UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)

“EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA EN LA EXPRESIÓN DE GENES Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ASOCIADO A LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FRUCTANOS DURANTE EL DESARROLLO DE AJO (*Allium sativum* L) VARIEDAD COREANO”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

I. en A. José Luis Lorenzo Manzanarez.

DIRIGIDO POR

Dra. Dulce María Rivera Pastrana.

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, ENERO DE 2015

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
PROPAC

EFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA EN LA EXPRESIÓN DE GENES Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ASOCIADO A LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FRUCTANOS DURANTE EL DESARROLLO DE AJO (*Allium sativum* L) VARIEDAD COREANO

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

I.A. José Luis Lorenzo Manzanarez

Dirigido por:

Dra. Dulce María Rivera Pastrana

SINODALES

Dra. Dulce María Rivera Pastrana
Presidente
Firma

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Secretario
Firma

Dr. Andrés Cruz Hernández
Vocal
Firma

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios
Suplente
Firma

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Suplente
Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro Qro.
Enero 2015
México

DEDICATORIAS

A mi mamá Adela Manzanarez Vázquez por su apoyo incondicional, durante el desarrollo de este trabajo. Hermanos, tíos y primos gracias a todos y por todo.

A mis asesores: Dra. Dulce M. Rivera Pastrana, Dr. Edmundo M. Mercado Silva, Dr. Andrés Cruz Hernández, Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios y Dr. Gerardo M. Nava Morales por sus asesorías, correcciones, experiencias, conocimiento y sobre todo el tiempo dedicado en la mejora del trabajo.

A mi tutor, Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez por su orientación y consejos durante la maestría.

A mis compañeras de generación del Lab. Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas, que con el tiempo se convirtieron en mis hermanas: Ana y Rossana las llevaré siempre en mi memoria y corazón.

A mis amigos de generación: Ely, Angy, Liz-josé, Magy, David, Honorio, Daniel, Diana, Dunia a todos muchas gracias.

A mis compañeros del Lab. Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas: Dalia, David, Elier, Francisco, Gisela, Humberto, Javier, Jimena, Paty, Paz, Rocío, Teresita Valeria y Ximena por su apoyo y colaboración en el desarrollo del trabajo.

A mis amigos del Lab. de Biomol: Agustín, Felix, Isaac, Jann, Ma. José, Poncho, Ricardo, Tania, Ximena por las vivencias.

A los miembros del IPICYT: Dr. Sergio Casas Flores y Dra. Mayte Cervantes por su colaboración en el trabajo.

AGRADECIMIENTO

- Al Departamento de Investigación y posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

- A los Productores de ajo del municipio de Rincón de Romos, Aguascalientes, especialmente al Ing. Ostilio.

- Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

El presente trabajo de Investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, Bajo la dirección de la Dra. Dulce María Rivera Pastrana

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L) es una planta monocotiledónea de la familia Alliaceae, su bulbo es ampliamente consumido por sus atributos culinarios y sus propiedades medicinales. Por su volumen de producción, el ajo, se ubica dentro de las 20 principales hortalizas a nivel mundial. Aunque la producción de ajo en México es baja; su calidad es muy apreciada en el mercado de exportación lo que permite su comercialización a Estados Unidos de América y La Unión Europea. Los factores de calidad del bulbo están relacionados con la adecuada secuencia de fotoperiodo y termoperiodo durante el ciclo de cultivo. No obstante, existen problemas de calidad cuando los factores ambientales no cumplen los requerimientos demandados por cada variedad. Se ha observado que un almacenamiento a 5 ºC durante cinco semanas previo a la siembra, adelanta la cosecha y disminuye la incidencia de bulbos con defectos. En este trabajo se comparó el efecto del almacenamiento de la semilla por 5 semanas a temperatura ambiente (TA) y a 5 ºC (5 ºC) antes de la siembra en el desarrollo de la planta, contenido de fenoles, flavonoides y fructanos totales, actividad enzimática de fenilalanina amonioliasa (PAL) y sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) y capacidad antioxidante de ajos de la variedad Coreano, los cuales fueron cultivados en la localidad de Cosío, Aguascalientes, Ags. en la temporada 2012-2013. El almacenamiento a 5 ºC incrementó el contenido de fenoles totales (39 %), flavonoides (24 %) y capacidad antioxidante (39 %) en de túnicas y el contenido de fructanos totales (17%) en bulbo durante el desarrollo en campo respecto al almacenamiento a TA. A su vez se encontró mayor actividad enzimática específica de PAL en túnicas (32 %) y de 1-SST (sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa) en bulbo (25 %) en la condición de 5°C al final del desarrollo. Después de las 5 semanas de almacenamiento a 5 °C, en los brotes de las semillas se incrementó la expresión en aproximadamente 9, 5, 24 y 18 veces los genes *AsPAL*, *AsC4H* (Cinnamato 4-hydroxilasa), *As4CL* (4Cumarato-CoA ligasa) y *As1-SST* respectivamente. A los 44 días de después de siembra (DDS) se observó una sobreexpresión en raíces de 5 °C de los genes *AsPAL* y *AsC4H* (33 y 15 veces respectivamente), y a los 106 DDS de los genes *As4CL* y *As1-SST* (6 y 7 veces respectivamente). Mientras que en disco basal proveniente de 5 °C se sobreexpresaron los genes *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* (10, 21, 10, 25 veces respectivamente) hacia el final del desarrollo (106 DDS). Estos resultados indican que el almacenamiento a 5°C por 5 semanas induce la sobreexpresión de genes de la ruta de los fenilpropanoides (*AsPAL, AsC4H* y *As4CL*) y fructanos (*As1-SST*) en diferentes tejidos la cual se mantiene durante el desarrollo de la planta y se correlaciona con el aumento de la actividad enzimática de PAL y 1-SST, así como con la acumulación de metabolitos primarios (fructanos) y secundarios (fenoles y flavonoides) como una respuesta al estrés generado por el acondicionamiento en frío. El acondicionamiento al frío de la semilla fue suficiente para inducir una respuesta de defensa contra el estrés oxidativo en la nueva planta durante el desarrollo, lo cual podría llevar a una mayor tolerancia del ajo a otros tipos de estrés y/o enfermedades.

(**Palabras clave**: Ajo, baja temperatura, expresión genética, fenoles, fructanos)

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is a monocotyledonous plant of the Alliaceae family, its bulb is widely consumed for its culinary attributes and their medicinal properties. By production volume, garlic, ranks among the 20 major crops worldwide. Although garlic production in Mexico is low; its quality is highly appreciated in the export market allowing trading with the United States and the European Union. The bulb quality factors are related to the proper sequence of thermoperiod and - photoperiod during the growing season. However, there are quality problems when environmental factors do not meet the requirements demanded by each variety. It has been observed that storage at 5 ° C for five weeks prior planting, forward harvest and decreases the incidence of defective bulbs. In this study, the effect of seed storage for 5 weeks at room temperature (RT) and at 5 °C (5 °C) before planting on total phenolic, flavonoids and fructans contents, enzyme activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) , sucrose-sucrose 1- fructosyltransferase (1-SST) and antioxidant capacity of garlic of the Coreano cultivar grown at Cosío, Aguascalientes, Ags. at the 2012-2013 season was determined during crop development. Storage at 5 ° C increased the total phenolic content (39%), flavonoids (24%) and antioxidant capacity (39%) in cataphyll tissues and the content of total fructans (17%) in the bulb during development in comparison with storage at RT. In turn higher specific enzymatic activity of PAL in cataphylls (32%) and 1-SST (sucrose-sucrose-fructosyltransferase-1) activity in bulb (25%) for the condition 5 °C at the end of development was found. After 5 weeks of storage at 5 °C, expression of genes *AsPAL*, *AsC4H* (cinnamate 4-hydroxylase), *As4CL* (4Coumarate-CoA ligase) and *As1-SST* in sprouting seeds increased approximately 9, 5, 24 and 18 fold respectively. At 44 days after sowing (DAS) overexpression of *As1-SST* and *As4CL* genes was observed (33 and 15 fold respectively) in roots of 5 °C, and at 106 DAS, *AsPAL* and *AsC4H* were overexpressed (6 and 7 times respectively). While in basal plate of 5 °C, *AsPAL, AsC4H, As4CL* and *As1-SST* genes were overexpressed (10, 21, 10, 25 fold respectively) towards the end of development (DDS 106). These results indicate that storage at 5 °C for 5 weeks induces overexpression of genes of the phenylpropanoid pathway (*AsPAL*, *AsC4H* and *As4CL*) and fructans metabolism (*As1-SST*) in different tissues of garlic which is maintained during the development of the plant and correlates with increased enzymatic activity of PAL and 1-SST as well as with the accumulation of primary (fructans) and secondary metabolites (phenols and flavonoids) as a response to stress generated by cold conditioning. The cold conditioning of the seed was sufficient to induce a defense response against oxidative stress in the new plant during development, which could lead to greater tolerance of garlic to other type of stress and / or diseases.

(Key words: Garlic, low temperature, gene expression, phenols, fructans**)**.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN……i
ABSTRACT……...ii
ÍNDICE GENERAL……..iii
ÍNDICE DE FIGURAS……...vi
ÍNDICE DE CUADROS……..……ix
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÓN DE LITERATURA 3
2.1 El ajo y su origen..... 3
2.2 Taxonomía 3
2.3 Morfología 4
2.3.1. Bulbo.....6
2.3.2. Bulbillos 6
2.4 Producción mundial y nacional de ajo (*Allium sativum* L.) 8
2.5. Desarrollo del cultivo de ajo. 10
2.5.1 Bulbificación.....13
2.5.2. Efecto de la temperatura ambiental en la bulbificación.....14
2.5.3 Defectos morfológicos del bulbo 15
2.5.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento en el desarrollo 16
2.5.5. Letargo de bulbillos.....17
2.6 Composición química del ajo 19
2.6.1 Compuestos fenólicos en ajo 20
2.6.1.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento en compuestos fenólicos en el ajo. 23
2.6.2 Fructanos en ajo 24
2.6.2.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento en contenido de fructanos en el ajo 26
2.8 Efecto de la temperatura en la expresión de genes en ajo 27
III. JUSTIFICACIÓN..... 30
IV. HIPÓTESIS..... 31
V. OBJETIVO..... 32
5.1 Objetivos Específicos. 32
VI. METODOLOGÍA..... 33

6.1 Diseño experimental 33
6.2 Desarrollo en campo y toma de muestras de ajo 34
6.3 Análisis de variables de crecimiento 36
6.3.1 Clasificación del calibre del bulbo 36
6.3.2 Peso de la cosecha y calibres 37
6.3.3 Presencia de defectos 37
6.4 Análisis bioquímicos..... 38
6.4.1 Contenido de fenoles totales 38
6.4.2 Contenido de Flavonoides totales.....39
6.4.3 Capacidad antioxidante 40
6.4.4 Cuantificación de fructanos totales 40
6.4.4.1 Extracción de fructanos 41
6.4.4.2 Remoción de sacarosa, almidón y azúcares reductores 41
6.4.4.3Hidrólisis y cuantificación de fructanos.....42
6.4.4.4 Estándar de fructosa 42
6.4.4.5 Blanco de reacción 43
6.4.4.6 Cálculo del porcentaje de fructanos 43
6.5 Análisis enzimáticos 45
6.5.1 Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL).....45
6.5.1.1 Extracción.....45
6.5.1.2 Medición de actividad enzimática de PAL 45
6.5.2 Actividad enzimática de sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (1-SST) 46
6.5.2.1 Extracción.....48
6.5.2.2 Precipitación de la proteína con actividad de 1-SST. 48
6.5.2.3 Medición de actividad enzimática 1-SST.....48
6.6 Análisis expresión de genes..... 49
6.6.1 Extracción de ARN total.....50
6.6.2 Síntesis de ADNc.....51
6.6.3 Expresión diferencial de genes 52
6.6.3.1 Diseño de oligonucleótidos.....52
6.6.3.2 Expresión de genes por PCR punto final.....53
6.6.3.3 Expresión de genes por Q-PCR 55

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN 58
7.1 Desarrollo en campo del cultivo 58
7.2 Análisis de las variables de crecimiento 60
7.2.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en la altura de la planta 60
7.2.2 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la semilla en el peso de la planta 61
7.2.3 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la semilla en el ancho de la hoja 63
7.2.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en el número de hojas 65
7.2.5 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en el índice de bulbificación 67
7.3 Análisis bioquímicos 69
7.3.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en el contenido de fenoles totales 69
7.3.2 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en el contenido de flavonoides 71
7.3.3 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en capacidad antioxidante 73
7.3.5 Fructanos totales 76
7.4 Análisis enzimáticos 78
7.4.1 Cambio en la actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL) 78
7.4.2 Cambio en la actividad enzimática de sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa (1-SST) 81
7.5 Análisis de expresión de genes 82
7.5.1 ARN total de ajo 83
7.5.2 Análisis y confirmación de genes de ajo por PCR-punto final 83
7.5.3 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la expresión relativa de genes en brotes 84
7.5.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la expresión relativa de genes en raíz 87
7.5.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la expresión relativa de genes en disco basal 89
VIII. CONCLUSIONES 94
IX. LITERATURA CITADA 95
X. ABREVIATURAS 110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Planta joven de ajo. Raíces adventicias (ra), tallo (t), bulbo (b) y hojas funcionarias (hf), (B) bulbo, (C) sección longitudinal del bulbo, (D) bulbillo o diente, (E) inflorescencia, escapo florar (ef), bulbillos aéreos (ha) y flores (fl).	5
2.	Sección longitudinal del bulbillo de ajo (*Allium sativum* L.) en brotación.	7
3.	Producción de ajo por continente.	8
4.	Esquema de las etapas de desarrollo del cultivo de ajo.	11
5.	Bulbo de ajo bien desarrollado y diferenciado “a”, ajo no diferenciado o acebollado “b” y ajo rebrotado “c”.	15
6.	Ruta de la síntesis de polifenoles, comenzando con la vía de fenilpropanoides, el cual conduce a la síntesis de flavonoides.	21
7.	Perfil y contenido de flavonoides en ajo.	22
8.	Apariencia visual de los bulbos de ajo (A y B) a los 122 días después de siembra (DDS), C y D bulbos al final del desarrollo. A y C bulbos provenientes de dientes “semillas” almacenadas a 5°C. B y D bulbos provenientes del almacenamiento a temperatura ambiente.	24
9.	Biosíntesis de fructanos en plantas.	25
10.	Estrategía experimental.	35
11.	Diagrama general para la determinación de fructanos totales.	44
12.	Diagrama general de la actividad de la sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa.	47
13.	Diagrama de flujo del análisis de expresión de genes.	50
14.	Esquema de la técnica de fluoróforos de unión al ADN.	56
15.	Perfil de amplificación de fluorescencia del producto de Q-PCR.	57
16.	Desarrollo del cultivo de ajo a los 44, 78, 129, 144 (cosecha 5°C) y 206 (TA cosecha) DDS respectivamente de ajo provenientes de bulbillos (dientes) que fueron almacenados a temperatura ambiente (TA) y 5°C durante 5.	59

17. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la altura de la plantas (cm) de ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. 60

18. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el peso (g) de plantas de ajos generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. 62

19. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el ancho de la hoja de ajos generados de “semilla” almacenadas a 5°C y TA. 64

20. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el número de la hoja de ajos generados de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. 66

21. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el índice de bulbificación del ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. 67

22. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de fenoles totales (mg EAG/g.m.s) en túnicas de ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. 69

23. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de flavonoides (mg Quercetina/g.m.s) en túnica de ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. 71

24. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la capacidad antioxidante por DPPH• (% inhibición del radical) en túnica de ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. 74

25. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el porcentaje de fructanos (% m.s.) en el disco basal y bulbo de ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. 76

26. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad específica de PAL (U/mg de proteína*h). 79

27. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad específica de *1-SST* (mg 1-Kestosa/mg de proteína). 81

28. Gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con Gel RedTM, carril 1: Brote 5ºC, carril 2: Brote TA, carril 3: Disco basal 5ºC, carril 4: Disco basal de TA, carril 5: Raíz 5ºC, carril 6: Raíz TA, carril 7: Raíz 5ºC y carril 8: Disco basal 5ºC. 83

29. Gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con Gel RedTM. Amplificación de genes *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* en disco basal provenientes de “semillas” almacenadas a 5 °C por 5 semanas. DDS=Días después de siembra. 84

30. Cambio en el número de veces en la expresión relativa de *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* en brotes provenientes de “semillas” almacenadas a 5ºC (experimental) con respecto a brotes a TA (control). 85

31. Cambio en la expresión relativa de los genes *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* en raíz durante el desarrollo provenientes de “semillas” almacenadas a 5ºC (experimental) respecto a TA (control) durante 5 semanas. 88

32. Cambio expresión relativa de *AsPA*L, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* en disco basal durante el desarrollo de “semillas” almacenadas a 5ºC (experimental) respecto a TA (control) durante cinco semanas. 89

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro **Página**

1. Clasificación taxonómica del ajo ……..……...… 4

2. Principales productores de ajo en el mundo.……..……..... 9

3. Principales productores de ajo en la República Mexicana……..……..… 10

4. Composición química de ajo (*Allium sativum* L.).……...…… 19

5. Diseño experimental de los tratamientos……..……..…… 33

6. Calibre comercial en relación al diámetro ecuatorial del bulbo……...……. 37

7. Componentes para la síntesis de ADNc.……..……...…… 51

8. Protocolo de reacción de la transcriptasa reversa……...……....… 52

9. Secuencias de oligonucleótido de genes utilizados para el PCR tiempo real junto con la temperatura de fusión (Tm), peso molecular (MW), porcentaje de guanina-citosina (%GC) y longitud de la amplificación……..…….. 53

10. Componentes para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)……. 54

11. Protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)…….…… 54

12. Mezcla de reacción para la PCR en tiempo real……...…..…. 56

I. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es ampliamente consumido por sus propiedades culinarias y medicinales, y se produce de manera vegetativa a través de los bulbillos (dientes).Este cultivo se encuentra dentro de las 20 principales hortalizas a nivel mundial. Para el año 2013, los principales países productores de este cultivo fueron: China, India, República de Corea y Egipto. En nuestro país la producción para ese año fue de 50,014 toneladas (FAOSTAT, 2013). Así mismo, los principales estados productores fueron: Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Baja California, Aguascalientes, Nuevo León, Puebla y Oaxaca (SIAP, 2013).

El ajo mexicano es considerado de alta calidad en el mercado de exportación debido a que cumple con los estándares de calidad que demandan dichos mercados; lo que permite su exportación a los Estados Unidos de América, Unión Europea, Australia y Canadá, aun cuando el volumen de exportación no son tan grandes como los de otros países. Sin embargo, la producción de ajo en nuestro país se redujo, teniendo una producción máxima en 1997 de 74 810 ton y al 2002 que registró un mínimo de 41300 ton, hasta el momento no ha recuperado sus máximos niveles de producción, esto debido al estancamiento del comercio de producto nacional por la incursión de ajo procedente de China en los mercados internacionales a precios bajos respecto de otros países productores (CONAJO, 2009).

Aunque las características de calidad de los bulbos se encuentran definidas en la Norma Oficial United States Standars for Grades of Garlic, de 1997, (http://www.ams.usda.gov) o en la Norma Mexicana (NOM) NMX-FF-018-SCFI-2006 (http://www.conajo.com.mx); éstas señalan los factores más importantes que la componen como el tamaño y la firmeza del bulbo, su forma regular, bajo número de dientes y ausencia de defectos (rebrotes, bulbos acebollados) los cuales conforman los descriptores más importantes para su comercialización.

Para obtener bulbos de buena calidad, es necesario tener durante las primeras etapas de desarrollo días fríos y fotoperiodo cortos, posteriormente cuando se encuentra en la etapa de formación hasta su cosecha, es importante tener días con temperaturas más elevadas y fotoperiodo largo. Estas condiciones ambientales promueven la adecuada formación y diferenciación de los bulbos (Burba, 1992 y Braz *et al*., 1997). La carencia o ausencia de estas condiciones en la etapa de desarrollo favorecen a la formación de bulbos “acebollados” o no diferenciados.

El Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro ha demostrado que un almacenamiento a 5 ºC durante cinco o seis semanas previas a la siembra, adelanta la cosecha y reduce la incidencia de bulbos con defectos. No obstante, este almacenamiento provoca cambios transcripcionales, en la sobre expresión de 15 genes relacionadas a fenilalanina amonio liasa (PAL), un gen de Cinnamato 4-hydroxilasa (C4H), un gen de la 4Cumarato-CoA ligasa (4CL), dos genes sacarosa-sacarosa 1fructosiltransferasa (1-SST) con 85, 50, 66 y 42 % de homología respectivamente. Mientras que otros 11 genes se reprimieron y otros 48 genes no sufrieron cambios (Zavala-Gutiérrez, 2011 y Dufoo *et al*., 2012)

A fin de entender con mayor amplitud la relación que existe entre los factores ambientales (en particular la temperatura) y los cambios en la expresión y regulación post-transcripcional de genes que llevan a la formación del bulbo; el presente trabajo de tesis pretende aportar información relacionada con los cambios en los niveles de expresión de los genes PAL, C4H, 4CL y 1-SST y su efecto en el metabolismo durante el desarrollo de plantas de ajo ‘Coreano’ obtenidas de bulbos almacenados a 5 °C y temperatura ambiente durante 5 semanas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El ajo y su origen

El ajo (*Allium sativum* L.) se incluye dentro de la familia Alliaceae (Takhtajan, 1997) y es uno de los cultivos hortícolas más antiguos conocidos. Existe una clara evidencia histórica de su uso. Su centro de origen es Asia central (Kasajastán, Uzbekistán y Turmenistán) de donde se expandió a Egipto y China (Mc Collin, 1976, Cabrera y Elliot 1996). Se ha señalado que el cultivo de ajo se derivó de una especie silvestre procedente de Asía y es esta región el "centro de origen". El centro de origen también se conoce como "centro de diversidad", ya que es donde se puede esperar la más amplia gama de variación genética (Simón, 2001). Tanto el ajo silvestre como el ajo cultivado a lo largo de la historia ha sido propagado asexualmente por a través de los brotes vegetativos bulbillos o dientes (Volk *et al*., 2004).

