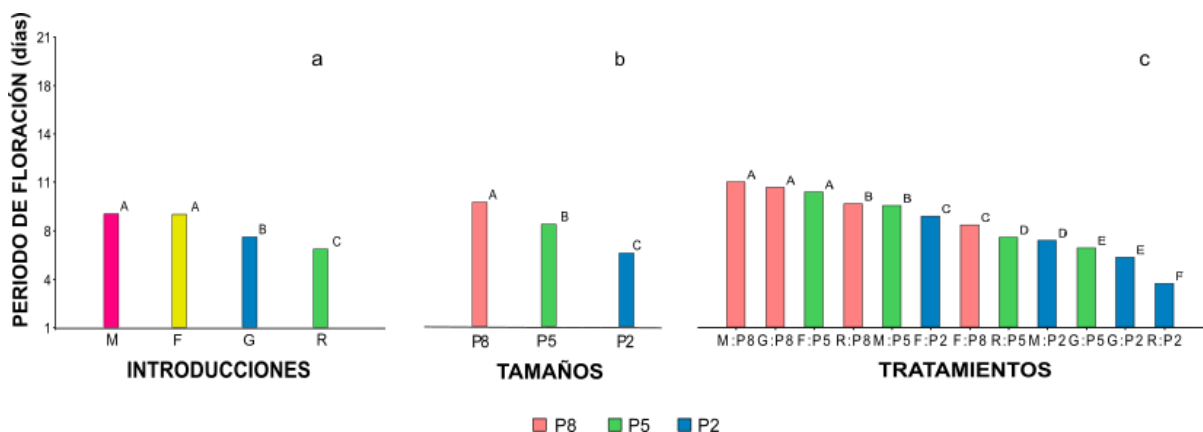


Figura 2. Períodos de floración en el conjunto de los tres años: a) introducción (F-FCA, G-FCA, M-FCA y R-FCA) b) tamaños de corno inicial (P2 = 2,5 - 5,4g; P5 = 11,5 - 14,4g; P8 = 20,5 - 23,4g) y c) tratamientos (interacción entre introducción y tamaño). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Los resultados del período de floración por año tanto para introducciones, tamaños y tratamientos (Figura 3) resultaron significativos ( $p \leq 0,05$ ), con excepción del tamaño en el año 2014 (Figura 3.d).

El período de floración del año 2014 se desarrolló entre el 15/04 y el 23/05 sumando un total de 38 días. La introducción R-FCA ( $6,89 \pm 1,55$ ) y el tratamiento R:P5 ( $11,71 \pm 4,86$ ) se diferenciaron ( $p \leq 0,05$ ) de los restantes por su mayor extensión (Figura 3.a y 3.c).

En el año 2015 el período de floración comenzó el día 10/04 y terminó el 12/05 sumando un total de 32 días. La introducción M ( $8,89 \pm 0,76$ ) y el tamaño de cormos P8 se destacaron por tener mayores períodos de floración (Figura 3.d y 3.e). Sin embargo, al ser la interacción significativa ( $p \leq 0,05$ ) los resultados se centran en los valores de los tratamientos. La media de M:P8 ( $21,02 \pm 1,73$ ) fue la mayor para este carácter, con una amplia diferencia con las medias de M:P2, R:P2, F:P2 y G:P2 ( $3,92 \pm 0,51$ ,  $3,34 \pm 0,71$ ,  $3,15 \pm 0,73$  y  $2,16 \pm 0,62$  respectivamente) (Figura 3.f).

En el año 2016 el período de floración comenzó el día 23/04 y culminó el 30/05 sumando 37 días totales. La introducción F tuvo el mayor período de floración ( $13,08 \pm 0,83$ ), y la G ( $10,32 \pm 0,67$ ) y la R ( $9,55 \pm 0,65$ ) con los menores (Figura 3.g). El tamaño P8 fue el de mayor tiempo medio de floración ( $13,17 \pm 0,78$ ), y el de menor tiempo fue P2 ( $9,93 \pm 0,65$ ) (Figura 3.h). Al ser significativa la interacción introducción\*tamaño, lo relevante son los tratamientos. Entre ellos se diferenciaron cinco grupos; el conformado por G:P8 ( $16,33 \pm 1,13$ ) y F:P5 ( $15,53 \pm 0,99$ ), tuvo el período de floración más extenso mientras que el grupo formado por G:P5 ( $7,35 \pm 0,65$ ) y R:P2 ( $6,46 \pm 0,75$ ) tuvo el período más corto (Figura 3.i).

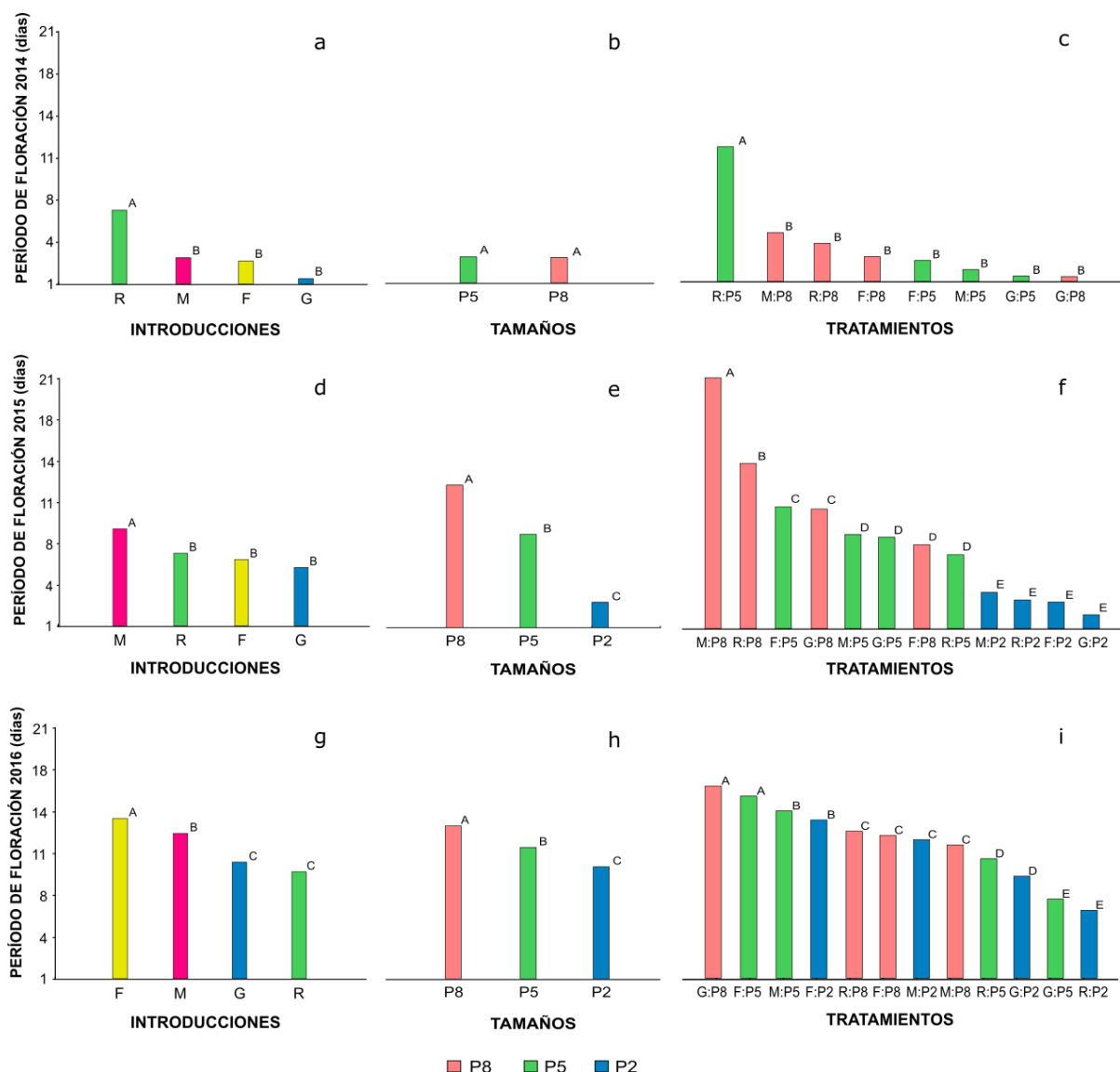


Figura 3. Período de floración en cada año. Comparaciones entre introducciones (F-FCA, G-FCA, M-FCA y R-FCA) (a, d, g), tamaños de corno inicial (P2 = 2,5 - 5,4g; P5 = 11,5 - 14,4g; P8 = 20,5 - 23,4g) (b, e, h) y tratamientos (interacción entre introducción y tamaño de corno inicial (c, f, i). Letras distintas indican diferencias significativas.

## PRODUCCIÓN DE FLORES

En términos generales, la producción total de flores por introducción mostró un amplio rango de variación en valores absolutos (302 – 556 flores) cuyos extremos corresponden a las introducciones G-FCA y M-FCA, respectivamente. También la producción de flores varió entre 251 y 773 para tamaños de cormos asignados como P2 y P5, respectivamente. En la producción de flores se detectaron diferencias ( $p < 0,05$ ) entre las introducciones, entre los tamaños de corno iniciales y entre la interacción entre

introducción y tamaño de cormo en el análisis conjunto de los tres años (Figura 4). La introducción R fue la de mayor producción media ( $13,57 \pm 4,73$ ) y la G la de menor producción ( $10,02 \pm 3,48$ ) (Figura 4.a). El tamaño de cormo P8 fue el que más flores produjo entre los tamaños ensayados (Figura 4.b). En los tratamientos (introducción\*tamaño) se observó la formación de seis grupos. R:P8 fue el tratamiento que mayor producción media de flores registró ( $17,03 \pm 5,93$ ) y M:P2 el de menor producción ( $6,81 \pm 2,37$ ) (Figura 4.c).

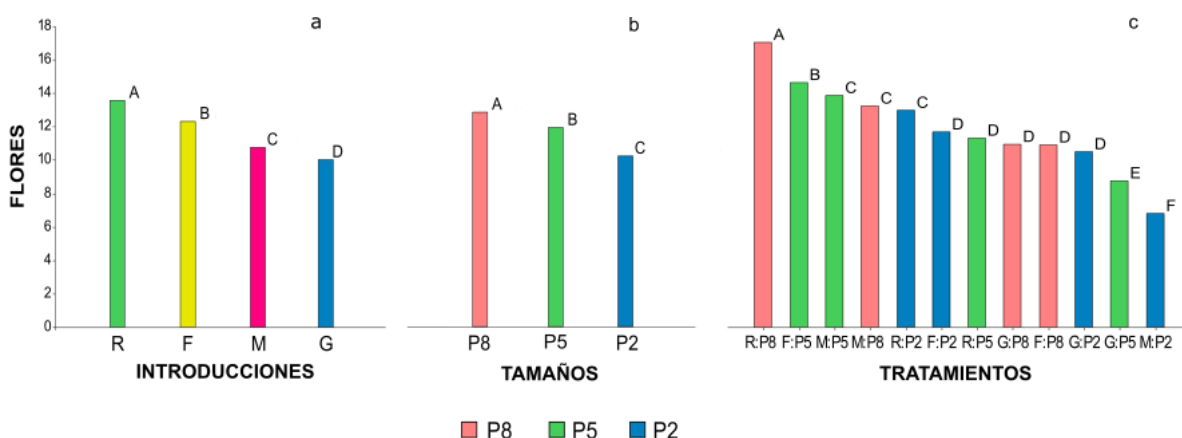


Figura 4. Floración total media en el conjunto de los tres años. Comparación de medias entre introducciones (F-FCA, G-FCA, M-FCA y R-FCA) (a), entre tamaños de cormo plantado (P2 = 2,5 - 5,4g; P5 = 11,5 - 14,4g; P8 = 20,5 - 23,4g) (b) y entre las interacciones (interacción entre introducción y tamaño) (c). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En el análisis de la media de producción de flores separada por año la respuesta varió de acuerdo al año de producción.

En el año 2014, la producción total fue de 46 flores. No se detectaron diferencias ( $p \leq 0,05$ ) por introducciones, por tamaño de cormos iniciales y en la interacción de estos factores (tratamientos) (Figura 5.a, 5.b y 5.c).

Durante el año 2015 la producción total fue de 713 flores. Los efectos de la introducción, el tamaño inicial de cormo y la interacción fueron significativos ( $p \leq 0,05$ ). Si bien la introducción R presentó la mayor producción de flores y G y F tuvieron las menores (Figura 5.d); al ser significativa la interacción los valores de tratamientos son los que toman relevancia. Es el caso de R:P8 con la mayor producción ( $53,81 \pm 16,29$ ) y de F:P2 con una menor producción ( $3,32 \pm 1,11$ ) (Figura 5.f).

La producción en el año 2016 sumó un total de 943 flores. Todos los efectos (la introducción, el tamaño inicial de cormos y la interacción) fueron significativos ( $p \leq 0,05$ ). Entre las introducciones se destacó la F con una producción de  $24,51 \pm 5,17$  flores (Figura 5.g). En el tamaño inicial de cormos, P5 se diferenció con la mayor producción de flores ( $28,14 \pm 5,96$ ) y P8 como el tamaño de menor producción de flores ( $17,29 \pm 3,65$ ) (Figura 5.h). De la misma manera que en el año 2015 la significancia de la interacción lleva a relevar los tratamientos. El que presentó mayor producción fue: M:P5 y el de menor R:P8 ( $34,48 \pm 7,34$  y  $10,28 \pm 2,23$  respectivamente) (Figura 5.i).

