

## Effects of mother corm diameter and plant growth regulators on *ex vitro* corm propagule regeneration in saffron (*Crocus sativus* L.)

Efectos del diámetro del cormo madre y de los reguladores de crecimiento vegetal en la regeneración *ex vitro* de cormos de azafrán (*Crocus sativus* L.)

Efeitos do diâmetro do rebento e reguladores de crescimento de plantas na regeneração do propriótulo de córtex *ex vitro* em açafrão (*Crocus sativus* L.)

Mehmet Ugur Yildirim\* and Mortaza Hajyzadeh

Department of Field Crops, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, Usak University, Eylul Campus, 64200 Usak, Turkey. E-mails: ugur.yildirim@usak.edu.tr, mortaza.hajyzadeh@usak.edu.tr.

### Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.), is an economically important spice, medicinal and dye plant that is vegetatively propagated through corms. Saffron corms have low multiplication efficiency under field conditions; therefore, any effort to accelerate their multiplication will be desired. The study aimed to establish a multiplication system using small (1.10 to 1.75 cm) and large (1.75 to 2.40 cm) diametered mother saffron corms after treatment with 20 mg · L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> or 20 mg · L<sup>-1</sup> BAP for 4, 6, 8, 10 h. The best corm induction rate was noted on treatment with 20 mg · L<sup>-1</sup> BAP for 4 h pretreatment irrespective of the mother corm diameter. Small and large mother corms had maximum multiplication rate of 80.00 and 86.67%, mean number of 6.17 and 5.55 cormlets induction per mother corm with 0.62 and 0.69 cm diameter. All of them induced variable number of roots per corm propagule. The experiment was completed in 90 days. The results show that, pretreatment of saffron corms with BAP + GA<sub>3</sub> or BAP could serve as an appropriate technique for economic multiplication of saffron corms without compromising qualitative and quantitative characteristics of saffron. The results obtained in this study could be used to help in designing improved saffron corm production in future.

---

Recibido el 10-07-2017 • Aceptado el 15-06-2018

\*Corresponding author. Email: ugur.yildirim@usak.edu.tr

**Key words:** *ex vitro*, saffron, preconditioning, corm, propagation, plant growth regulators.

## Resumen

El azafrán (*Crocus sativus* L.), es una especie con gran importancia económica, medicinal y colorante (tinte) que se propaga vegetativamente por medio de cormos. Los cormos de azafrán tienen una baja eficacia de multiplicación en condiciones de campo; por lo tanto, se requiere cualquier esfuerzo para acelerar su multiplicación. El objetivo de la presente investigación fue establecer un sistema de mutiplicación usando cormos madres pequeños de azafrán (1,10 a 1,75 cm) y grandes (1,75 a 2,40 cm), después del tratamiento con 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> o 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP por 4, 6, 8 y 10 h. La mayor tasa de inducción de cormos se observó en el tratamiento con 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP con 4 h de pretratamiento, independientemente del diámetro del cormo madre. Los cormos madre pequeños y grandes tuvieron una tasa de multiplicación máxima de 80,00 y 86,67%, número promedio de 6,17 y 5,55 de inducción de propágulos de cormo por cormo madre con un diámetro de 0,62 y 0,69 cm. Todos indujeron diferentes números de raíces por propágulos del cormo. El experimento duró 90 días. Los resultados mostraron que el pretratamiento de cormos de azafrán con BAP + GA<sub>3</sub> o BAP podría servir como una técnica para la multiplicación económica de cormos de azafrán sin comprometer las características cualitativas y cuantitativas del mismo. Los resultados obtenidos en este estudio podrían utilizarse para ayudar en el diseño de la producción de cormos de azafrán en el futuro.

**Palabras clave:** *ex vitro*, azafrán, pretratamiento, cormo, propagación, reguladores de crecimiento.

## Resumo

Açafrão (*Crocus sativus* L.), é uma especiaria com grande importância econômica, medicinal e coloração (corante) que se propaga vegetativamente por meio de bulbos. Os bulbos de açafrão possuem baixa eficiência de multiplicação em condições de campo; portanto, qualquer esforço é necessário para acelerar sua multiplicação. O objetivo deste estudo foi estabelecer um sistema mutiplicación usando pequenos (1,10-1,75 cm) e grandes (1,75-2,40 cm) mães bulbos açafrão, após o tratamento com 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> ou 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP por 4, 6, 8 e 10 h. A maior taxa de indução de bulbos foi observada no tratamento com 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP com 4 h de pré-tratamento, independentemente do diâmetro do bulbo-mãe. Os bulbos mãe pequenos e grandes apresentaram taxa de multiplicação máxima de 80,00 e 86,67%, número médio de 6,17 e 5,55 indução de propágulos de bulbo por bulbo-mãe com diâmetro de 0,62 e 0,69 cm. Todos induziram diferentes números de raízes por propágulos do bulbo. O experimento durou 90 dias. Os

resultados mostraram que o pré-tratamento de bulbos de açafrão com BAP ou BAP GA<sub>3</sub> + poderia servir como uma técnica adequada para as lâmpadas açafrão multiplicação económicos, sem comprometer as características qualitativas e quantitativas dos mesmos. Os resultados obtidos neste estudo poderiam ser usados para auxiliar no projeto da produção de bulbos de açafrão no futuro.

**Palavras-chave:** *ex vitro*, açafrão, pré-tratamento, bulbo, propagação, reguladores de crescimento.

## Introduction

Saffron, *Crocus sativus* L. (family Iridaceae), is a sterile, valuable perennial plant species of great economic importance (Vurdu, 2004; Kafi *et al.*, 2006; Bayat *et al.*, 2016; Mzabri *et al.*, 2017; Shokati *et al.*, 2017; Menia *et al.*, 2018). Saffron stigma is an important spice, that is widely used for its aroma, dye properties (Abdullaev, 2002; Moradi and Turhan, 2017), and pharmaceutical characteristics. Saffron cultivation in the world extends through 0-90° East longitude (Spain to Kashmir) and 30-40° North latitude (Persia to England). Iran, Spain and Kashmir are the main saffron producing areas of the world. Saffron is also cultivated in Hilvan, Viransehir of Sanliurfa province and Saffron Bolu district of Karabük province in Turkey (Abdullaev, 2002).

Due to unavailability of trained manpower, decreasing market and deficiency of appropriate propagation techniques, a sharp decrease in saffron production has been observed in last 30-50 years all over the world (Fernández, 2006).

Saffron is an autotriploid that can only be propagated vegetatively. Natural multiplication rate of saffron

## Introducción

El azafrán, *Crocus sativus* L. (familia Iridaceae), es una especie estéril, perenne y de gran importancia económica (Vurdu, 2004; Kafi *et al.*, 2006; Bayat *et al.*, 2016; Mzabri *et al.*, 2017; Shokati *et al.*, 2017; Menia *et al.*, 2018). Es ampliamente utilizado por su aroma, y el color que aporta que lo hace tan característico (Abdullaev, 2002; Moradi y Turhan, 2017), y por sus propiedades farmacéuticas. El cultivo de azafrán en el mundo se extiende a través 0-90° longitud este (España a Kashmir) y 30-40° latitud norte (Persia a Inglaterra). Irán, España y Kashmir son los principales países productores de azafrán en el mundo. El azafrán también se cultiva en Hilvan; Viransehir, provincia de Sanli Urfa y Bolu distrito de Karabük de la provincia de Turquía (Abdullaev, 2002).

La falta de personal capacitado, el mercado decreciente y la deficiencia de apropiadas técnicas de propagación, han causado una fuerte disminución de la producción de azafrán en los últimos 30-50 años en todo el mundo (Fernández, 2006).

El azafrán es un autotriploide que solo puede propagarse vegetativamente.

is very low. Corms used for saffron production accounts for the most expensive input (Khan *et al.*, 2011; Moradi and Turhan, 2017; Menia *et al.*, 2018). There is a general practice to sow corms with 2.5 cm diameter or above under field conditions. Smaller corms are planted on field margins and not preferred for planting in the fields to avoid yield losses (Anonymous, 2016; Hajyzadeh *et al.*, 2017; Yildirim *et al.*, 2017; Menia *et al.*, 2018).

Since saffron is reproduced vegetatively any effort to accelerate saffron multiplication will be desirable. It is well known that mother corms produce 3-4 cormlets in the second year after planting. These cormlets (acting as mother corms) produce 1-6 new corms from each corm of the previous year in a cyclic way such that mother corms die after the production of cormlets each year (Goliaris, 2006; Moradi and Turhan, 2017). One or no corm propagule is produced on the mother corms after the fourth year. Thus, it will be economical, if multiple cormlets are produced on mother corms after one year of plantation. Similarly, renovation of corm plantations after every 4-5 years is recommended to ensure profitable yields (Tammaro, 1999).