2.2 Taxonomía

En 1754 Carl Linnaeus asigno el nombre científico de *Allium sativum* al ajo (Batchvarov, 1993). Aunque existe una controversia según Hanelt (1990) respecto a la posición taxonómica del género *Allium* y otros géneros emparentados. En clasificaciones iniciales dicho género fue ubicado en la familia *Liliaceae* y hace aproximadamente 50 años fue incluido en la familia *Amaryllidaceae*. Debido a su distribución y propagación el género *Allium* es el más representativo e importante de la familia *Alliaceae*; cuenta con 450 especies de amplia distribución en el hemisferio norte. Además del ajo y la cebolla, existen otras especies que se cultivan ampliamente para su uso culinario, como el puerro (*Allium porrum* L.), cebollín (*Allium fistulosum* L.), ajo chalote (*Allium ascalonicum* Hort.), los silvestre (*Allium ursinum* L.), el ajo elefante (*Allium ampeloprasum* L. var. *ampeloprasum*), cebolleta (*Allium schoenoprasum* L.) y cebolleta Chino (*Allium tuberosum* L.). En la

clasificación taxonómica más reciente de las monocotiledóneas realizada por Hanelt (1990), el género *Allium* y sus parientes cercanos fueron incluidos en la familia *Alliaceae* (cercana a la *Amaryllidaceae*). La taxonomía del ajo se resume en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del ajo.

Clase	Monocotiledóneas
Superorden	*Lilliflorae*
Orden	*Asparagales*
Familia	*Alliaceae*
Tribu	*Allieae*
Género	*Allium*
Subgénero	*Allium*
Sección	*Allium*
Especie	*A. sativum*

(Hanelt, 1990)

2.3 Morfología

Es una planta herbácea erecta de 30 a 60 cm de altura, de raíces adventicias superficiales, los bulbos están compuestos por un tallo discoidal, hojas escamosas secas y delgadas que constituyen la base de las hojas fotosintéticamente funcionales (hojas aéreas) y bulbillos o dientes formados de yemas axilares de hojas funcionales más jóvenes. Las hojas funcionales son aplanadas, sólidas de 2.5 cm ancho aproximadamente, plegadas en forma longitudinal. De acuerdo a Takagi (1990) éstas varían en número, pero generalmente no son menos de 10, y se encargan de llevar a cabo la fotosíntesis

de la planta. Purseglove (1985) describe la estructura de la planta de ajo (*Allium sativum* L.) como se muestra en la Figura 1.

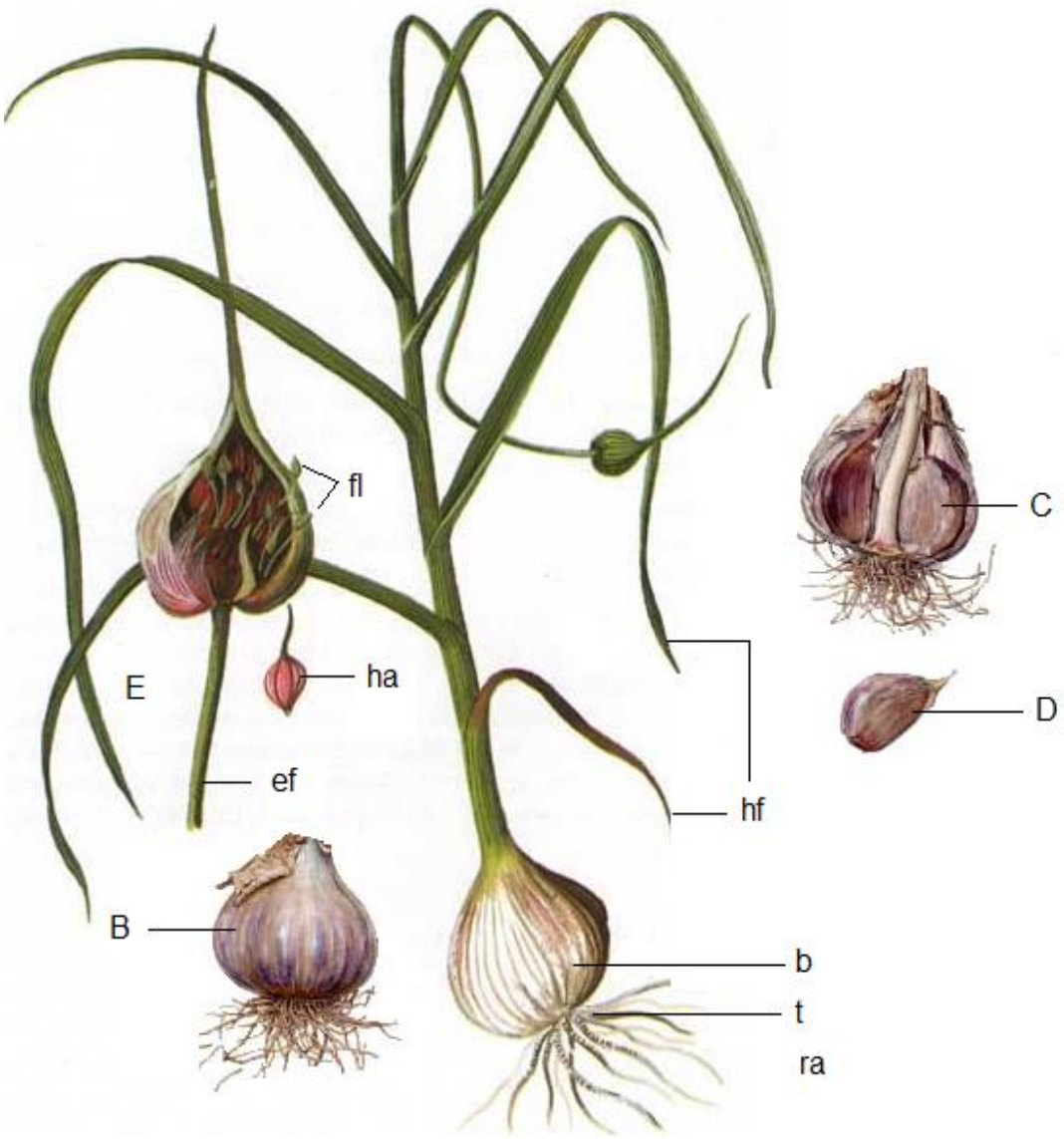


Figura 1. Planta joven de ajo. Raíces adventicias (ra), tallo (t), bulbo (b) y hojas funcionarias (hf), (B) bulbo, (C) sección longitudinal del bulbo, (D) bulbillo o diente, (E) inflorescencia, escapo florar (ef), bulbillos aéreos (ha) y flores (fl). (Purseglove, 1985).

2.3.1. Bulbo

El bulbo es un órgano de reserva aunque también es el órgano que contiene los elementos para su propagación debido que la planta de ajo no produce semilla y por lo tanto su propagación es de manera vegetativa a través de reproducción agámica. Este está compuesto por seis a doce bulbillos o dientes, ubicados en la base del tallo discoidal; a este conjunto de dientes se denomina bulbo o “cabeza de ajos”. Cada bulbillo se encuentra envuelto por una túnica delgada, el cual se caracteriza por presentar colores que van del blanco, morada o rojiza, dependiendo de la variedad y que en estructura son semejantes a las que cubren el bulbo.

2.3.2. Bulbillos

En la Figura 2 se observa sección longitudinal del bulbillo de ajo en brotación, el cual es un órgano formado por un tallo anual, yema central, hojas funcionales, hoja de almacenamiento y una hoja de protección, el cual consiste de una vaina foliar lignificada y seca, ésta es la responsable del color que caracteriza a los cultivares y que varía desde el blanco al púrpura.

Hacia el interior continúa otra hoja sin lámina denominada hoja de reserva o de almacenamiento, que representa entre el 90 y 95 % del peso total del bulbillo y en el cual se acumulan los fructanos. Después de esta hoja se observa la hoja funcional o de brotación, el cual se desarrolla durante el almacenamiento y puede ser utilizada como indicadora del estado de letargo.

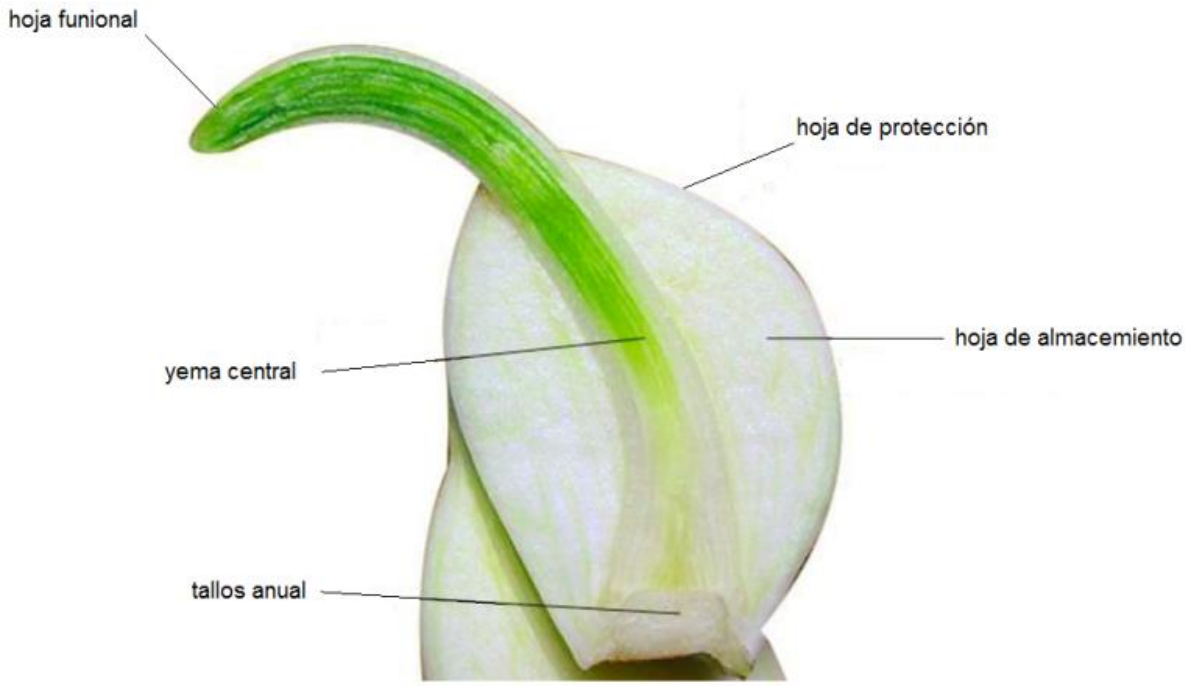


Figura 2. Sección longitudinal del bulbillo de ajo (*Allium sativum* L.) en brotación.

Protegidos por la hoja de brotación, se encuentran varios primordios, llamados hojas verdaderas los cuales son responsables de la arquitectura normal de la planta. Todas las hojas que forman el diente están asentadas sobre un pequeño tallo anual o disco, el cual posee primordios radicales (Izquierdo *et al*., 1992).

El bulbillo o diente se originan en la axila de las hojas fértiles o dentadas y están apoyados sobre el tallo anual o “disco”. Debido a su estructura son órganos de propagación por la presencia de yemas vegetativas en estado de letargo, las cuales se activan durante el crecimiento para generar una nueva planta bajo determinadas condiciones ambientales (Utrilla-Vazquez, 2008).

2.4 Producción mundial y nacional de ajo (*Allium sativum* L.)

En la Figura 3 se observa la producción mundial de ajo en el año del 2012-2013, la producción se ubicó en 22.7 millones de toneladas, el 91.5 % de esta producción se originó en el continente asiático, mientras que el continente europeo aportó 3.1 % y el americano aportó el 2.7 %, África contribuyó con el 2.7 % y Oceanía fue el continente que no aportó a la producción.

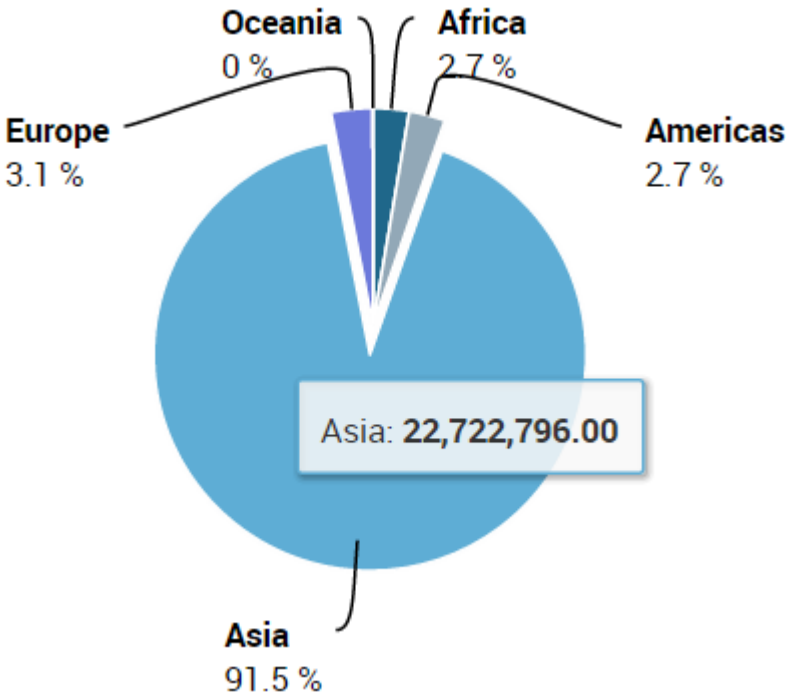


Figura 3. Producción de ajo por continente, (FAOSTAT, 2012-2013).

Esto es debido que la mayor proporción de la superficie dedicada al cultivo del ajo se concentra en los países asiáticos, principalmente China, que en el año 2012-2013 alcanzó más del 60 % de la superficie cosechada y un 91.5% de la producción mundial (FAOSTAT, 2012-2013).

Analizando la producción de este cultivo por país, China es el principal productor con más del 81 %, seguido de India y República de Corea (Cuadro 2). China, además de ser el principal productor de ajo, también es el mayor exportador de esta hortaliza a nivel mundial, aunque exporta menos de 10% de su producción. Esto hace que la situación de esta hortaliza en China sea determinante en el comercio internacional del ajo (FAOSTAT, 2013).

Cuadro 2. Principales productores de ajo en el mundo.

País	Producción (ton)
China	20,082,000
India	1,150,000
República de Corea	339113
Egipto	309155
Federación de Rusia	213480

(FOASTAT, 2013)

A nivel nacional, en el 2013 la producción de ajo en México fue de 59,014 toneladas; este valor representó el 7.75 % de la producción en todo el continente Americano. (FAOSTAT, 2013).

El Cuadro 3 muestra los principales estados productores de ajo y su producción en toneladas correspondiente al año 2013. Destacan por su importancia Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Baja California, Aguascalientes y Nuevo León (SIAP, 2013), quienes en conjunto produjeron más de 50 mil toneladas .de ajo en este año.

Cuadro 3. Principales productores de ajo en la República Mexicana.

Estado	Producción (ton)
Zacatecas	26,832
Guanajuato	8,248
Sonora	4,695
Baja California	4,460
Aguascalientes	3,522
Nuevo León	3,251
Puebla	2,269
Oaxaca	1,237
Querétaro	803
San Luis Potosí	775

(SIAP, 2013)

2.5. Desarrollo del cultivo de ajo.

El ajo se caracteriza por ser cultivado en zonas de clima templado y su siembra se realiza en verano o en otoño y se cosecha hasta el final de la primavera; siendo el tiempo de cosecha dependiente de la región y la variedad del cultivo (Ledesma *et al.,* 1980).

La primera etapa de desarrollo corresponde al crecimiento vegetativo del ajo, en donde los procesos metabólicos y fisiológicos están encaminados a la formación radicular (alargamiento de las raíces) y a las hojas de brotación, esta etapa del proceso se observa durante el otoño y parte del invierno y es dependiente de sustancias liberadas por la hoja de reserva del bulbillo, lo cual provoca una disminución del peso seco del diente madre. El aporte de reservas

por parte del bulbillo se mantiene por un largo periodo, aún después de que planta haya emergido y se encuentra realizando fotosíntesis. La etapa de crecimiento vegetativo se realiza en condiciones de días cortos y con temperaturas bajas (Racca *et al*., 1981). Los factores ambientales intervienen en el desarrollo y crecimiento de la zona radicular y del área foliar lo cual tendrán por ello una influencia directa en el rendimiento final del cultivo. La inducción y el desarrollo del bulbo y el escapo floral requieren del cumplimiento de una etapa de vernalización (bajas temperaturas) seguida de fotoperiodos largos (Rahim y Fordham, 2001).

Portela y Cavagnaro (2005), elaboraron una escala grafica del crecimiento de las plantas de ajo blanco y violeta que integran las cinco etapas fenológicas más importantes del ciclo de cultivo que incluyen el crecimiento de la parte aérea y del bulbo las cuales se describen a continuación (Figura 4):

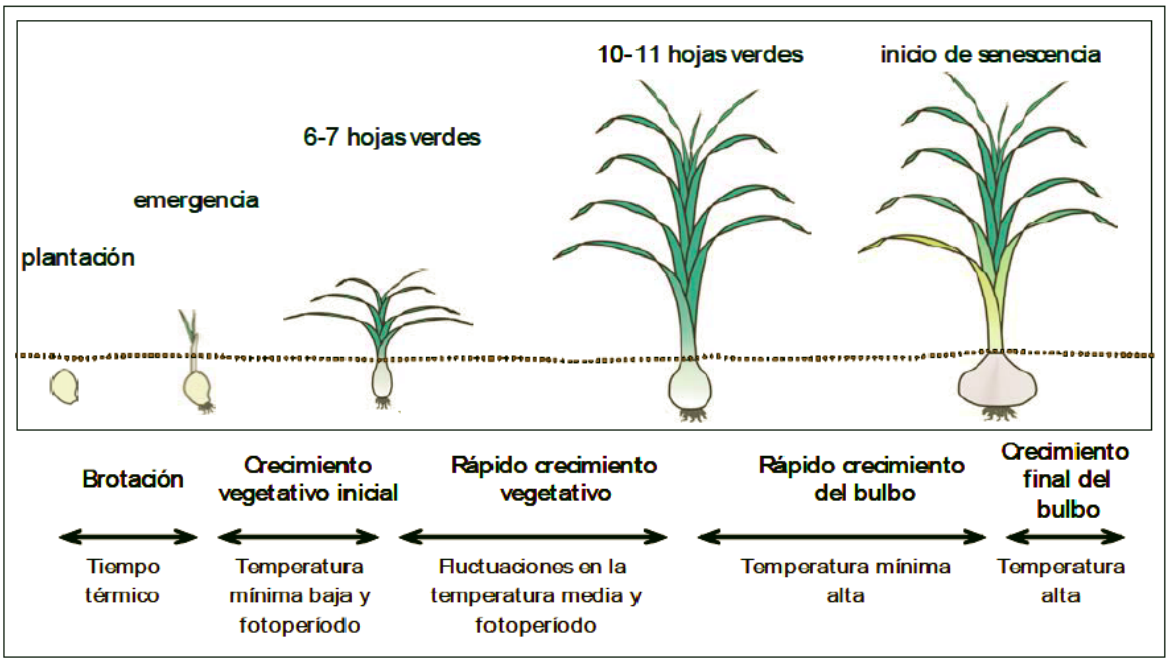


Figura 4. Esquema de las etapas de desarrollo del cultivo de ajo (Portela y Cavagnaro, 2005).

1. Brotación: Se inicia con la plantación de los bulbillos y culmina con la emergencia de la hoja de brotación sobre la superficie del suelo; su duración depende de la acumulación de temperaturas (sumatoria de tiempo térmico en grados-día), de la disponibilidad de agua y de la variedad.

2. Crecimiento vegetativo inicial: En esta etapa hay un bajo ritmo de acumulación de materia seca, en la que esencialmente se expanden las hojas preformadas a partir de la activa removilización de reservas desde el bulbillo; su duración depende de las temperaturas mínimas que tiene el sitio de cultivo durante el invierno y del fotoperiodo que se alcanza al término de esta estación. Si las temperaturas mínimas son muy bajas y constantes, el fin de esta etapa puede adelantarse (es decir, la longitud del día necesario para pasar a la etapa siguiente es menor).

3. Crecimiento vegetativo rápido: El crecimiento de la parte aérea es muy activo, el cual está acompañado por días largos y temperaturas altas. Su duración está definida por la longitud del día y las temperaturas medias diarias las cuales pueden hacer variar marcadamente el ritmo de crecimiento de la planta. Las bajas temperaturas hacen esencialmente más lento el crecimiento del bulbo, que se encuentra en proceso de formación. Esta etapa es muy importante porque al inicio de la misma tiene lugar la primera etapa de diferenciación del bulbo (el inicio de las yemas laterales), mientras que a su término ocurre la segunda etapa (la transición de la hoja de reserva), quedando a partir de allí establecida definitivamente la formación del nuevo bulbo.