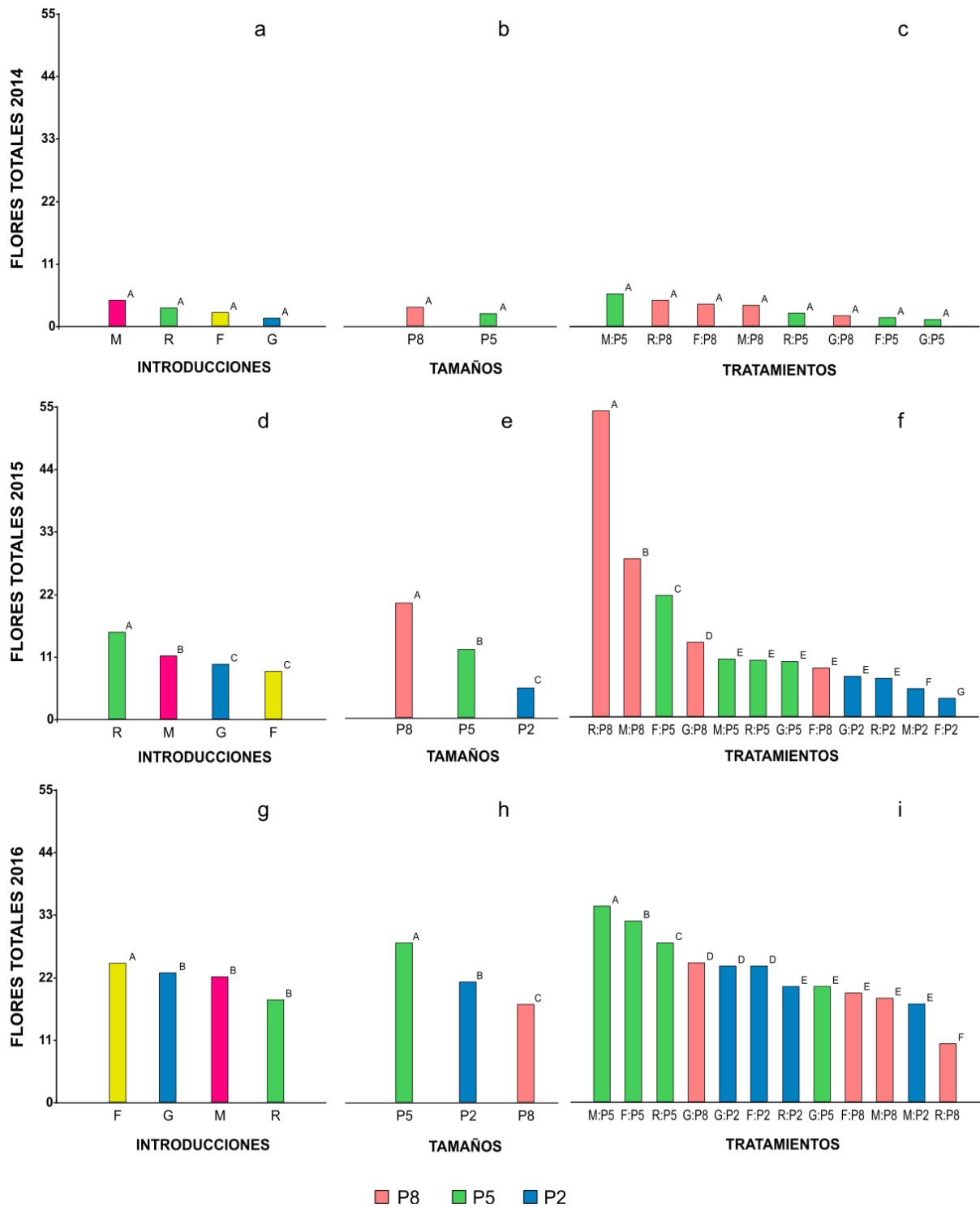


Figura 5. Producción de flores por año. Comparaciones entre introducciones (F-FCA, G-FCA, M-FCA y R-FCA) (a,d,g), tamaños de corno inicial (P2 = 2,5 - 5,4g; P5 = 11,5 - 14,4g; P8 = 20,5 - 23,4g) (b,e,h) y tratamientos (interacción entre introducción y tamaño de corno inicial) (c,f,i). Letras distintas indican diferencias significativas.

## LONGITUD DE ESTIGMAS

La longitud de los estigmas se analizó cada año por separado debido a la escasa cantidad de estigmas obtenidos de acuerdo a la floración del año inicial de plantación. En el año 2014 no se detectaron diferencias entre introducciones, ni tamaños ni tratamientos. En el año 2015 se diferenció ( $p < 0,05$ ) por el tamaño de cormo inicial. La menor longitud la presentaron los estigmas de flores producidas por cormos de tamaño P8 (Tabla 3).

Tabla 3. Valores medios y error estándar de la longitud de estigmas frescos por año.

		LE (mm) 2014	LE (mm) 2015
<b>INTRODUCCIÓN</b>	F	29,16 ( $\pm 1,2$ )	33,3 ( $\pm 0,07$ )
	G	29,26 ( $\pm 2,57$ )	33,7 ( $\pm 0,07$ )
	M	32,39 ( $\pm 1,09$ )	35,2 ( $\pm 0,05$ )
	R	28,78 ( $\pm 1,47$ )	34,4 ( $\pm 0,08$ )
<b>TAMAÑO</b>	P2	sd	34,8 ( $\pm 0,04$ ) a*
	P5	29,29 ( $\pm 1,47$ )	34,8 ( $\pm 0,08$ ) a*
	P8	30,42 ( $\pm 0,76$ )	33,0 ( $\pm 0,05$ ) b*
<b>TRATAMIENTO</b>	F:P2	sd	32,6 ( $\pm 0,18$ )
	F:P5	26,72 ( $\pm 2,44$ )	34,3 ( $\pm 0,05$ )
	F:P8	30,79 ( $\pm 1,18$ )	32,2 ( $\pm 0,08$ )
	G:P2	sd	36,1 ( $\pm 0,19$ )
	G:P5	34,12 ( $\pm 4,20$ )	33,3 ( $\pm 0,08$ )
	G:P8	24,39 ( $\pm 2,97$ )	32,0 ( $\pm 0,11$ )
	M:P2	sd	35,1 ( $\pm 0,11$ )
	M:P5	29,61 ( $\pm 1,88$ )	35,4 ( $\pm 0,08$ )
	M:P8	33,32 ( $\pm 1,31$ )	34,1 ( $\pm 0,07$ )
	R:P2	sd	35,8 ( $\pm 0,18$ )
	R:P5	29,30 ( $\pm 2,97$ )	34,8 ( $\pm 0,09$ )
	R:P8	28,53 ( $\pm 1,63$ )	31,7 ( $\pm 0,09$ )

(\* ) letras distintas indican diferencias significativas  $p \leq 0,05$

sd: sin datos

### PRODUCCIÓN DE CORMOS

En el número de cormos total cosechados después de los tres años de cultivo se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre tamaños de cormo inicial y tratamientos (Figura 6.b y 6.c) pero no se encontraron diferencias entre introducciones (Figura 8.a). El tratamiento M:P8 fue el más productivo ( $84,06 \pm 23,03$ ) y los tratamientos con tamaño de cormo P2 fueron los de menor producción (G:P2  $26,38 \pm 7,69$ ; F:P2  $22,61$

$\pm 6,47$ ; M:P2  $21,96 \pm 6,15$  y R:P2  $14,93 \pm 4,88$ ) (Figura 6.c). Entre los cormos de tamaño P5 no hubo un tratamiento distinguido y tampoco entre los de tamaño P2 (Figura 8.c).

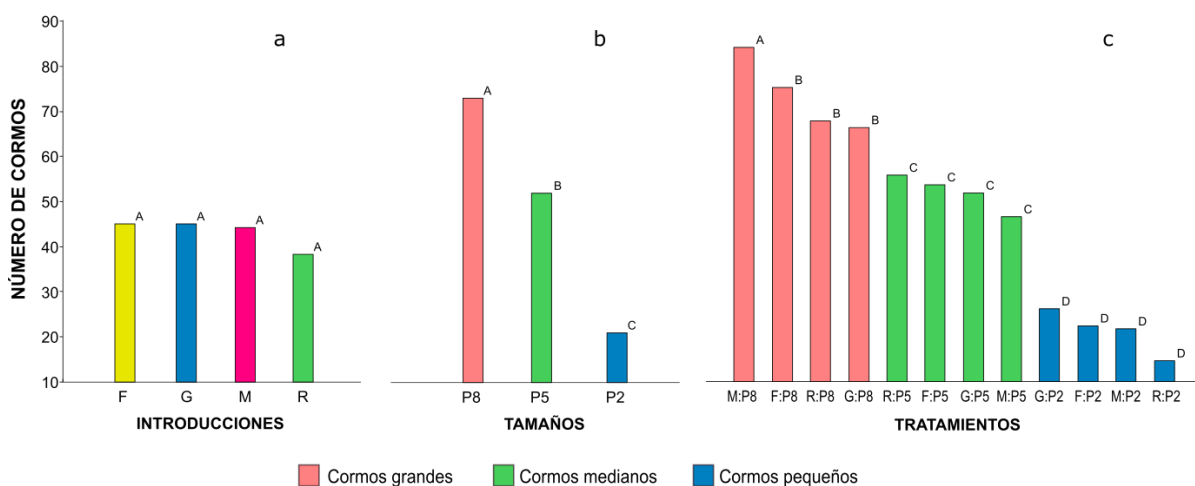


Figura 6. Media de número de cormos producidos por introducción (F-FCA, G-FCA, M-FCA y R-FCA) (a), tamaño de cormo inicial (P2 = 2,5 - 5,4g; P5 = 11,5 - 14,4g; P8 = 20,5 - 23,4g) (b) y tratamiento (interacción entre introducción y tamaño) (c) luego de tres años de cultivo consecutivo. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la figura 7 se observa la proporción acumulada de cormos cosechados de acuerdo a la clasificación establecida (grandes (N20), medianos (N11) y pequeños (N10)), después de tres años de cultivo. En general, todos los tratamientos produjeron mayor proporción de cormos pequeños que de tamaño medianos y grandes destacándose del resto M:P8 ( $0,75,02 \pm 0,02$ ) (Figura 7). Sin embargo, se distinguen los tratamientos F:P2, G:P2, G:P5 y R:P2 ( $0,33 \pm 0,05$ ;  $0,29 \pm 0,04$ ;  $0,28 \pm 0,03$  y  $0,38 \pm 0,07$  respectivamente) como los de mayor proporción de producción de cormos grandes y los tratamientos G:P8, M:P8 y R:P5 ( $0,12 \pm 0,02$ ;  $0,10 \pm 0,01$  y  $0,12 \pm 0,02$  respectivamente) los de menor proporción (Figura 7). Por su parte el tratamiento R:P2 produjo una alta proporción de cormos grandes, y menor proporción de cormos pequeños ( $0,38 \pm 0,07$  de cormos grandes;  $0,47 \pm 0,07$  de cormos pequeños); situación similar que se encontró en los tratamientos F:P5 ( $0,21 \pm 0,02$  de cormos grandes y  $0,42 \pm 0,03$  de cormos pequeños) y G:P5 ( $0,28 \pm 0,03$  de cormos grandes y  $0,43 \pm 0,03$  de cormos pequeños) (Figura 7).

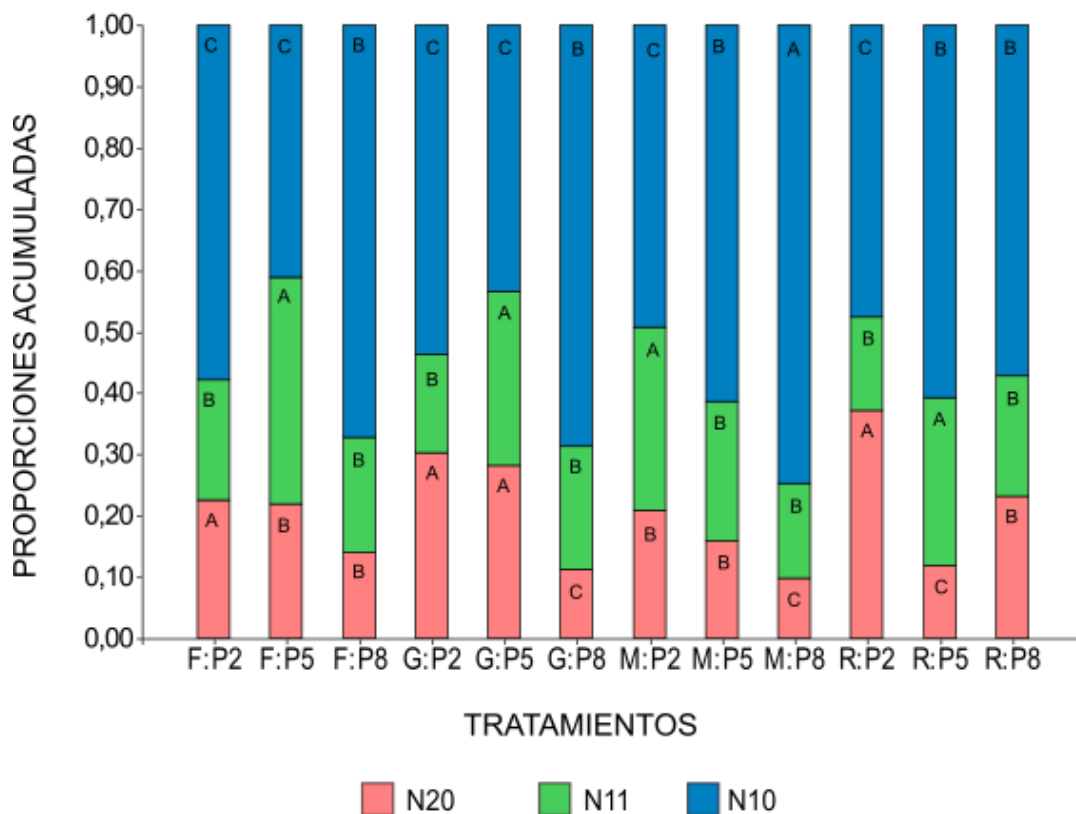


Figura 7. Proporciones de número de cormos producidos según clasificación por tamaño (N20=  $\geq 20$ g, N11= 11 - 19,9g, N10=  $\leq 10,9$ g) y tratamiento (interacción entre introducción y tamaño de corno inicial). Letras distintas indican diferencias significativas  $p < 0,05$  entre tratamientos dentro de tamaño de corno producido.