*In vitro* tissue culture technology is applied for propagation of almost all geophytes including saffron (Sevimay *et al.*, 2005; Alam, 2006; Parmaksiz and Khawar, 2006; Ozel and Khawar, 2007; Raja *et al.*, 2007; Aasim *et al.*, 2008; Ozel *et al.*, 2008; Mir *et al.*, 2010; Parray *et al.*, 2010; Bakhtavari *et al.*, 2011; Salwee *et al.*, 2011a, b) suggest that the treatment

La tasa de multiplicación natural es muy baja. Por otra parte, los cormos utilizados para la producción de azafrán son muy costosos (Khan *et al.*, 2011; Moradi y Turhan, 2017; Menia *et al.*, 2018). Existe una práctica general para sembrar cormos con un diámetro de 2,5 cm o superior en condiciones de campo. Los cormos más pequeños se plantan en las áreas marginales del campo y se prefiere no sembrarlos con el fin de evitar pérdidas en el rendimiento (Anonymous, 2016; Hajyzadeh *et al.*, 2017; Yildirim *et al.*, 2017; Menia *et al.*, 2018).

Debido a que el azafrán se reproduce de forma vegetativa, se requiere cualquier esfuerzo para agilizar su multiplicación. Como se conoce, los cormos madre producen entre 3-4 cormos en el segundo año después de sembrados. Estos cormos (actuando como cormos madre) producen entre 1-6 nuevos cormos de cada cormo del año anterior de forma cíclica, de tal manera que los cormos madre mueren después de la producción de cormos cada año (Goliaris, 2006; Moradi y Turhan, 2017). Después de un año de plantación, se producen uno o tal vez ningún cormo de los cormos madre. Por lo tanto, resultaría más económico si se produjeran cormos múltiples en los cormos madre. Asimismo, se recomienda renovar las plantaciones de cormo cada 4-5 años para asegurar la obtención de rendimientos rentables (Tammaro, 1999).

La tecnología de cultivo de tejidos *in vitro* se aplica para la propagación de casi todos los geófitos incluyendo el azafrán (Sevimay *et al.*, 2005; Alam, 2006; Parmaksiz and Khawar,

of corms with different plant growth regulators under *in vitro* conditions promote cormogenic nodes variability, depending on the corm size, type and concentration of medium, plant growth regulators and sucrose concentration. Moreover, micropropagation is non successful for profitable commercial Saffron propagation. All previous protocols about Saffron production are time consuming, laborious, very slow, and generally unpredictable (Ding *et al.*, 1981; Karaoglu *et al.*, 2007; Zeybek *et al.*, 2012).

However, it takes 6-9 months or even more to micropropagate Saffron; therefore, its propagation is economically not feasible and very difficult, if cultured *in vitro* (Negbi, 1999; Karaoglu *et al.*, 2007). Saffron micropropagation protocols are complex, time consuming, trained labor intensive and are not repeatable enough to justify their use for commercial propagation. Therefore, there was need to develop more convenient and cheap protocols to multiply elite corms that could be counted as a substitute against conventional and tissue culture propagation techniques.

Devi *et al.* (2011) suggests that bud sprouting in saffron was season dependent. They noted maximum bud sprouting on corms of November to December and minimum sprouting on the corms of May to August. They suggest that buds sprout during months of March to May undergo a dormancy with changes in biochemical contents and regain further growth only in the next growing phase (starting from September to December).

2006; Ozel and Khawar, 2007; Raja *et al.*, 2007; Aasim *et al.*, 2008; Ozel *et al.*, 2008; Mir *et al.*, 2010; Parray *et al.*, 2010; Bakhtavari *et al.*, 2011; Salwee *et al.*, 2011a, b), estos autores sugirieron que el tratamiento de cormos con diferentes reguladores de crecimiento vegetal bajo condiciones *in vitro* promueven la variabilidad de los cormos, dependiendo del tamaño del cormo, tipo y concentración del medio, reguladores de crecimiento vegetal y concentración de sacarosa. Por otra parte, la micropropagación no es una técnica acertada para la propagación comercial del azafrán. Todos los protocolos anteriores para la producción de azafrán son lentos, laboriosos y generalmente impredecibles (Ding *et al.*, 1981; Karaoglu *et al.*, 2007; Zeybek *et al.*, 2012).

Sin embargo, la micropropagación de azafrán toma entre 6-9 meses o más; por lo tanto, si se cultiva *in vitro* su propagación resultaría económicamente inviable y muy difícil (Negbi, 1999; Karaoglu *et al.*, 2007). Los protocolos de micropropagación *in vitro* de azafrán son complejos, consumen mucho tiempo, requieren un entrenamiento intensivo de la mano de obra y no son lo suficientemente repetibles como para justificar su uso en la propagación comercial. Por lo tanto, resulta necesario desarrollar protocolos más convenientes y económicos para multiplicar los cormos que podrían servir como sustituto en las técnicas convencionales y en la propagación del tejido.

There is an urgent need to increase the production of saffron, both during off and on seasons to enhance yield. If Saffron cultivation is extended beyond traditional saffron growing areas or its production is done under indoor/greenhouse conditions, it will need additional planting material, which is not easily available. Production of new cormlets is a very slow process that is vegetatively propagated only, which can not be accelerated under field conditions to meet the putative demand of corms if the Saffron production is to be extended to other areas (Ding *et al.*, 1981; Majourhay *et al.*, 2007).

This study aimed to find effects of BAP (6 benzylaminopurine) with and without GA<sub>3</sub> (gibberellic acid) treatments for different durations of time on induction of cormlets for accelerated regeneration using moist peat moss under controlled greenhouse conditions.

## Materials and methods

Safron corms were obtained from a private grower at the Davutobasi village at Safranbolu of Karabuk province; Turkey, the main Safron producing area in Turkey. Commercial size mother corms with healthy appearance and no wounds or bruises were chosen. They were rinsed with water to remove any dirt or adhering soil and dried under shade in a cool and dry place for 3 hours. Care was taken not to remove roots from saffron corms as it is known that bud growth was affected when roots were removed (Rubio-Moraga *et al.*, 2014).

Devi *et al.* (2011) sugirieron que la brotación en el azafrán depende de la estación. Se observó la máxima brotación de los cormos en los meses de noviembre a diciembre y la mínima en los meses de mayo a agosto. Los autores antes mencionados sugirieron que los brotes durante los meses de marzo a mayo experimentaron una latencia con cambios en los contenidos bioquímicos y recuperaron el crecimiento solo en la siguiente fase de crecimiento (comenzando de septiembre a diciembre).

Se debe aumentar la producción de azafrán en todas las estaciones para mejorar su rendimiento, y si el cultivo se extiende más allá de las áreas tradicionales o si su producción se realiza bajo condiciones de invernadero, se necesitaría material de siembra adicional el cual no es de fácil acceso. Sin embargo, en caso que la producción del azafrán se extienda a otras áreas, la producción de nuevos cormos no podría acelerarse bajo condiciones de campo y no se cubriría la demanda de cormos (Ding *et al.*, 1981; Majourhay *et al.*, 2007).

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos del tratamiento BAP (6 bencilaminopurina) con y sin GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) para la inducción de cormos en diferentes tiempos y para acelerar la regeneración utilizando turba húmeda bajo condiciones controladas de invernadero.

## Materiales y métodos

Los cormos de azafrán se obtuvieron de un productor privado en Davutobasi, en Safranbolu,



A compass vernier caliper compass was used to measure corm diameter at the widest portion when placed horizontally. They were graded as small (1.10 to 1.75 cm) or large (1.76 to 2.40 cm) corms based on diameter. Only creamy white mother corms with shiny epidermis and without physical damage or disease scars were selected for multiplication.

Each treatment contained 60 mother corms that were divided into four replicates of 15 mother corms each. The mother corms were soaked in a solution of 20 mg · L<sup>-1</sup> BAP or a mix of 20 mg · L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> for 0, 4, 6, 8 and 10 h. Each experiment was repeated thrice.

The mother corms were grown in sieved plastic trays (60 × 40 × 10 cm) containing 0.015 m<sup>3</sup> peat moss. Each mother corm was planted at 1-1.5 cm deep to ensure adequate moisture uptake and corm peat moss contact and to ease sprouting as well. The experiments were carried out in a greenhouse under controlled conditions of temperature (24 ± 2 °C) and relative humidity (60 ± 5%) photoperiod (16 h light and 8 h dark). The day time (light time) temperature of the greenhouse ranged between 24 ± 1 °C and at night time (dark time) the temperature ranged around 10 ± 1 °C.