4. Crecimiento rápido del bulbo: La planta inicia el “llenado” del bulbo a una velocidad alta y su duración depende de las temperaturas mínimas, como sucede en la etapa 2, aunque en este caso se indica que son las temperaturas máximas y no las mínimas las que, según estos autores, controlan esta etapa; esto significa, que la ocurrencia de noches muy cálidos pueden acelerar el paso a la siguiente etapa.

5. Crecimiento final del bulbo: el ritmo de “llenado” del bulbo disminuye respecto de la etapa anterior, mientras que la planta se acerca al estado de dormición; va desde el inicio de la senescencia, hasta la muerte de la parte aérea de la planta y, al igual que la etapa 4, su duración está controlada por las temperaturas mínimas diarias; lo usual es que esta etapa no termine de ocurrir en el campo y se recomienda cosechar los bulbos cuando las hojas de las plantas aún mantienen actividad biológica aunque se encuentran en su etapa senescencia.

2.5.1 Bulbificación

La bulbificación del ajo es un proceso morfogénico en el cual las yemas vegetativas (bulbillo o diente) se desarrollan de las yemas axilares. El inicio de la formación del bulbo constituye un estado del cultivo de suma importancia ya que a partir de este momento disminuye hasta ser nula la ganancia de peso seco de la parte aérea y radicular (Bertoni *et al*., 1992). El bulbo se convierte a partir de este momento en el órgano de mayor demanda de fotoasimilados hasta que ocurre la senescencia del cultivo (Rizzalli *et al*., 2002).

El proceso es inducido por la interacción entre la duración del fotoperiodo y la temperatura. La formación del bulbo inicia por un estímulo termo y fotoperiódico que se caracteriza a través de dos etapas. La primera llamada “inductiva” en la cual, el frío y los días cortos serían factores imprescindibles. En la segunda etapa, llamada “morfológica” (temperaturas en ascenso y alargamiento de los días), las condiciones termo y fotoperiódicas son sólo capaces de modificar la velocidad del proceso de bulbificación (Portela, 1996). La bulbificación comienza con el hinchamiento de las bases de las hojas afiladas y luego con el hinchamiento de los primeros dientes formados. Los dientes continúan desarrollándose en las axilas de las hojas internas del follaje conforme avanza el proceso de bulbificación. Durante la bulbificación, las hojas jóvenes en desarrollo terminan de formar las partes afiladas pero desarrollan en hojas hinchadas u hojas del bulbo. La bulbificación se puede caracterizar por un incremento en la relación del diámetro máximo del bulbo

con respecto al diámetro mínimo del pseudo tallo o cuello del bulbo, esta relación se denomina ‘índice de bulbificación’. Cuando el bulbo madura, la hoja de cubierta más externa hasta la tercera más interna, se convierten en cubiertas más delgadas, secas y protectoras como una cubierta de papel. Ya que las hojas afiladas dejan de formarse en las hojas internas del bulbo, el pseudo tallo queda vacío. También los tejidos de la cubierta en la región media del cuello se ablandan y ocasionan finalmente, la caída del follaje o senescencia. La senescencia de las hojas, es un indicador útil de la madurez del bulbo y por tanto un índice de cosecha (Brewster, 1994).

2.5.2. Efecto de la temperatura ambiental en la bulbificación

En la etapa de desarrollo inicial se requiere de un clima fresco a frío (5 y 10 °C) con el objetivo de diferenciar las yemas axilares en el bulbillo y periodos caluroso y luminoso cuando se inicia la formación y diferenciación del bulbo hasta su cosecha (Giaconi y Escaff, 1993).

Los dientes almacenados a temperaturas de 5 o 10 ºC y posteriormente cultivados en campo a temperaturas altas, aumentan su velocidad de formación de bulbos en comparación de aquellos que son almacenados a temperaturas de 15 y 20 ºC y sembrados a temperaturas bajas. La temperaturas elevadas del suelo generan en la primera etapa del desarrollo una alta tasa de acumulación de materia seca en el bulbo, pero posteriormente disminuye; debido a la rápida senescencia tanto de las hojas como de raíces (Rahim y Fordham, 2001).

La ausencia o carencia de las condiciones antes mencionadas en el desarrollo vegetativo de la planta provoca una deficiencia en la formación del bulbo. Por otro lado si el tiempo de las condiciones óptimas fue corto en la primera etapa del desarrollo se promueve la malformación de bulbos hasta la falta de túnicas de protección (Messiaen *et al*., 1993).

2.5.3 Defectos morfológicos del bulbo

Con la finalización del ciclo vegetativo, los bulbos deben ser cosechados. Si los factores ambientales fueron óptimos el bulbo debe tener las siguientes características: una apariencia uniforme, redonda y al cortarse transversalmente, deben presentar los bulbillos bien diferenciados y cubiertos por varias capas externas (Figura 9a).

Figura 5. Bulbo de ajo bien desarrollado y diferenciado “a”, ajo no diferenciado o acebollado “b” y ajo rebrotado “c” (López-Hernández, 2010).

Uno de los principales defectos del cultivo de ajo es el denominado acebollado (Figura 5b), recibe este nombre porque el bulbo presentan características morfológicas que semejan una cebolla, una base globosa, una mínima o nula formación de bulbillos y con vainas concéntricas grandes y gruesas (Portela, 1997).

El defecto de acebollado se atribuye a fotoperiodos largos y temperaturas altas inmediatamente después de la plantación, que promueven una rápida diferenciación de las hojas de almacenamiento, así que los dientes pueden formar ramificaciones axilares anticipadamente, resultando en bulbos de un solo diente. También se ha observado que una bulbificación demasiado rápida ocasiona este

fenómeno de formación de un solo diente en el ápice foliar sin la generación de yemas laterales previo al desarrollo de los dientes y sin desarrollo de inflorescencia. (Brewster, 1994).

El “rebrote” (Figura 5c), es la formación de tallos laterales en la planta del ajo debido al crecimiento secundario. Tiene lugar durante el cultivo una vez que se ha completado la inducción del mismo para bulbificar, y se evidencia en la cosecha como bulbos abiertos (con gran espacio entre bulbillos), poco firmes e irregulares. Comercialmente, estos bulbos resultan defectuosos, y el “rebrote” se considera como una enfermedad de tipo fisiogénica (Portela, 1998). Lee y Moon (1982) señalan que el crecimiento secundario se asocia a una alta actividad de fitohormonas, como las giberelinas, una de las características de estas fitohormonas es que pueden conjugarse con compuestos nitrogenados y esta conjugación podría representar un almacenamiento dentro de la planta, el cual provoca el crecimiento secundario.

2.5.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento en el desarrollo

La formación natural de los bulbos es promovido por la presencia de temperaturas bajas y fotoperiodos cortos seguidos por temperaturas mayores y también por fotoperiodos largos de acuerdo con Racca *et al*., (1981); Takagi (1990) y Rahim y Fordham (2001). No obstante, se ha observado que un almacenamiento de los bulbillos a temperaturas de 0 y 10 ºC por 30 y 60 días previo al cultivo, puede suplir la demanda de temperaturas bajas del campo de siembra (Braz *et al.,* 1997). Por otro lado, Ferreira *et al.,* (1987) sometieron los dientes de ajo cv ‘Quitéria’ a un almacenamiento previo a la plantación en refrigeración (3 ±1 °C) durante 0, 15, 30 y 45 días, donde observaron que la refrigeración causó una brotación más rápida, una mejora en la inducción la bulbificación y un adelantó en el ciclo vegetativo.

2.5.5. Letargo de bulbillos

El bulbillo o diente de ajo recién cortado se encuentra en un estado de letargo o dormición, por lo que no brota si es plantado inmediatamente después de su cosecha, aún en condiciones óptimas. La dormición de una yema está definida como el estado de suspensión temporal del crecimiento visible aun cuando el órgano se encuentre en condiciones ambientales que promueven el mismo. Esta suspensión del crecimiento es causada por factores fisiológicos endógenos. La etapa de letargo se puede dividir en tres estadios: pre dormición, dormición y post dormición. El primer estadío incluye la entrada en este estado fisiológico controlada fundamentalmente por factores externos y los relacionados con las últimas etapas del cultivo antes de la cosecha; el segundo es debido exclusivamente a factores internos y la post dormición nuevamente controlada por las condiciones ambientales imperantes (Zavala-Gutiérrez, 2011).

Durante la formación y el crecimiento del bulbo, los fotosintatos elaborados en las hojas se transportan al bulbo; este transporte es fundamentalmente de carbohidratos, también incluye sustancias inhibidoras que afectarán el comportamiento durante el letargo. Por esta razón, una defoliación, desecamiento o cosecha prematura puede actuar negativamente en el almacenamiento, al establecerse, por menores niveles de inhibidores, un letargo menos profundo y de menor duración (Stahlschmidt, 1989).

En el almacenamiento de los bulbos, el fenómeno de letargo decrece gradualmente a temperaturas de 5 a 10 °C y con menor velocidad cuando la temperatura es más elevada. Los bulbos brotan más rápido y más vigorosamente, mostrando pseudo tallos más gruesos y hojas más largas a una temperatura de almacenamiento de 5 a 10 °C. Tanto el proceso de dormición como el de brotación

están regulados por un balance entre compuestos hormonales, los cuales funcionan como promotores e inhibidores del crecimiento del ajo (Mann, 1952).

Takagi (1990) señala que la tasa a la cual declina la dormición depende fuertemente de la temperatura de almacenamiento y de la variedad del ajo. La temperatura efectiva para disminuir la dormición depende fundamentalmente de la fase de dormición en que se encuentran los dientes. En general, el almacenamiento a 5 °C es efectivo para interrumpir la dormición cuando los dientes están en un verdadero estado de letargo, inmediatamente después de su cosecha y durante la post dormición.

Messiaen *et al.,* (1993) enfatizaron que es lógico pensar, que cada grupo varietal, representa una combinación particular para los caracteres; profundidad de dormición, facilidad de romper ese letargo con tratamientos a baja temperatura, requerimiento de frío para la diferenciación de yemas axilares y requerimientos de días largos y temperaturas elevadas para la bulbificación y crecimiento del bulbo. El ajo requiere la dormición para estimular la germinación y desarrollo del bulbo.

Durante la hibernación, los brotes y los bulbillos son a menudo dañados por las temperaturas bajo cero. Por lo tanto, la tolerancia al frío es un rasgo importante del ajo a pesar de que la profundidad fisiológica del requisito de dormición varía dependiendo de la variedad. Mientras que las variedades meridionales pueden hibernar en temperaturas cálidas (5 - 10 ºC), las variedades del norte pueden tolerar temperaturas más frescas, incluidas las temperaturas de congelación menores a 0 ºC (Jae-Han S. *et al*., 2012).

2.6 Composición química del ajo

En el Cuadro 4 se observa la composición química del ajo, estos valores pueden variar dependiendo del cultivo o variedad, prácticas agronómicas, condiciones ambientales, composición del suelo y condiciones de almacenamiento poscosecha. El agua es el componente mayoritario en la composición del ajo, los carbohidratos son el componente principal de la materia seca, los carbohidratos tipo fructanos representan más del 65 %; además es una buena fuente de vitamina C así como de potasio (Fenwick y Hanley, 1990).

Cuadro 4. Composición química de ajo (*Allium sativum* L.).

Componente	Valor	Unidades
Agua	58.58	g
Proteínas	6.36	g
Lípidos	0.5	g
Glúcidos	33.06	g
Fibra	2.1	g
Tiamina	0.1	mg
Riboflavina	0.11	mg
Vitamina	31.2	mg
Niacina	0.7	mg
Calcio	181	mg
Hierro	1.7	mg
Magnesio	25	mg
Fósforo	153	mg
Potasio	401	mg
Selenio	14.2	mg
Valor energético	149	kcal

*Composición por 100 g de producto fresco (USDA, 2014).

El aroma característico de la planta de ajo se debe a un aceite esencial que en su composición incluye el disulfuro de alilo, trisulfuro de alilo y el disulfuro de propilo. El origen de este producto se debe a la oxidación, por calentamiento o al aire libre, del principio activo fundamental la alicina. La enzima responsable de la transformación bioquímica se denomina aliinasa, que se activa al romperse los tejidos del diente, en el proceso se descompone una molécula de aliina dando lugar a una de alicina más dos moléculas de ácido pirúvico y dos de amoniaco (García-Alonso, 1998).

2.6.1 Compuestos fenólicos en ajo

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en las plantas (Javanmardi *et al*., 2003). Son particularmente importantes en frutas y verduras contribuyendo al color y sabor. Por otra parte, los compuestos fenólicos de frutas y verduras contribuyen a la ingesta de antioxidantes y se presume que tienen una acción protectora de la salud en los seres humanos (Macheix *et al*., 1991). La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) se considera que es la enzima principal de la vía de los fenilpropanoides (Figura 6), catalizando la transformación, por desaminación, de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico, que es el primer intermediario en la biosíntesis de compuestos fenólicos.

Los Fenilpropanoides se producen constitutivamente en tejidos específicos de plantas y tipos de células, actuando como fitoalexinas, filtros solares UV, pigmentos, moléculas de señalización y los principales componentes estructurales (Christelle *et al*., 2009).

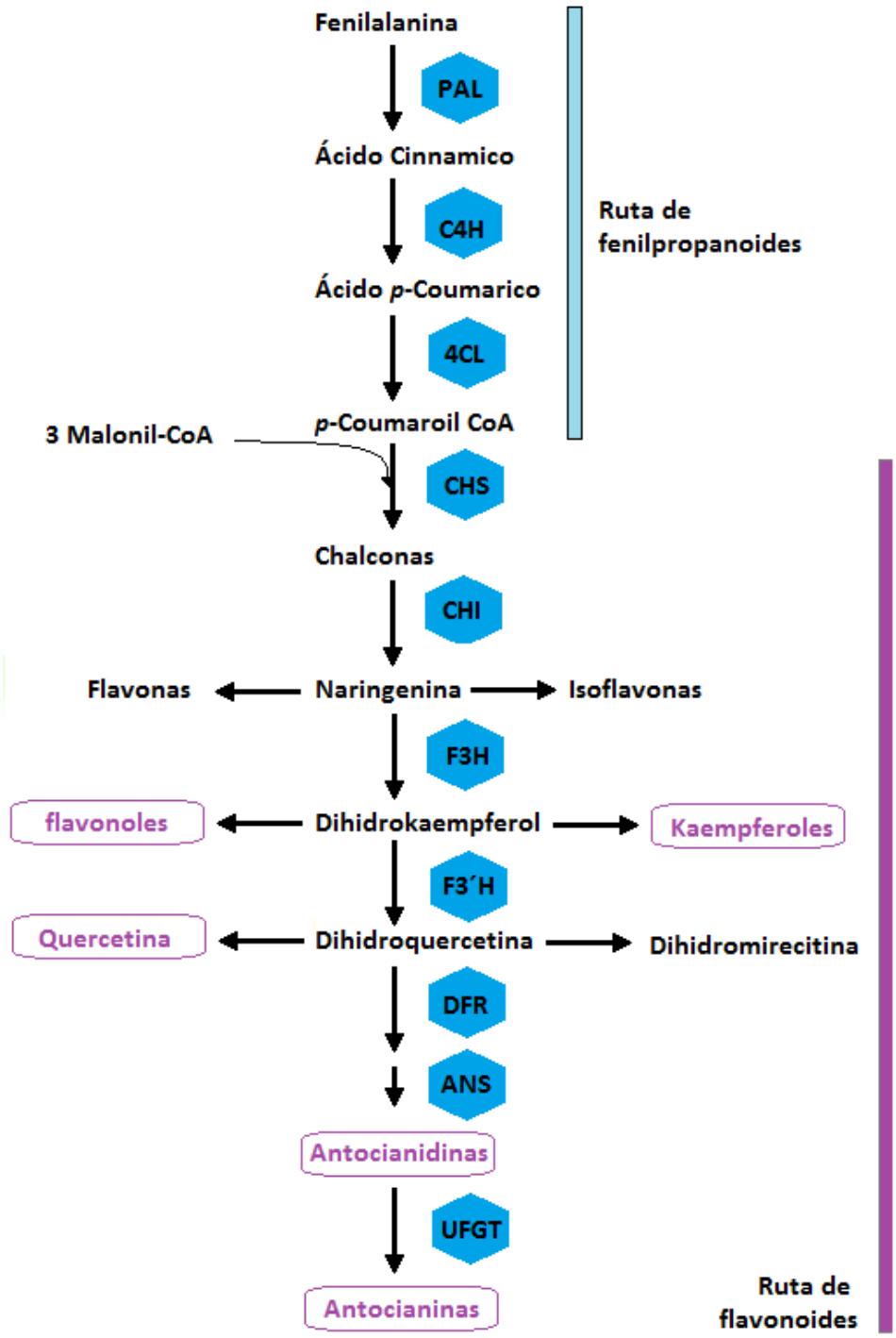
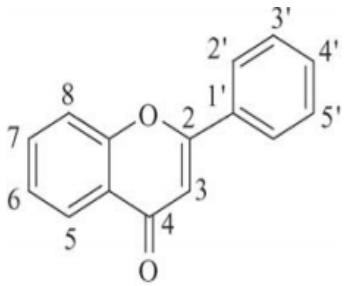


Figura 6. Ruta de la síntesis de polifenoles, comenzando con la vía de fenilpropanoides, el cual conduce a la síntesis de flavonoides (Christelle *et al*., 2009).

Por otro lado, se ha observado que diferentes fenoles, en especial los flavonoides presentes en los bulbos y túnicas de ajo confieren capacidad antioxidante. Miean y Mohamed (2001) analizaron compuestos fenólicos y los principales flavonoides en el ajo y sus actividades antioxidantes mediante HPLC en fase reversa. , reportando un contenido de 639.0 mg/kg de miricetina, 47.0 mg/kg de quercetina y 217.0 mg/kg de apigenina. Estos componentes confieren la capacidad de inhibición del radical por el método de DPPH•, también se ha observado que el ajo tiene la actividad antioxidante más alta contra los radicales peroxilo (Figura 7).



Compound	Subst.	Content in garlic (mg/Kg)
Apigenin (**52**)	4′, 5, 7 $(OH)_3$	217
Isorhamnetin (**53**)	3, 4′, 5 $(OH)_3$; 7 (OCH_3)	n.d.
Kaempferol (**54**)	3, 4′, 5, 7 $(OH)_4$	n.d.
Luteolin (**55**)	3′, 4′, 5, 7 $(OH)_4$	n.d.
Quercetin (**56**)	3, 3′, 4′, 5, 7 $(OH)_5$	47
Myricetin (**57**)	3, 3′, 4′, 5′, 5, 7 $(OH)_6$	693

m.a., minor amounts; n.d., not detected.

Figura 7. Perfil y contenido de flavonoides en ajo (Miean y Mohamed *et al*., 2001).

2.6.1.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento en compuestos fenólicos en el ajo.

Se ha observado que la actividad de PAL aumenta en respuesta al estrés térmico y es considerado por la mayoría de los autores, ser una de las principales líneas de aclimatación celular contra el estrés en las plantas (Leyva A. *et al*., 2005). Dufoo *et al*., (2013) encontraron que el almacenamiento a 5 ºC por 5 semanas de los dientes “semilla” de ajo, acelera el desarrollo de este cultivo en campo, disminuye el crecimiento vegetativo, incrementa el contenido de compuestos fenólicos y antocianinas en las túnicas.

Se observaron que los ajos que fueron sometidos a esta condición de almacenamiento por 5 semanas, al final del desarrollo en campo presentaron mayor pigmentación morada en las túnicas. Posiblemente, debido al incremento compuestos fenólicos, específicamente antocianinas que provienen de la ruta de los fenilpropanoides (Figura 8).

El incremento de la actividad de la PAL está relacionado con el incremento de los metabolitos secundarios de la vía de los fenilpropanoides y con ello se esperaría un incremento en la capacidad antioxidante de la planta, producto del estrés o el acondicionamiento de los dientes “semillas” previo a la siembra. Se ha observado que el incremento de PAL aumenta la pigmentación en hojas de plantas.

Figura 8. Apariencia visual de los bulbos de ajo (A y B) a los 122 días después de siembra (DDS), C y D bulbos al final del desarrollo. A y C bulbos provenientes de dientes “semillas” almacenadas a 5°C. B y D bulbos provenientes del almacenamiento a temperatura ambiente (Dufoo *et al.*, 2013).

2.6.2 Fructanos en ajo

La mayoría de las plantas almacenan almidón o sacarosa como hidratos de carbono reserva, aproximadamente 15 % de las plantas con flores almacenan fructanos como la principal fuente de reservas. En las plantas, los fructanos tienen otras funciones además del almacenamiento de carbono fotosintético, pues están implicados en la protección de la planta contra el déficit de agua debido a la sequía o a las bajas temperaturas (Hendry y Wallace, 1993; Pilon-Smiths *et al*., 1995).

El sustrato para la síntesis de fructanos es la sacarosa, y tanto ésta como fructosa son almacenadas en la vacuola. Aunque la sacarosa sea sintetizada en el citoplasma, los fructanos son producidos en la vacuola por la acción de dos o más

enzimas con especificidades distintas (fructosiltransferasas) para los sustratos del fructosil-donador y fructosil aceptor (Figura 9).

