



Propagación *in vitro* del azafrán de raíz (*Escobedia grandiflora* L. f.) Kuntze

In vitro propagation of root saffron (*Escobedia grandiflora* L. f.) Kuntze

Dagoberto Castro - Restrepo*, Juan Andrés Arredondo Urrego**,
David Alexander Jaramillo Tobón ***

Resumen

La regeneración *in vitro* de plántulas de *Escobedia grandiflora* L. se logró mediante organogénesis directa a partir de entrenudos obtenidos de plantas madre mantenidas en cultivos hidropónicos. Los explantes compuestos por una porción de nudo y una yema (0,5 a 1 cm de longitud) se desinfectaron con etanol (70%) durante un minuto y nitrato de plata (1%) por tres minutos, y se sembraron en el medio de cultivo MS al cual se le adicionó BAP (0,5 mgL⁻¹). Para la proliferación, el empleo de 5 mgL⁻¹ de BAP indujo la formación de 2,5 brotes/explante y mostró las mejores características de número de hojas, altura y vigor. La utilización de AIB (1 mgL⁻¹) produjo la mejor respuesta respecto al número y la longitud de raíces con un promedio del 56,7% de enraizamiento. Las plántulas enraizadas se transfirieron a semilleros donde el sustrato estuvo compuesto por arena y se obtuvo el 95% de supervivencia.

Palabras clave: *Escobedia grandiflora*, micropropagación, enraizamiento, aclimatización.

* Doctor en Ciencias Agrícolas con énfasis en fisiología y biotecnología. Líder Grupo de Investigación Unidad de Biotecnología Vegetal. Director de Investigación y Desarrollo Universidad Católica de Oriente - UCO. Rionegro, Antioquia, Colombia.

E-mail: investigacion.dir@uco.edu.co

** Magister Biotecnología Vegetal. Universidad Católica de Oriente - UCO. Rionegro, Antioquia, Colombia.

E-mail: Guacharo23@hotmail.com

*** Agrónomo Zootecnista. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Católica de Oriente - UCO. Rionegro, Antioquia, Colombia. E-mail: dajato30@hotmail.com

Abstract

In vitro regeneration of *Escobedia grandiflora* L. seedlings was achieved through a shoot meristem culture from mother plants cultivated under a hydroponic system. The explants consisted of a node plus a bud (0.5 to 1 cm long) were disinfected with ethanol (70%) for one minute and silver nitrate (1%) for three minutes, and then inoculated in a MS medium supplemented with BAP 5 mgL⁻¹. For proliferation, employing BAP at 5 mgL⁻¹ resulted in the formation of 2.5 buds per explant and the best characteristics in number of leaves, height and vigor. The use of AIB (1 mgL⁻¹) produced the best answers regarding the number and length of roots with an average of 56.7% rooting. Plantlets with roots were transferred to nurseries with substratum made up of sand, under which 95% of survival was obtained.

Keywords: *Escobedia grandiflora*, micropropagation, rooting, acclimatization.

Introducción

El género *Escobedia* Ruiz y Pavón es de origen americano actualmente ubicado en la familia Orobanchaceae. Anteriormente se tenía clasificado como Scrophulariaceae (Olmstead *et al.*, 2001). Su distribución se extiende desde el norte de México hasta Argentina (Carranza y Medina, 2008). En Colombia esta especie se conoce como azafrán de raíz, y crece libremente en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Chocó, Cauca, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Tolima, Valle, Vaupés y Vichada; de acuerdo con Fernández (1987) esta especie se establece bien en diferentes pisos térmicos con rango altitudinal que oscila entre 1.000 y 2.000 m.s.n.m.

Las poblaciones nativas utilizaban sus raíces en las comidas como condimento, para lo cual las molían hasta obtener un material abundante de color anaranjado, que dejaban asentar en el agua y luego lo secaban para el uso diario. Su color lo confiere la *azafrina*, un ácido carotenoide. Su utilización ha decaído hasta olvidarse casi por completo en regiones en donde era indispensable para mercados de colorantes, artesanías y alimentos (González, 1988, pp. 107-109).