Peat moss used in the study was prepared locally from oak and mulberry tree leaves (1:1). It had a pH of 6.2, EC of 0.15 dS · m<sup>-1</sup> and porosity of about (63% w/w), that allowed high water absorption at low bulk density of 0.01 mg · m<sup>-3</sup>.

Initially, each sieved plastic tray was irrigated with 1500 mL of water

provincia de Karabuk, Turquía. Se seleccionaron cormos madre con tamaño comercial, apariencia sana y sin grietas. Se lavaron con agua para remover cualquier suciedad o suelo adherido y se secaron bajo sombra en un lugar fresco y seco durante 3 horas. Se tuvo cuidado de no remover las raíces de los cormos, ya que de acuerdo con Rubio-Moraga *et al.* (2014) el crecimiento del brote se vio afectado cuando se eliminaron las raíces. Se utilizó un vernier para medir el diámetro del cormo en la porción más ancha cuando se colocó horizontalmente y fueron calificados basados en el diámetro como cormos pequeños (1,10 a 1,75 cm) o grandes (1,76 a 2,40 cm). Solo se seleccionaron para la multiplicación los cormos madre con aspecto cremoso, epidermis brillante y que no mostraron daños físicos o síntomas de enfermedad.

Cada tratamiento estuvo conformado por 60 cormos madre, divididos en cuatro repeticiones de 15 cormos madre cada uno. Luego, se remojaron en una solución de 20 mg · L<sup>-1</sup> BAP o una mezcla de 20 mg · L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> por 0, 4, 6, 8 y 10 h. Cada experimento se repitió dos veces.

Las cormos madre se cultivaron en bandejas de plástico (60 × 40 × 10 cm) conteniendo 0,015 m<sup>3</sup> de turba. Cada cormo madre se sembró a 1-1,5 cm de profundidad para asegurar una adecuada humedad y que quedaran en contacto con la turba, y también para ayudar a la brotación. Los experimentos se realizaron en un invernadero bajo condiciones controladas de temperatura (24 ± 2 °C) y humedad relativa (60 ±

before planting the corms. Thereafter, the sieved plastic trays containing mother corms were sprayed with 500 mL water every third or fourth day to maintain moisture level.

Water characteristics were 0.15 NTU, without odor, 0.7 mg·L<sup>-1</sup> chlorine, electrical conductivity of 67.8 mS·m<sup>-1</sup> at 25 °C, without ammonium, nitrite concentration of 0.006 mg·L<sup>-1</sup>, 145.6 mg·L<sup>-1</sup> without sulphate, Fe concentration of 18 µg·L<sup>-1</sup> and aluminium concentration of 5 µg·L<sup>-1</sup>. Water analysis was carried out at ASKİ laboratories Ankara, Turkey.

### Observations and statistical analysis

Corms were evaluated after 90 days based on the following variables (1) corm propagule multiplication percentage, (2) number of cormlets per mother corm (3) diameter of cormlets (cm), (4) percentage of corms propagules with roots, (5) number of roots per corm propagule, (6) average root length per corm propagule, (7) fresh biomass (8) and dry biomass of cormlets were analyzed using one way ANOVA (IBM SPSS 20.0). Duncan's multiple range test was selected to compare mean values. All values expressed in percentages were square root transformed at the time of statistical analysis (Snedecor and Cochran, 1989).

### Results and discussion

The results of this study suggests that it was possible to rapidly multiply newly harvested mother Saffron corms under without the involvement of slow, and expensive micropropagation

5%) y fotoperiodo (16 h luz y 8 h de oscuridad). La temperatura del día (tiempo de luz) del invernadero osciló entre  $24 \pm 1$  °C y por la noche (tiempo oscuro), la temperatura osciló alrededor de  $10 \pm 1$  °C.

La turba utilizada en el estudio se preparó con hojas de los árboles de roble y mora (1:1). Este tenía un pH de 6,2; una conductividad eléctrica (CE) de 0,15 dS·m<sup>-1</sup> y una porosidad de aproximadamente 63% p/p, que permitiera una alta absorción del agua a baja densidad 0,01 mg·m<sup>-3</sup>.

Inicialmente, cada bandeja plástica fue irrigada con 1500 mL de agua antes de sembrar los cormos. Luego, las bandejas fueron rociadas con 500 mL de agua cada tres o cuatro días para mantener el nivel de humedad.

Las características del agua fueron 0,15 UTN, sin olor, 0,7 mg·L<sup>-1</sup> de cloro, conductividad eléctrica de 67,8 mS·m<sup>-1</sup> a 25 °C, sin amonio, la concentración de nitrito fue de 0,006 mg·L<sup>-1</sup>; 145,6 mg·L<sup>-1</sup> sin sulfato, la concentración de Fe fue de 18 µg·L<sup>-1</sup> y la concentración de aluminio fue de 5 µg·L<sup>-1</sup>. El análisis del agua se llevó a cabo en los Laboratorios ASSKI Ankara, Turquía.

### Observaciones y análisis estadísticos

Los cormos fueron evaluados después de 90 días, basados en las siguientes variables: (1) porcentaje de multiplicación de los cormos, (2) número de cormos por madre (3) diámetro de los cormos (cm), (4) porcentaje de cormos enraizados, (5) número de raíces por cormo, (6) longitud promedio de la raíz por cormo, (7) la biomasa fresca (8) y biomasa seca de los cormos, se



techniques treatment of small (1.10 to 1.75 cm) and large (1.76 to 2.40 cm) sized mother corms for different durations of time induced significantly ( $P < 0.05$ ) different effects on sprouting percentage and all other parameters related to corm induction under controlled sets of temperature, humidity and photoperiod.

Mother corm buds in a whorl close to apical bud were the first and more active to sprout irrespective of the duration of time and phytohormonal treatment. It was further noted that sprouting potential of mother corms was also influenced by the circumference of corms. Non treated small and large mother corms (control) induced 0.95 and 0.82 cormlets per small and large mother corm respectively (table 1).

#### **Effect of the 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> treatment**

The experiment checked if the saffron corms of two different diameters/dimensions were able to sprout buds and had any influence on regeneration of new propagules. BAP used singly or in combination showed to regulate axillary cormlets induction. The buds began to sprout after 4-5 days of treatment in moist peat moss. BAP + GA<sub>3</sub> treatment improved sprouting of corm propagule buds.

Treatment of small corms for different periods in hours (excluding control) resulted in variable response to regeneration percentage of cormlets having a range of 40.00-80.00%. Maximum and minimum regeneration was registered on 4 and 8 h BAP + GA<sub>3</sub> treatments (table 1). In contradiction,

analizaron usando ANOVA (IBM SPSS 20,0). Se seleccionó la prueba de rango múltiple de Duncan para comparar los valores promedio. Para en el análisis estadístico todos los valores expresados en porcentaje fueron transformados a raíz cuadrada (Snedecor y Cochran, 1989).

## **Resultados y discusión**

Los resultados de este estudio sugirieron que es posible multiplicar rápidamente los cormos madre de azafrán recién cosechados sin la implicación de tratamientos lentos y costosos, usando técnicas de micropropagación de cormos pequeños (1,10 a 1,75 cm) y cormos grandes (1,76 a 2,40 cm) en diferentes tiempos; lo que indujo significativamente ( $P < 0,05$ ) efectos sobre el porcentaje de brotación y todos las demás variables relacionadas con la inducción de los cormos bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo.

Los cormos madres fueron los primeros y más activos para brotar independientemente del tiempo y del tratamiento fitohormonal. Se observó además que en el potencial de brotación de los cormos madre también influyó la circunferencia de los cormos. Los cormos madre y pequeños no tratados (testigo) indujeron en 0,95 y 0,82 los cormos madre pequeños y grandes, respectivamente (cuadro 1).

#### **Efecto del tratamiento con 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>**

En el experimento se corroboró si los cormos de azafrán con dos diámetros/dimensiones diferentes fueron capaces de brotar yemas y

large sized mother corms induced 20.00-73.33% cormlets with incoherent regeneration behavior. Maximum cormlets induction was noted on the 4 h treatment. The results pertaining to treatments were against the expectations of sprouting and induction of all axillary buds to induce new cormlets. Number of cormlets induction was irregular independently of the treatment periods.

No treatments (control treatment) induced sprouting of 19.38% cormlets on small corms and 12.89% cormlets on large mother corms (table 1). This is in agreement with Ahrazem *et al.* (2015), who reports dormancy of axillary buds of saffron corms that fail to induce shoots under the effects of auxins released at apical meristem. In general terms, smaller corms were more efficient in terms of cormlets regeneration percentage on all treatments in hours including control.