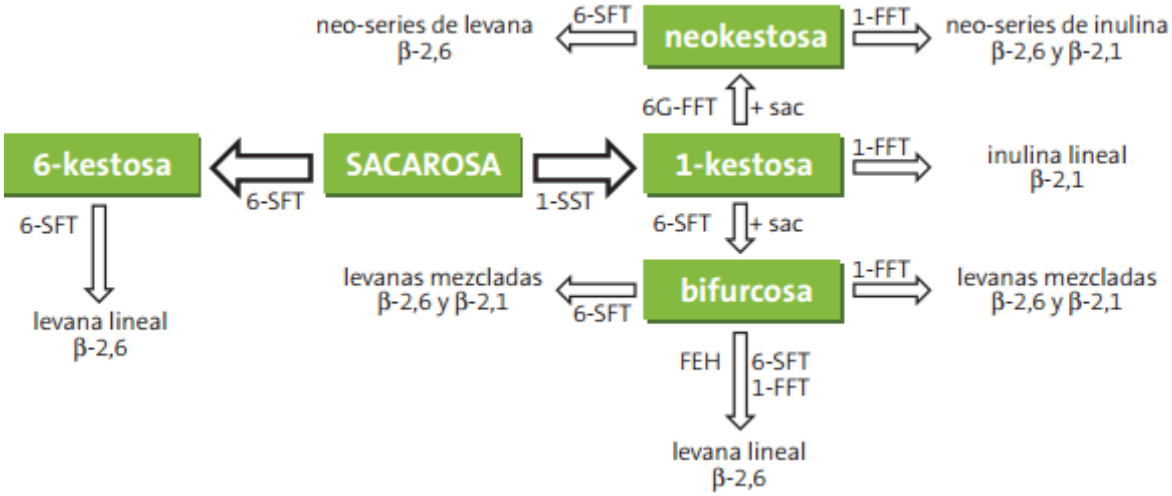


Figura 9. Biosíntesis de fructanos en plantas (Vijn y Smeekens, 1999).

La actividad fotosintética alta está relacionada con niveles elevados de la exportación del carbono del cloroplasto al citoplasma, resultando en un incremento de intermediarios para la síntesis de sacarosa. La sacarosa sintetizada puede ser distribuida a la vacuola (almacenamiento) o al apoplasto (exportación). En la vacuola, la sacarosa puede ser convertida a fructanos por la acción de fructosiltransferasas o ser hidrolizada en glucosa y fructosa por invertasas (Vijn y Smeekens, 1999).

Inicialmente la enzima 1-SST toma dos moléculas de sacarosa uniendo el residuo fructosil de una de ellas para unirlo al otro residuo fructosil de la otra molécula generándose una molécula de glucosa y un oligofructósido o trisacárido (1-Kestosa); el cual puede ser polimerizado por la participación de la enzima fructosa fructan-fructan-fructosil transferasa (1-FFT) que transfiere, de modo reversible, un fructosil de un fructano con un grado de polimerización mayor o igual a tres a la molécula de 1-kestosa generando así inulina cuya estructura es

lineal de diferente grado de polimerización. No obstante, la propia 1-SST puede también llevar a cabo la formación de nistosa (G1-2F1-2F1-2F) una inulina de un grado de polimerización de 4.

En las especies de la familia de las Lilaceas, a la cual pertenece el ajo y la cebolla, en adición a la inulina, se pueden sintetizar fructanos del tipo neoseries de inulina formados por la polimerización de la neo-kestosa. La formación de neo-kestosa es catalizada por la acción de la enzima 6 glucosa fructan-fructosil-transferasa (6G-FFT) que une el residuo fructosil de una molécula de 1-kestosa al carbono 6 del residuo de glucosa de una molécula de sacarosa. La extensión de la molécula de neo-kestosa se lleva a cabo por la participación de la enzima 1-FFT que generará diferentes neoseries de inulina con diferentes grados de polimerización. En general se ha mencionado que los grados de polimerización de estos fructanos es dependiente del tipo de planta y por lo tanto de las características de la enzima 1-FFT particular; por lo que en ajo se reportan grados de polimerización de más de 50 mientras que en cebolla se señalan grados de polimerización de 6-12.

2.6.2.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento en contenido de fructanos en el ajo

En el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortaliza se observado que el tamaño de los nuevos bulbos es menor en aquellos que provienen de “semillas” almacenadas a 5 ºC por 5 semanas que a TA. Vázquez-Mandujano (2009), quien evaluó la actividad de la 1-SST y su relación con la acumulación de fructanos durante el desarrollo del ajo, encontró mayor actividad específica de esta enzima a los 155, 229 y 259 DDS en bulbos proveniente de semillas almacenadas a 5ºC que en 10ºC y TA, asi como mayor contenido de fructanos en pseudotallo a los 155 DDS en los bulbos proveniente de

5°C que en TA. López Hernández (2010) encontró mayor contenido de fructanos en bulbos originados de semillas almacenadas a 5ºC (56 %) que en TA (34.4%) durante los 157 DDS, mientras que en tallos observó mayor porcentaje de fructanos en TA que en 5ºC, aunque fueron disminuyendo durante el desarrollo del cultivo, ambos resultado sugiere que los fructanos son almacenados por un tiempo corto en el pseudotallo y tallo y luego son transportado al bulbo.

2.8 Efecto de la temperatura en la expresión de genes en ajo

Para los análisis moleculares existen técnicas modernas de amplificación de genes utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual permite la amplificación de secuencia de nucleótido (ADN y ARN) atreves de ciclos repetitivos. En los últimos años, se han realizado variantes de PCR para mejorar el rendimiento y la especificidad y para lograr la amplificación de otras moléculas de interés en la investigación como ARN. Algunas de estas variantes son: 1). PCR Multiplex que amplifica varias secuencias simultáneamente de ADN (por lo general secuencia de exones); 2) PCR Nested el cual aumenta la especificidad del producto amplificado para una segunda PCR con nuevos oligonucleótidos que se hibridan dentro del fragmento amplificado en la primera PCR; 3). PCR punto final que permite una aproximación a la cantidad relativa de los ácidos nucleicos presentes en una muestra; 4). RT-PCR (transcriptasa reversa) que genera ADNc (ADN complementario al ARN) a través de la amplificación del ARN y 5). PCR en tiempo real que lleva a cabo la cuantificación absoluta o relativa de copias de ácidos nucleicos obtenidos por PCR (Hernández y Gómez, 2012).

Zavala-Gutiérrez, (2011) estudió los cambios en el perfil transcriptómico por hibridación sustractiva de brotes de ajo procedentes de bulbillos “semilla” almacenados a diferentes temperaturas (TA y 5 °C). Encontró 85 genes, de los cuales 20 se sobreexpresaron (11 genes de isoenzimas de fenilalanina amonio

liasa y 2 del metabolismo de fructanos), 17 genes se reprimieron y 48 no sufrieron cambios.

Pham *et al*., (2011), realizaron una clonación molecular y caracterización de los genes de fenilalanina amonio-liasa y Cinamato 4-hidroxilasa en Ajo (*Allium sativum*), observaron que la expresión de *AsPAL* y *AsC4H* fue mayor en las raíces y baja en los bulbillos, Estos resultados sugieren que algunos fenilpropanoides se sintetizan en las raíz y posteriormente pueden ser transportados a los bulbillos de *A. sativum*.

Jae-Han S. *et al*., (2012) aislaron genes de respuesta al frío de ajo de la var. "coreana" a través de análisis sistemáticos de genes expresados de manera diferencial mediante secuencias de ADNc y amplificación por Differential Display (DD)-PCR, transcripción inversa (RT)-PCR y cuantitativa (Q)-PCR. De los 2470 transcritos encontrados, 76 fueron regulados y 20 no fueron regulados en respuesta a las bajas temperaturas (4 º C) según lo determinado por análisis de DD-PCR. Los análisis por RT-PCR y PCR-Q muestran que 15 genes son regulados y cuatro no. De los 15 genes fueron afectados, 11 genes fueron homólogos a genes de regulación a estrés abiótico regulados en otras especies y cuatro genes no se han encontrado similitudes con secuencias conocidas. La manipulación genética de los genes de respuesta al frío obtenidos puede proporcionar una herramienta molecular para mitigar los daños causados por las heladas en la plantas de ajo durante la hibernación.

A pesar que se ha demostrado el efecto del almacenamiento a 5 °C en el adelanto del ciclo del cultivo de ajos, debido a la expresión de genes durante el almacenamiento, pero los mecanismos durante el desarrollo y el flujo de metabolismo aún no han sido elucidados. Con la finalidad de entender el efecto que provoca el almacenamiento de la "semilla" a 5 °C durante 5 semanas previo a la siembra en el ajo durante su desarrollo en campo. Este trabajo de tesis aporta

información relacionada con los cambios en los metabolitos primarios (fructanos totales) y secundarios (fenoles totales, flavonoides totales y su efecto antioxidante), así como los cambios en la actividad específica de las enzimas relacionadas a la síntesis de fenilpropanoides (fenilalanina amonio liasa, PAL) y fructanos (sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa ,1-SST) y su correlación en la sobreexpresión de los genes de fenilalanina amonio liasa (*AsPAL*), Cinnamato 4-hydroxilasa (*AsC4H*), 4Cumarato-CoA ligasa *(As4CL)* y sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (*As1-SST*), durante el desarrollo de plantas de ajo 'Coreano' obtenidas de bulbos almacenados a 5 °C y temperatura ambiente.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la calidad de los bulbos de ajo está determinada por la variedad, sus prácticas culturales y por los factores ambientales de temperatura y fotoperiodo, estos últimos son difícilmente controlables y por ello las expectativas de buenas cosechas son inciertas en cada temporada; por ello es importante acumular conocimiento de cómo esos factores ambientales generan respuestas específicas en el desarrollo de los bulbos para que este conocimiento forme la base de acciones tecnológicas que pudieran mejorar las prácticas agronómicas para su producción.

Aunque se han establecido bases para adelantar la cosecha y disminuir la incidencia de defectos de ajo ‘Coreano’, a través del acondicionamiento de los dientes semilla a bajas temperaturas el conocimiento del efecto que hace este tratamiento en la expresión de genes todavía es muy limitado.

Por ello el presente trabajo de tesis aportar mayor información a nivel molecular y bioquímico del efecto de la baja temperatura de almacenamiento de los dientes semilla en la expresión de los genes de fenilalanina amonio liasa (*AsPAL*), Cinnamato 4-hydroxilasa (*AsC4H*), 4Cumarato-CoA ligasa (*AsC4H*) y sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (*As1-SST*) y en la actividad específica de la enzimas PAL y 1-SST durante el desarrollo de las plantas de esta variedad.

IV. HIPÓTESIS

El almacenamiento del bulbillos “dientes” a baja temperatura induce cambios en los niveles de expresión de genes y actividad enzimática asociados a la síntesis de compuestos fenólicos y fructanos durante el desarrollo en campo de ajo (*Allium sativum* L) cv. “Coreano”.

V. OBJETIVO

Estudiar la relación en los cambios de la expresión de genes, la actividad enzimática y la producción de metabolitos observados durante el desarrollo de los bulbos de ajo variedad 'Coreano' en campo cuyos dientes semillas se almacenaron a 5 °C y temperatura ambiente.

5.1 Objetivos Específicos.

1.- Evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento de 5 °C durante 5 semanas de la "semilla" en el desarrollo de la plantas en campo.

2.- Determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y fructanos totales y evaluar su correlación con la actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa y sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa respectivamente.

3.-Evaluar el efecto del almacenamiento a 5 °C de la "semilla" previo a la siembra en la expresión relativa de genes de la ruta de fenilpropanoides (fenilalanina amonio liasa, Cinnamato 4-hydroxilasa y 4Cumarato-CoA ligasa) y fructanos (sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa) en ajo durante el desarrollo de bulbos en campo.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño unifactorial con dos niveles, siendo el factor de estudio la temperatura de almacenamiento de los dientes “semilla” a temperatura ambiente y 5 °C, se realizaron tres repeticiones por tratamiento que se describen en el Cuadro 5. Se sembraron 231 dientes “semilla” de los tratamientos TA y 5 ºC, los cuales fueron plantados en un huerto comercial de Cosío, Aguascalientes, (102°18' longitud oeste y 22°22' latitud norte, a una altura de 2.000 metros sobre el nivel del mar) sobre surcos independientes de doble hilera, distribuidos completamente al azar dentro de la producción del terreno. Durante el desarrollo del cultivo se realizaron cuatro muestreos. De cada tratamiento se recolectaron 5 plantas al azar en cada muestreo (unidad experimental).

Cuadro 5. Diseño experimental de los tratamientos

Factor	**Tratamiento**	**Número de repeticiones**	**Número de muestreos**	**UE***
Temperatura de almacenamiento	TA	3	5	5
	5 ºC	3	5	5

UE*=Unidad experimental de 5 plantas

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico JMP versión 10.0. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza con $p\pm$ 0.05 en el que se comparó el efecto del tratamiento en cada periodo de muestreo; al encontrar diferencia significativa se aplicó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con $\alpha \leq 0.05$.

6.2 Desarrollo en campo y toma de muestras de ajo

La estrategia general realizada en este trabajo se muestra en la Figura10. Bulbos 'semilla' de ajo cv “Coreano” obtenidos de la temporada 2012-2013, se separaron en dos grupos y se almacenaron a temperatura ambiente (TA) y 5°C durante cinco semanas respectivamente.

Posteriormente, los bulbos se desgranaron y fueron seleccionados aquellos dientes con un peso entre 5 y 6 g, posteriormente se formaron dos conjuntos de 250 dientes para ser sembrados a doble hilera a 7 cm de distancia, esto se realizó en un huerto comercial en Cosío, Aguascalientes. Las prácticas culturales aplicadas fueron las recomendadas por el Consejo de Ajo de Aguascalientes.

Después de la siembra se realizaron muestreos mensuales, en el cual se recolectaron 5 plantas al azar de cada tratamiento y sus respectivas réplicas; las plantas fueron llevadas al laboratorio donde se separaron las túnicas, disco basal, bulbos, raíces y las hojas, los cuales fueron congelados con nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C hasta su análisis de compuestos fenólicos, fructanos, flavonoides, capacidad antioxidante, actividad enzimática y expresión de genes asociados al metabolismo de fructanos así como la ruta de los fenilpropanoides.

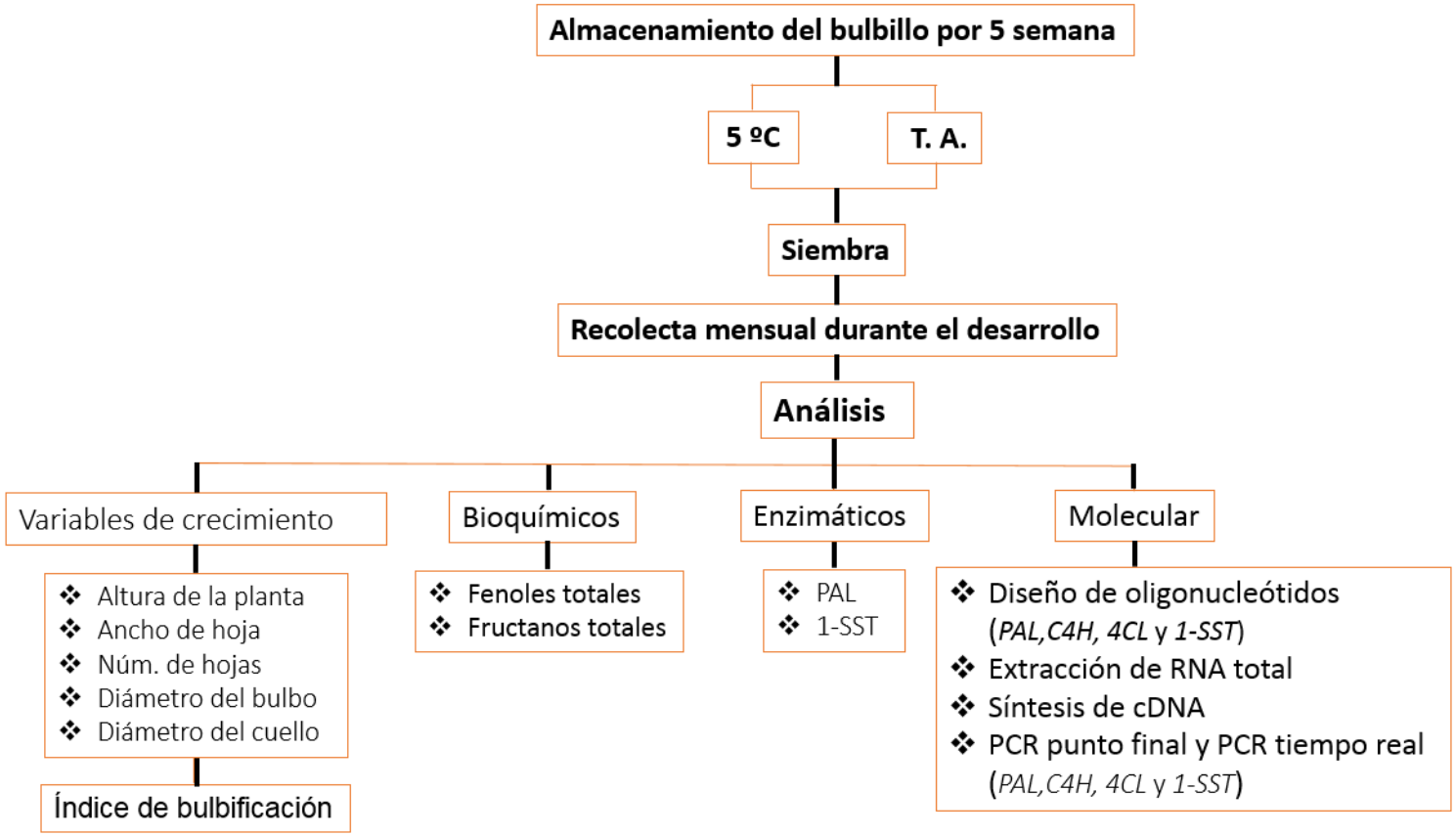


Figura 10. Estrategia experimental.

6.3 Análisis de variables de crecimiento

Se realizó un monitoreo del crecimiento de las plantas en campo durante 4 muestreos. En cada muestreo se tomaron 5 plantas al azar de cada tratamiento; los cuales se colocaron en hielo y se transportaron al laboratorio para medir los parámetros fisiológicos: Altura de la planta (se midió a partir del disco basal del bulbo hasta el extremo de la hoja más larga), ancho y número de hojas (se medió el ancho de la base de la primera hoja fisiológicamente activa y se contaron las hojas totales de cada planta), peso fresco (se determinó por una balanza digital de cada planta), diámetro del cuello (en la medición se usó un vernier digital), diámetro del bulbo (en la medición se usó un vernier digital) e índice de bulbificación (IB): esta variable de respuesta se determinó mediante la relación del diámetro del bulbo y el diámetro del cuello, (Mann., 1952) con la siguiente formula.

IB = diámetro del bulbo/diámetro del cuello.

6.3.1 Clasificación del calibre del bulbo

La clasificación se realizó mediante una carta de calibre comercial de acuerdo a su diámetro ecuatorial (Cuadro 6). Los datos se relacionaron a los cinco metros donde se plantaron los dientes y se extrapoló a una hectárea para calcular el rendimiento global y la producción de cada calibre de bulbos por hectárea.

Cuadro 6. Calibre comercial en relación al diámetro ecuatorial del bulbo.

Diámetro ecuatorial (cm)	Número del calibre
4.5	< 6
5.0	6
5.5	7
6.0	8
6.5	9
7.0	10
7.5	11
8.0	12
8.5	> 12

6.3.2 Peso de la cosecha y calibres

Después de la clasificación por calibre, los bulbos se pesaron y se contaron el número de cabezas por calibre para cada tratamiento, estos datos se extrapolaron a una hectárea con los cuales se analizaron los efectos de los tratamientos en el rendimiento global y la calidad. Para el cálculo por hectárea, se consideró que las plantas fueron sembradas a una distancia de 7 cm entre planta y planta y en surcos de doble hilera separados 85 cm entre cada surco.

6.3.3 Presencia de defectos

Se observaron las características visuales de los bulbos cosechados y se identificaron la presencia de alguno de los siguientes defectos: ajos “acebollados” o ausencia de dientes, mal llenado (falta de madurez), bulbos irregulares, daño mecánico. Con el peso de estos ajos y el peso total del tratamiento, se obtuvo el porcentaje de ajos defectuosos.

6.4 Análisis bioquímicos

6.4.1 Contenido de fenoles totales

Para la extracción de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante se siguió el protocolo descrito por Rivera-Pastrana *et al*., (2013), para el cual se pesaron 0.5 g de túnica. Estos fueron homogenizados en 40 mL de metanol (80 %). El homogenizado fue centrifugado a 9,400 g por 30 min a 4ºC en una centrifuga Beckman J2-MC. Se recolectó el sobrenadante y se filtró a través de papel Whatman número 1.

La medición de los compuestos fenólicos de las túnicas de ajo se realizó por el reactivo Folín-Ciocalteu (FC) el cual está formado por mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3HW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolíbdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). El reactivo FC es inespecífica a los compuestos fenólicos, ya que se puede reducir muchos compuestos no fenólico (vitamina C, Cu (I), etc.). Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo FC sólo bajo condiciones básicas (ajustados por una solución de carbonato de sodio a pH ~ 10). La disociación de un protón fenólico conduce a un anión fenolato, que es capaz de reducir el reactivo FC. Esto apoya la noción de que la reacción se produce a través del mecanismo de transferencia de electrones. Los compuestos azules formados entre fenolato y reactivos FC son independientes de la estructura de los compuestos fenólicos, por lo tanto se descarta formación de complejos de coordinación entre el centro metálico y los compuestos fenólicos (Huang *et al*., 2005).