En la parte medicinal se le encuentran propiedades para problemas hepáticos y es rico en vitamina A (Arias, 1982, p. 69). La raíz contiene cristales de escobedina y un colorante resinoso

de azafrina, el resultado de la mezcla con ácido sulfúrico produce un color azul violeta que es utilizado como colorante (Maisch, 1885). La *Escobedia grandiflora* posee un gran potencial por sus propiedades colorantes (color amarillo), las cuales pueden ser de interés para la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica dado su origen natural. Eschenmoser *et al.* (1982) identificaron la azafrina como carotenoide en esta especie.

La propagación se realiza mediante la separación de bulbos, los cuales son escasos y no se encuentran fácilmente disponibles, además se ha observado que la semilla sexual presenta un bajo porcentaje de viabilidad; por esta razón se recomienda el cultivo de tejidos para su conservación y propagación. Esta técnica se ha utilizado para propagar especies medicinales en vía de extinción mediante organogénesis o por embriogénesis somática (Chen *et al.*, 2001; Chueh *et al.*, 2001). El objetivo de este trabajo fue establecer la propagación clonal de *E. grandiflora* mediante la organogénesis directa para la formación de brotes múltiples y la formación de raíces *in vitro*.

Materiales y métodos

Material vegetal. La selección de las plantas en estado silvestre se realizó en la vereda Palenque, del municipio de Venecia en el Suroeste Antioqueño, a 1.260 m.s.n.m., y en la vereda San Pablo, del mu-

nicipio de Yarumal en el Nordeste Antioqueño, a 1.800 m.s.n.m. Para la selección de las plantas se tuvieron en cuenta algunas características relacionadas con la morfología de la planta, su estado fitosanitario y la calidad de las raíces. Las plantas se sembraron en condiciones de invernadero bajo condiciones semihidropónicas, donde se utilizó como sustrato arena previamente desinfectada con Dazomed (30 gm⁻²). La composición química de solución nutritiva que se empleó durante esta fase, y que se aplicó con un volumen de 5 Lm² diarios, fue la siguiente (mgL⁻¹): N – NO₃(200); N – NH₄(50); P(43); K(208); Ca(185); Mg(48); S(32); Fe – 3(5,6); Mn(0,54); Cu(0,06); Zn(0,26); B(0,54); Mo(0,012); Cl(1,8); Co(0,004) (Marulanda, 2003, p. 173).

Establecimiento in vitro. Como fuente de explantes se utilizaron entrenudos, los cuales se desinfectaron con etanol (70%) durante un minuto y posteriormente se colocaron en una solución de nitrato de plata (1%) por tres minutos en condiciones de vacío, y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Los entrenudos se sembraron en el medio de cultivo compuesto por las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962), enriquecido con bencil amino purina —BAP— (0,5 mgL⁻¹) en total oscuridad durante 30 días a una temperatura de 24 °C.

Proliferación. El medio básico de cultivo estuvo constituido por las sales MS, enriquecido con vitaminas, sacarosa (3.0%) y agar gelrite (2,4 gL⁻¹); se evaluaron las siguientes concentraciones de BAP (mgL⁻¹): 0, 0,5, 1, 3 y 5; los explantes se incubaron bajo condiciones de luz de 80 μmom⁻²s⁻¹, fotoperíodo de ocho horas luz y 16 horas de oscuridad, y temperatura de 24 °C ± 1 °C. Se utilizó un diseño completamente al azar compuesto por cinco tratamientos cada uno con 30 repeticiones.

Enraizamiento. Se emplearon brotes de un centímetro de longitud, los cuales se sembraron en un medio MS, sacarosa (3.0%), agar gelrite (2,4 gL⁻¹) y se evaluaron las siguientes concentraciones de ácido indolbutírico AIB (mgL⁻¹): 0, 0,1, 1, 3 y 5.