En el peso de cormos cosechados se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre introducciones, entre los tamaños de corno plantado y entre tratamientos. La introducción F-FCA presentó el peso de cormos cosechado más elevado ( $522,28 \pm 246,54$ ) y la introducción R-FCA el menor ( $367,19 \pm 173,29$ ) (Figura 8.a). El peso de cormos producido fue el mayor cuando el tamaño de corno inicial plantado fue P8 ( $625,12 \pm 295,24$ ) (Figura 8.b). Entre los tratamientos los que produjeron los mayores pesos de cormos a cosecha fueron: F:P8, M:P8, G:P5, F:P5 y R:P8 ( $660,80 \pm 312,09$ ;  $659 \pm 311,76$ ;  $652,55 \pm 308,65$ ;  $632,71 \pm 298,96$  y  $613,83 \pm 290,21$  respectivamente) y el tratamiento de menor peso fue R:P2 ( $175 \pm 83,41$ ) (Figura 8.c).

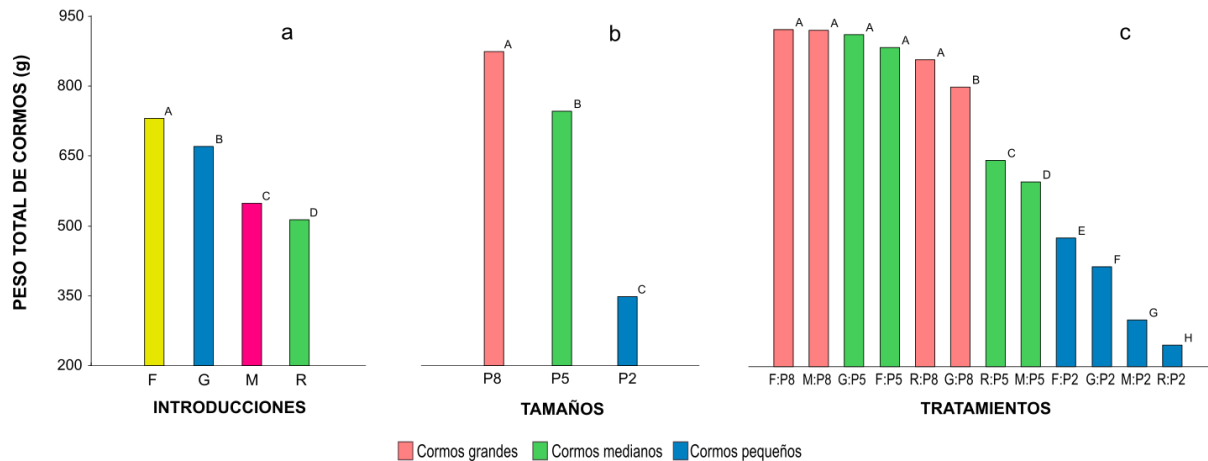


Figura 8. Peso total (g) de cormos producidos. Por introducción (F-FCA, G-FCA, M-FCA y R-FCA) (a), por tamaño de corno inicial (P2 = 2,5 - 5,4g; P5 = 11,5 - 14,4g; P8 = 20,5 - 23,4g) (b) y por tratamiento (interacción entre introducción y tamaño inicial del corno) (c) al tercer año de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

La proporción en peso de cormos grandes, medianos y pequeños producidos se diferenció ( $p \leq 0,0001$ ) entre tratamientos (Figura 9). La mayor proporción del peso producido fue debida a los cormos grandes. El tratamiento R:P2 ( $0,70 \pm 0,02$ ) tuvo el ICOGR más elevado mientras que M:P8 y R:P5 presentaron el menor ( $0,30 \pm 0,01$  cada uno) (Figura 9).

Los tratamientos F:P5, R:P5, G:P8 y G:P2 tuvieron el mayor ICOME ( $0,41 \pm 0,01$  y  $0,40 \pm 0,01$  respectivamente) y F:P2 y R:P2 tuvieron el menor ( $0,16 \pm 0,01$  y  $0,13 \pm 0,01$  respectivamente) (Figura 9). Por su parte, el tratamiento M:P8 fue el que registró el ICOPE más elevado y el tratamiento G:P5 ( $0,14 \pm 0,01$ ) tuvo la menor ICOPE (Figura 9).

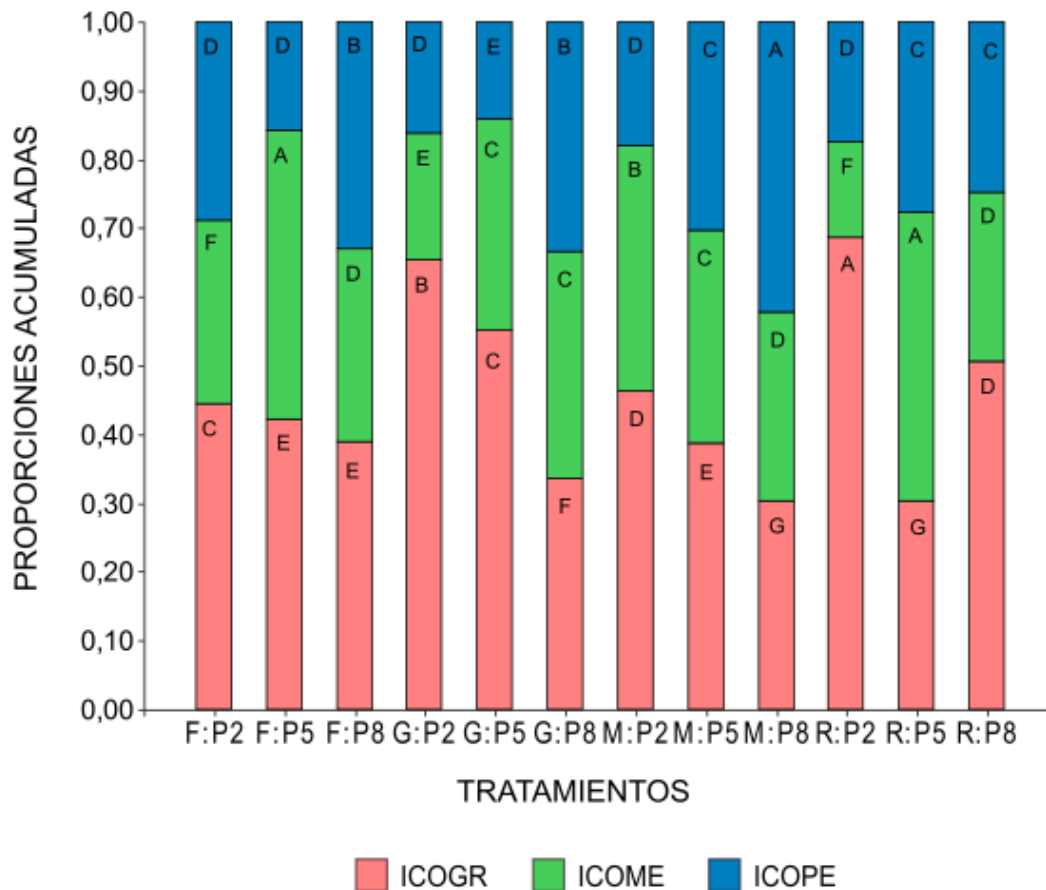


Figura 9. Distribución de la proporción de cormos producidos. Cormos grandes (ICOGR) ( $\geq 20g$ ), medianos (ICOME) (11 - 19,9g) y pequeños (ICOPE) ( $\leq 10,9g$ ), producidos por tratamiento (interacción entre introducción y tamaño de cormo inicial). *Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de tamaño de cormos producidos.*

El análisis conjunto de los caracteres agronómicos de fenología y producción a través de componentes principales explicó en el plano factorial un 76,1% de la variabilidad observada (Figura 10).

Las variables mejor representadas en el primer eje del plano factorial fueron en el sector positivo ICOGR y en el negativo PEFLOR, NCOR y PCOR. En el segundo eje en el sector positivo ICOME, y en el negativo ICOPE (Tabla 4).

Tabla 4. Autovalores y autovectores de distribución de las variables en los componentes principales.

<b>Autovalores</b>				<b>Autovectores</b>		
<b>Lambda</b>	<b>Valor</b>	<b>Proporción</b>	<b>Prop. Acum.</b>	<b>Variables</b>	<b>e1</b>	<b>e2</b>
1	5	0,62	0,62	FL	-0,35	0,3
2	1,1	0,14	0,76	NCOR	-0,4	-0,31
3	0,9	0,11	0,87	PCOR	-0,38	-0,11
4	0,6	0,08	0,95	ICOGR	0,42	-0,02
5	0,24	0,03	0,98	ICOME	-0,3	0,64
6	0,13	0,02	1	ICOPE	-0,28	-0,63
7	0,03	0,0035	1	LE	0,28	-0,07
8	0,0013	0,00016	1	PEFLOR	-0,4	0,03

En base a un análisis de conglomerados (no presentado) y a las variables mejor representadas se conformaron cuatro grupos de tratamientos (Figura 10):

**I:** constituido por los tratamientos G:P2, M:P2, F:P2 y R:P2. Caracterizado por tener un ICOGR elevado, un PEFLOR reducido, un NCOR y PCOR bajos y un ICOME bajo, con excepción de M:P2 con ICOME intermedio.

**II:** conformado por el tratamiento G:P5. Caracterizado por tener un ICOGR intermedio, un ICOPE bajo, una producción FL intermedia y un reducido PEFLOR.

**III:** compuesto por los tratamientos F:P5, M:P5 y R:P5. Caracterizado por tener elevada producción de FL, un largo PEFLOR, un elevado ICOME, un bajo ICOGR y presentar bajos LE.

**IV:** constituido por los tratamientos M:P8, R:P8, F:P8 y G:P8. Caracterizado por valores altos en NCOR, PCOR, PEFLOR, FL e ICOPE, y bajos valores en el ICOME, LE y en el ICOGR.

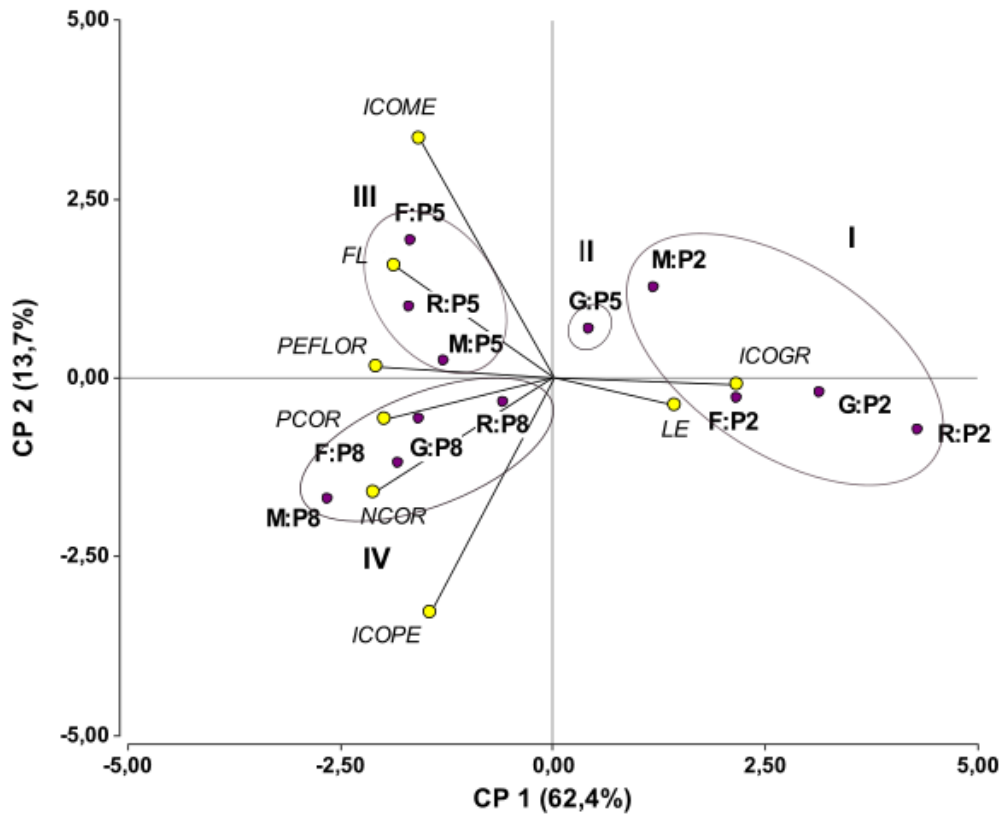


Figura 10. Análisis de Componentes Principales. Asociaciones entre variables fenológicas y productivas y tratamientos. *Números romanos indican agrupamientos. Correlación cofenética= 0,95*

## CALIDAD DE HEBRAS

Los componentes químicos principales de las hebras de azafrán: crocina, picrocrocina y safranal son responsables del color, el sabor amargo y el aroma característicos de esta especia.