The activation of first buds largely depended on the local bud competitiveness, which is determined by the temperature, local environment, photoperiod and developmental state of the buds (Domagalska and Leyser, 2011). It was further noticed that cormlets out of the sprouting buds in each case were noted on the buds closer to the basal plates (figure 1a,1b) in contradiction to Rubio-Moraga (2014); who noted sprouting gradually moved from the bottom to the apical buds on the mother corms.

This could be due to the difference in experimental conditions. Number and diameter of cormlets was affected by treatment durations. Number of cormlets per mother corm ranged

si esto tuvo alguna influencia en la regeneración de nuevos propagulos. El BAP usado individualmente o en combinación demostró regular la inducción de cormos axilares. Los brotes se observaron después de 4-5 días de comenzado el tratamiento con turba húmeda. El tratamiento de BAP + GA<sub>3</sub> incrementó la brotación de los propagulos.

El tratamiento de cormos pequeños para diferentes tiempos (excluyendo el testigo) dio como resultado una respuesta variable al porcentaje de regeneración de cormos con un rango de 40.00-80.00%. La regeneración máxima y mínima se registró en los tratamientos 4 y 8 h BAP + GA<sub>3</sub> (cuadro 1). En contraste, los cormos madre grandes indujeron el 20.00-73.33% de cormos con un comportamiento regenerativo que no fue consistente. La inducción máxima de los cormos se observó en el tratamiento de 4 h. Los resultados correspondientes a los tratamientos no cumplieron con las expectativas de brotación e inducción de todas las yemas axilares para inducir nuevos cormos. El número de inducción de cormos fue irregular independientemente del tiempo que involucraba los tratamientos.

Los cormos no tratados (tratamiento testigo) indujeron la brotación de 19,38% cormos madre pequeños y 12,89% cormos madre grandes (cuadro 1). Ahrazem *et al.* (2015), reportaron latencia de las yemas axilares de cormos de azafrán que no indujeron brotes bajo los efectos de las auxinas liberadas en el meristemo apical. En términos generales, los cormos más pequeños fueron más eficientes en

between 3.27-4.50 and 2.33-5.33 on small and large sized mother corms, respectively. Maximum number of cormlets was induced on 8 and 6 h treatment on small and large sized mother corms, respectively (table 1 and figure 1a, 1b). In general terms, both types of corms had inconsistent behavior in terms of number of cormlets per mother corm on both types of corms. Maximum number of cormlets per mother corm were induced on large moter corms.

Diameter of cormlets on small mother corms (excluding control with diameter of 0.11 cm) varied in a range of 0.44 to 0.54 cm. Minimum and maximum diameter of cormlets was

cuanto al porcentaje de regeneración en todos los tratamientos en horas incluyendo el testigo.

La activación de las primeras yemas dependió en gran medida de la competitividad local de las yemas, que se determina por la temperatura, el ambiente local, el fotoperíodo y el estado de desarrollo de las yemas (Domagalska y Leyser, 2011). Se observó además que las yemas brotadas estuvieron más cerca a las placas basales (figura 1a, 1b), contrario a lo reportado por Rubio-Moraga (2014), quien observó que la brotación se trasladó gradualmente de la parte inferior a las yemas apicales en los cormos madre.



**Figure 1. Effects of different concentrations of BAP + GA<sub>3</sub> on *ex vitro* corm induction of Saffron corms (a,b) Maximum number of daughter corms were induced on 8 and 6 h treatment on small and large sized mother corms respectively.**

**Figura 1. Efectos de diversas concentraciones de BAP + GA<sub>3</sub> en la inducción *ex vitro* de cormos de azafrán (a, b). El número máximo de cormos se obtuvo en el tratamiento de 8 y 6 h en cormos pequeño y grandes, respectivamente.**

**Table 1: Effect of 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> treatments for different durations of time on induction of cormlets on small and large sized saffron corms.**  
**Cuadro 1. Efecto de los tratamientos de 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> para diferentes duraciones de tiempo en la inducción de cormos de azafrán de tamaño pequeño y grande.**

Duration of treatment (h)	Cormlet regeneration percentage		Number of cormlets per mother corm		Diameter of cormlets (cm)		Rooting percentage of cormlets		Number of roots per cormlet		Average root length per cormlet (cm)		Fresh biomass of cormlet (g)		Dry biomass of cormlets (g)	
	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms
(Control)	19.38dA	12.89dB	0.95dA	0.82dB	0.11cA	0.13dA	0.00eB	10.00dA	0.00B	0.34eA	0.00cA	0.04cA	0.00	0.07	0.00	0.02
4	80.00aA	73.33aB	3.88bB	4.73bA	0.54aA	0.56bA	10.12bB	71.51aA	1.44aA	1.26aB	1.75aB	3.33aA	0.08	0.13	0.01	0.04
6	46.67cA	26.67cB	3.27cB	5.33aA	0.47bB	0.62aA	0.17dB	50.83bA	0.07cB	0.72bA	0.05cB	1.56bA	0.06	0.12	0.02	0.05
8	40.00cA	20.00cB	4.50aA	2.33dB	0.52aB	0.62aA	33.98aB	53.33bA	0.37bA	0.33cA	0.45bA	0.38cB	0.10	0.18	0.03	0.07
10	73.33bA	53.33bB	3.43cA	3.39cA	0.44bA	0.47cA	5.59cB	28.33cA	0.06cB	0.13dA	0.06cB	0.22cA	0.10	0.09	0.04	0.03

Means of different parameters shown by a different small letters in a column are significantly different using Duncan's Multiple Range test at  $p < 0.05$  level of significance.

Means of different parameters shown by a different capital letters in a row are significantly different using t test at  $p < 0.05$  level of significance.

registered on 10 and 4 h treatment respectively (table 1). Azizbekova *et al.* (1982) reported effects of gibberellin to break dormancy of saffron corms by treating them with 100 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> and water (control) for 4 h at the time of planting. They observed that GA<sub>3</sub> treated saffrons showed subsequent accelerated growth and development with elongated leaves, roots and increased number of flowers.

Cormlets diameter induced on large mother corms (excluding control with diameter of 0.13 cm) ranged 0.47 to 0.62 cm. Minimum (0.47 cm) and maximum (0.62 cm) diameter of cormlets on large corms was registered on 10 and 6-8 h treatment durations, respectively (table 1). The diameter of cormlets induced after treatment for any duration of time was larger compared to the diameter of cormlets induced on small corms. In general terms, both types of corms had inconsistent behavior in terms of diameter of cormlets. Maximum diameter of cormlets per mother corm per treatment was induced on large mother corms. These results underline the importance of corm size and BAP + GA<sub>3</sub> on their involvement in accelerated sprouting and induction of new cormlets.

Rooting percentage on cormlets ranged between 0.17-33.98% on small and 28.33-71.51% on large sized mother corms. Maximum rooting on cormlets of large mother corms were registered at 4 and 8 h treatment, respectively. No roots were induced on cormlets of small mother corms and 10% roots were noted on cormlets of larger corms of control treatment

Esto podría deberse a la diferencia en las condiciones experimentales. El número y diámetro de los cormos se vieron afectados por la duración de los tratamientos. El número de cormos por cormo madre osciló entre 3,27-4,50 y 2,33-5,33 para cormos pequeños y grandes, respectivamente. El número máximo de cormos se indujo en los tratamientos de 8 y 6 h en los cormos madre pequeños y grandes, respectivamente (cuadro 1 y figura 1a, 1b). En términos generales, ambos tipos de cormos tuvieron un comportamiento no consistente en términos de número de cormos en ambos tipos de cormos madre. El número máximo de cormos por cormo madre se indujo en los cormos grandes.

El diámetro de los cormos en los cormos madre pequeños (excepto el testigo con un diámetro de 0,11 cm) varió entre 0,44 y 0,54 cm. El diámetro mínimo y máximo de los cormos se registró en los tratamientos de 10 y 4 h, respectivamente (cuadro 1). Azizbekova *et al.* (1982) reportaron los efectos de la giberelina para romper la latencia de los cormos de azafrán al tratarlos con 100 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> y agua (testigo) durante 4 h al momento de la siembra. Los autores antes mencionados observaron que los cormos de azafrán tratados con GA<sub>3</sub> mostraron crecimiento y desarrollo acelerado, junto con hojas y raíces alargadas e incremento en el número de flores.

El diámetro de cormos inducidos en los cormos madre grandes (excepto el testigo con un diámetro de 0,13 cm) osciló entre 0,47 y 0,62 cm. El diámetro mínimo (0,47 cm) y

(table 1). In general terms, large corms had inconsistent behavior in terms of rooting percentage of cormlets per treatment duration.