El contenido de fenoles totales fueron medidos de acuerdo a Rivera-Pastrana *et al*., (2013), 50 µL del extracto fueron mezclados con 3 mL de H_20 y 250 µL Folin-Ciocalteu. Se dejó equilibrar por 15 min la reacción, posteriormente

se adicionó 750 µL Na_2CO3 (20 %) y 950 µL de H_2O. Después de mezclar en el vortex, la reacción fue incubada por 30 min a temperatura ambiente (en ausencia de luz). La absorbancia fue medida a 765 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA). El contenido de fenoles totales fue calculado en base a una curva estándar de ác. gálico; los resultados fueron expresado como mg de equivalente de ác. gálico por 100 g de materia seca (mg EGA/100 g.m.s.).

6.4.2 Contenido de Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales en las túnicas de ajo se realizó por el método de Al (III). El método se basa en la nitración de cualquier anillo aromático que lleva un grupo catecol con sus tres o cuatro posiciones no sustituidos o no estéricamente bloqueado. Después de la adición de Al (III), se forma una complejo de color amarillo, que luego se vuelve a color rojo después de la adición de NaOH, y el valor de la absorbancia se mide a 510 nm (Pękal & Pyrzynska, 2014)

El contenido de flavonoides totales fue determinado de acuerdo a lo reportado por Rivera-Pastrana *et al.,* (2013), con algunas modificaciones. 1 mL del extracto metanólico se mezcló con 4 mL de H_20 y 300 µL de $NaNO_2$ (5 %). La mezcla se agitó y se dejó incubar por 5 min, después se adicionó 300 µL de $AlCl_3$ (10 %) y se dejó reaccionar un minuto más. Posteriormente, se adicionó 2 mL de NaOH (1M) y 2.4 mL de agua. Después de agitar, se determinó la absorbancia a 415 nm, en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA). El contenido de flavonoides totales fue calculado en base a una curva estándar de quercetina; los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de quercetina por 100 g de materia seca (mg quercetina/100 g.m.s.).

6.4.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de la túnicas se realizó por el método de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), que nos permite evaluar la actividad de sustancias frente al radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) en una solución metanólica que tiene un color violeta intenso que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra que contiene antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm (Huang *et al*., 2005).

La actividad de captación de radical de túnicas de ajo fue medido en el extracto metanólico por la metodología de DPPH• descrito por Rivera-Pastrana *et al.,* (2013). En donde 0.1 mL del extracto metanólico se adicionó a 3.9 mL de solución metanólica de DPPH• (0.025g/L). El cambio en la reducción del color de la solución de DPPH• fue medido en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA) a 515 nm después de 30 min de reacción a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Los resultados fueron expresado como porcentaje de inhibición de DPPH•.

6.4.4 Cuantificación de fructanos totales

La cuantificación de fructanos totales se realizó en el bulbos y disco basal, mediante el método enzimático y espectrofotométrico de la AOAC a través del Kit de Megazyme fructans HK assay (McCleary *et al.,* 2000) (Figura 11).

El procedimiento involucra 3 reacciones:

1.- Hidrólisis de la sacarosa a D-fructosa y D-glucosa mediante el uso de la enzima sacarasa (EC. 3.2.1.10).

2.- Hidrólisis del almidón y los maltosacaridos presentes en la muestra a D-glucosa por la acción combinada de β-amilasas (EC. 3.2.1.3), pululanasas (EC. 3.2.1.41) y maltasas (EC. 3.2.1.20) altamente purificadas.

3.- Hidrólisis de los fructanos a D-fructosa y D-glucosa, usando fructanasa (E.C. 3.2.1.7) purificada.

6.4.4.1 Extracción de fructanos

Las muestras a analizar fueron liofilizadas y molidas. 50 mg de la muestra liofilizada se mezcló con 20 mL de H_2O destilada a 80 ºC con agitación durante 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó a un volumen de 25 ml (solución 1).

6.4.4.2 Remoción de sacarosa, almidón y azúcares reductores

200 µL de la solución 1 se mezcló con 200 µL de la solución de sacarasa/amilasa, la mezcla se incubó a 40 ºC durante 30 min (para provocar la hidrólisis enzimática del almidón y sacarosa presentes en la muestra). A la mezcla se adicionó 200 µL$NaBH_4$, el cual se agitó en un vortex y se incubó a 40 ºC por 30 min (para convertir los azucares reductores a alcohol). Posteriormente, se adicionó 500 µL de ácido acético (200mM) y se agitó en un vortex, (para remover el exceso $NaBH_4$ y se ajusta el pH a 4.5).

6.4.4.3Hidrólisis y cuantificación de fructanos

200 µL de la solución anterior se colocaron en 3 tubos de ensayo (cada tubo se marcó de manera numérica; 1,2 y 3 respectivamente). A los tubos 1 y 2se les añadió 100 µL de la solución de fructanasa (hidrolisis de fructano contenido en las muestras a azucares reductores; glucosa y fructosa), al tubo 3 se le añadió 100 µL de buffer acetato de sodio 100mM pH 4 (el cual se consideró como el blanco de la muestra). Los tubos fueron incubados a 40 ºC durante 60 min. A los tres tubos se añadió 5 mL de hidrazida (PAHBAH) y se incubaron en baño de agua a 100 ºC por 6 min (el reactivo PAHBAH reacciona con los azucares reductores presentes en las muestras produciendo un color amarillo). Después, los tubos se colocaron inmediatamente en baño de agua fría (18 – 20 ºC por 5 minutos). La absorbancia se midió a 410 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA).

6.4.4.4 Estándar de fructosa

Se tomaron 200 µL de la solución de D-fructosa (1.5 mg/mL) se mezcló con 900 µL de buffer acetato de sodio (100mM pH 4.0), de esta mezcla se tomó 200 µL se colocaron en cuatro tubos de ensayo, a cada tubo se les añadió 100 µL de buffer acetato de sodio 100mM pH 4.0 y 5 mL de PAHBAH y se incubaron en baño de agua a 100 ºC por 6 min. Después, los tubos se colocaron inmediatamente en baño de agua fría (18 – 20 ºC por 5 min). La absorbancia se midió a 410 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA).

6.4.4.5 Blanco de reacción

300 µL de buffer acetato de sodio 100mM pH 4.0 se mezcló con 5 mL de PAHBAH y se incubó en baño de agua a 100 ºC por 6 min. Después, se enfrío en agua fría (18 – 20 ºC por 5 min). La absorbancia se midió a 410 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA).

6.4.4.6 Cálculo del porcentaje de fructanos

El porcentaje de fructanos (p/p) presentes en las muestras se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

% fructanos (p/p) = ΔA x F x 5 x V x (1.1/0.2) x (100/W) x (1/1000) x (162/180)

% fructanos (p/p) = ΔA x Fx (V/W) x 2.48

ΔA= Promedio de la absorbancia de la muestra (tubo 1 y 2) – absorbancia blanco muestra (tubo 3).

F= factor de conversión (54.5 µg D-fructosa/promedio de las absorbancias estándar de fructosa).

V= Volumen (mL) de extracto usado (50 o 100mL), para el ajo se utiliza 50 mL

W= peso de la muestra (mg).

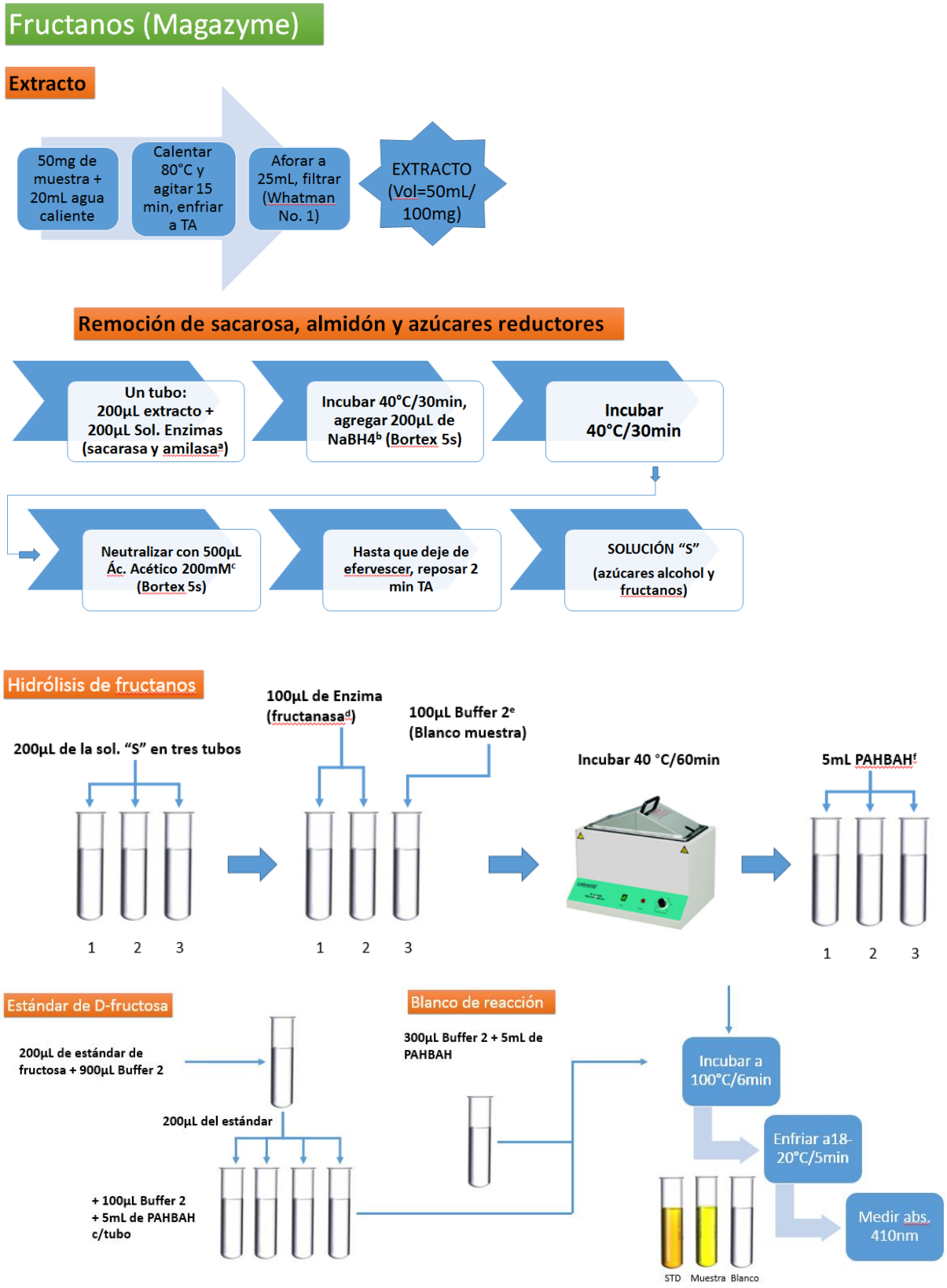


Figura 11. Diagrama general para la determinación de fructanos totales

6.5 Análisis enzimáticos

6.5.1 Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL)

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) se considera que es la enzima principal de la vía de los fenilpropanoides (figura 8), catalizando la transformación, por desaminación, de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico, que es el primer intermediario en la biosíntesis de compuestos fenólicos (Christelle *et al*., 2009). La actividad de PAL (EC 4.3.1.5) fue determinada de acuerdo a la metodología descrita por Martínez-Téllez y Lafuente (1997).

6.5.1.1 Extracción

0.4 g de muestra se mezcló con 0.4 g de PVPP (polivinilpolipirrolidona), 16 mL de buffer borato de sodio (50 mM) a pH 8.5 y 14 µL β-mercaptoetanol (0.01 M). La solución se homogenizó a 8000 r.p.m. en un Ultra-Turrrax por 5 min. Luego, se filtró a través de 4 capas de manta de cielo. El filtrado se centrifugó a 12000 r.p.m. por 20 min a 4 ºC (Beckman J2-MC). Posteriormente se recuperó el sobrenadante donde se encuentra suspendida la enzima.

6.5.1.2 Medición de actividad enzimática de PAL

Se tomaron dos alícuotas de 2.7 mL del extracto y se colocaron en tubos independientes. Al tubo 1 se adicionó 300 µL de fenilalanina (100 mM), al tubo 2 se adicionó 300 µL de agua destilada. La absorbancia inicial se midió a 290 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA). Posteriormente ambos tubos se colocaron en un baño de agua a 40 ºC por 60 min. La absorbancia final se midió después de 60 min a 290 nm.

La actividad de PAL presente en las muestras se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

1 unidad de PAL = Absorbancia final– Absorbancia inicial

Absorbancia final= Absorbancia tubo 1 al tiempo cero – Absorbancia tubo 1, a los 60 min.

Absorbancia inicial= Absorbancia tubo 2– Absorbancia tubo 2, al inicio de la reacción.

El valor obtenido de la actividad de la enzima se expresó en la cantidad de enzima que produce 1 µmol de ácido cinámico en una hora.

Para estimar la actividad específica de la enzima se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford (1976). La actividad específica de la enzima fenilalanina amonio liasa se reportó como 1 unidad de PAL/miligramo de proteína por hora (1U de PAL/ mg de proteína*h).

6.5.2 Actividad enzimática de sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa (1-SST)

La actividad de la enzima 1-SST, la cual es responsable de la biosíntesis de fructanos, la cuantificación se realizó siguiendo los protocolos descritos por Puebla *et al*., (1999) y Van Den Ende *et al*., (1999) con algunas modificaciones. El método utilizado mide la actividad de la 1-SST basado en la determinación de 1-kestosa formada, haciendo uso de la enzima sacarasa, la cual no hidroliza el producto de

reacción, provocando únicamente la hidrólisis de la sacarosa sin reaccionar y permitiendo una estimación colorimétrica directa de 1-kestosa (Figura 12).

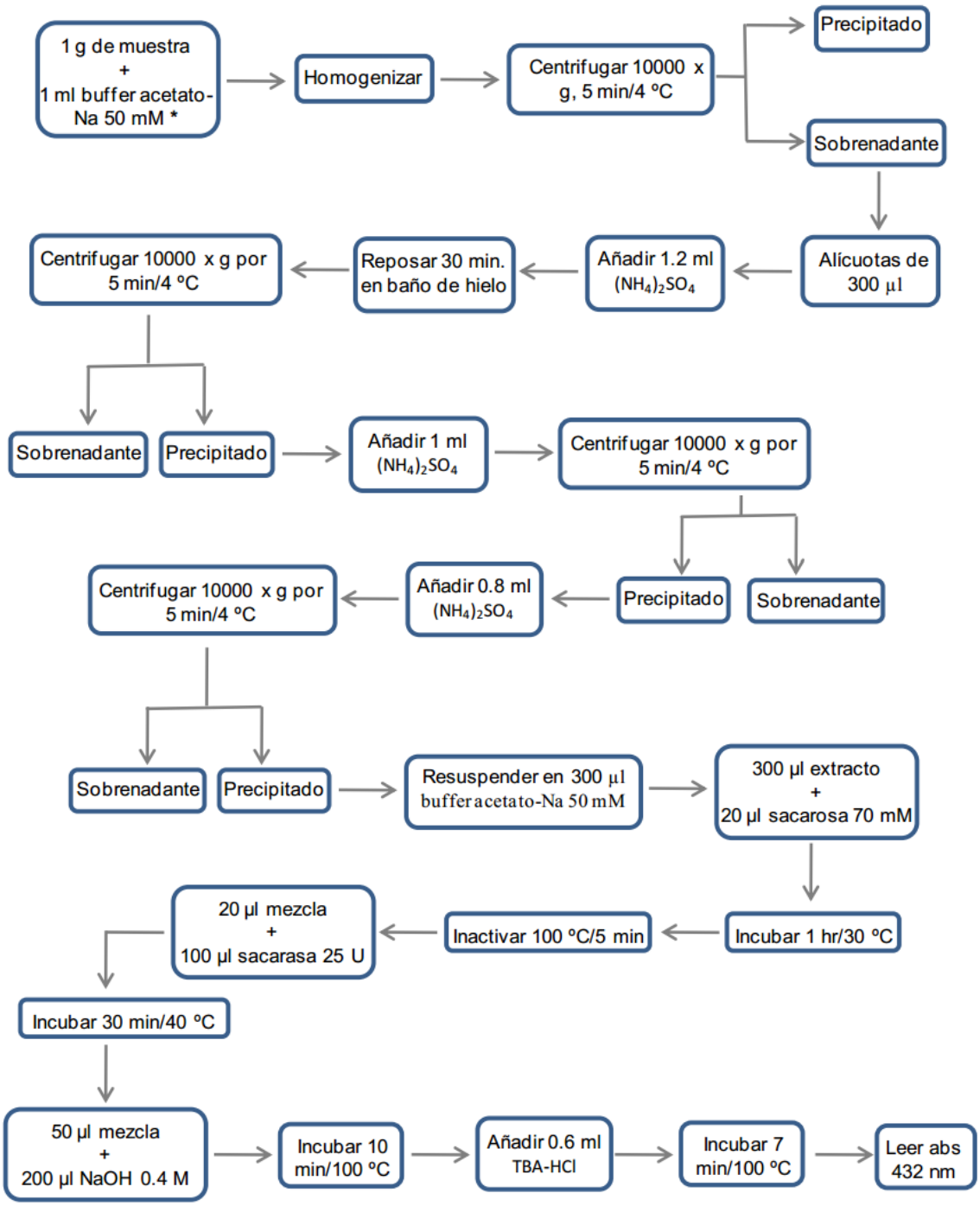


Figura 12. Diagrama general de la actividad de la sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa (Puebla *et al*., 1999 y Van Den Ende *et al*., 1999).

6.5.2.1 Extracción

Se pesaron 0.05 g de muestra liofilizada y molida, el cual fue homogenizado en 1 mL de buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) compuesto por citrato-malato, polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 1%, β-mercaptoetanol (10 mM), bisulfito de sodio ($NaHSO_3$) 10 mM, fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF) 0.1 mM y 1 μg·mL-1 de pepstatina.

6.5.2.2 Precipitación de la proteína con actividad de 1-SST.

Posteriormente se centrifugó la mezcla usando una microcentrifuga Beckman Coulter Microfuge® 18, California, USA durante 5 min a 10,000 g a 4 ºC. Se tomaron 300 μL del sobrenadante los cuales fueron mezclados con 1.2 mL de sulfato de amonio al 80%, la mezcla se incubó 30 min sobre baño de hielo. Después, se centrifugó la mezcla a 10,000 x g a 4 ºC por 5 min y se decacantó el sobrenadante. Al precipitado se adicionó 1 mL de sulfato de amonio al 80% y se centrifugó a 10,000 x G a 4 ºC por 5 min y posteriormente se decacanto el sobrenadante. Nuevamente, al precipitados se adicionó 1 mL de sulfato de amonio al 80% y se centrifugó a 10,000 x G a 4 ºC por 5 min y se decacantó el sobrenadante. El precipitados se resuspendió en 300 μL de buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5).

6.5.2.3 Medición de actividad enzimática 1-SST

Se tomaron 300 μL del extracto enzimático al cual se adicionó 20 μL de sacarosa (70 mM). Posteriormente se incubó a 30 ºC por 60 min (obteniendo glucosa y fructosilsacarosa por la acción de 1-SST). Después la reacción fue detenida por calentamiento a 100 ºC por 5 min. De la mezcla se tomaron 20 μL y se mezcló con 100 μL de sacarasa 25 U y se incubó a 40 ºC por 30 min (generando la hidrolisis de la sacarosa por la acción de la sacarasa específica),

posteriormente se adiciono 200 µL de hidróxido de sodio (NaOH) 0.4 M y se calentó a 100 ºC por 10 min (provocando la destrucción de monosacáridos por calentamiento).

Para determinar la cantidad de 1-kestosa formada adiciono 600 µL de ácido tiobarbitúrico en medio ácido (TBA-HCl) el cual se incubó en baño de agua a 100 ºC durante 7 min. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA) a una longitud de onda de 432 nm. Para cuantificar la cantidad de kestosa formada se elaboró una curva estándar para relacionar con la absorbancia obtenida.

Para estimar la actividad específica de la enzima se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford (1976). La actividad específica de la enzima 1-SST se reportó como microgramos de 1-kestosa formada por microgramos de proteína (µg 1-kestosa/µg proteína).

6.6 Análisis expresión de genes

En este trabajo se estudió la expresión de tres genes de enzimas involucradas en la vía de biosíntesis de los fenilpropanoides y uno de biosíntesis de fructanos, fenilalanina amonio liasa (*AsPAL*), Cinnamato 4-hydroxilasa (*AsC4H*), 4Cumarato-CoA ligasa (*As4CL*) y sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (*As1-SST*) respectivamente, utilizando las técnicas de PCR punto final y q-PCR, partiendo de la extracción de ARN total de diferentes tejidos del Ajo en diferentes etapas de desarrollo en campo, posteriormente se realizó la síntesis del ADNc y la amplificación del genes (Figura 13).

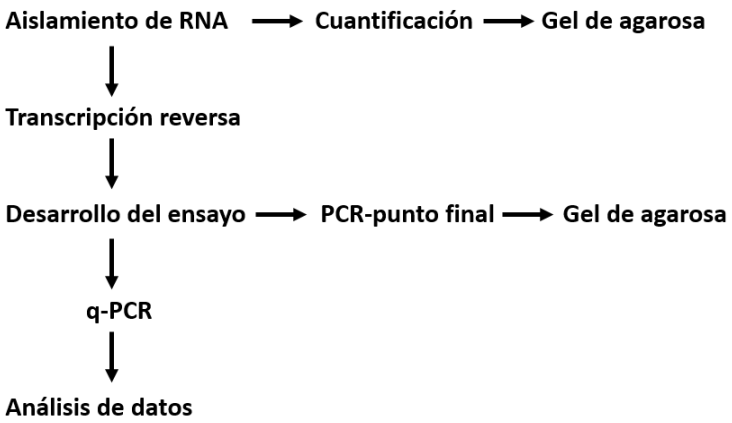


Figura 13. Diagrama de flujo del análisis de expresión de genes.