Los resultados obtenidos como lecturas directas de absorbancia se expresaron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{(D * 10000)}{(m * (100 - H))}$$

Donde:

D: es la absorbancia específica a las longitudes de onda 257, 330 y 440 nm

m: es la masa de la muestra de azafrán en gramos

H: es la humedad y contenidos volátiles de la muestra, expresada como fracción de la masa

Se encontró que el ambiente tiene una gran influencia en la variabilidad de los compuestos químicos.

En el ANAVA el factor que explicó la variabilidad de los compuestos fue el año de producción; la interacción entre introducciones y años no resultó significativa ( $p \leq 0,05$ ) para todos los compuestos (Tabla 5). En el 2015 la absorbancia de crocina y de picrocrocina en las introducciones fue significativamente mayor que en 2016 y para safranal el año con mayores valores fue 2016 (Tabla 6).

Tabla 5. ANAVA de los componentes químicos. Valores de F y probabilidades.

FUENTE VARIACIÓN	PCR		SFR		CRC	
	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
INTRODUCCIÓN	0,20	0,8934	0,34	0,7941	0,03	0,9933
BLOQUE	10,40	0,0003	0,52	0,6001	6,04	0,0059
INTRODUCCIÓN*BLOQUE	0,33	0,9142	1,64	0,1685	0,48	0,8197
AÑO	32,55	<0,0001	128,76	<0,0001	95,46	<0,0001
CLON*AÑO	0,50	0,6826	0,92	0,4436	0,45	0,7182

Tabla 6. Absorbancia media de crocina, picrocrocina y safranal. Comparaciones de los años para las introducciones evaluadas (F, G, M y R). *Letras distintas indican diferencias ( $p \leq 0,05$ )*

AÑO	PCR ( $E_{1cm}^{1\%}$ 257 nm )	SFR ( $E_{1cm}^{1\%}$ 330 nm )	CRC ( $E_{1cm}^{1\%}$ 440 nm )
2015	81,88 b	14,72 a	237,61 b
2016	61,83 a	29,12 b	125,88 a

## CARACTERES A NIVEL MOLECULAR

Un total de 367 bandas, de tamaño entre 100 pb y 500 pb, se obtuvieron del análisis de los geles (Figura 11). De estas bandas, 78 fueron monomórficas resultando un 78,75% de bandas polimórficas. El rango de bandas polimórficas obtenidas por combinación varió de 33 (combinación D: E+AGC/M+CAA) a 80 (combinación A: E+ACA/M+CTG). En todas las combinaciones el porcentaje de bandas polimórficas fue mayor al 45%, con un rango de variación entre 46 – 67% y tuvieron un porcentaje de amplificación elevado, del 80% al 87,4%. El contenido de información polimórfica (PIC) fue de 0,18 a 0,22 el mayor valor corresponde a la combinación E la cual fue, también, la de menor probabilidad de que dos individuos presenten el mismo alelo (Tabla 7). El índice de polimorfismo calculado con estos datos fue de 0,787.

Tabla 7. Resultados descriptivos de los perfiles de bandas de AFLP. BP: número de bandas polimórficas; BM: número de bandas monomórficas; BT: número total de bandas; PMF (95): proporción de loci polimórficos; PIC: contenido de información polimórfica promedio; EE: error estándar de PIC; AMP: porcentaje de amplificación; PDICMA: probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo.

Cebador	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
A	80	13	93	0,61	0,20	0,01	82,97	9,6 <sup>-06</sup>
B	58	18	76	0,57	0,19	0,01	83,70	1,0 <sup>-04</sup>
C	65	29	94	0,46	0,18	0,01	87,44	5,7 <sup>-06</sup>
D	33	7	40	0,50	0,18	0,01	87,02	4,6 <sup>-05</sup>
E	53	11	64	0,67	0,22	0,01	79,99	1,4 <sup>-07</sup>
<b>Total</b>	<b>289</b>	<b>78</b>	<b>367</b>				<b>84,19</b>	<b>3,7<sup>-26</sup></b>

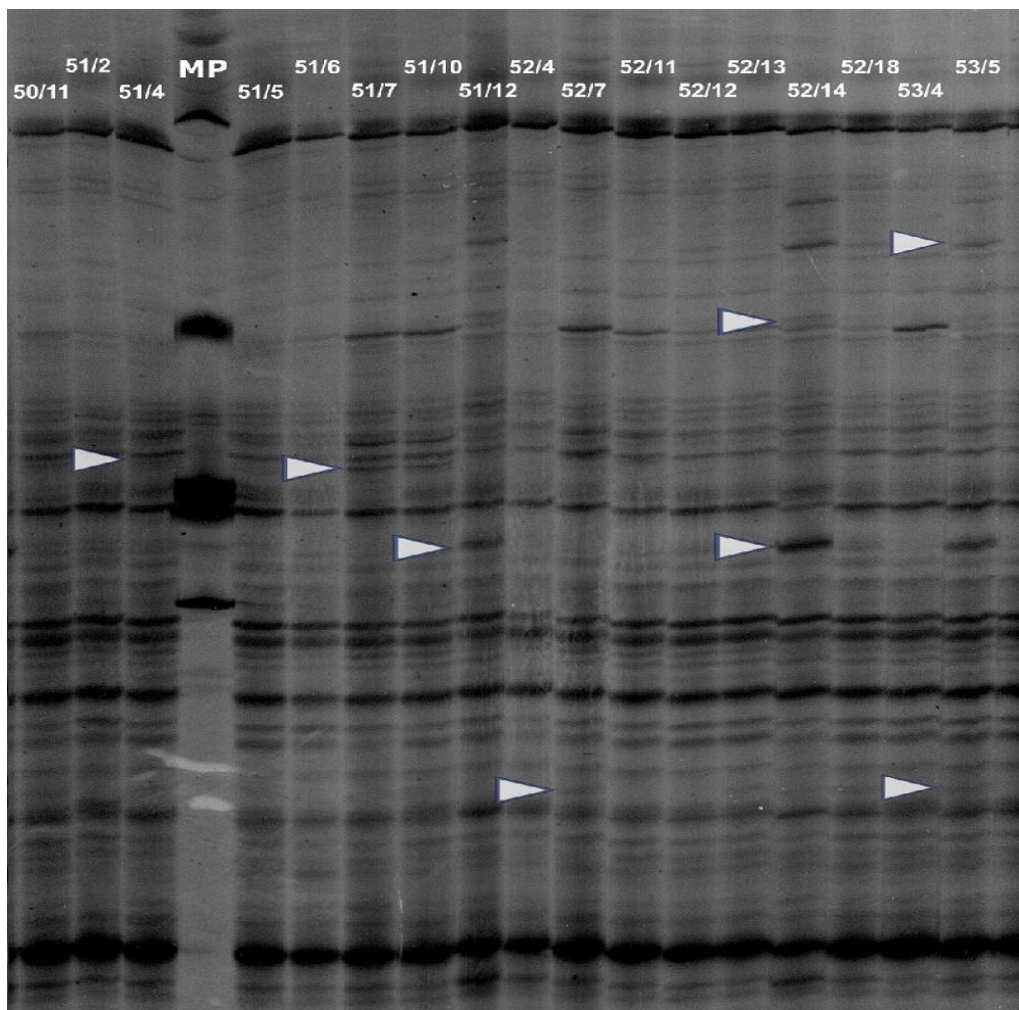



Figura 11. Perfiles de bandas de AFLP obtenidos en clones de *Crocus sativus*. Imagen ilustrativa de gel con la combinación de cebadores eACC-mCTC. Las marcas  indican bandas en alelos polimórficos. MP: marcador de peso molecular.

En el análisis de los 46 clones se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre procedencias y entre clones dentro de las mismas. El 13,4% de la variación fue explicada por las procedencias y el 86,6% por los clones dentro de procedencia (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis molecular de la varianza por procedencia.

Fuente de variación	p-valor	Porcentaje variación
Procedencia	<0,0001	13,40
Dentro	<0,0001	86,60

Las procedencias se diferenciaron en cinco grupos, a través de sus distancias en un análisis de conglomerados, conformando los siguientes grupos: I: G-FCA, R-FCA, F-FCA y CBAA; II: SJ; III: MZAM; IV: SJR y V: M-FCA (Figura 12).

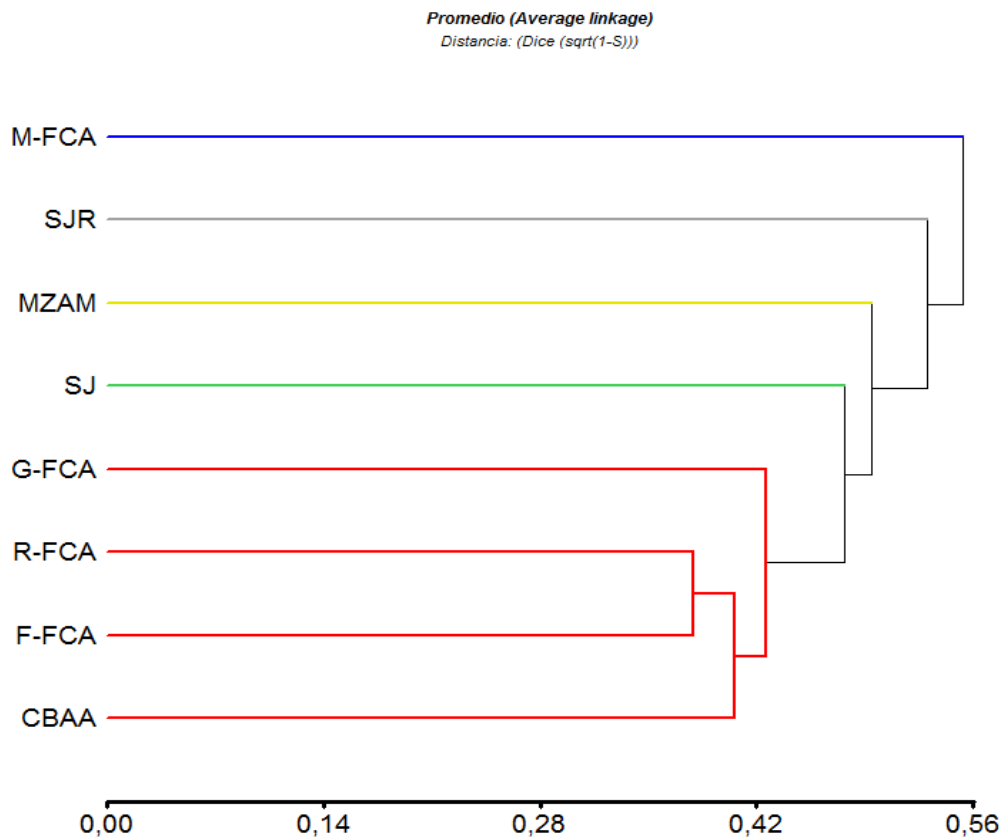


Figura 12. Dendrograma según procedencias. En rojo el grupo I, verde el grupo II, amarillo el grupo III en gris el grupo IV y en azul el grupo V. *Correlación cofenética= 0,897*

Los clones se agruparon en 12 clases como sigue (Figura 13):

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| I. MZAM:46/5                  | VII. SJ:43/10 y MZAM:46/4                 |
| II. M-FCA:53/27 y M-FCA:53/26 | VIII.R-FCA:51/5                           |
| III. SJR:44/5                 | IX. M-FCA53/25, M-FCA:53/24 y M-FCA:53/22 |
| IV. SJR:44/9                  | X. SJR:44/4                               |
| V. SJ:43/3                    | XI. G-FCA:140                             |
| VI. G-FCA: 50/9               | XII. Los 31 clones restantes              |