Excluding control treatments, the maximum number of roots per cormlets of small and large mother corms were 1.44 and 1.26, respectively, and was noted at 4 h treatment. Rest of the treatments including control were inhibitory and induced significantly reduced number of roots per corm propagule irrespective of the diameter of mother corm (table 1). Large corms had inconsistent behavior in terms of number of roots per cormlet per treatment duration.

Root length on cormlets of small and large mother corms ranged 0.05-1.75 cm and 0.22-3.33 cm, respectively. The longest roots in each case was noted on cormlets of mother corms treated for 4 h. The root length on control treatment of large mother corms was 0.04 cm (table 1). Roots are the main source of cytokinins that could influence growth of axillary buds (Shimizu-Sato and Mori, 2001) in different dimensioned corms. Large corms had inconsistent behavior in terms of average root length per cormlet per treatment duration.

Cytokinins promote auxin signalling in induction of shoots and buds. Therefore, cytokinins help in generation of auxin proportionately and antagonize production of auxin responsible for rooting (Wickson and Thimann, 1958; Faiss *et al.*, 1997). Auxin (indole-3-acetic acid, IAA), produced in young shoot organs, induced root development, elongation and vascular differentiation (Aloni *et al.*, 2006).

máximo (0,62 cm) de los cormos en los cormos madre grandes se registró en la duración de los tratamientos de 10 y 6-8 h, respectivamente (cuadro 1). El diámetro de los cormos inducidos después del tratamiento para cualquier tiempo, fue mayor comparado con el diámetro de los cormos inducidos en los cormos pequeños. En términos generales, ambos tipos de cormos tuvieron un comportamiento inconsistente en términos del diámetro de los cormos. El diámetro máximo se indujo en los cormos madre grandes. Estos resultados indicaron la importancia del tamaño del cormo y del BAP + GA<sub>3</sub> en la implicación de la brotación acelerada y la inducción de nuevos cormos.

El porcentaje de enraizamiento en los cormos osciló entre 0,17-33,98% en cormos pequeños y 28,33-71,51% en cormos grandes. El enraizamiento máximo en los cormos madre grandes se registró en el tratamiento de 4 y 8 h, respectivamente. No hubo inducción de raíces en los cormos madres pequeños y se observaron 10% de las raíces en los cormos grandes del tratamiento testigo (cuadro 1). En términos generales, los cormos grandes presentaron un comportamiento inconsistente en términos de porcentaje de enraizamiento en combinación con la duración de los tratamientos.

Excluyendo los tratamientos testigos, el número máximo de raíces por cormos madre pequeños y grandes fue 1,44 y 1,26, respectivamente, se observó en el tratamiento de 4 h. El resto de los tratamientos,



Although, numerical variability in root fresh and dry weight of cormlets was noted yet their weights showed statistical similarity within their own (small and large corms) groups. In general terms, large corms had more fresh and dry weights of induced cormlets.

Moreover, BAP + GA<sub>3</sub> treatments had non antagonistic effect. Gan *et al.* (2007) reported that gibberellins and cytokinins act antagonistically in leaf formation and maintenance of meristems. Lane (1978) reports antagonistic activity of GA<sub>3</sub> to shoot proliferation in cv. 'McIntosh' of apple shoot cultures. It is assumed that external supply of BAP with and without GA<sub>3</sub> promoted out growth of buds in significantly visible way; which was supplemented with the cytokinins produced in the roots (Hartung *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2006) and was influenced by sprouting of buds and induction of new cormlets.

#### **Effect of 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP treatment**

Excluding controls, cormlets regeneration percentage on small mother corms ranged 33.33-80.00%. Maximum and minimum regeneration (%) was registered on 4 h and 8-10 h BAP treatments on small corms. Control treatments induced 19.38 and 12.89% cormlets. Excluding controls, large sized mother corms induced 40.00-86.67% cormlets with coherent regeneration behavior. Maximum cormlet regeneration percentage from larger mother corms was noted on the 4 h treatment which was very closely followed by cormlets regeneration percentage on the 6 h BAP treatment.

incluyendo el testigo, fueron inhibidores e indujeron un número significativamente reducido de raíces por cormo, independientemente del diámetro del cormo madre (cuadro 1). Los cormos grandes presentaron un comportamiento inconsistente en términos de número de raíces por cormo.

La longitud de la raíz en los cormos madre pequeños y grandes varió entre 0,05-1,75 cm y 0,22-3,33 cm, respectivamente. Las raíces más largas en cada caso se observaron en los cormos tratados durante 4 h. La longitud de la raíz en el tratamiento testigo de los cormos madre grandes fue 0,04 cm (cuadro 1). Las raíces son la principal fuente de citocininas que podrían influir en el crecimiento de las yemas axilares (Shimizu-Sato y Mori, 2001) en diferentes tamaños de los cormos. Los cormos grandes tuvieron un comportamiento inconsistente en términos de la longitud de la raíz media.

Las citocininas promueven la señalización de auxinas en la inducción de brotes y yemas. Por lo tanto, las citocininas ayudan en la generación de auxina y antagonizan la producción de las auxinas responsables del enraizamiento (Wickson y Thimann, 1958; Faiss *et al.*, 1997). La auxina (ácido indol-3-acético, IAA), producida en órganos jóvenes, induce el desarrollo de la raíz, el alargamiento y la diferenciación vascular (Aloni *et al.*, 2006).

Aunque se observó una variabilidad numérica en la biomasa fresca y seca de la raíces de los cormos, la biomasa presentó una semejanza

All other treatment durations were inhibitory and induced significantly reduced regeneration percentage (table 2). Higher regeneration percentage on each duration of time was noted for each of large corms.

Excluding controls, number of cormlets per mother corm ranged 3.08-6.17 and 3.89-5.55 on small and large sized mother corms, respectively. Maximum number of cormlets were induced at 4 h BAP treatment in each case (table 2, figure 2A, 2B, 2C). Comparing diameter of cormlets on small mother corms, they varied in range of 0.51 to 0.62 cm. The largest cormlets were noted at 4 h treatment. A sharp decrease in cormlets diameter was noted on the rest of the treatment durations. Cormlets diameter of large mother corms, was affected by BAP treatment durations. Their diameter varied in range of 0.48 to 0.69 cm. The largest cormlets were noted at the 4 h long treatment (table 2, figure 2A, 2B, 2C). It seemed as if smaller corms had more potential to induce cormlets compared to the larger corms.

Excluding controls and the 10 h treatment duration with no rooting, significant differences were noted for rooting percentage of cormlets induced on small mother corms as affected by the duration of BAP treatments. Ten percentage rooting on control and no rooting was noted on cormlets induced on large mother corms treated for the 10 h. The rest of the cormlets of large mother corms had rooting percentage range of 5.5-35.37% with significant differences ( $P < 0.05$ ) among them. Small mother

estadística dentro de los propios grupos (cormos pequeños y grandes). En términos generales, los cormos grandes presentaron mayor biomasa fresca y seca en los cormos inducidos.

Por otra parte, los tratamientos de BAP + GA<sub>3</sub> tuvieron un efecto no antagónico. Gan *et al.* (2007) reportaron que las giberelinas y citocininas actuaron de forma diferente en la formación de hojas y en el mantenimiento de los meristemas. Lane (1978) reportó una actividad antagónica de la GA<sub>3</sub> para la proliferación de brotes en manzanas de la variedad 'McIntosh'. Se asumió que la fuente externa de BAP con y sin GA<sub>3</sub> promovió el crecimiento de yemas perceptiblemente visibles, que se complementó con las citocininas producidas en las raíces (Hartung *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2006) y fue influenciado por la brotación de yemas y la inducción de nuevos cormos.

#### **Efecto del tratamiento 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP**

El porcentaje de regeneración de los cormos, excluyendo los testigos, en los cormos madre pequeños varió entre 33,33-80,00%. La regeneración máxima y mínima (%) se registró en 4 h y 8-10 h en el tratamiento BAP en cormos pequeños. Los tratamientos testigos indujeron 19,38% y 12,89% cormos. Los cormos madre grandes, excluyendo los testigos, indujeron entre 40,00-86,67% de cormos con un comportamiento consistente de regeneración. El porcentaje máximo de la regeneración de cormos madre grandes se observó en el tratamiento de 4 h, seguido por el porcentaje de regeneración



**Figure 2.** Effects of different concentrations of BAP on *ex vitro* corm induction of Saffron corms. (A) maximum number of corms were induced on 4 h treatment on small sized mother corms. (B) number of cormlets per mother corm ranged 3.89-5.55 cm on large sized mother corms. Maximum number of corms were induced on 4 h treatment. (C) Their diameter varied in range of 0.48 to 0.69 cm, respectively. The largest cormlets were noted on 4 h long treatment.