6.6.1 Extracción de ARN total

Se pesó 0.1 g de diferentes tejidos de ajo y se trituró en mortero con nitrógeno líquido hasta pulverizar. Se colocó el polvo en tubos Eppendorf de 2 mL, se agregaron 1000 µL de Trizol (Sigma®), el tubo se agitó en vórtex por 1 min. La muestra se incubó a temperatura ambiente (25 ± 2° C) por 5 min, se agregaron 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24/1) y se mezcló en vortex; la muestra se centrifugó a 7000 *g* a 4° C por 15 min. Se recuperó la fase acuosa (sobrenadante) en un tubo nuevo. Se adicionó 100 µl de acetato de sodio 5 M y 700 µL de isopropanol, la mezcla se incubó durante 16 horas a -20° C. El precipitado se centrifugó a 7000 *g* a 4° C por 10 min, se deshechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1000 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 2800 *g* a 4° C por 5 min, el sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente (25 ± 2° C), finalmente, se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril (Sambrook y Russell, 2001).

Con la finalidad de observar la integridad de la molécula, una alícuota de 3µl se analizó en un gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con Gel Red™. Así mismo, se midió la densidad óptica (D.O) del ARN, mediante espectrofotometría a una

longitud de onda de 260nm, la pureza del ARN se calculó mediante el cociente que resulta de D.O280nm/D.O260nm, la concentración de ARN se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN } \mu g/g \text{ de tejido}] = \frac{\text{D.O 260 nm} * 40 * \text{Factor de dilución}}{1000}$$

Donde:

D.O 260nm= Densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm

6.6.2 Síntesis de ADNc

Comprobada la concentración y calidad del ARN, así como la ausencia de ADN genómico, se realizó la síntesis de ADNc con el kit de transcriptasa reversa de Bio Rad® (iScript™ Reverse Transcription Supermixfor RT-qPCR). Para las amplificaciones se utilizó una concentración de1 µg de ARN y se mezcló con los componentes que se describe en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Componentes para la síntesis de ADNc.

Componentes	**Volumen de Reacción**
SuperMix 5X iScript™ Reverse Transcription	4µL
ARNt (1µg)	Variable
Agua libre de nucleasas	Variable
Volumen total de reacción	20µL

A partir de la mezcla anterior se realizó la síntesis de ADNc por medio de la reacción de la transcripta reversa (RT). Para ello se siguió el siguiente protocolo de ciclos térmicos: temperatura/tiempo de alineamiento de 25ºC/5min, activación

de la transcriptasa reversa de 42ºC/30 min y por último la inactivación de la transcriptasa reversa de 85 ºC/5 min (Cuadro 8).

Cuadro 8. Protocolo de reacción de la transcriptasa reversa.

Ciclo térmico de reacción	
Alineamiento	5 min a 25 ºC
Activación de transcriptasa reversa	30 min a 42 ºC
Inactivación de transcriptasa reversa	5 min a 85 ºC

6.6.3 Expresión diferencial de genes

6.6.3.1 Diseño de oligonucleótidos

Para la amplificación de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), se diseñaron y seleccionaron oligonucleótidos (oligos) sintéticos, que hibridaron con las regiones del ADN molde que se localizan en los extremos de la región de interés. Estos oligonucleótidos fueron orientados con sus extremos 3´ (-OH) hacia el oligo opuesto, es decir, encontrados y ser complementarios para ambas cadenas del ADN. La longitud de estos oligos fueron de 18 a 20 nucleótidos, la complementariedad entre el oligo y la secuencia blanco fue cercana al 100 % en las últimas 5 a 6 bases del extremo 3´ del oligo. El contenido de GC fueron de alrededor de 35 a 66 % (Breslauer *et al.,* 1986).

Para diseñar los oligonucleótidos se utilizó el programa Primer3, en el cual se amplificaron las secuencias de las enzimas fenilalanina amonio liasa (número de acceso ADO24189), 4Cumarato-CoA ligasa (número de acceso AEM44785), Cinnamato 4-hydroxilasa (número de acceso ADO24190) y sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (número de acceso AAM21931) reportadas de mARN de ajo en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El Cuadro 9 se observan las características de las secuencias en ambos sentido de oligonucleótidos sintetizado para la ruta de los fenilpropanoides y síntesis de fructanos de *Allium sativum*, la temperatura de amplificación (Tm), peso molecular, el porcentaje de GC y el tamaño del amplicón.

Cuadro 9. Secuencias de oligonucleótido de genes utilizados para el PCR tiempo real junto con la temperatura de fusión (Tm), peso molecular (MW), porcentaje de guanina-citosina (%GC) y longitud de la amplificación.

Gen	Sentido	Secuencia	Tm	MW	% GC	Amplicón*
AsPAL	Forward	ACATGGACCCACTCCAGAAG	64.0	6080	55	155
	Reverse	CTTGACACGTCGATCAATGG	64.2	6117	50	155
AsC4H	Forward	GCGGAGCTGGTGAACCATCCTG	74.1	6776	63	250
	Reverse	GAGGCGGAGAGGTTTCCTTGAC	6.9.2	6831	59	250
As4CL	Forward	CTTTTTCGCAGTCGTCTTCC	63.8	6001	50	178
	Reverse	TTCGGATTCTCTCCATCCAC	64.0	5979	50	178
As1-SST	Forward	TGTCGAACCCGGCTTCACTTAC	69.2	6646	54	178
	Reverse	TGAGCTGAACCATCGCTTGTGC	71.8	6726	54	178

*Pares de bases

6.6.3.2 Expresión de genes por PCR punto final.

Para la amplificación de los genes por PCR punto final se utilizó el kit de SYBR GREEN® de Bio Rad® (Sso Advanced™ SYBR® Green Supermix). Para la reacción se utilizó una concentración de 200 ng de ADNc y 2.5 µM de cada oligonucleótido, el cual se mezcló con los componentes de reacción que se describe en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Componentes para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Componente	Volumen de reacción	Concentración final
Sso Advanced™ SYBR® Green Supermix	10 µL	1X
Oligo Forward	Variable	2.5 µM
Oligo Reverse	Variable	2.5 µM
Agua libre de RNase/DNase	Variable	----------
cADN	Variable	200 ng
Volumen total	20µL	----------

El protocolo usado para los ciclos térmicos de reacción en cadena de la polimerasa se muestra en el Cuadro 11, la temperatura de alineamiento es variable para cada gen de interés.

Cuadro 11. Protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Componente	Volumen de reacción	Concentración final
Sso Advanced™ SYBR® Green Supermix	10 µL	1X
Oligo Forward	Variable	2.5 µM
Oligo Reverse	Variable	2.5 µM
Agua libre de RNase/DNase	Variable	----------
cADN	Variable	200 ng
Volumen total	20µL	----------

Posterior a la reacción se observó la integridad del gen, analizando una alícuota de 3µL en un gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con Gel Red™. Así mismo, se coloraron por carril de la siguiente manera: en el carril 1 el marcador de pesos molecular de 1Kb, en el carril 2 en control negativo (contiene la mezcla de reacción, oligonucleótidos excepto ADNc) y posteriormente los genes de interés.

Después de la amplificación de los genes, se realizó la purificación utilizando el QIAquick PCR Purificación Kit, QIAGEN. Estos genes se secuenciaron en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Las secuencias de los productos de amplificación obtenidas por el PCR punto final coincidieron con los genes de interés (*AsPAL* = 100 %, *AsC4H* = 98%, *As4C*L = 98% y *As-1SST* = 100 %), posteriormente se prosiguió a realizar el análisis de q-PCR.

6.6.3.3 Expresión de genes por Q-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR, por siglas en inglés) tiene una gran variedad de tecnologías para liberar la fluorescencia. Sin embargo, son dos los métodos más utilizados: a) fluoróforos con afinidad por el ADN y b) sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés. En este trabajo se usó un fluoróforo de unión al ADN (Figura 14). En esta tecnología, se añade un fluoróforo que es afín al ADNc o ADN de doble cadena, es decir, la fluorescencia aumenta, en función de que el producto de PCR en tiempo real se acumula en cada ciclo de la reacción. Esta metodología es una de las más usadas por su bajo costo y facilidad de manejo. El fluoróforo de unión al ADN de mayor uso en esta técnica es el SYBR Green (Zipper, *et al*., 2004; Wong & Medrano, 2005; Kubista, *et al*., 2006).

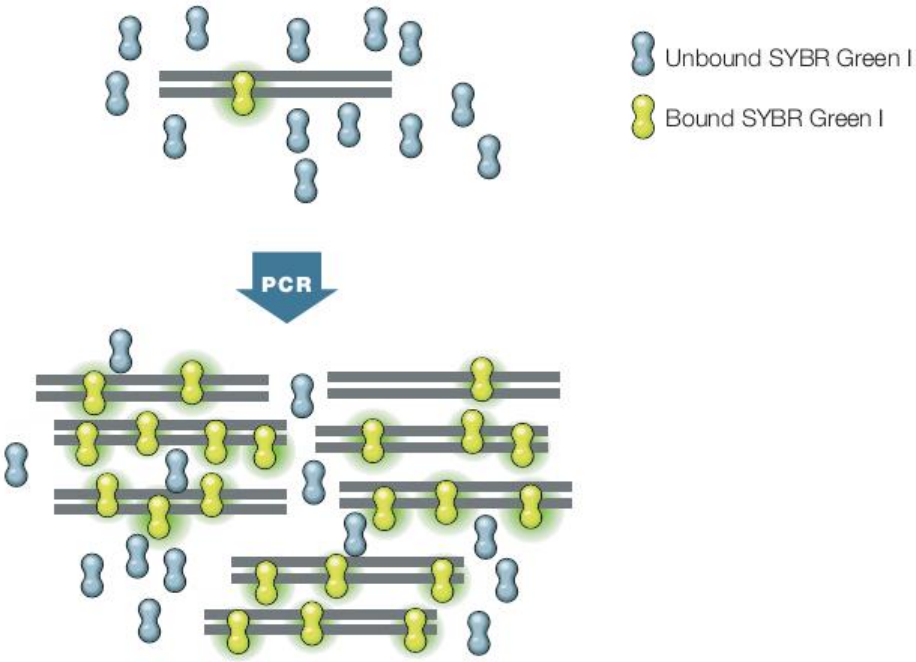


Figura 14. Esquema de la técnica de fluoróforos de unión al ADN (Zipper *et al*., 2004).

En este trabajo se realizó la expresión relativa de los genes utilizando el sistema Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems, usando Fast SYBR® Green Master Mix como cromoforo de unión al ADN. La mezcla de reacción contenía SYBR® Green Master Mix, Oligo Forward, Oligo Reverse, ADNc y agua, el volumen se ajustó a 20µL (Cuadro 12).

Cuadro 12. Mezcla de reacción para la PCR en tiempo real.

Componente	Mix 600/600µM
SYBR mix	10µL
Oligo Forward	1.2 µL
Oligo Reverse	1.2 µL
cADN (200ng)	2 µL
H_2O	5.6 µL

Los cuatro genes fueron amplificados a 60ºC por 35 ciclos, al término se determinó la expresión relativa de los genes usando en método $2^{-\Delta C'T}$ descrito por Livak y Schmittgen (2001), este método determina el cambio en la expresión de un gen por efecto de un tratamiento experimental. Comparando el valor del $C_{T:}$ ciclo umbral de fluorescencia (siglas del inglés cycle treshold) del gen experimental y el control. El C_T correlaciona el número de copias de la secuencia blanco que contiene una muestra (Figura 15).

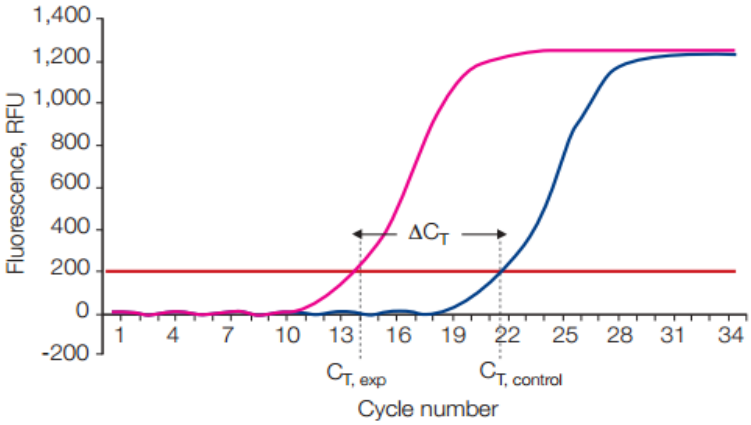


Figura 15. Perfil de amplificación de fluorescencia del producto de Q-PCR.

Para el cálculo de la expresión relativa de los genes presente en las muestras se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta C_T = C_{T,\text{Time } x} - C_{T,\text{Time } 0}$$

En donde:

$C_{T,\text{Time } x} = C_T$ del gen con tratamiento experimental (5ºC).

$C_{T,\text{Time } 0} = C_T$ del gen control o sin tratamiento (TA).

Expresión relativa = $2^{-\Delta C'T}$

El valor se expresó como el factor de cambio de la expresión genética.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Desarrollo en campo del cultivo

En la Figura 16 se observa gráficamente el crecimiento del cultivo de ajo durante el desarrollo, los cuales fueron formadas a partir de semillas almacenadas a 5 °C y temperatura ambiente (TA) por 5 semanas. A los 44 días después de siembra (DDS) para ambas condiciones de almacenamiento se aprecia un crecimiento foliar y el enraizamiento (características de crecimiento y desarrollo normal del cultivo), posteriormente a los 78 DDS se observa un aumento en la pigmentación (color morado) en las túnica de las plantas de ajos generada de la condición de 5ºC a diferencia de las túnicas de las plantas de ajos de TA las cuales solo se visualiza en alguna plantas. Siguiendo con el desarrollo, a los 106 DDS en la planta de TA se visualiza un incremento en el diámetro en el cuello, así como el incremento en el ancho y número de hojas en comparación con las plantas de ajo de 5ºC, posiblemente se deba a un incremento de la actividad fotosintética en las platas de la condición de TA. Mientras que a los 129 DDS en las plantas de ajo 5ºC se observa una disminución en el diámetro del cuello, así como la formación algunos dientes y además se visualiza que algunas hojas está en proceso de senescencia (indicios de pronta cosecha), también presentan una mayor pigmentación del color morado, mientras que las plantas de ajos de TA presenta mayor diámetro en el cuello e incremento en la raíz. En la cosecha correspondiente a 144 y 206 DDS para las plantas generadas de la condición de 5ºC y TA respectivamente, ambas presentan diámetros de bulbos similares, pero las plantas de la condición de 5°C tienen mayor pigmentación en las túnicas que las de TA.

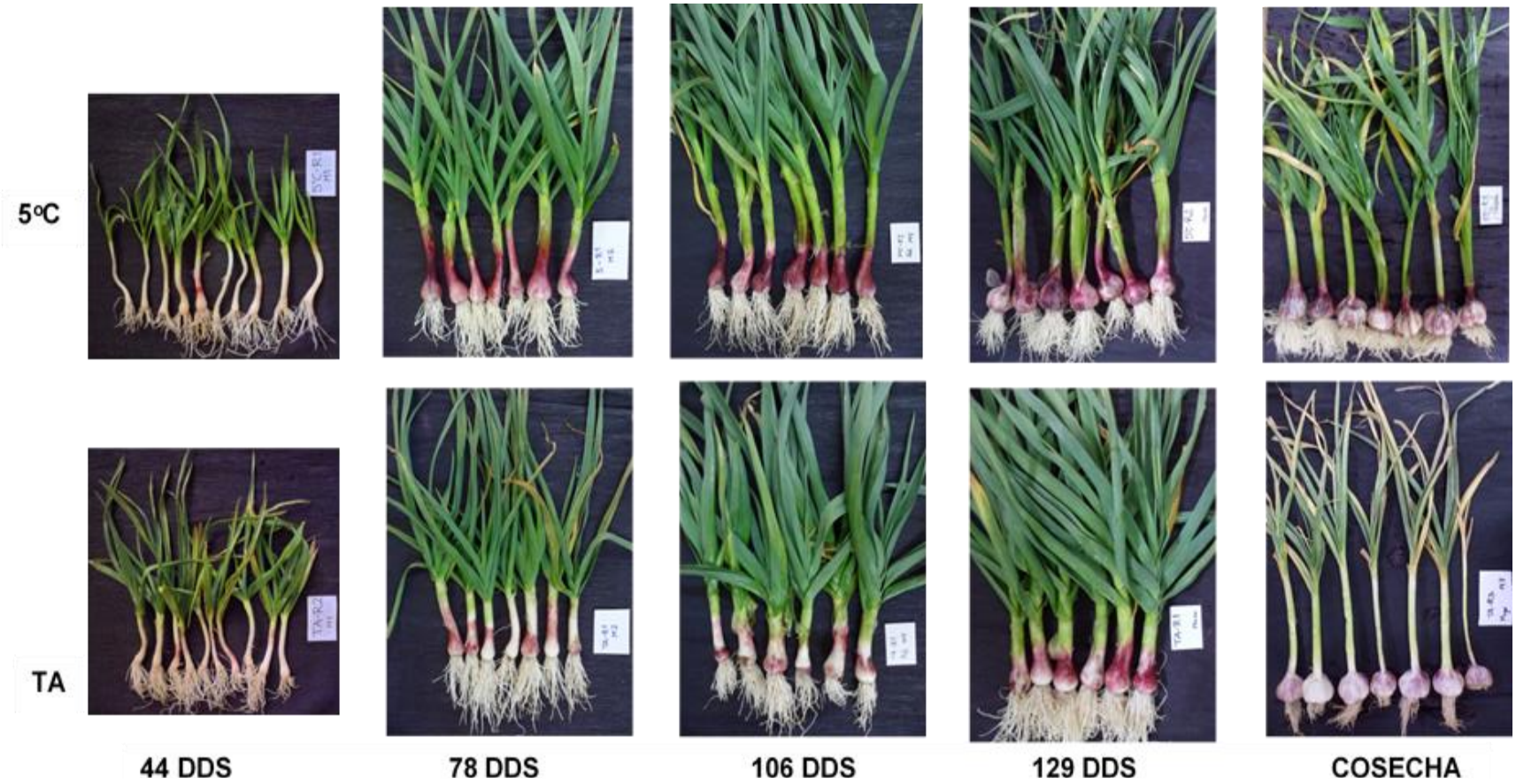


Figura 16. Desarrollo del cultivo de ajo a los 44, 78, 129, 144 (cosecha 5°C) y 206 (TA cosecha) DDS respectivamente de ajo provenientes de bulbillos (dientes) que fueron almacenados a temperatura ambiente (TA) y 5°C durante 5.

7.2 Análisis de las variables de crecimiento

Las variables analizadas durante el desarrollo en campo de ajo provenientes de “semillas” almacenadas a 5 °C y TA por 5 semanas fueron las siguientes: Altura de la planta (cm), peso fresco (g), ancho de las hojas de la planta (cm) e índice de bulbificación (IB), este último es la relación de diámetro del cuello y el diámetro del bulbo (mm), cuando esté índice supera el valor de 2, se dice que el cultivo está en plana bulbificación.

7.2.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en la altura de la planta

En la Figura 17 se observa el aumento en la altura de la planta de ajo, provenientes de “semillas” almacenadas a 5 °C y TA durante 5 semanas.

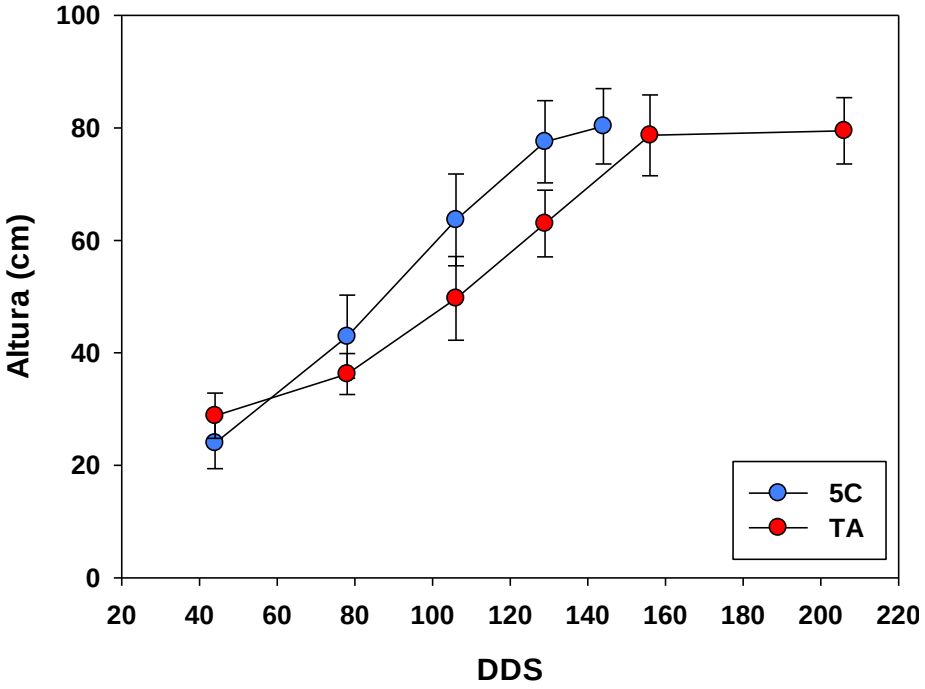


Figura 17. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la altura de la plantas (cm) de ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA DDS=Días después de siembra.