Aclimatización. Las plantas se sembraron en dos sustratos, uno de arena y el otro de turba, para evaluar su comportamiento. En ambos casos las plantas se mantuvieron en cámara húmeda durante 15 días, luego se retiró la cubierta de la cámara y se dejaron en lugar sombreado pero con buena iluminación natural por otros 8 días.

Análisis estadístico. En todos los casos se utilizó un diseño completamente al azar con 30 repeticiones por tratamiento. Para los ensayos de proliferación se determinaron las variables correspondientes a número de brotes, altura (cm), número de hojas; adicionalmente, se midió una variable cualitativa que se denominó como vigor y se estableció una escala de 1 a 3, donde 1 correspondió a brotes con presencia de hiperhidricidad y de color verde claro, 2, a brotes con algunas deformaciones en las hojas y 3, a brotes con hojas bien formadas, color verde oscuro. En el enraizamiento se evaluó el porcentaje de plantas que formaron raíz, número de raíces y su longitud; y para la aclimatización se estudió el porcentaje de supervivencia a los 30 días después de la siembra. Todos los datos se sometieron a análisis de distribución normal, y en el caso de los porcentajes de enraizamiento se transformaron a arco seno ÖX. Se realizó análisis de varianza de una vía para determinar el efecto de los tratamientos y se utilizó el test de rangos múltiples de Duncan (P<0.05) para encontrar diferencias entre los tratamientos. Todos los datos se evaluaron con la utilización de StatGraphics plus versión 8.0.

Resultados y discusión

Selección de plantas madres. Las plantas seleccionadas tuvieron las siguientes características: diámetro del bulbo entre 5 y 7 cm; peso fresco 17,5 g; color

anaranjado intenso; brotes de aspecto vigoroso y una altura mínima de 1,5 cm. En la figura 1 se muestran las características generales de las plantas que se utilizaron para los ensayos de proliferación.

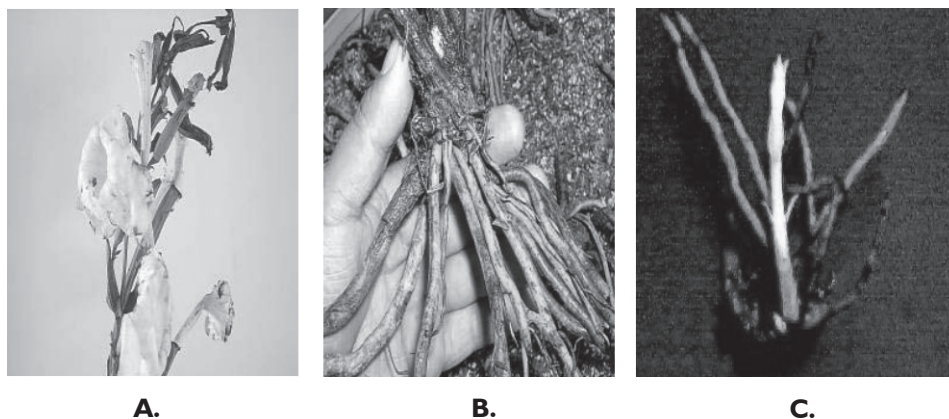


Figura 1. Selección de plantas madres de *Escobedia grandiflora* para los procesos de micropropagación. A. Planta en estado de floración. B. Raíces producidas en sistema semihidropónico. C. Brote emitido desde la raíz, utilizado como fuente de explante para la fase de establecimiento *in vitro*.

Establecimiento de los materiales. Como fuente de explantes se utilizaron entrenudos de 0,5 a 1,0 cm de altura, los cuales presentaron cerca de un 60% de supervivencia después del tratamiento de desinfección con nitrato de plata (1%) durante tres minutos. Estos se incubaron durante 30 días en condiciones de total oscuridad, con lo cual se obtuvieron brotes para iniciar la fase de proliferación.