**Figura 2.** Efectos de diferentes concentraciones de BAP en la inducción *ex vitro* de cormos de azafrán. (A) El número máximo de cormos se obtuvo en el tratamiento de 4 h en los cormos madre pequeños. (B) El número de cormos en la madre varió entre 3,89-5,55 cm en los cormos madre grandes. El número máximo de cormos se obtuvo en el tratamiento de 4 h. (C) El diámetro varió entre 0,48 y 0,69 cm, respectivamente. Los cormos más grandes se observaron en el tratamiento de 4 h.

corms were more efficient compared to large mother corms (table 2).

Number of roots per corm propagules of small corms ranged 0.32-2.75. No rooting was noted on corm propagules when BAP treated for 10 h. Number of roots per cormlets of large corms ranged 0.10-1.40. Whereas, maximum number of roots were noted on cormlets of small corms treated for 4 h (table 2.). The results are not in agreement with Yildirim (2007), who made use of 50 mg·L<sup>-1</sup> IAA, 50 mg·L<sup>-1</sup> kinetin and 200 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> for *ex vitro* corm induction

de cormos en el tratamiento BAP de 6 h. Todas las demás tiempos de tratamiento inhibieron e indujeron significativamente los porcentajes de regeneración (cuadro 2). Se observó un mayor porcentaje de regeneración en cada período de tiempo para cada uno de los cormos grandes.

Excluyendo los testigos, el número de cormos por cormos madre varió entre 3,08-6,17 y 3,89-5,55 en cormos pequeños y grandes, respectivamente. El número máximo de cormos se indujo en el tratamiento de 4 h BAP en cada caso (cuadro 2, figuras 2A, 2B,

**Table 2. Effect of 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP treatments for different durations of time on induction of cormlets on small and large sized saffron corms.**  
**Cuadro 2. Efecto de los tratamientos 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP para diferentes duraciones de tiempo en la inducción de cormos de azafrán de tamaño pequeño y grande.**

Duration of Treatment (h)	Cormlet regeneration percentage		Number of cormlets per mother corm		Diameter of cormlets (cm)		Rooting percentage on cormlets		Number of roots per cormlet		Average root length per cormlet (cm)		Fresh weight of cormlets, (g)		Dry weight of cormlets, (g)	
	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms	Small corms	Large corms
(control)	19.38dA	12.89dB	0.95dA	0.82dB	0.11cA	0.13dA	0.00dB	10.00dA	0.34cA	0.00cA	0.03cA	0.00cA	0.00	0.07	0.00	0.02
4	80.00aB	86.67aA	6.17aA	5.55aB	0.62aB	0.69aA	27.99aB	35.37aA	2.75 aA	1.40aB	2.06aA	1.78aB	0.14	0.18	0.05	0.06
6	46.67bB	80.00aA	4.50bA	4.17bA	0.51bA	0.48cB	26.43aA	21.10bB	0.32bB	0.63bA	0.36bB	0.59bA	0.12	0.09	0.05	0.04
8	33.33bB	60.00bA	3.08cB	4.50bA	0.53bA	0.52cA	21.48bA	5.55cB	0.60bA	0.110dB	0.63bA	0.06cB	0.08	0.12	0.03	0.04
10	33.33bB	40.00cA	3.60cA	3.89cA	0.51bB	0.62bA	0.00cA	0.0eA	0.00cA	0.00eA	0.00cA	0.00cA	0.00	0.00	0.00	0.00

Means of different parameters shown by a different small letters in a column are significantly different using Duncan's Multiple Range test at P<0.05 level of significance.

Means of different parameters shown by a different capital letters in a row are significantly different using t test at P<0.05 level of significance.

and found positive effects of these phytohormones on regeneration. Comparing rooting on propagules of small and large sized mother corms, the best rooting was noted for the 4 h BAP treatment. Increased treatment duration significantly reduced rooting on cormlets irrespective of the diameter of mother corms.

Root length ranged 0.36-2.06 cm and 0.06-1.78 cm on cormlets induced on small and large sized mother corms, respectively. The longest roots in each case were noted on corm propagules obtained after the 4 h treatment of respective mother corms. No root length per corm was noted on cormlets when BAP was treated for 10 h (table 2).

Irrespective of duration of the BAP treatment, both fresh and dry biomass of daughter corms on small and large sized mother corms were statistically similar. Their numerical range excluding control treatment for fresh biomass ranged 0.08-0.14 g for small corms and 0.09-0.18 g for larger corms. Similarly, their numerical range for dry biomass ranged 0.03-0.05 g for small corms and 0.04-0.06 g for larger corms (table 2).

The results are not in agreement with Yildirim (2007), who noted that 50 mg·L<sup>-1</sup> IAA and 50 mg kinetin were favorable for corm production; whereas, 200 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, 50 mg·L<sup>-1</sup> IAA and 50 mg·L<sup>-1</sup> kinetin had negative impacts on corm production and bud germination ratio. Comparing these results with the present study, it seems as if the concentrations and durations of treatment and physical state of corms used by Yildirim (2007)

2C). Comparando el diámetro de los cormos en los cormos madre pequeños, este varió en el rango de 0,51 a 0,62 cm. El cormo más grande se evidenció en el tratamiento 4. Se observó una disminución aguda del diámetro de los cormos en el resto de las duraciones del tratamiento. El diámetro de los cormos madre grandes se afectó por las duraciones del tratamiento de BAP. Su diámetro varió entre 0,48 y 0,69 cm. Los cormos más grandes se observaron en el tratamiento de 4 h (cuadro 2, figuras 2A, 2B, 2C). Pareciera que los cormos más pequeños tuvieran mayor potencial para inducir a los cormos en comparación a los cormos más grande.

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de cormos inducidos en los cormos madre pequeños que se vieron afectados por la duración de los tratamientos de BAP, excluyendo los controles y la duración del tratamiento de 10 h sin enraizamiento. Se observó un enraizamiento del 10% en el testigo y ningún enraizamiento en los cormos madre grandes tratados durante 10 h. El resto de los cormos de los cormos madre grandes presentaron un porcentaje de 5,5-35,37% con diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre ellos. Los cormos madres pequeños fueron más eficientes en comparación con los cormos madre grandes (cuadro 2).

El número de raíces por cormos pequeños osciló entre 0,32-2,75. No se observó ningún enraizamiento en los cormos en el tratamiento de BAP durante 10 h. El número de raíces por cormos en los cormos grandes osciló entre 0,10-1,40. Por otra parte, el

affected regeneration of new corms negatively to induce new corms. Sumlu *et al.* (2009) also pointed out that cytokinin treatment could help in breaking thermo dormancy. The researchers suggests that thermo-inhibition could be overcome after treatment with thidiazuron under moist conditions.

Endogenous cytokinins can enter axillary buds and promote their out growth by promoting the cell cycle. It is well known that cytokinins are synthesized throughout the growth of Saffron corms, but how they regulate buds is still to be discovered (Muller and Leyser, 2011).

Saffron corms experience severe shoot bud dormancy after autumn harvests (September) influenced by reduction in gibberellins and excretion of abscisic acid; which results in induction of dormancy and delayed sprouting of corms after the passage of cold season (roughly 4-6 months), with the start of spring season that helps in reactivation of the gibberellin activity and differentiation of new corm buds with shoot elongation of the sprouts (Aung *et al.*, 1969; Bakhtavari *et al.*, 2011).

Generally no or a few cormlets sprout during the first year. These juvenile corms transform into vegetatively mature tissues during the 2nd year; when the buds sprout and elongate to flower (Kaushal and Upadhyay, 2002). It is popularly known that corm production decreases progressively during a period post 3rd or 4th year; when it is non economical to continue thereafter (Golmohammadi,

número máximo de raíces se observó en los cormos pequeños tratados por 4 h (cuadro 2). Los resultados difieren con los presentados por Yildirim (2007), quien utilizó  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA,  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  cinetina y  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{GA}_3$  para la inducción *ex vitro* de cormos y encontró efectos positivos de estas fitohormonas en la regeneración. Comparando el enraizamiento en los cormos madre pequeños y grandes, el mejor enraizamiento se observó en el tratamiento de 4 h BAP. El aumento de la duración del tratamiento redujo significativamente el enraizamiento en los cormos, independientemente del diámetro de los cormos madre.

La longitud de la raíz osciló entre 0,36-2,06 cm y 0,06-1,78 cm en los cormos inducidos en los cormos madre pequeños y grandes, respectivamente. Las raíces más largas en cada caso se observaron en los cormos obtenidos después del tratamiento de 4 h de los respectivos cormos madre. No se observó ninguna longitud de la raíz en los cormos cuando el BAP fue tratado durante 10 h (cuadro 2).