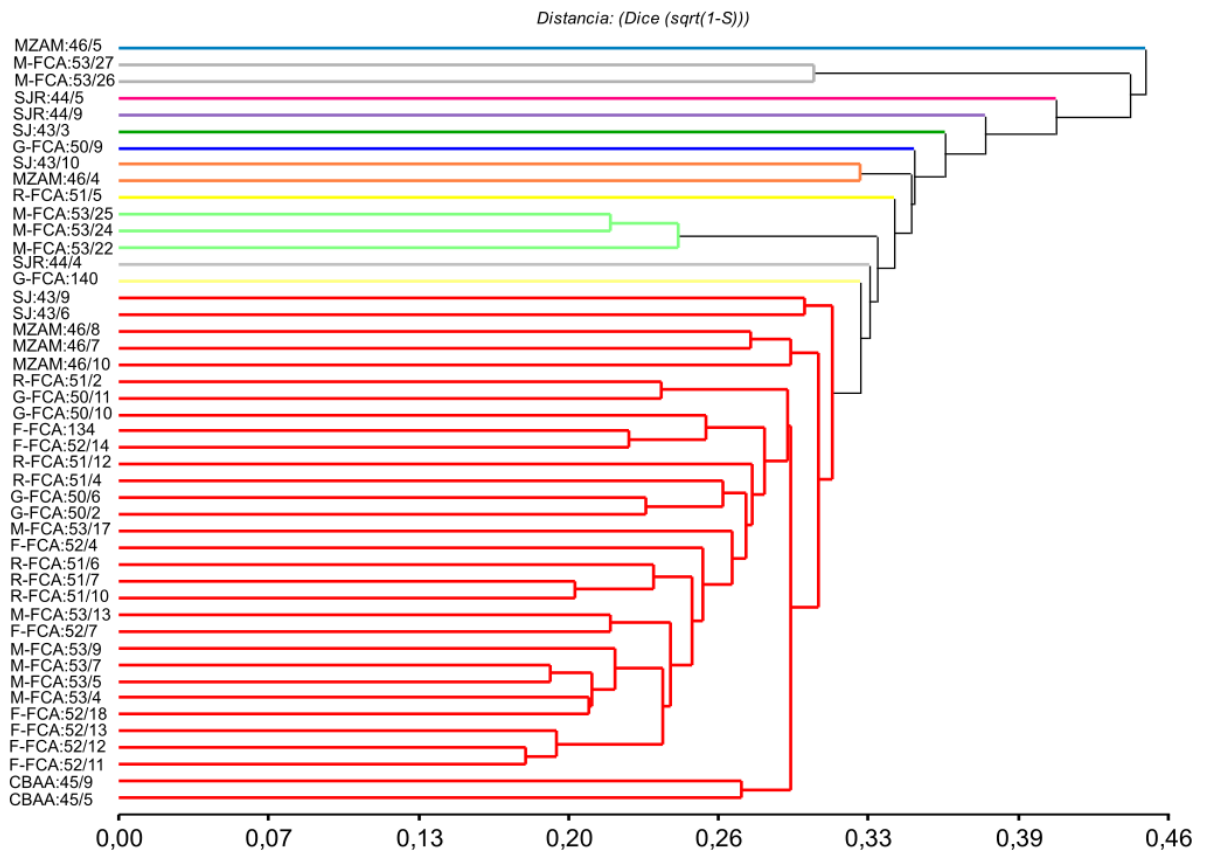


Figura 13. Dendrograma de clones de *C. sativus* en Argentina. *Correlación cofenética*= 0,936

El plano factorial del análisis de coordenadas principales explicó el 20,7% de la variabilidad encontrada en el conjunto de los materiales analizados con una agrupación de los clones concordante con el dendrograma de la Figura 13 como se muestra en la Figura 14.

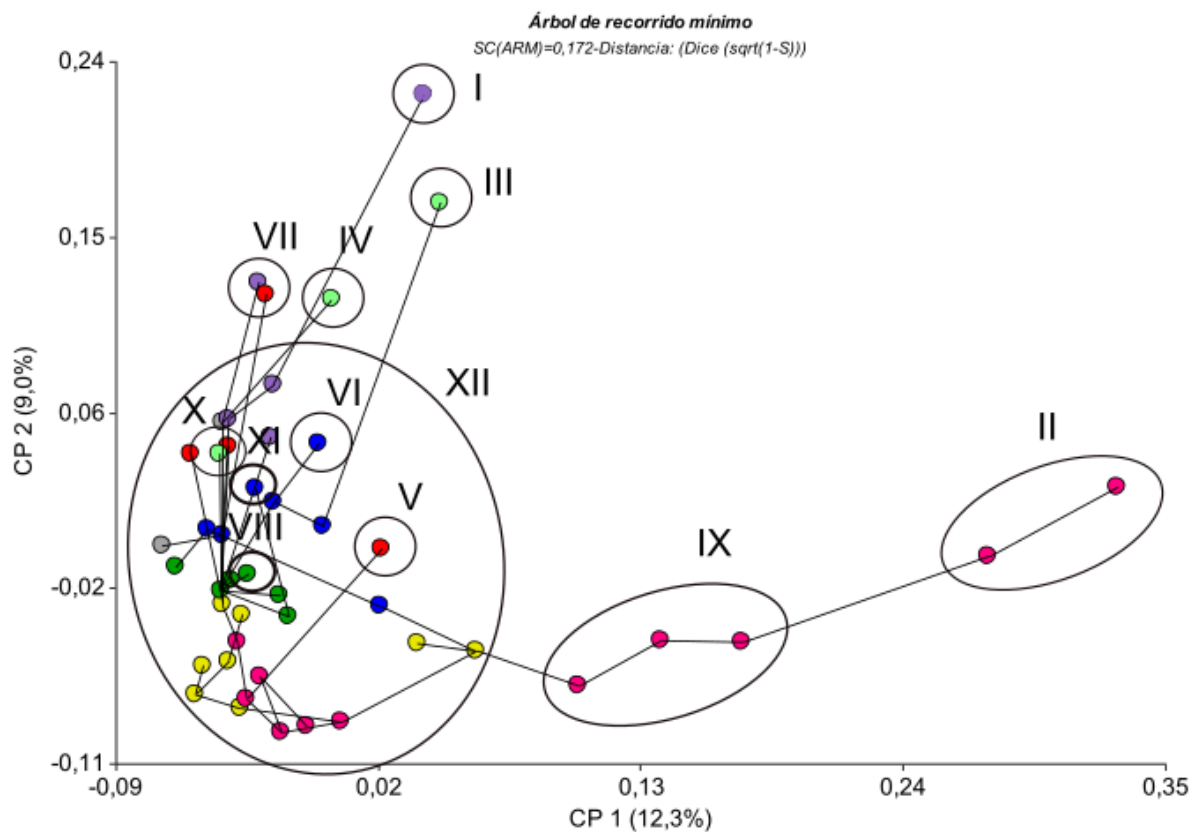


Figura 14. Análisis de Coordenadas Principales. Distribución de los 46 clones y su relación con las coordenadas, se muestra el árbol de recorrido mínimo con agrupamiento de clones. *Colores indican procedencias: CBAA, MZAM, F-FCA, G-FCA, M-FCA, R-FCA, SJ, SJR. Números romanos indican agrupamientos. Correlación cofenética 0,928*

En la localidad FCA se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre procedencias y dentro de las mismas. El 10,7 % de la variación fue explicado por las procedencias y el resto por las diferencias entre clones (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis molecular de la varianza de la localidad FCA.

Fuente de Variación	p-valor	Porcentaje de variación
Procedencia	<0,0001	10,76
Dentro	<0,0001	89,24

En el análisis de conglomerados de las procedencias de la localidad FCA se visualiza a la procedencia la M-FCA como la más distante (Figura 15). Al analizar los clones de las procedencias se clasificaron en seis grupos en base a sus distancias (Figura 16). Los clones de la localidad FCA se agruparon en clases (Figura 16):

- I: M-FCA53/26 y M-FCA53/27;
- II: G-FCA50/9;
- III: R-FCA51/5;
- IV: G-FCA140;
- V: M-FCA53/22, M-FCA53/24 y M-FCA53/25 y
- VI: los 24 restantes.

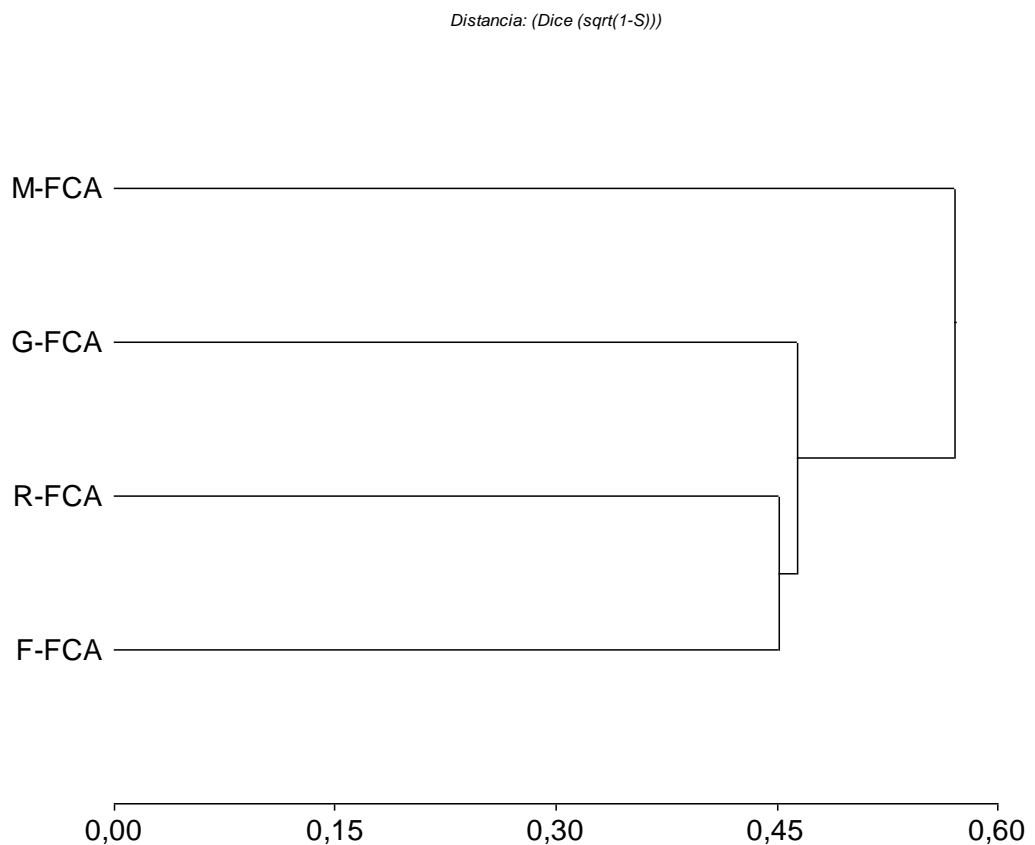


Figura 15. Dendrograma de procedencias de la localidad FCA. *Correlación cofenética= 0,89*

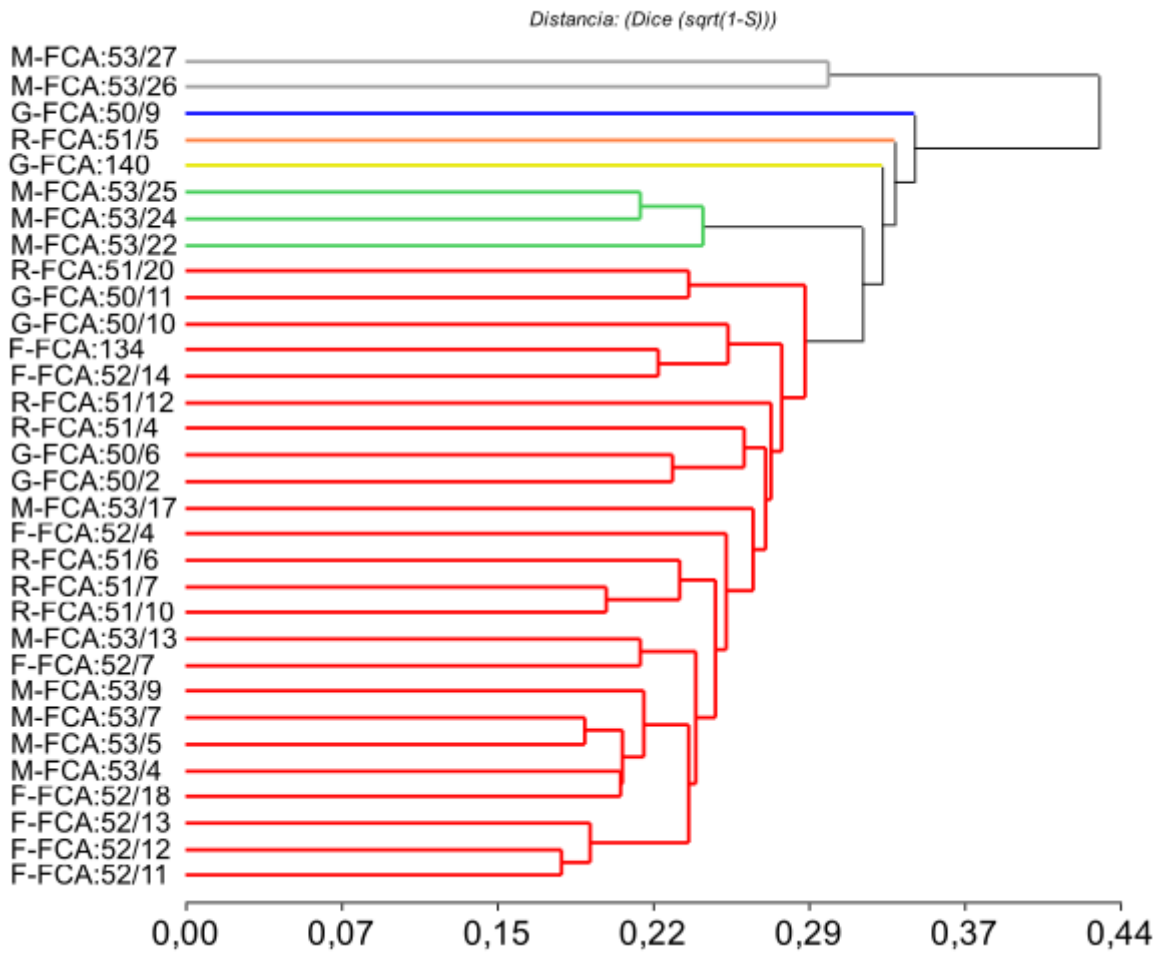


Figura 16. Dendrograma de clones de la localidad FCA. Colores distintos indican grupos distintos. *Correlación cofenética*= 0,935

En el ACoP de esta localidad se observan los mismos grupos que en el dendrograma de la figura 16 (Figura 17).