Proliferación. En esta etapa se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de BAP sobre la proliferación. Según los datos mostrados en la tabla 1, no existen diferencias significativas para la producción de brotes, el mayor número de hojas y la mayor altura se presentaron en el tratamiento con la concentración de 5 mgL⁻¹ de BAP. En la medición del vigor de los brotes se encontró que con la concentración de 5 mgL⁻¹

las plantas tuvieron una mejor apariencia en cuanto a forma de las hojas, color verde oscuro y ausencia de hiperhidricidad (figura 2A). La utilización de la BAP ha sido empleada en otras plantas que producen carotenoides en sus raíces como es el caso de *Curcuma longa* y *Curcuma aromatica* donde las concentraciones entre 3 a 5 mgL⁻¹ presentaron la mejor respuesta con relación a la producción de brotes *in vitro* (Shukla, 2007). En general, de acuerdo con los resultados obtenidos, el promedio de los brotes correspondió a 2,4 por explante en un lapso de cuatro semanas. Un aspecto importante en los procesos de micropropagación es que, además del número de brotes, estos tengan la calidad, en este caso referida a su altura o al número de hojas e incluso a su apariencia general, para permitir tener un protocolo adecuado de multiplicación.

Tabla 1. Evaluación del efecto del BAP sobre la proliferación de brotes de *Escobedia grandiflora* L.

BAP (mgL ⁻¹)	Brotes (N.º)	Hojas (N.º)	Altura brotes (cm)	Vigor
0	2,4	6,9a	2,2a	1
0,5	2,1	6,6a	1,6a	2
1,0	2,1	6,1a	1,7a	2
3,0	2,7	7,9a	1,9a	2
5,0	2,5	10,4b	2,5b	3

Los datos representan la media de 30 repeticiones por tratamiento. Los promedios con letras diferentes presentaron diferencias significativas para $p < 0.05$ mediante el test de Duncan.

Enraizamiento. En la tabla 2 se muestran los resultados relacionados con el enraizamiento, donde las concentraciones entre 1 y 3 mgL⁻¹ presentaron los mayores porcentajes de enraizamiento y longitud de las raíces; con relación

al número de raíces, cuando se empleó 1 mgL⁻¹ el número promedio fue de 3,5. El enraizamiento de los brotes ocurrió aproximadamente a los 30 días, con una coloración anaranjada, gruesas y sin la formación de raicillas (figura 2B).

Tabla 2. Evaluación de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento de brotes de *Escobedia grandiflora* L.

AIB (mgL ⁻¹)	Enraizamiento (%)	Raíces N.º	Longitud (cm)
0	1,0c	0,1a	0,14a
0,1	26,7b	0,5ab	0,35a
1	56,7c	3,5c	0,52b
2	50,0c	1,6b	0,54b
3	40,0c	1,2b	0,47b

Los datos representan la media de 30 repeticiones por tratamiento. Los promedios con letras diferentes presentaron diferencias significativas para $p < 0.05$ mediante el test de Duncan.

Aclimatización. La aclimatización es una de las etapas más delicadas en el proceso debido a que las plántulas son particularmente sensibles a los cambios de ambiente, por ello es bueno

saber cuáles son las mejores condiciones para ellas. Se pudo determinar que el mejor sustrato para la aclimatización es el de arena (tabla 3) con un 95% de supervivencia de las plántulas. Las

condiciones ambientales de humedad relativa (80%) y temperatura promedio de 25 °C ± 2 °C permitieron obtener estos resultados. Las plántulas

se desarrollaron de manera normal y han mostrado características similares a las plantas madres (figura 2C).

Tabla 3. Evaluación de dos sustratos en la supervivencia de plántulas de *Escobedia grandiflora* L. enraizadas *in vitro*

Sustrato	Supervivencia (%)
Arena	95
Turba	70

El sustrato en turba presentó exceso de humedad, lo cual interfirió en la aireación del sistema radical

causando debilidad en las plantas y aumentando su susceptibilidad a hongos y mortalidad.