Independientemente de la duración del tratamiento BAP, la biomasa fresca y seca de los cormos nacidos de cormos madre pequeños y grandes fue estadísticamente similar. El rango numérico, excluyendo el tratamiento de control para la biomasa fresca, varió entre 0,08-0,14 g para los cormos pequeños y 0,09-0,18 g para los cormos grandes. Del mismo modo, su rango numérico para biomasa seca osciló entre 0,03-0,05 g para cormos pequeños y 0,04-0,06 g para cormos grandes (cuadro 2).

Los resultados difirieron de los presentados por Yildirim (2007), quien



2014). Therefore, corm sprouting or propagation is a long delayed and slow procedure, if traditional propagation techniques are used.

It is assumed that living meristematic corm bud cells after treatment with 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP and 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> for different durations of time reacted variably to induce new corm tissues/propagules under *ex vitro* conditions and confirm similar observations of Majourhay *et al.* (2007), Raja *et al.* (2007), Sharma *et al.* (2008), Kiran *et al.* (2011) and Bakhtavari *et al.* (2011).

## Conclusions

This study reports feasibility of breaking corm dormancy without giving them cold treatment soon after harvest. Furthermore, the results suggests that it is possible to rapidly multiply saffron corms under *ex vitro* conditions compared to other commonly used conventional and in vitro techniques. Use of 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP pretreatment is more favorable compared to 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> used singly.

It was conceivable and concluded that the plant has high potential to multiply under optimum conditions of growth in a short period of 90 days that has not been accounted for in earlier reports.

These results could be further expanded by molecular biology techniques that involve RNAs/micro RNAs translation and studying changes in anatomic, morphological, cytological features of corms and corm buds.

observó que 50 mg·L<sup>-1</sup> IAA y 50 mg·L<sup>-1</sup> de cinetina fueron favorables para la producción de cormos; considerando que 200 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, 50 mg·L<sup>-1</sup> IAA y 50 mg·L<sup>-1</sup> de cinetina tuvieron impactos negativos sobre la producción de cormos y la tasa de brotación de yemas. Comparando estos resultados con los del presente estudio, parece como si las concentraciones y duraciones de tratamiento y estado físico de cormos utilizados por Yildirim (2007) afectarían negativamente la regeneración de cormos para inducir nuevos cormos. Sumlu *et al.* (2009) también señalaron que el tratamiento con citocinina podría ayudar a romper la latencia. Los investigadores sugirieron que la termo-inhibición podría superarse después del tratamiento con tidiazurón bajo condiciones de humedad.

Los citocininas endógenas podrían entrar en las yemas axilares y promover su crecimiento promoviendo el ciclo celular. Se sabe que las citocininas se sintetizan a lo largo del crecimiento de los cormos de azafrán, pero la forma en que se regulan las yemas aún se desconoce (Muller y Leyser, 2011).

Los cormos de azafrán experimentan latencia severa de las yemas después de las cosechas de otoño (septiembre), esto influenciado por la reducción de giberelinas y el exceso de ácido abscísico, que resulta en la inducción de la latencia y en el retardo de la brotación de cormos después del paso de la temporada fría (aproximadamente 4-6 meses), con el inicio de la temporada de primavera que ayuda a la reactivación de la actividad de giberelina y la

## Acknowledgement

The authors acknowledge joint support of the Departments of Field Crops, Usak and Ankara Universities, Turkey.

## Literature cited

- Aasim, M., K.M. Khawar and S. Ozcan. 2008. *In vitro* regeneration of red squill *Urginea maritima* (L.) Baker. using thidiazuron. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 22(4):925-928.
- Abdullaev, F.I. 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp. Biol. Med.* 227:20-25.
- Ahrazem, O., A. Rubio-Moraga, S.G. Nebauer, R.V. Molina and L. Gómez-Gómez. 2015. Saffron: its phytochemistry, developmental processes, and biotechnological prospects. *J. Agric. Food Chem.* 63(40):8751-8764.
- Alam, A. 2006. Status and prospects of mechanization in Saffron cultivation in Kashmir. *Acta Hort.* 650:409-415.
- Aloni, R., E. Aloni, M. Langhans and C.I. Ullrich. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann. Bot.* 97(5):883-893.
- Anonymous. 2016. Regional Saffron cultivation and harvesting techniques in Spain, Greece and Italy. Available in: <http://www.europeansaffron.eu/archivos/Annex%20White%20book.pdf>. Date of consultation: October 2017.
- Aung, L.H., A.A. De Hertogh and G.L. Staby. 1969. Temperature regulation of endogenous gibberellin activity and development of *Tulipa gesneriana* L. *Plant Physiol.* 44:403-406.
- Azizbekova, N.S., E.L. Milyaeva and M.K. Chailakhyan. 1982. Effect of gibberellin on functional activity of dormant saffron buds. *Fiziologiya Rastenii* 29(6):1164-1169.

diferenciación de nuevas yemas con alargamiento de los brotes (Aung *et al.*, 1969; Bakhtavari *et al.*, 2011).

Generalmente ninguno o solo unos pocos cormos brotan durante el primer año. Estos cormos jóvenes se transforman en tejidos vegetativamente maduros durante el segundo año, cuando las yemas brotaron y se alargaron hasta florecer (Kaushal y Upadhyay, 2002). Se sabe que la producción de cormos disminuyó progresivamente durante un período posterior al tercer o cuarto año, momento en que dejaron de ser rentables (Golmohammadi, 2014). Se asume que las células vivas del meristemo del cormo después del tratamiento con 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP y 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> para diversas duraciones de tiempo reaccionaron para inducir los nuevos tejidos/propágulos del cormo bajo condiciones *ex vitro*, y fue similar a lo reportado por Majourhay *et al.* (2007), Raja *et al.* (2007), Sharma *et al.* (2008), Kiran *et al.* (2011) y Bakhtavari *et al.* (2011).

## Conclusiones

Este estudio reporta la viabilidad en la ruptura de la latencia de cormos sin aplicación de tratamiento en frío, poco después de la cosecha. Además, los resultados sugieren que es posible multiplicar rápidamente los cormos de azafrán bajo condiciones *ex vitro* en comparación a otras técnicas convencionales *in vitro* comúnmente usadas. El uso del pre-tratamiento de 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP es más favorable comparado a 20 mg·L<sup>-1</sup> BAP +

- Bakhtavari, A.S., K.M. Khawar and N. Arslan. 2011. *Ex vitro* shoot regeneration and lateral buds of freshly harvested saffron corms. *Afr. J. Agric. Res.* 6(15):3583-3588.
- Bayat, M., M. Rahimi and M. Ramezani. 2016. Determining the most effective traits to improve saffron (*Crocus sativus* L.) yield. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 22(1):153-161.
- Devi, K., M. Sharma, M. Singh and P.S. Ahuja. 2011. *In vitro* cormlet production and growth evaluation under green house conditions in saffron (*Crocus sativus* L.) a commercially important crop. *Eng. Life Sci.* 11(1):16.
- Ding, B., S. Bai, Y. Wu and X. Fan. 1981. Induction of callus and regeneration of plantlets from corm of *C. sativus* L. *Acta Bot. Sin.* 23:419-420.
- Domagalska, M.A. and O. Leyser. 2011. Signal integration in the control of shoot branching. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 12(4):211-221.
- Faiss, M., J. Zalubilova, M. Strnad and T. Schmullig. 1997. Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J.* 12:401-415.
- Fernández, A. 2006. Genetic resources of saffron and allies (*Crocus* spp.). Proceedings of the Second International Symposium on Saffron Biology and Technology. *Acta Hort.* 650:167-188.
- Gan, Y., C. Liu, H. Yu and O. Broun. 2007. Integration of cytokinins and gibberellins signalling by *Arabidopsis* transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate. *Devel.* 134:2073-2081.
- Goliaris, A.H. 2006. Saffron cultivation in Greece. pp. 73-86. Saffron: *Crocus sativus* L. medicinal and aromatic plants: industrial profiles. Negbi, M. (Ed.). Taylor & Francis e-Library. Harwood academic publishers Australia, Canada, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore and Switzerland. Vol 8.
- 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> utilizado de forma individual.
- Se llegó a la conclusión de que la planta tiene un alto potencial para multiplicarse en condiciones óptimas de crecimiento en un período corto de 90 días, información que no se había reportado en estudios anteriores.
- Estos resultados podrían ampliarse aún más usando técnicas de biología molecular que involucren los ARNs/micro y ARNs y el estudio de los cambios en las características anatómicas, morfológicas y citológicas de los cormos.