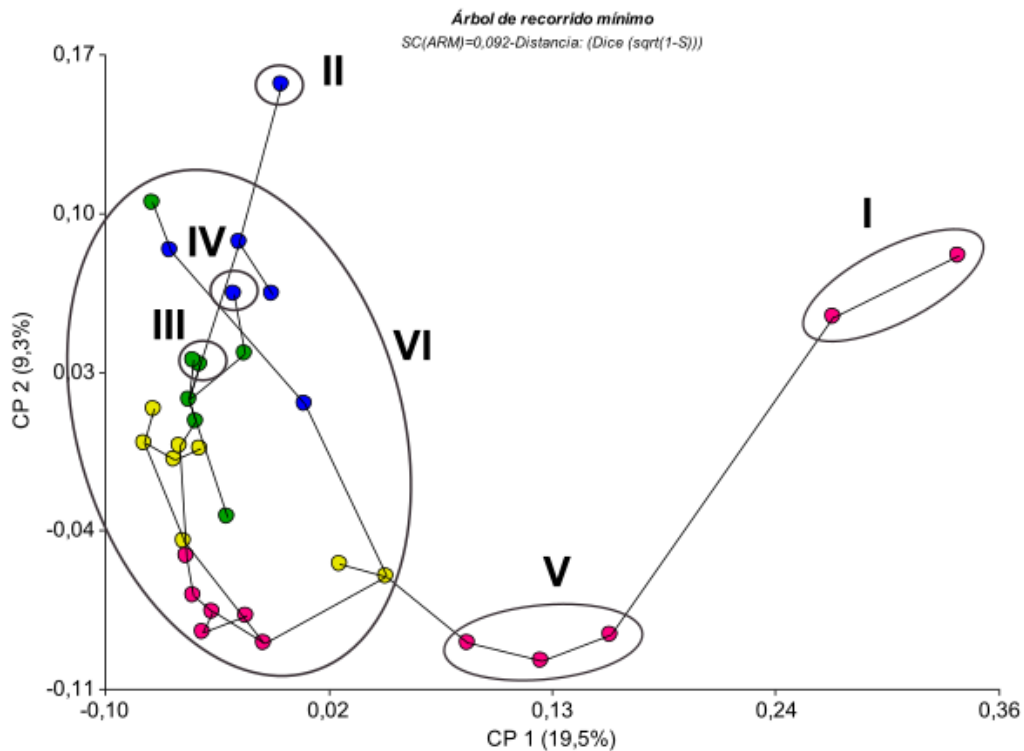


Figura 17. Análisis de Coordenadas Principales. Distribución de los 32 clones de la localidad FCA y su relación con las coordenadas, se muestra el árbol de recorrido mínimo con agrupamiento de clones. Colores indican procedencias: ● F-FCA, ● G-FCA, ● M-FCA, ● R-FCA. Números romanos indican agrupamientos en base a dendrograma anterior (Figura 16). Correlación cofenética 0,92

### CORRELACIÓN ENTRE VARIABILIDAD AGRONÓMICA Y MOLECULAR

La correlación entre los caracteres agronómicos y moleculares resultó no significativa ( $p > 0,10$ ) y con un  $r = -0,13$ . Estos resultados indicarían la no existencia de relación entre los fragmentos de ADN analizados y los caracteres agronómicos evaluados.

# DISCUSIÓN

## VARIABILIDAD AGRONÓMICA

### FENOLOGÍA

El azafrán tiene un período concreto de cultivo, determinado principalmente por la temperatura (Alonso Díaz-Marta y Sánchez Gómez, 2007; Poggi, 2009). En Luján de Cuyo la etapa de floración comienza la primera quincena de abril y finaliza hacia fines de mayo - primeros días de junio; cuando la temperatura se hace inferior al rango propicio para el desarrollo floral (Poggi, 2009). Teniendo en cuenta la concentración de la floración en pocos días y la demanda de mano de obra intensiva de las labores de cosecha, desbrizne y secado de las hebras; la diferenciación de materiales en el inicio de floración, así como la longitud del período de floración o la finalización resultan muy importantes en el manejo agronómico del cultivo. Artificialmente se ha probado el escalonamiento de la floración con tratamientos en cámaras de cultivo simulando condiciones de verano y de otoño (Molina *et al.* 2004, Poggi y Portela, 2010). Entre las introducciones de la localidad FCA no se encontraron diferencias en el inicio ni en el fin de floración, pero sí en el período de floración entre tratamientos. Las introducciones F y M resultaron de período más extenso de floración ( $8,8 \pm 0,7$ ) tanto en el análisis de los años en conjunto como en 2015 y 2016 individualmente. El tamaño de cormo inicial P8 tuvo el período más extenso que P5 y éste que P2, situación que se mantuvo en cada uno de los años registrados. Los cormos de plantación de tamaño P2 no florecieron en 2014, indicando que su tamaño era insuficiente para desarrollar flores (Douglas *et al.*, 2014).

Estos resultados contradicen los obtenidos por Torricelli *et al.*, 2019 en los que encontraron poblaciones más precoces (Barisciano de Italia y Torbat Market de Irán) y más tardías (Ghaien y Rhan de Irán) en cuanto a la emergencia de las plantas. Encontraron además, que este carácter está negativamente relacionado con el número de flores por unidad experimental y por planta.

### PRODUCCIÓN DE FLORES

Se ha observado una dinámica de producción de flores a través de los años respecto de los tamaños de cormos iniciales. Si bien en números absolutos todos los tamaños

aumentaron la cantidad de flores año a año, no se esperaba floración el año de plantación para cormos iniciales P2. Los cormos P5, florecieron todos los años alcanzando los valores máximos al tercer año; los de tamaño P8 alcanzaron sus valores máximos al segundo año de floración y en el tercero fueron los menos productivos. Esto hace suponer que en un cuarto año los valores máximos de producción de flores, los alcanzarán los tratamientos con tamaños iniciales P2.

Los valores medios de producción de flores totales en el conjunto de los tres años de cultivo situó a los cormos de tamaño P8 como los más productivos según Poggi y Portela (2010) y Negbi *et al.*, (1989). Sin embargo esto no fue así en cada uno de los años como se mencionó anteriormente. Este fenómeno podría explicarse por la dinámica de multiplicación de los cormos; habiendo observado que los cormos de tamaño P8 tuvieron mayor N10 e ICOPE, estos cormos de renuevo no alcanzaron el tamaño suficiente para florecer, durante los años de experimentación.

Por otra parte, cabe destacar el tratamiento F:P5 que, sin ser el más productivo, mantuvo en los tres años una elevada producción de flores.

## **PRODUCCIÓN DE CORMOS**

La tasa natural de multiplicación media de la especie es muy baja, alrededor de cuatro a cinco cormos hijos por cormo inicial, por año (Agayev *et al.*, 2007); por esta razón la implantación del cultivo es onerosa y su expansión es limitada (Ali *et al.*, 2013). Conocer materiales, o genotipos con altas tasas de multiplicación implicaría un adelanto importante en el cultivo. En el presente trabajo se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos evaluados. El tratamiento M:P8 se destacó por sobre los 11 restantes en la producción de número de cormos. Asimismo, las diferencias entre tratamientos más notorias fueron debidas al tamaño de cormo inicial, siendo el tamaño P8 el que más cormos hijos produjo y el tamaño P2 el de menor producción; tal como observaron Douglas *et al.* (2014).

La superioridad del tratamiento M:P8 se debió principalmente a la producción de cormos pequeños con más del 70% y la menor producción de cormos grandes. Si bien, la producción de cormos pequeños fue mayoritaria en todos los tratamientos, las proporciones variaron. Se debe destacar a los tratamientos F:P5 y G:P5 que produjeron altos valores de cormos grandes y medianos, y bajos valores de cormos pequeños. Se observó también que los cormos iniciales de tamaño P2 produjeron la menor cantidad de cormos pequeños, pero la proporción de cormos grandes fue elevada comparada con los cormos de tamaño P8. La

producción de cormos de tamaño mediano estuvo relacionada con los tamaños de cormos iniciales P5 y el tratamiento M:P2.

### **CALIDAD DE HEBRAS**

El uso medicinal del azafrán, como ya se mencionó, es conocido desde su explotación comercial. Pero el crecimiento exponencial en la investigación básica y farmacéutica en la búsqueda de compuestos naturales con propiedades benéficas para las enfermedades actuales es reciente (Geromichalos *et al.*, 2014).

Los estigmas de azafrán se componen de sustancias como azúcares, minerales, grasas, vitaminas y metabolitos secundarios como terpenos, flavonoides, antocianinas y carotenoides. Entre todos éstos, los carotenoides son los más importantes ya que son los responsables del color (crocina), aroma (safranal) y sabor (picrocrocina) de la especia (Bolhassani *et al.*, 2014). Innumerables investigaciones han comunicado la importancia de estos tres componentes por sus efectos antihipertensivo, antitusivo, anticonvulsivante, ansiolítico, antidepresivo, antitumoral y anticancerígeno, entre otros (Abdullaev y Espinosa-Aguirre, 2004; Bolhassani *et al.*, 2014).

La identificación de clones con mayor contenido de carotenoides resultaría promisorio para su selección y satisfacer las demandas de estos remedios naturales. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y en concordancia con Cossignani *et al.*, (2014), estos compuestos tienen una gran influencia del ambiente territorial como de procesamiento en la manufactura de la especia. En este sentido, D'Archivio *et al.* (2016) diferenciaron geográficamente muestras de la especia producidas en diferentes áreas de Italia. Postularon estos compuestos o sus perfiles metabolómicos para diferenciar geográficamente la procedencia de la especia.

La medición por espectrofotometría, de acuerdo a la norma ISO 3632, requiere el secado a estufa de las hebras, y luego la extracción de los compuestos en solución acuosa. La volatilidad del safranal, sobre todo, sugiere un control ambiental en la operatividad muy estricta, lo que podría resultar en variaciones muy importantes (Cagliani *et al.*, 2015). Sería interesante realizar la medición por otras técnicas en que no se mida directamente el compuesto en las hebras, sino que conociendo las rutas moleculares de la síntesis se midan sus precursores más estables. En este sentido la Transcriptómica y/o Metabolómica podrían ser herramientas a probar.

## VARIABILIDAD A NIVEL MOLECULAR

La búsqueda de variabilidad tanto a nivel fenotípico como genético es la base para todo programa de mejoramiento. Particularmente en el caso de especies que no poseen reproducción sexual es necesario observar la diversidad genotípica por la posibilidad de realizar selección clonal.

Los marcadores moleculares son una herramienta que nos asegura la caracterización diferenciada de genotipos independientemente de la influencia ambiental como sí puede suceder con los marcadores morfológicos. Asimismo, a diferencia de los marcadores morfológicos que son limitados en número, los moleculares superan notoriamente esta limitante pudiendo obtener marcadores distribuidos por todo el genoma. Diversas técnicas de marcadores moleculares se han utilizado en este sentido con resultados dispares a pesar del uso del mismo tipo de marcadores.

Marcadores de tipo RAPD, ISSR, SSR, IRAP, AFLP se probaron en poblaciones de azafrán de diferentes sitios de cultivo con resultados negativos o valores muy bajos de polimorfismo (Alsayied *et al.*, 2015; Busconi *et al.*, 2015; Grilli-Caiola *et al.*, 2004; Rubio-Moraga *et al.*, 2009; Torricelli *et al.*, 2019). La elección de marcadores AFLP responde a las ventajas que esta técnica provee al no requerir la secuencia de los fragmentos a amplificar y su gran distribución por todo el genoma generando una gran cantidad de fragmentos para comparar. Los resultados obtenidos en esta tesis, con marcadores AFLP concuerdan con los de Beiki *et al.* (2010), Izadpanah *et al.* (2015), Khansarinejad *et al.* (2015), Mir *et al.* (2013), Namayandeh *et al.* (2013) y Nematy *et al.* (2012) quienes utilizando RAPD y SSR encontraron polimorfismo entre clones de azafrán; incluso con los mismos cebadores de SSR probados anteriormente por Rubio-Moraga *et al.* (2009) en clones de diferentes sitios de cultivos de Irán (Namayandeh *et al.*, 2013).

Ante estos resultados de diversos investigadores a nivel molecular, sumados a los obtenidos a nivel fenotípico se puede afirmar la existencia de variabilidad genética entre clones de azafrán. Sería de gran importancia continuar con la caracterización de genotipos en las colecciones de germoplasma disponibles para su identificación y selección de aquellos con aptitudes destacadas.

## CONCLUSIONES

De los estudios realizados se encontró que fue significativa la interacción entre dos factores: **introducciones** (“genotipos”) y el **tamaño inicial de los cormos** de plantación, para la mayoría de los caracteres fenológicos y productivos analizados. En base a esto, es posible caracterizar el material vegetal a través de los aspectos agronómicos evaluados.

Se observó una fuerte influencia del tamaño de corno de plantación en la tasa de multiplicación vegetativa y en la producción floral. Este hecho permitió dilucidar una dinámica de multiplicación de cormos de gran utilidad para el manejo del cultivo (Figura 18). Para ello se debe tener en cuenta la cantidad de años que el cultivo permanecerá en el suelo. El tamaño de corno inicial P8 comenzó su floración el año de plantación pero su mayor producción de flores se dio en el segundo año de cultivo. Se multiplicó en gran número de cormos, con prevalencia de tamaño pequeño, estos últimos poseen una floración errática y escasa; por lo que, hacia el tercer año, fue decayendo la floración de este tamaño inicial. Los cormos de tamaño intermedio, P5, tuvieron una multiplicación en número comprendida entre los cormos producidos por los tamaños P8 y P2 con una distribución equilibrada entre los tres tamaños (grande, mediano y pequeño). El tamaño P2 fue el que menor cantidad de cormos produjo pero con mayor proporción de cormos grandes, en comparación con los otros tamaños iniciales. A su vez, los tamaños P2 y P5 fueron aumentando la producción de flores a partir del segundo año de cultivo cuando los cormos plantados de tamaño P8 iban declinando (Figura 18).