El almacenamiento a 5 ºC de las “semilla” previo a la siembra provoca un efecto de aceleración del crecimiento vegetativo. Durante los primeros 78 y 129 DDS se observaron un crecimiento en ambas condiciones de almacenamiento. La altura de las plantas en ambas condiciones de almacenamiento 5°C y TA, al final del ciclo de desarrollo fue estadísticamente igual (80.3 ± 6.6 cm y 79.5 ± 6.6 cm respectivamente).También se observó que el almacenamiento a 5 ºC por 5 semanas previo a la siembra redujo el ciclo de cultivo del ajo en 62 días.

Los datos encontrados en este trabajo fueron similares con lo reportado por Dufoo *et al*., (2013), quienes encontraron que el almacenamiento a 5 ºC por 5 semanas de los dientes “semilla” de ajo, acelera el desarrollo de este cultivo en campo y disminuye el crecimiento vegetativo. Rahim y Fordham (1988) mencionan que la inducción temprana en el crecimiento foliar de las semillas almacenadas a 5ºC por 5 semanas está relacionado con la formación temprana de los primordios presentes en el disco basal del ajo, además Allen y Ort. (2002) han observado que las temperaturas frías son uno de los principales factores de estrés abióticos que afectan directamente el crecimiento y la productividad de las plantas. Esto nos permite sugerir la hipótesis que el adelanto en la cosecha está relacionada con la diferenciación temprana del diente “semilla” el cual induce el crecimiento prematuro de las hojas, menor desarrollo en la altura de planta y la senescencia del pseudo tallo al final del desarrollo del cultivo.

7.2.2 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la semilla en el peso de la planta

En la Figura 18 se observa que en ambas condiciones de almacenamiento, 5 ºC y TA respectivamente, se incrementa el peso (g) del cultivo de ajo durante el desarrollo, la relación anterior es debido que todo el crecimiento de la planta está relacionado con la fotosíntesis y acumulación de metabolitos primarios y secundarios, los cuales están reguladas por la temperatura y la luz

ambiental en el desarrollo. El almacenamiento a 5ºC y TA durante 5 semanas respectivamente, no provocó un efecto significativo en el peso de las plantas durante el desarrollo.

A pesar de tener ciclos de cultivos diferentes por efecto del almacenamiento, el peso al final del ciclo de desarrollo de las plantas provenientes de semillas almacenadas a 5 ºC fue de 129.58 ± 37.40 g y de TA fue de 168.41 ± 62.50 g, los cuales fueron estadísticamente iguales.

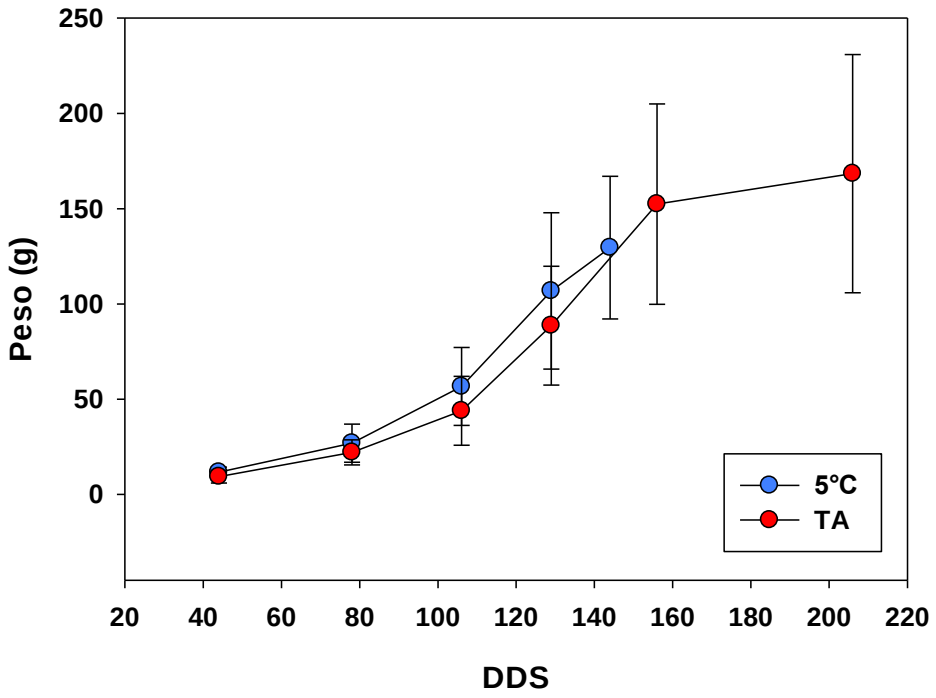


Figura 18. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el peso (g) de plantas de ajos generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. DDS=Días después de siembra.

Estos datos difieren con lo reportado por Utrilla-Vázquez (2008), quien observó una disminución en el peso del cultivo de ajos durante el desarrollo provenientes de dientes “semillas” almacenadas a 5 ºC durante 10 días, en comparación a los almacenados a TA. De igual manera, López Hernández (2010)

y Zavala Gutiérrez (2011) observaron que almacenar la “semilla” a 5ºC durante 5 semanas; provoca una diminución en el peso del ajo al final del ciclo de cultivo en comparación con los almacenados a TA.

Posiblemente en este trabajo no se observaron diferencias significativas en el peso al final del desarrollo del cultivo, debido a la variabilidad de las muestras, el periodo de siembra del cultivo, la fertilidad del suelo de la localidad en donde se sembró y la practicas culturales de siembra, así como, diferencia en los factores ambientales como fotoperiodo y termoperiodo durante el desarrollo del cultivo; diferentes investigadores (Brewster, 1994; Simon, 2001; Takagi, 1990) han observado que el medio ambiente tiene efecto sobre el cultivo del ajo y que existen competencia endógena entre sus fases vegetativas y reproductivas durante el desarrollo, los cuales aún están lejos de ser claras.

7.2.3 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la semilla en el ancho de la hoja

En la Figura 19 se observa un crecimiento en el ancho de las plantas provenientes de las dos condiciones de almacenamiento de la “semilla”, 5ºC y TA por 5 semanas respectivamente. Durante las primeras etapas de desarrollo (44 y 78 DDS) se aprecia un incremento estadísticamente igual en el ancho de las hojas de las plantas de 5 °C y TA. A los 106 DDS se observaron diferencias estadísticas en el aumento en el ancho de la hoja de las plantas provenientes de la condición de TA respecto a los de 5 °C. El ancho en hoja de las plantas de ajo provenientes del almacenamiento a 5 ºC fue de 27.62 ± 3.68 mm al final de su ciclo de desarrollo, mientras que el ancho de la hoja de las plantas de TA fue de 31.26 ± 4.26 mm.

En general se observaron que las plantas provenientes del almacenamiento a TA tuvieron mayor incremento en el ancho de las hojas a partir de los 106 DDS en

comparación con los de 5ºC, este efecto permaneció hasta el final del ciclo de desarrollo del cultivo de ajo.

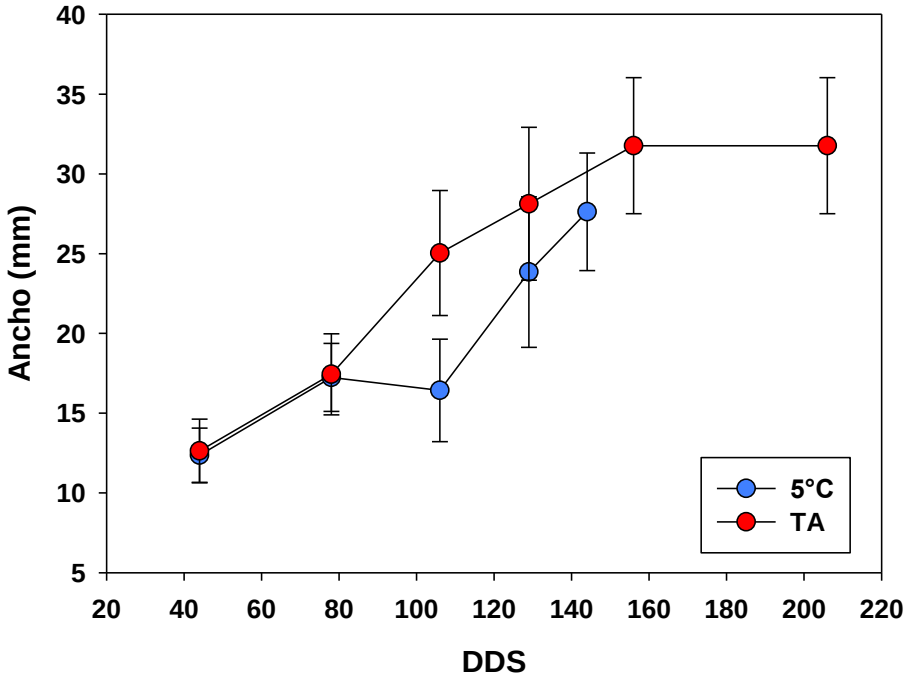


Figura 19. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el ancho de la hoja de ajos generados de "semilla" almacenadas a 5 °C y TA. DDS=Días después de siembra.

Los datos encontrados en este trabajo fueron similares con lo reportado por Zavala Gutiérrez (2011), quien observó que las plantas generadas a partir de dientes almacenados a 5 °C por 5 semanas, tuvieron menor tamaño en el ancho de hoja que las del almacenamiento a TA durante todo su desarrollo. Así como, lo reportado por Kamenetsky *et al.,* (2004) quienes encontraron menor desarrollo de las hojas en plantas generadas a partir de semillas que se almacenaron a -2, 2, 4 y 9 °C por dos semanas, debido que las bajas temperaturas disminuyen el desarrollo floral y un fotoperiodo largo es esencial para la elongación escapo floral. Lo anterior indica la importancia que tiene el almacenamiento a baja temperatura de la "semilla" y el efecto del fotoperiodo durante el ciclo de cultivo de ajo para obtener una adecuada calidad de los bulbos.

Con respecto a la disminución del ancho de la hoja por efecto de la temperatura de almacenamiento Nellaepalli *et at.,* 2012 mencionan que los cambios en la temperatura e intensidad de la luz influyen en el estado de oxidación del fotosistema II (PSII), tales cambios pueden modificar el equilibrio entre la utilización de la energía en los procesos de crecimiento y la aclimatación al frío, así como la modificación de la expresión de algunos genes que participan directamente en la aclimatación al frío.

7.2.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la "semilla" en el número de hojas

En la Figura 20 se observan el número de hojas de las plantas de ajo durante el desarrollo provenientes del almacenamiento de la "semilla" a 5 °C y TA por 5 semanas respectivamente. A los 78 DDS, para ambas condiciones de almacenamiento, 5 °C y TA, se observó un incremento estadísticamente igual en número de hoja en la planta de ajo (4.93 ± 0.86 y 5.50 ± 1.92 respectivamente), el cual es correspondiente al estado de desarrollo vegetativo de la planta. Las plantas procedentes del almacenamiento a TA alcanzaron un máximo de número de hojas a los 156 DDS (10.88 ± 1.06), posteriormente empezó una disminución como consecuencia del desarrollo y de la senescencia del cultivo, obteniendo 7,45 ± 1.27 hojas al final del desarrollo, mientras que las plantas resultantes del almacenamiento a 5 ºC alcanzó un máximo de número de hojas a los 106 DDS con un promedio de 7.21 ± 1.11 hojas, de igual manera se observó una disminución del número de hoja a los 129 y 144 DDS obteniendo un valor de 5,3 ± 1.03 y 5,1 ± 1.19 hojas respectivamente, resultante del ciclo de desarrollo y senescencia del cultivo. En general se observaron que las plantas provenientes del almacenamiento a TA tuvieron mayor número de hojas después de los 106 DDS en comparación con los de 5ºC, este efecto permaneció hasta el final del ciclo de desarrollo del cultivo de ajo, lo cual confirma el efecto de la aclimatación al frio previo a la siembra, el cual ejerce un efecto en el desarrollo y crecimiento foliar Nellaepalli *et at.,* 2012.

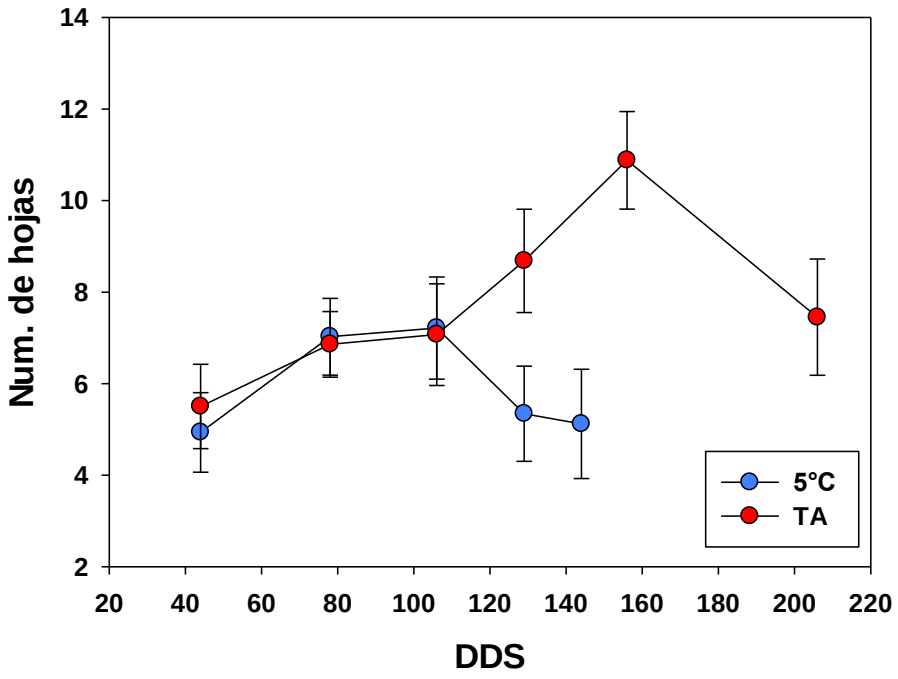


Figura 20. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el número de la hoja de ajos generados de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. DDS=Días después de siembra.

Los datos encontrados en este trabajo son similares a lo reportado por López-Hernández (2010), quien observó un comportamiento semejante en el número de hojas, encontrando en promedio, mayor número de hojas al final del desarrollo en las plantas provenientes de “semillas” almacenadas TA (11) respecto de las plantas provenientes de “semillas” almacenados a 5 °C (8 hojas). Además menciona que esta diferencia se debió a que las plantas TA se mantuvieron dos meses más en el campo de cultivo. Actualmente, se sabe que la aclimatación al frío, así como, el almacenamiento a 5 °C durante 5 o 6 semanas de la “semilla” previo a la siembra del cultivo de ajo aceleran el ciclo del cultivo del ajo y disminuye el crecimiento foliar durante el desarrollo (Rahim y Fordham, 1988; Nellaepalli *et at.,* 2012 y Dufoo *et al.,* 2013). Kamenetsky *et al.,* (2004) encontraron menor desarrollo de las hojas en plantas que se almacenaron a -2, 2, 4 y 9 °C por dos semanas, además observo que estas plantas adelantaron su ciclo de cultivo.

7.2.5 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en el índice de bulbificación

En la Figura 21 se observa el cambio en el índice de bulbificación (IB) en las plantas de ajo durante el desarrollo provenientes de “semillas” almacenadas a 5ºC y TA durante 5 semanas. A los 44 DDS se observó un incremento en el IB en la plantas provenientes del almacenamiento a 5 °C (1.83 ± 0.18 mm) el cual fue estadísticamente igual de TA (1.69 ± 0.13 mm). Las plantas provenientes del almacenamiento a 5 ºC alcanzaron el máximo de IB al final de su ciclo de cultivo (144 DDS) con un promedio de 4.34 ± 0.74 mm; el cual fue uno de los indicios para la cosecha. Mientras que para las plantas provenientes del almacenamiento a TA alcanzan un máximo IB a los 206 DDS con un promedio de 3.72 ±0.59 mm.

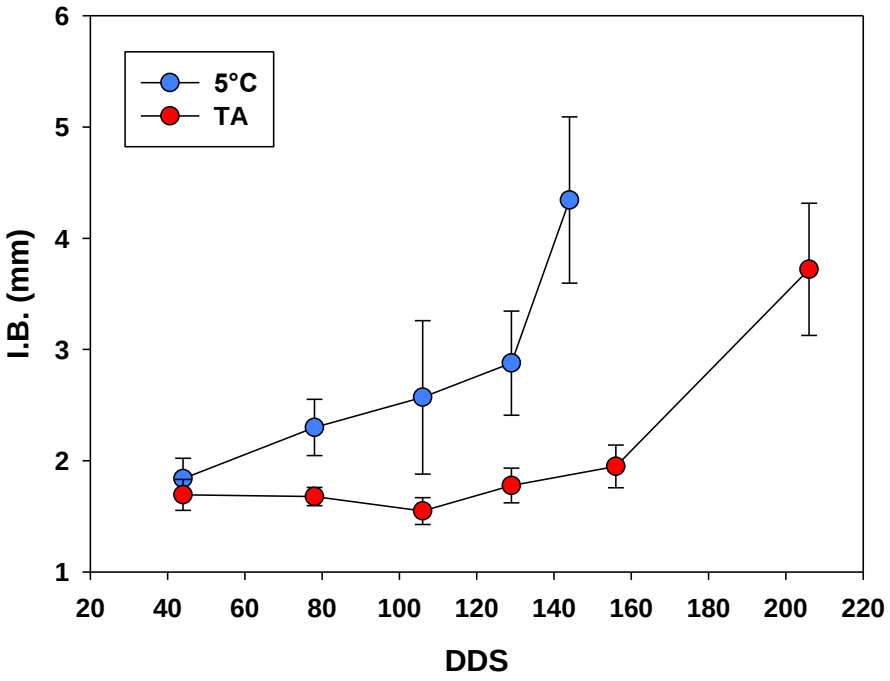


Figura 21. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el índice de bulbificación de ajos generados de “semilla” almacenadas a 5 ° C y TA. DDS=Días después de siembra.

Almacenar los dientes “semilla” a 5 ºC por 5 semanas previo a la siembra, acelera el índice de bulbificación en campo, este incremento en la I.B. se conservó

hasta el final del desarrollo, en comparación de los dientes “semilla” almacenados a TA la aceleración del índice de bulbificación es más pronunciado a partir de los 156 DDS. Los datos encontrados en este trabajo difieren con lo reportado por Galaz-Pérez (2008), quien evaluó el efecto de factores ambientales precosecha en el desarrollo de la planta, bulbificación, calidad y acumulación de fructanos en ajo, no encontró diferencias significativas por efecto de la localidad (lugar de siembra de ajo), tratamiento de almacenamiento previo a la siembra (TA y 5ºC) y la interacción de estos factores en el índice de bulbificación. Por otro lado, estos resultados son similares a los reportados por Del Pozo y González (2005) quienes encontraron que almacenar “semillas” a 4 y 7 ºC por 30 días previo a la siembra estimula la bulbificación de ajos cv. Akukeli y Rosado INIA.

En general, almacenar la “semilla” a 5 °C durante 5 semanas previo a la siembra, induce cambios en las variables de crecimiento. Provocando una pronta diferenciación e incremento del I.B. el cual se asocia que el ciclo de desarrollo del cultivo de ajos se reduzca 62 días, así como una reducción en el crecimiento foliar tanto de altura como en el ancho de las hojas de las plantas.

Posiblemente, el adelanto de la cosecha de los cultivos de ajo provenientes de semillas almacenadas a 5ºC se deba a la temprana formación de los primordios en el disco basal del ajo, el cual pudiera estar relacionado con un efecto de vernalización inducida en el cual reprime genes de floración previo a la siembra y lo sobreexpresa al inicio del desarrollo de las plantas, también al efecto de la aclimatación al frío de la plantas el cual se refleja directamente en la reducción del crecimiento vegetativo generando cambios en el estado de oxidación del fotosistema II (PSII), el cual modifica el equilibrio entre la utilización de la energía en los procesos de crecimiento (Rahim y Fordham, 1988; Allen y Ort, 2002; Henderson y Dean, 2004; Kim *et al.*, 2009; Nellaepalli *et at.,* 2012).

7.3 Análisis bioquímicos

Se evaluó el contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en túnica, así como, de fructanos totales en bulbo y disco basal durante el desarrollo en campo de ajos provenientes de “semillas” almacenadas a 5ºC y TA durante 5 semanas.

7.3.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en el contenido de fenoles totales

En la Figura 22 se observa el contenido de fenoles totales presentes en túnicas de plantas de ajos provenientes de “semillas” almacenadas a 5 °C y TA durante 5 semanas previo a la siembra. El contenido de fenoles totales se expresó en mg de equivalentes de ácido gálico/gramos de materia seca (EAG/g.m.s.).