### Agradecimiento

Los autores agradecen el apoyo brindado por el Departamentos de Cultivos de Campo, Usak y por la Universidad de Ankara, Turquía.

*Fin de la versión Español*

---

Golmohammadi, F. 2014. Saffron and its farming, economic importance, export, medicinal characteristics and various uses in south khorasan province- east of Iran farhood. *IJFAS.* 31(3-5):566-596.

Hajyzadeh, M., H. Asil, M.U. Yildirim, E.O. Sarihan, F. Ayanoglu and K.M. Khawar. 2017. Evaluating effects of corm circumference and storage temperatures on yield and yield components of saffron at different elevations. *Acta Hort.* 1184:39-46.

Hartung, W., A. Sauter and E. Hose. 2002. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J. Exp. Bot.* 53(366):27-32.

- Kafi, M., A. Hemmati Kakhki and A. Karbasi. 2006. Historical background, economy, acreage, production, yield and uses. pp: 1-11. *In*: Kafi, M., A. Koocheki, M.H. Rashed and M. Nassiri (Eds.). Saffron (*Crocus sativus*) production and processing. Science Publishers, Enfield.
- Karaoglu, C., S. Cocu, A. Ipek, I. Parmaksiz, E.O. Sarihan, S. Uranbey, N. Arslan, M.D. Kaya, C. Sancak, S. Ozcan, B. Gurbuz, S. Mirici, C. Er and K.M. Khawar. 2007. *In vitro* micropropagation of saffron. *Acta Hort.* 739:223-228.
- Kaushal, S.K. and R.G. Upadhyay. 2002. Studies on variation in corm size and its effect on cormel production and flowering in *Crocus sativus* L. under midd hill conditions of H.P. *Research on Crops* 3(1):126-128.
- Khan, M.A., S. Naseer, S. Nagoo and F.A. Nehvi. 2011. Behaviour of Saffron (*Crocus sativus* L.) corms for daughter corm production. *J. Phytol.* 3(7):47-49.
- Kiran, D., S. Madhu, S. Markandey and S.A. Paramvir. 2011. *In vitro* cormlet production and growth evaluation under greenhouse conditions in saffron (*Crocus sativus* L.) a commercially important crop. *Life Sci.* 11(1):1-6.
- Lane, W.D. 1978. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. *Plant Sci. Lett.* 13:281-285.
- Majourhay, K., J.A. Fernandez, P. Martínez-Gómez and A. Piqueras. 2007. Enhanced plantlet regeneration from cultured meristems in sprouting buds of saffron corms. *Acta Hort.* 739:275-278.
- Menia, M., S. Iqbal, R. Zahida, S. Tahir, R.H. Kanth, A.A. Saad and A. Hussian. 2018. Production technology of saffron for enhancing productivity. *J. Pharmacognos. Phytochem.* 7(1):1033-1039.
- Mir, G.H., V.M. Kumar, S. Ahmad and L.S. Devi. 2010. Etiology and management of saffron corm rot disease in Kashmir. *Proceeding of National Seminar on Technological Innovations in Saffron.* November 25-26. 1-16.
- Moradi, M.M. and S. Turhan. 2017. The importance of Saffron plant in Afghanistan's agricultura. *J. Biol. Environ. Sci.* 11(33):165-169.
- Mzabri I., M. Legsayer, M. Chetouani, A. Aamar, N. Kouddane, A. Boukroute, I. Bekkouch and I. Berrichi. 2017. Saffron (*Crocus sativus* L.) yield parameter assessment of abiotic stressed corms stored in low temperature. *J. Mater. Environ. Sci.* 8(10):3588-3597.
- Muller, D. and O. Leyser. 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Ann. Bot.* 107(7):1203-1212.
- Negbi, M. 1999. Saffron cultivation: past, present and future prospects. p. 19-30. *In*: Negbi, M. (Ed.). Saffron *Crocus sativus* L. Harwood Academic Publ., Amsterdam.
- Ozel, C.A. and K.M. Khawar. 2007. *In vitro* bulblet regeneration of *Ornithogalum oligophyllum* Clarke E.D. using twin scale bulb explants. *Propag. Ornam. Plants* 7(2):82-88.
- Ozel, C.A., K.M. Khawar, S. Karaman, M.A. Ates and O. Arslan. 2008. Efficient *in vitro* myultiplication in *Ornithogalum alophyllum* Hand Mazz from twin scales. *Sci. Hort.* 116(1):109-112.
- Parmaksiz, I. and K.M. Khawar. 2006. Plant regeneration by somatic embryogenesis from immature seeds of *Sternbergia candida* Mathew Et T. Baytop, an endangenred endemic plant of Turkey. *Propag. Ornam. Plants* 6(3):128-133.
- Parray, J.A., A.N. Kamili and R. Hamid. 2010. Application of biotechnological tools for Saffron propagation. *Proceeding of National Seminar on Technological Innovations in Saffron.* November 25-26. 2-4:18.
- Raja, W., G. Zaffer and S.A. Wani. 2007. *In vitro* microcorm formation in Saffron (*Crocus sativus* L.). *Acta Hort.* 739:291-296.
- Rubio-Moraga, A., O. Ahrazem, R.M. Pérez-Clemente, A. Gómez-Cadenas, K. Yoneyama, J.A. López-Ráez, R.V. Molina and L. Gómez-Gómez. 2014.

- Apical dominance in Saffron and the involvement of the branching enzymes CCD7 and CCD8 in the control of bud sprouting. *BMC Plant Biol.* 14:171.
- Sakakibara, H., K. Takei and N. Hirose. 2006. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci.* 11(9):440-448.
- Salwee, Y., F.A. Nehvi and S. Jyoti, 2011a. Tissue culture a tool for corm production in Saffron national conference on recent trends in biosciences. 3-4th Oct 2011 organized by Department of Biotechnology and Biotechnology, Sri Pratap College. Srinagar. 100 p.
- Salwee, Y., F.A. Nehvi, S.S. Jyoti and A. Wani. 2011b. Shoot initiation in Saffron in response to growth regulators under *in vitro* conditions abstracts and souvenir. 1th J&K Agricultural Science Congress.
- Sevimay, C.S., K.M. Khawar, I. Parmaksiz, S. Cocu, C. Sancak, E.O. Sarihan and S. Ozcan. 2005. Prolific *in vitro* bulblet formation from bulb scales of Meadow Lily (*Lilium candidum* L.). *Period. Biol.* 107(1):107-111.
- Sharma, K.D., R. Rathour, R. Sharma and S. Goel. 2008. *In vitro* cormlet development in *Crocus sativus*. *Biol. Plant* 52:709-712.
- Shimizu-Sato, S.S. and H.Mori. 2001. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* 127(4):1405-1413.
- Shokati, B., M.R. Asgharipour, A. Ghanbari and B. Feizizadeh. 2016. Suitability assessment of Saffron cultivation using GIS based multi-criteria decision analysis approach; study area: East Azerbaijan province. *Desert* 21(2):115-131.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1989. *Statistical methods*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 8th Edition.
- Tammara, F. 1999. Saffron (*Crocus sativus* L.) in Italy. Negbi M. (Ed.). Saffron. *Crocus sativus* L. Harwood Academic Publishers. Australia.
- Vurdu, H. 2004. Agronomical and biotechnological approaches for saffron improvement. proceedings of the first on saffron biology and biotechnology symposium. *Acta Hort.* 650:285-290.
- Wickson, M. and K.V. Thimann. 1958. The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. *Physiol. Plant.* 11:62-74.
- Yildirim, E. 2007. Development of *in vitro* micropropagation techniques for Saffron (*Crocus sativus* L.). Master of Science in Department of Biology, Middle East Technical University. Available in: [https://www.researchgate.net/profile/Arvind\\_Singh56/post/Saffron\\_micropropagation\\_need\\_help/chment/59d6371f79197b8077994801/AS:391675584237575@1470394144697/download/2.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Arvind_Singh56/post/Saffron_micropropagation_need_help/chment/59d6371f79197b8077994801/AS:391675584237575@1470394144697/download/2.pdf). Date of consultation: October 2017.
- Yildirim, M.U., H. Asil, M. Hajyzadeh, E.O. Sarihan and K. M. Khawar. 2017. Effect of changes in planting depths of saffron (*Crocus sativus* L.) corms and determining their agronomic characteristics under warm and temperate (Csa) climatic conditions of Turkish province of Hatay. *Acta Hort.* 1184:47-54.
- Zeybek, E., S. Önde and Z. Kaya. 2012. Improved *in vitro* micropropagation methods with adventitious corms and roots for endangered saffron. *Central Eur. J. Biol.* 7:138-145.