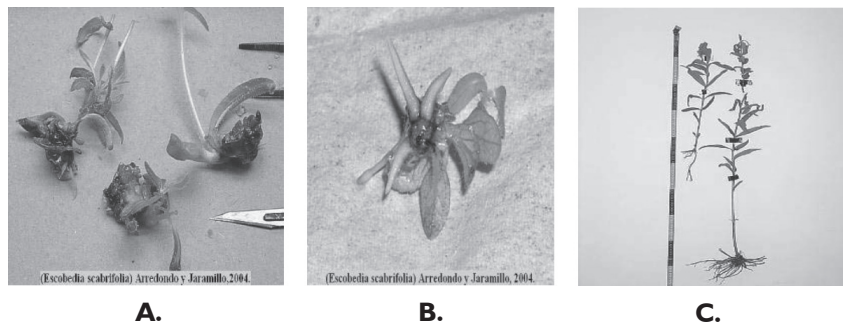


Figura 2. Plántulas micropropagadas de *S. grandiflora*. A. Brotes micropropagados con BAP (5 mgL⁻¹) que presentan una apariencia normal. B. Brotes enraizados con AIB (1 mgL⁻¹). C. Plántulas adaptadas a condiciones de exterior después de 30 días.

Conclusiones

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son una herramienta para la conservación y propagación de plantas que tienen algún riesgo de disminución de sus poblaciones, como es el caso del azafrán de raíz (*Escobedia grandiflora* L.). Los tratamientos evaluados para la proliferación no mostraron diferencias significativas respecto al número de brotes; sin embargo, con la

concentración de 5 mgL⁻¹ de BAP mostraron la mejor respuesta respecto al número de hojas, altura y vigor de los brotes. Para el enraizamiento, el AIB (1 mgL⁻¹) presentó la mejor respuesta con relación al número de raíces y su longitud. Durante la fase de aclimatación se logró un 95% de supervivencia cuando se utilizó arena como sustrato en condiciones controladas de humedad (80%) y temperatura (25 °C).

Referencias bibliográficas

- Arias, E. (1982). *Plantas medicinales*. 17.^a edición. Bogotá: Editorial Bedout.
- Carranza, G. y Medina, C. (2008). Una especie nueva de *Escobedia* (Orobanchaceae), del estado de Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana*, 85, 31-37.
- Chen, C. C., Chen, S. J., Sagare, A. P. and Tsay, H. S. (2001). Adventitious shoot regeneration from stem internode explants of *Adenophora triphylla* (Thunb.) A.DC. (Campanulaceae) – an important medicinal herb. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 1-7.
- Chueh, F. S., Chen, C.C., Sagare A. P. and Tsay, H. S. (2001). Quantitative determination of secoiridoid glucosides in *in vitro* propagated plants of *G. davidii* var. *formosana* by high performance liquid chromatography. *Planta Medica*, 67, 70.
- Eschenmoser, W., Uebelhart, P., Hans Eugster C. (1982). Synthese von (+)-(5*S*, 6*S*)-Azafrin-methylester; absolute Konfiguration von Aeginetinsäure and von weiteren vicinalen Apocarotin-diolen. *Helvetica Chimica Acta*, 65, 353-364.
- Fernández, A. (1987). Escrofulariáceas. En *Flora de la real expedición botánica del Reino de Granada (1783-1816)*, José Celestino Mutis. (tomo 39). Madrid, España: Ediciones Cultura hispánica.
- González, D. (1988). *Plantas medicinales: Un resumen de farmacognosia*. Bogotá: Tercer Mundo .
- Maisch, J. (1985). *American Journal of Pharmacy*, 57, 7. Pennsylvania, EUA.
- Marulanda, C. (2003). Hidroponía familiar de esperanzas con rendimientos de paz. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo, Alcaldía de Armenia, Cámara de Comercio de Armenia, Universidad Gran Colombia, seccional Armenia. Armenia: Impresión tudesco.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- Olmstead, R. G., Pamphilis, C.W de, Wolfe, A.D., Young, N. D., Elisons, W. J. y Reeves, P. A. (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *Amer. Journ. Bot.*, 88 (2), 348-361.
- Shukla, S. K., Shukla, S., Koche, V. and Mishra, S. (2007). In vitro propagation of tinkhur (*Curcuma angustifolia* R.): A starch yielding plant. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 247-276.