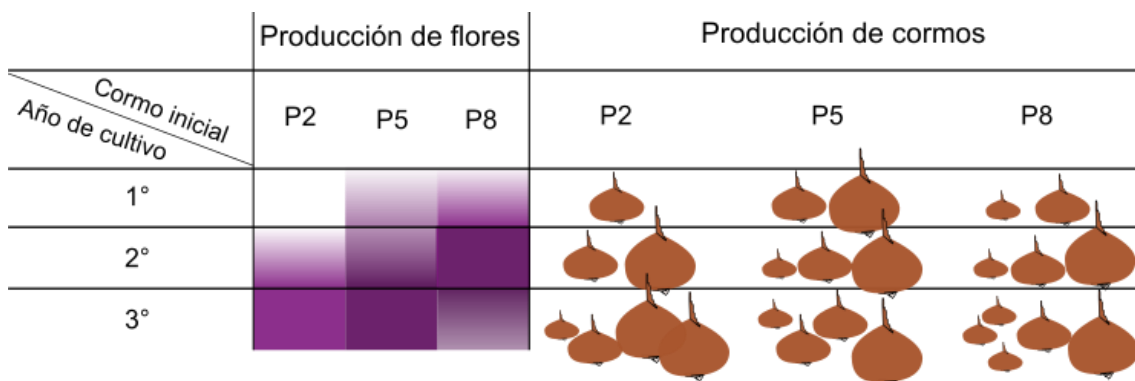


Figura 18. Esquema de dinámica de floración y producción de cormos de acuerdo al tamaño de corno de plantación en un ciclo de tres años. Representación de la curva de floración y dinámica de multiplicación de cormos de diferentes tamaños en cada año de cultivo. Color más intenso indica mayor cantidad de flores.

Entre los caracteres fenológicos evaluados se detectaron diferencias entre tratamientos sólo en el período de floración, destacándose M:P8 en 2015 y G:P8 y F:P5 en 2016, tratamientos que, además, fueron de los más productivos en cuanto a número de flores.

La expresión de los principales componentes químicos en las hebras de azafrán especia (crocina, picrocrocina y safranal), analizados de acuerdo a la norma de calidad ISO 3632 no diferenció introducciones, tamaños de cormos ni tratamientos. Las diferencias entre estos compuestos sólo se evidenciaron entre años de cultivo. Manifestando una gran influencia ambiental del año en estos caracteres.

Se observaron diferencias a nivel molecular; a través del análisis de agrupamientos se obtuvieron cinco grupos de las ocho procedencias evaluadas. Entre ellas cabe destacar que F-FCA, G-FCA, R-FCA y CBAA se agruparon juntas, lo que deja en evidencia el intercambio de materiales entre estos sitios de cultivo. Sin embargo, la mayor variabilidad fue explicada por las diferencias entre clones; que se agruparon en 12 clases. Entre estas clases, ocho estuvieron conformadas por clones únicos. Dentro de la localidad FCA los clones no mantuvieron el agrupamiento inicial de acuerdo a sus procedencias, destacándose la variabilidad interna.

Estos resultados confirmaron la existencia de variabilidad genética en el germoplasma de azafrán. Con esta información y la caracterización agronómica realizada permite un nuevo enfoque en el manejo del cultivo y la identificación de clones con distintas aptitudes para los objetivos de un programa de selección.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdullaev, F.I. y Espinosa-Aguirre, J.J. (2004). Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev*, 28(6), 426-432. doi: 10.1016/j.cdp.2004.09.002
- Abe, K. y Saito, H. (2000). Effects of Saffron Extract and its Constituent Crocin on Learning Behaviour and Long-term Potentiation. *Phytotherapy Research*, 14, 149–152.
- Agayev, Y.M. (2002). New features in karyotype structure and origin of saffron, *Crocus sativus* L. *Cytologia*, 67(3), 245-252.
- Agayev, Y.M., Shakib, A.M., Soheilvand, S. y Fathi, M. (2007). Breeding of saffron (*Crocus sativus*): possibilities and problems. *Acta Hort.* 739, 203-207. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.739.25
- Agayev, Y.M, Fernández, J.A y Zarifi, E. (2009). Clonal selection of saffron (*Crocus sativus* L.): the first optimistic experimental results. *Euphytica*, 169(1), 81-99. doi: 10.1007/s10681-009-9946-z
- Agüero, C. y Tizio, R. (1994). In vitro mass bulbification as a preliminary contribution to saffron (*Crocus sativus* L.) micropropagation. *BIOCELL-MENDOZA*-, 18, 55-55.
- Ahmad, M., Zaffar, G., Mir, S.D., Razvi, S.M., Rather, M.A. y Mir, M.R. (2011). Saffron strategies for enhancing productivity (PLAGIARIZED). *Reaserch Journal of Medicinal Plant*, 5(6), 630-649. doi: 10.3923/rjmp.2011.630.649
- Ahmad, M., Zaffar, G., Habib, M., Arshid, A., Dar, N. A. y Dar, Z. A. (2014). Saffron (*Crocus sativus* L.) in the light of biotechnological approaches: A review. *Scientific Research and Essays*, 9(2), 13-18. doi: 10.5897/sre2013.5773
- Alavi-Kia, S.S., Mohammadi, S.A., Aharizad, S. y Moghaddam, M. (2008). Analysis of Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in *Crocus* Genus of Iran Using Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(3), 795-800. doi: 10.1080/13102818.2008.10817555
- Ali, G., Iqbal, A.M., Nehvi, F.A., Samad, S.S., Nagoo, S., Naseer, S., y Dar, N.A. (2013). Prospects of clonal selection for enhancing productivity in Saffron (*Crocus sativus* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 8(5), 460-467. doi: 10.5897/ajar12.1270
- Alonso Díaz-Marta, G.L. y Sánchez Gómez, A.M. (2007). Libro Blanco de Azafrán en Europa. Problemas y estrategias para valorizar la calidad y mejorar la competitividad. Ed. Nuove Grafiche Puddu. ISSN: 88-89061-29-4 Disponible en: [http://www.europeansaffron.eu/archivos/Libro\\_Blanco\\_espanol.pdf](http://www.europeansaffron.eu/archivos/Libro_Blanco_espanol.pdf)
- Alsayied, N.F., Fernandez, J.A., Schwarzacher, T. y Heslop-Harrison, J.S. (2015). Diversity and relationships of *Crocus sativus* and its relatives analysed by inter-retroelement amplified polymorphism (IRAP). *Ann Bot*, 116(3), 359-368. doi: 10.1093/aob/mcv103
- Álvarez Ortí, M. (2003). *Desarrollo y expresión génica en cormos de azafrán (Crocus sativus L.)*. Tesis doctoral en Ingeniería Agronómica, Universidad de Castilla-La Mancha, ProQuest Information and Learning Company. (UMI 3139426)
- Baghalian, K., Sheshtamand, M. Shabani, y Jamshidi, A. H. (2010). Genetic variation and heritability of agro-morphological and phytochemical traits in Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) populations. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 401-406. doi: 10.1016/j.indcrop.2009.12.010
- Balzarini, M.G. y Di Rienzo, J.A. (2012). Info-Gen. Universidad Nacional de Córdoba: Facultad de Ciencias Agropecuarias.

- Balzarini, M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A., y Robledo, C.W. (2008). Manual del Usuario. Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.
- Basker, D. y Negbi, M. (1983). Uses of Saffron. *Economic Botany*, 37(2), 228-236. doi: 10.1007/BF02858789
- Beiki, AH., Keifi, F., Mozafari, J. (2010). Genetic Differentiation of *Crucus* Species by Random Amplified Polymorphic DNA. *Genetic Engineering and Biotechnology*, 2010. E-ISSN: 21503516
- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P., y Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 10(2), 77-81.
- Bolhassani, A., Khavari, A. y Bathaie, S.Z. (2014). Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochim Biophys Acta*, 1845(1), 20-30. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.11.001
- Brighton, C.A. (1977). Cytology of *Crocus sativus* and Its Allies (Iridaceae) *Plant Systematics and Evolution*, 128, 137-157. doi: 10.1007/BF00984551
- Busconi, M., Colli, L., Sanchez, R. A., Santaella, M., De-Los-Mozos Pascual, M., Santana, O., Roldán, M. y Fernandez, J.A. (2015). AFLP and MS-AFLP analysis of the variation within saffron crocus (*Crocus sativus* L.) germplasm. *PLoS One*, 10(4), e0123434. doi: 10.1371/journal.pone.0123434
- Cagliani, L.R., Culeddu, N., Chessa, M. y Consonni, R. (2015). NMR investigations for a quality assessment of Italian PDO saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Control* 50, 342-348. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.017
- Chichiriccò, G. y Grilli-Caiola, M. (1984). *Crocus Sativus* Pollen Tube Growth in Intra- and Interspecific Pollinations. *Caryologia*, 37(1-2), 115-125. doi: 10.1080/00087114.1984.10797690
- Chichiriccò, G. y Grilli-Caiola, M. (1982). Germination and viability of the pollen of *Crocus sativus* L. *Giornale botanico italiano*, 116(3-4), 167-173. doi: 10.1080/11263508209428062
- Comercio y Justicia (2018, enero,15). Cooperativa de productores de azafrán vende 60% más hebras. *Comercio y Justicia*. Recuperado de <https://comercioyjusticia.info/blog/negocios/cooperativa-de-productores-de-azafran-vende-60-mas-hebras/>
- Cossignani, L., Urbani, E., Simonetti, M.S., Maurizi, A., Chiesi, C., Blasi, F. (2014). Characterisation of secondary metabolites in saffron from central Italy (Cascia, Umbria). *Food Chemistry* 143, 446–451. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.020
- D'Archivio, A.A., Giannitto, A., Maggi, M.A., Ruggieri, F. (2016). Geographical classification of Italian saffron (*Crocus sativus* L.) based on chemical constituents determined by high-performance liquid-chromatography and by using linear discriminant analysis. *Food Chemistry* 212, 110–116. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.149
- Day, J. (2011a). Counting Threads. Saffron in Aegean Bronze Age Writing and Society. *Oxford Journal of Archaeology*, 30(4), 369-391. doi: 10.1111/j.1468-0092.2011.00372.x
- Day, J. (2011b). Crocuses in Context. A Diachronic Survey of the *Crocus* Motif in the Aegean Bronze Age. *Hesperia* 80, 337-379.
- de Juan, J.A., Moya, A., López, S., Botella, O., López, H. y Muñoz, R. (2003). Influencia del tamaño del cormo y de la densidad de plantación en el rendimiento y la calidad de la producción de cormos de *Crocus sativus* L. *ITEA*, 99 (2), 169- 180.
- Dellaporta, S., Wood, J. y Hicks, J. (1983). A Plant DNA Minipreparation: Version II *Plant Molecular Biology Reporter* 1(4), 19-21. doi: 10.1007/BF02712670
- Dewan, R. (2015). Bronze Age Flower Power: The Minoan Use and Social Significance of Saffron and *Crocus* Flowers. *Chronika*, 42-55. Disponible en <http://www.chronikajournal.com/resources/Dewan%202015.pdf>

- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2011). InfoStat.
- Douglas, M.H., Smallfield, B.M., Wallace, A.R. y McGimpsey, J.A. (2014). Saffron (*Crocus sativus* L.): The effect of mother corm size on progeny multiplication, flower and stigma production. *Scientia Horticulturae*, 166, 50-58. doi: 10.1016/j.scienta.2013.12.007
- Erol, O., Kaya, H.B., Şilk, L., Tuna, M., Can, L. y Tanyolaç, M.B. (2014). The genus *Crocus*, series *Crocus* (Iridaceae) in Turkey and 2 East Aegean islands: a genetic approach. *Turkish Journal of Biology*, 38, 48-62. doi: 10.3906/biy-1305-14
- Fernández, J.A. (2007). Genetic resources of saffron and allies (*Crocus* spp). *Acta Horticulturae* 739(22), 18. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.739.22
- Ferrence, S. y Bendersky, G. (2004). Therapy with Saffron and the Goddess at Thera. *Perspectives in Biology and Medicine*, 47(2), 199-226. doi: 10.1353/pbm.2004.0026
- Frizzi, G., Miranda, M., Pantani, C. y Tammaro, F. (2007). Allozyme differentiation in four species of the *Crocus cartwrightianus* group and in cultivated saffron (*Crocus sativus*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(12), 859-868. doi: 10.1016/j.bse.2007.03.024
- Geromichalos, G.D., Papadopoulos, T., Sahpazidou, D., y Sinakos, Z. (2014). Safranal, a *Crocus sativus* L constituent suppresses the growth of K-562 cells of chronic myelogenous leukemia. In silico and in vitro study. *Food Chem Toxicol*, 74, 45-50. doi: 10.1016/j.fct.2014.09.001
- Ghaffari, S.M. (1986). Cytogenetic studies of cultivated *Crocus sativus* (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution* 153(3-4), 6. doi: https://doi.org/10.1007/BF00983687
- Ghorbani, R. y Koocheki, A. (2017). Sustainable Cultivation of Saffron in Iran. E. Lichtfouse (ed.), *Sustainable Agriculture Reviews* 25. doi 10.1007/978-3-319-58679-3\_6
- Gresta, F., Avola, G., Lombardo, G. M., Siracusa, L., y Ruberto, G. (2009). Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.) as affected by environmental conditions. *Scientia Horticulturae*, 119(3), 320-324. doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.008
- Grilli-Caiola, M., Caputo, P. y Zanier, R. (2004). RAPD Analysis in *Crocus sativus* L. Accessions and Related *Crocus* Species. *Biologia Plantarum*, 48(3), 375-380. doi: 10.1023/b:biop.0000041089.92559.84
- Grilli-Caiola, M. y Canini, A. (2010). Looking for saffron's (*Crocus sativus* L.) parents. *Functional plant science and biotechnology*, 4, 1-14.
- Harpke, D., Meng, S., Rutten, T., Kerndorff, H., y Blattner, F. (2013). Phylogeny of *Crocus* (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: ancient hybridization and chromosome number evolution. *Mol Phylogenet Evol*, 66(3), 617-627. doi: 10.1016/j.ympev.2012.10.007
- Khansarinejad, B; Hassandokht, M; Nazeri, V y Aboozar, S. (2015). Comparison of molecular markers (RAPD, ISSR). *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 4 (5), 457-464.
- Kerndorff, H.; Pasche, E. y Harpke, D. (2015). The Genus *Crocus* (Liliiflorae, Iridaceae): Life-cycle, Morphology, Phenotypic Characteristics, and Taxonomical Relevant Parameters. *STAPFIA* 103, 27–65.
- Ilahi, I., Jabeen, M., y Firdous, N. (1987). Morphogenesis with Saffron Tissue Culture. *Journal of Plant Physiology*, 128(3), 227-232. doi: 10.1016/s0176-1617(87)80236-5
- Izadpanah, F.A., Kalantari, S.A., Hassani, M.E.B., Naghavi, M.R.C. y Shokrpoura, M. (2015). Molecular and morphological variation in some Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) accessions. *Genetika*, 47(2), 711-722. doi: 10.2298/gensr1502711i
- Mathew, B. (1977). *Crocus sativus* and Its Allies. *Plant Systematics and Evolution*, 128 89-103. doi: 10.1007/BF00985174
- Mathew, B. (1982). *The Crocus. A revision of the genus Crocus (Iridaceae)*. London: B.T. Batsford Ltd.

- Melnyk, J.P., Wang, S. y Marccone, M.F. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Research International*, 43(8), 1981-1989. doi: 10.1016/j.foodres.2010.07.033
- Mir, J.I., Nazeer, A., Khan, M.H., Mokhdomi, T.A., Wani, S.H., Bukhari, S., Amin, A. y Qadri, R.A. (2015). Molecular Characterization of Saffron-Potential Candidates for Crop Improvement. *Notulae Scientia Biologicae*, 7(1). doi: 10.15835/nsb.7.1.9346
- Molina, R.B., Valero, M., Navarro, Y., García-Luis, A. y Guardiola, J.L. (2004). The effect of time of corm lifting and duration of incubation at inductive temperature on flowering in the saffron plant (*Crocus sativus* L.). *Scientia Horticulturae* 103, 79–91. doi: 10.1016/j.scienta.2004.06.005
- Namayandeh, A., Nemati, Z., Kamelmanesh, M.M., Mokhtari, M. y Mardi, M. (2013). Genetic relationships among species of Iranian crocus (*Crocus* spp.). *Crop Breeding* 8 (3), 61-67. doi: 10.22092/cbj.2013.100451
- Negbi, M., Dagan, B., Dror, A. y Basker, D. (1989). Growth, Flowering, Vegetative Reproduction, and Dormancy in the Saffron Crocus (*Crocus sativus* L.). *Israel Journal of Botany*, 38(2-3), 95-113. doi: 10.1080/0021213x.1989.10677116
- Negbi, M. (1999). Saffron *Crocus sativus*. In R. Hardman (Ed.), *Medicinal and Aromatics Plants - Industrial Profiles* (Vol. 8). Taylor & Francis e-Library, 2006.: Overseas Publishers Association N.V. Published by license under the Harwood Academic Publishers.
- Nemati, Z., Zeinalabedini, M., Mardi, M., Pirseyediand, S.M., Marashi, S.H. y Khayam Nekoui, S.M. (2012). Isolation and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in saffron, *Crocus sativus* (Iridaceae). *Am J Bot*, 99(9), e340-343. doi: 10.3732/ajb.1100531
- Nemati, Z., Blattner, F.R., Kerndorff, H., Erol, O. y Harpke, D. (2018). Phylogeny of the saffron-crocus species group, *Crocus* series *Crocus* (Iridaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.ympev.2018.06.036
- Petersen, G.; Seberg, O.; Thorsoe, S.; Jorgensen, T. y Mathew, B. (2008). A phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions. *Taxon*, 57(2), 487-499. doi: 10.2307/25066017
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reinjas, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414.
- Plessner, O., Ziv, M. y Negbi, M. (1990). In vitro corm production in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20, 89-94. doi:10.1007/BF00114705
- Poggi, L.M. (2009). Problemáticas y nuevas perspectivas tecnológicas para la producción de azafrán. *Horticultura Argentina*, 28(65), 39-62.
- Poggi, L. y Portela, J. (2010). Efecto del tamaño de los cormos y de la incubación sobre el tiempo a floración y la producción de azafrán en hebras (*Crocus sativus* L.). *Horticultura Argentina* 29(69), 26-32.
- Poggi, L. (2011). Protocolo de estandarización de cosecha, desbrizne y deshidratado de azafrán.: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Informe Anual de Progresos. Disponible en <https://inta.gob.ar/documentos/protocolo-de-estandarizacion-de-cosecha-desbrizne-y-deshidratado-de-azafran>
- Rios, J.L., Recio, M.C., Giner, R.M., y Mhnez, S. (1996). An Update Review of Saffron and its Active Constituents. *Phytotherapy Research*, 10, 189-193. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199605)10:3<3C189::AID-PTR754>3E3.0.CO;2-C
- Rubio-Moraga, A, Castillo-López, R, Gómez-Gómez, L, y Ahrazem, O. (2009). Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. *BMC Research Notes*, 2(1), 189. doi: 10.1186/1756-0500-2-189

- Sharma, K.D., Rathour, R. Sharma, R., Goel, S. Sharma, T.R. y Singh, B.M. (2008). In vitro cormlet development in *Crocus sativus*. *Biologia Plantarum*, 52 (4), 709–712. doi: 10.1007/s10535-008-0136-y
- Sheikh, F.A., Makhdoomi, M.I., Ali, G., Nehvi, F.A., Lone, A.A., Zaffar, G.y Iqbal, A.M. (2014). Genetic variability in saffron (*Crocus sativus*L.) clones. *Medicinal Plants - International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 6(3), 185. doi: 10.5958/0975-6892.2014.00007.0
- Siracusa, L., Gresta, F., Avola, G., Albertini, E., Raggi, L., Marconi, G., Lombardo, G.M., Ruberto, G. (2012). Agronomic, chemical and genetic variability of saffron (*Crocus sativus* L.) of different origin by LC-UV–vis-DAD and AFLP analyses. *Genetic Resources and Crop Evolution*. doi: 10.1007/s10722-012-9868-9
- Toricelli, R., Yousefi Javan, I., Albertini, E., Venanzoni, R. y Hosseinzadeh, Y.G. (2019). Morphological and Molecular Characterization Of Italian, Iranian and Spanish Saffron (*Crocus sativus* L.) Accessions. *Applied Ecology And Environmental Research* 17(2):1875-1887. doi: 10.15666/aeer/1702-18751887
- Tsaftaris, A., Pasentsis, K., Makris, A., Darzentas, N., Polidoros, A., Kalivas, A., y Argiriou, A.. (2011). The study of the E-class SEPALLATA3-like MADS-box genes in wild-type and mutant flowers of cultivated saffron crocus (*Crocus sativus* L.) and its putative progenitors. *Journal of Plant Physiology*, 168(14), 1675-1684. doi: 10.1016/j.jplph.2011.03.015
- Yasmin, S., y Nehvi, F.A. (2018). Phenological Growth Stages of Saffron (*Crocus sativus* L.) under Temperate Conditions of Jammu and Kashmir-India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(04), 3797-3814. doi: 10.20546/ijcmas.2018.704.428
- Zubor, A.A., Surányi, G., Győri, Z., Borbély, G. and Prokisch, J. (2004). Molecular biological approach of the systematics of *Crocus sativus* L. And its allies. *Acta Hort.*, 650, 9. doi: 10.17660/2004.650.8

## ANEXO

### MODELOS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS

#### -INICIO Y FIN DE FLORACIÓN

$Y \sim \text{POI}(\mu)$

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \beta_k + \tau\gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, 4; j = 1, \dots, 3; k = 1, \dots, 3$$

Donde:

$\mu$ : media general;  $\tau_i$ : efecto de la “i-ésima” introducción;  $\gamma_j$ : efecto del “j-ésimo” tamaño inicial de cormo;  $\beta_k$ : efecto del “k-ésimo” bloque;  $\tau\gamma_{ij}$ : interacción entre la “i-ésima” introducción de la parcela principal y el “j-ésimo” tamaño y  $\varepsilon_{ijk}$ : error experimental

#### -PERÍODO DE FLORACIÓN

$Y \sim \text{POI}(\mu)$

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \beta_k + \tau\gamma_{ij} + \alpha + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, 4; j = 1, \dots, 3; k = 1, \dots, 3$$

Donde:

$\mu$ : media general;  $\tau_i$ : efecto de la “i-ésima” introducción;  $\gamma_j$ : efecto del “j-ésimo” tamaño inicial de cormo;  $\beta_k$ : efecto del “k-ésimo” bloque;  $\tau\gamma_{ij}$ : interacción entre la “i-ésima” introducción de la parcela principal y el “j-ésimo” tamaño;  $\alpha$ : efecto aleatorio de la fecha de floración y  $\varepsilon_{ijk}$ : error experimental

#### -NÚMERO DE FLORES PRODUCIDAS

$Y \sim \text{POI}(\mu)$

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \beta_k + \tau\gamma_{ij} + \alpha + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, 4; j = 1, \dots, 3; k = 1, \dots, 3$$

Donde:

$\mu$ : media general;  $\tau_i$ : efecto de la "i-ésima" introducción;  $\gamma_j$ : efecto del "j-ésimo" tamaño de cormo inicial;  $\beta_k$ : efecto del "k-ésimo" bloque;  $\tau\gamma_{ij}$ : interacción entre la "i-ésima" introducción de la parcela principal y el "j-ésimo" tamaño;  $\alpha$ : efecto aleatorio de la fecha de floración y  $\varepsilon_{ijk}$ : error experimental

-LONGITUD DE ESTIGMAS

$$Y \sim N(\mu, \phi)$$

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \beta_k + \tau\gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, 4; j = 1, \dots, 3; k = 1, \dots, 3$$

Donde:

$\mu$ : media general;  $\tau_i$ : efecto de la "i-ésima" introducción;  $\gamma_j$ : efecto del "j-ésimo" tamaño inicial de cormo;  $\beta_k$ : efecto del "k-ésimo" bloque;  $\tau\gamma_{ij}$ : interacción entre la "i-ésima" introducción de la parcela principal y el "j-ésimo" tamaño; y  $\varepsilon_{ijk}$ : error experimental

-NÚMERO DE CORMOS PRODUCIDOS Y PESO DE CORMOS PRODUCIDOS

$$Y \sim \text{POI}(\mu)$$

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \beta_k + \tau\gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, 4; j = 1, \dots, 3; k = 1, \dots, 3$$

Donde:

$\mu$ : media general;  $\tau_i$ : efecto de la "i-ésima" introducción;  $\gamma_j$ : efecto del "j-ésimo" tamaño inicial de cormo;  $\beta_k$ : efecto del "k-ésimo" bloque;  $\tau\gamma_{ij}$ : interacción entre la "i-ésima" introducción de la parcela principal y el "j-ésimo" tamaño y  $\varepsilon_{ijk}$ : error experimental.

-ÍNDICES DE NÚMERO DE CORMOS PRODUCIDOS Y PESO DE CORMOS PRODUCIDOS

$$Y \sim \text{BIN}(\eta, \rho)$$

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \beta_k + \tau\gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, 4; j = 1, \dots, 3; k = 1, \dots, 3$$

Donde:

$\mu$ : media general;  $\tau_i$ : efecto de la "i-ésima" introducción;  $\gamma_j$ : efecto del "j-ésimo" tamaño de corno inicial;  $\beta_k$ : efecto del "k-ésimo" bloque;  $\tau\gamma_{ij}$ : interacción entre la "i-ésima" introducción de la parcela principal y el "j-ésimo" tamaño y  $\varepsilon_{ijk}$ : error experimental

-CALIDAD DE HEBRAS

$$Y \sim N(\mu, \phi)$$

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \tau\beta_{ij} + \gamma_k + \tau\gamma_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, 4; j = 1, \dots, 3; k = 1, 2$$

Donde:

$\mu$ : media general;  $\tau_i$ : efecto de la "i-ésima" introducción;  $\beta_j$ : efecto del "j-ésimo" bloque;  $\tau\beta_{ij}$ : interacción entre la "i-ésima" introducción de la parcela principal y el "j-ésimo" bloque;  $\gamma_k$ : efecto del "k-ésimo" año;  $\tau\gamma_{ij}$ : interacción entre la "i-ésima" introducción y el "k-ésimo" año y  $\varepsilon_{ijk}$ : error experimental