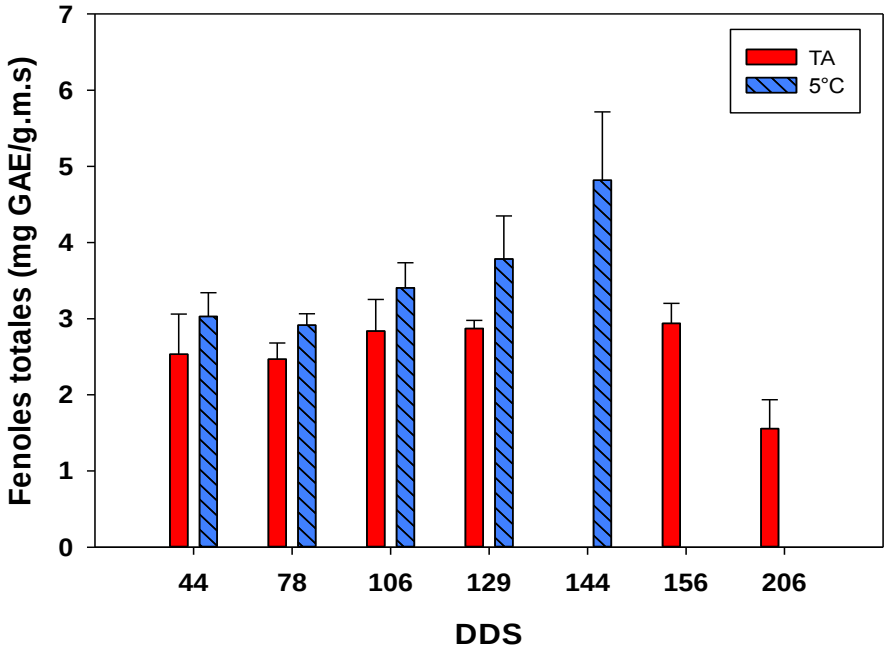


Figura 22. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de fenoles totales (mg EAG/g.m.s) en túnicas de ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. DDS=Días después de siembra.

Durante los primero 106 DDS, para ambas condiciones de almacenamiento (5 °C y TA), no se observaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales en las túnicas. Mientras que a los 129 DDS, las túnicas de las plantas provenientes del almacenamiento a 5 °C obtuvieron un incremento significativo de 3.78 ± 0.56 EAG/g.m.s. en comparación con los de TA el cual obtuvo 2.83 ± 0.41 EAG/g.m.s. Al final del desarrollo (144 DDS), las túnicas de las plantas procedentes de "semillas" almacenadas a 5 °C presentaron un incremento significativo de 4.81 ± 0.89 EAG/g.m.s. Por otro lado, al final del desarrollo (206 DDS) se observó una disminución significativa en el contenido de fenoles totales en las túnicas de las plantas provenientes del almacenamiento de TA (1.55 ± 0.37 EAG/g.m.s.).

El contenido de fenoles totales en las túnicas al final del desarrollo fueron similares a lo reportado por Dufoo-Hurtado *et al*., (2013), quienes observaron a los 122 DDS y al final de su desarrollo mayor contenido de fenoles totales en túnicas provenientes de semillas almacenadas 5ºC (3.24±0.02 y 1.87±0.039 mg EAG/g.m.s.) que en comparación con los de TA (2.61±0.019 y 0.61±0.04 mg EAG/g.m.s.) respectivamente, así como mayor pigmentación en las túnicas de las plantas de 5 °C que las de TA, lo cual concuerda con lo encontrado por Patil y Pike (1995), quienes reportan mayor contenido de fenoles y antocianinas en túnicas de cebollas rojas que en cebollas blancas. Por otro lado, se ha observado que existen factores ambientales que inducen la síntesis ciertos compuestos fenólicos y aumento en la capacidad antioxidantes de plantas como respuesta al estrés, en especial por efecto de las bajas temperaturas se ha observado que reduce la fotosíntesis e incrementa el contenido de antocianinas, debido a una aclimatación o protección al frío (Prasad, 1996; Rice-Evans *et al*., 1997; Joyce y Cox, 2005). Por lo anterior, el incremento en el contenido de los fenoles totales en las túnicas, al final del desarrollo de plantas provenientes de "semillas" almacenadas a 5 °C por 5 semanas, es producto de la aclimatación al frío y a la respuesta al estrés generada por el almacenamiento previo a la siembra de la

“semilla.” En general se observó un incremento del contenido de fenoles totales en las túnicas de 5 ° C conforme transcurría el desarrollo del cultivo.

7.3.2 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en el contenido de flavonoides

En la Figura 23 se observa el contenido de flavonoides presentes en túnicas de plantas de ajos provenientes de “semillas” almacenadas a 5 °C y TA durante 5 semanas previo a la siembra. El contenido de flavonoides se expresó en mg de quercetina/gramos de materia seca (mg Quercetina/g.m.s.).

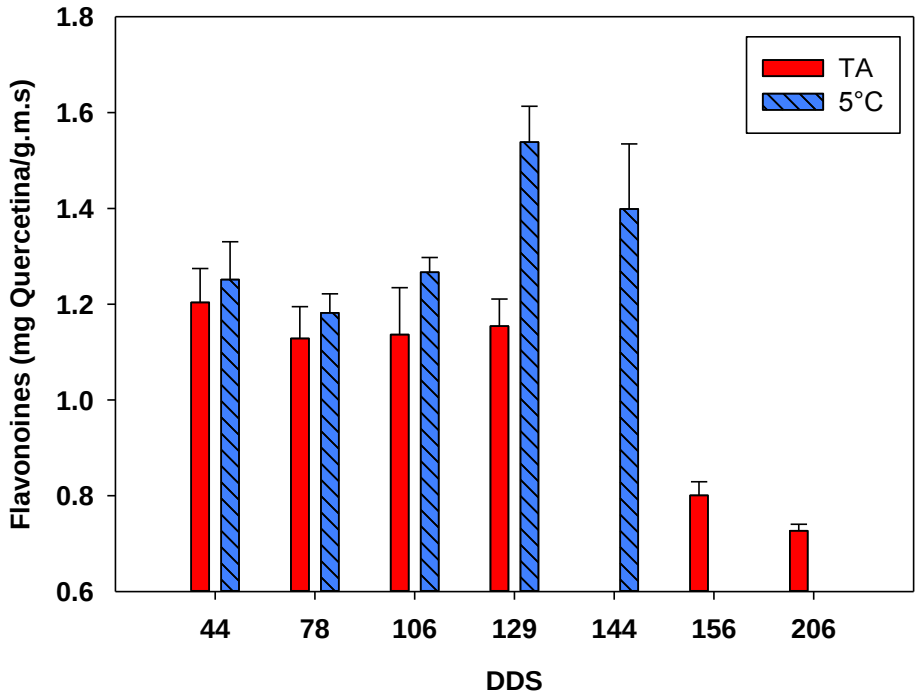


Figura 23. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de flavonoides (mg Quercetina/g.m.s) en túnica de ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. DDS=Días después de siembra.

Durante los primero 106 DDS, para ambas condiciones de almacenamiento (5 °C y TA), no se observaron diferencias significativas en el contenido de flavonoides en las túnicas. Mientras que a los 129 DDS, las túnicas de las plantas provenientes del almacenamiento a 5 °C obtuvieron un incremento significativo de 1.53 ± 0.074 mg Quercetina/g.m.s. en comparación con los de TA que obtuvo 1.15 ± 0.05 mg Quercetina/g.m.s. Al final del desarrollo (144 DDS), las túnicas de las plantas procedentes de “semillas” almacenadas a 5 °C presentaron un incremento significativo en el contenido de flavonoides (1.39 ± 0.13 mg Quercetina/g.m.s). En contraste, al final del desarrollo (206 DDS) se observó una disminución significativa en el contenido de flavonoides en las túnicas de las plantas provenientes del almacenamiento de TA (0.72 ± 0.013 mg Quercetina/g.m.s.).

Winkel-Shirley (2002) menciona que las plantas sometidas a un estrés por baja temperatura por un tiempo prolongado presentan un color rojo o púrpura, posiblemente sea debido a una acumulación de antocianinas y de flavonoides. Estas evidencias apuntan a diversas funciones fisiológicas de estos compuestos en las respuestas a la aclimatación al frío y como las plantas controlan los tipos y cantidades de flavonoides que se producen en respuesta a diferentes señales. La acumulación de los pigmentos en los tejidos vegetativos, como el caso de las antocianinas y flavonoides, es una característica de estrés de la planta.

Por otro lado, el aumento en el contenido de flavonoides está involucrado en una gran variedad de procesos, incluyendo las interacciones planta-patógeno, la polinización, la detección de luz, el desarrollo de la semilla, los cuales se ven inducidas por condiciones de estrés durante la exposición al estrés biótico y abiótico (baja temperatura).

Un denominador común en estas condiciones de estrés ambiental es la producción y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como los aniones superóxido (O_2^{-}•), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo

(OH^{-}•) y el oxígeno singulete ($^{1}O_{2}$). La acumulación de ROS conduce a un estrés oxidativo que puede dañar los componentes celulares, tales como ADN, lípidos, proteínas y azúcares. Para minimizar los daños oxidativos relacionadas con el estrés, las plantas regulan homeostasis de las ROS por un complejo de maquinaria antioxidantes enzimática y no enzimática, y por lo tanto los flavonoides se han sugerido para actuar como antioxidantes, protegiendo las plantas contra el estrés oxidativo (Hernández *et al*., 2009; Shivashankara *et al.,* 2004; Rivera-Pastrana *et al*., 2013).

Esto respalda la presencia y aumento en el contenido de flavonoides en las túnicas de ajos proveniente de “semillas” almacenadas 5ºC durante 5 semanas, los cuales se ven inducidos por efecto del almacenamiento. El almacenamiento a 5°C incrementa el contenido de flavonoides totales en túnica de ajo conforme avanza el desarrollo en comparación con el almacenamiento a TA.

7.3.3 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en capacidad antioxidante

En la Figura 24 se observa el comportamiento de la capacidad antioxidante presentes en túnicas de plantas de ajos provenientes de “semillas” almacenadas a 5 °C y TA durante 5 semanas previo a la siembra. La capacidad antioxidante se determinó por el método de $DPPH^{\bullet}$ y se expresó como % de inhibición del radical en muestras.

Durante los primeros 44 DDS, no se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante de las túnicas provenientes de ambas condiciones de almacenamiento (TA y 5ºC). A partir de los 78 hasta los 129 DDS se observó un incremento significativo en la capacidad antioxidante en las túnicas provenientes de la condición de almacenamiento de 5 ºC que en TA.

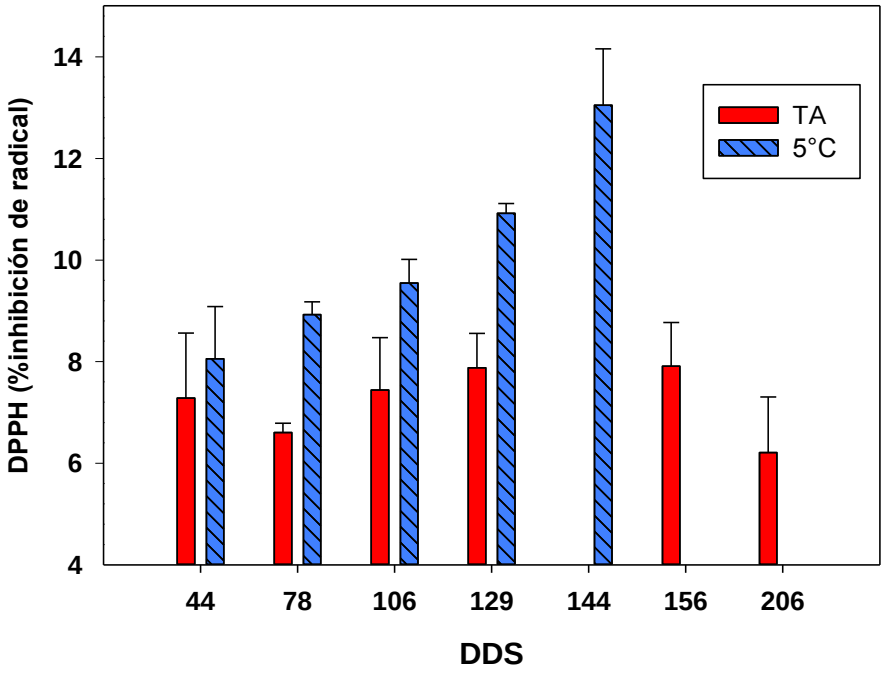


Figura 24. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la capacidad antioxidante por DPPH• (% inhibición del radical) en túnica de ajo generadas de "semilla" almacenadas a 5 °C y TA. DDS=Días después de siembra**.**

Al final del desarrollo (144 DDS) las túnicas de provenientes de la "semilla" almacenada a 5 ºC obtuvieron una capacidad antioxidante de 13.04 ± 1.10 % de inhibición del radical, mientras que para las túnicas de la condición TA al final del desarrollo (206 DDS) presentaron una disminución en la capacidad antioxidante (6.20 ± 1.89 % de inhibición del radical). En general se observa mayor capacidad antioxidante en las túnicas generadas de semillas almacenadas a 5ºC que en TA.

Se ha demostrado que los ajos y sus diferentes extractos tienen actividad antioxidante en diferentes modelos *in vitro*. Esta capacidad antioxidante de las plantas de la familia *Allium* es atribuido principalmente a una variedad de compuestos fenólicos, así como, a otros compuestos que contienen azufre y sus precursores (Kim, Kubota, y Kobayashi, 1997; Lampe, 1999). También se ha observado que algunos extractos de la familia *Allium* (cebolla y ajo) presentan

mayor capacidad antioxidante provocando inhibición de la peroxidación lipídica e inhibición del radicales (DPPH•), además se encontrado que las túnicas de los ajos poseen una mayor capacidad de inhibición de radicales que cualquier otro tejido de ajo y de cebolla (Nuutila *et al*., 2003).

Realizando un análisis de correlación de los datos de capacidad antioxidante (DPPH• % inhibición del radical) con el contenido de fenoles totales (mg EAG/g.m.s.) y flavonoides (mg Quercetina/g.m.s.), se observó mayor correlación entre la capacidad antioxidante y fenoles totales a 5ºC (R^2=0.94) durante el desarrollo, que a TA (R^2=0.81). Se observó una menor correlación entre la capacidad antioxidante y flavonoides totales a 5ºC y TA (R^2=0.45 y R^2=0.08 respectivamente).

En general, el incremento en el contenido de fenoles totales y flavonoides se correlaciona positivamente con la capacidad antioxidante inducida por el almacenamiento de la “semilla” a 5 °C, lo cual indica que estos compuestos pueden actuar como protección contra las ROS generados durante el almacenamiento del ajo. Hernández *et al.,* (2009) mencionan que algunos ácidos fenólicos y flavonoides en plantas actúan como antioxidantes, protegiendo las plantas contra el estrés oxidativo provocado por la exposición al estrés biótico y abiótico.

La correlación observada entre el contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante de túnica de 5°C indican que estos compuesto reducen las ROS generadas como respuesta al almacenamiento debido a una aclimatación al frio, se ha observado que la aclimatación al frio aumenta las ROS, activa el sistema antioxidante en las plantas, aunque no todas las ROS son simplemente productos tóxicos ya que pueden actuar como moduladores de la expresión de diversos genes incluyendo aquellas enzimas antioxidantes (Neill *et al*., 2002; Gechev *et al*., 2003; Suzuki *et al*., 2011).

7.3.5 Fructanos totales

En la Figura 25 se observa el contenido de fructanos presentes en disco basal y bulbos de plantas de ajos provenientes de “semillas” almacenadas a 5 °C y TA durante 5 semanas previo a la siembra. El contenido de fructanos se expresó como % de fructanos por materia seca.

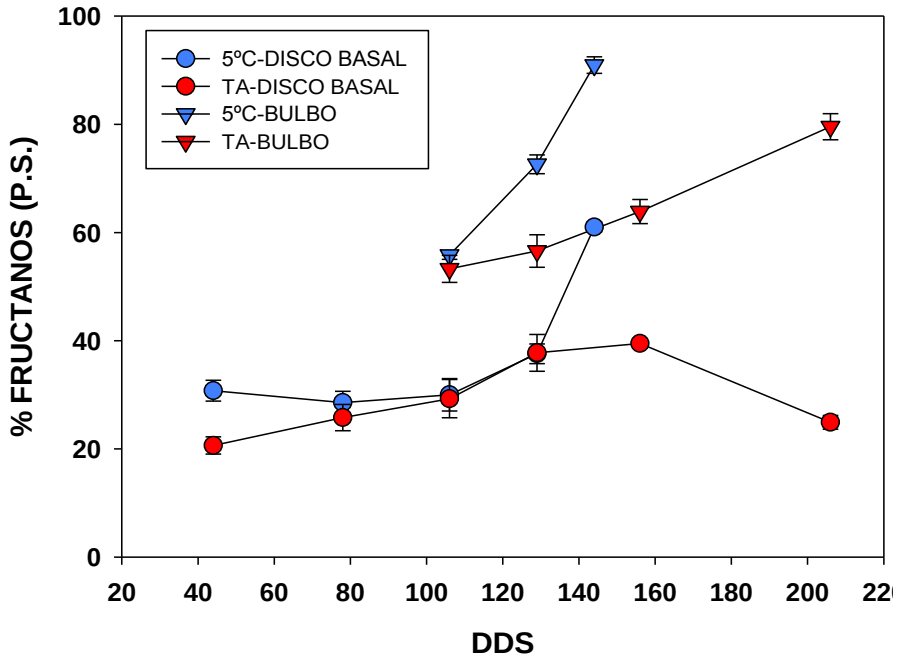


Figura 25. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el porcentaje de fructanos (% m.s.) en el disco basal y bulbo de ajo generadas de “semilla” almacenadas a 5 °C y TA. DDS=Días después de siembra**.**

Durante los primeros 44 DDS se observa un incremento significativo en el porcentaje de fructanos de las muestras de disco basal provenientes de la “semilla” de almacenadas a 5ºC (30.77 ± 1.91) que en TA (20.62 ± 1.59). A los 78, DDS el porcentaje de fructanos en disco basal para ambas condiciones de almacenamientos (5 °C y TA) son estadísticamente iguales (28.58 ± 2.08 y 25.79 ± 2.42 respectivamente) respecto a los 44 DDS. Posteriormente, a los 106 y 129 DDS se observa un incremento en ambas condiciones de almacenamiento. Al final del desarrollo (144 DDS) el disco basal proveniente de semillas almacenadas a

5ºC obtiene un porcentaje de fructanos de 61.01±0.87, mientras que los de TA disminuyen hasta 24.91±1.26. Durante la etapa de desarrollo del cultivo de ajos, los bulbos se obtuvieron a partir de 109 DDS, en el cual el porcentaje de fructanos en ambas condiciones de almacenamiento (5 °C y TA) fue estadísticamente igual (55.83 ± 0.79 y 53.29 ± 2.50 respectivamente). Al final del desarrollo se aprecia un incremento en ambas condiciones de almacenamiento, teniendo mayor porcentaje de fructanos los bulbo del almacenamiento de 5 ºC (91.95 ± 1.53) que TA (79.56 ± 2.43).

Los datos encontrados en este trabajo fueron similares a lo reportado por Galaz Pérez (2008); quien encontró mayor acumulación de fructanos en hojas de ajo obtenidas de semillas almacenadas a 5 y 0 ºC durante los primero 95 y 109 DDS, mientras que las hojas de TA disminuyeron en durante todo el desarrollo. De igual manera López Hernández (2010) encontró mayor contenido de fructanos en bulbos originados de semillas almacenadas a 5 ºC (56 %) que en TA (34.4 %) durante los 157 DDS, en tallos observó mayor porcentaje de fructanos en TA que en 5ºC, aunque se fueron disminuyendo durante el desarrollo del cultivo.

Los fructanos son carbohidratos de reserva en plantas y se almacena en tallos, tubérculos o raíces. Se ha sugerido que los fructanos protegen a la planta contra la sequía y estrés por frío, produciendo y acumulando fructanos de alto grado de polimerización, lo cual indica que tiene una función importante como regulador osmótico durante la bulbificación. Esto es debido que durante la aclimatación a la frio se sobreexpresan genes de 6-SFT y 1-SST el cual aumenta significativamente el contenido de fructanos (Henry ,1978; Pollock, 1986; González *et al.,* 1990; Puebla *et al*., 1997; Hisano *et al*., 2004; Shyama *et al.,* 2011).El incremento significativo en el contenido de fructanos en el disco basal y sobre todo en el bulbo al final del desarrollo de las plantas de ajo provenientes del almacenamiento a 5 °C por 5 semanas, sugiere que los fructanos ejercen un efecto protector durante la aclimatación al frío en el almacenamiento, mientras que

durante el desarrollo se observa una acumulación de fructanos debido que los carbohidratos se están almacenando para el siguiente ciclo del cultivo.

7.4 Análisis enzimáticos

Se analizaron las actividades específicas de las enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) en túnica y hojas, así como la actividad de sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (1-SST) en bulbo y disco basal durante el desarrollo en campo de ajos provenientes de “semillas” almacenadas a 5ºC y TA durante 5 semanas.

7.4.1 Cambio en la actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL)

En la Figura 26 se observa el cambio en la actividad específica de PAL en muestras de hojas y túnica generadas de “semillas” almacenadas a 5ºC y TA durante 5 semanas. El cambio en la actividad específica de PAL se expresó en 1U/mg de proteína*h. En hoja, durante los primeros 44 DDS se observa un incremento pero estadísticamente igual en la actividad de PAL en 5ºC (0,244±0,0112U/mg de proteína*h) que en TA (0,168±0,064U/mg de proteína*h). A los 78,106 y 129DDS la actividad de PAL fue estadísticamente igual en 5ºC y TA (0.242±7,95^{-3}, 0.20 ± 1,32^{-4}, 0.256 ± 1,32^{-4} y 0.216 ± 9,32^{-3}, 0.1742 ± 0,022, 0.212±0,027 U/mg de proteína*h respectivamente), al final del desarrollo las hojas de 5ºC (144 DDS) tienen la mayor actividad de 0,444 ±1,32^{-4}U/mg de proteína*h, mientras que hojas de TA al final del desarrollo (209 DDS) tienen una actividad de 0,40±0,0177U/mg de proteína*h.

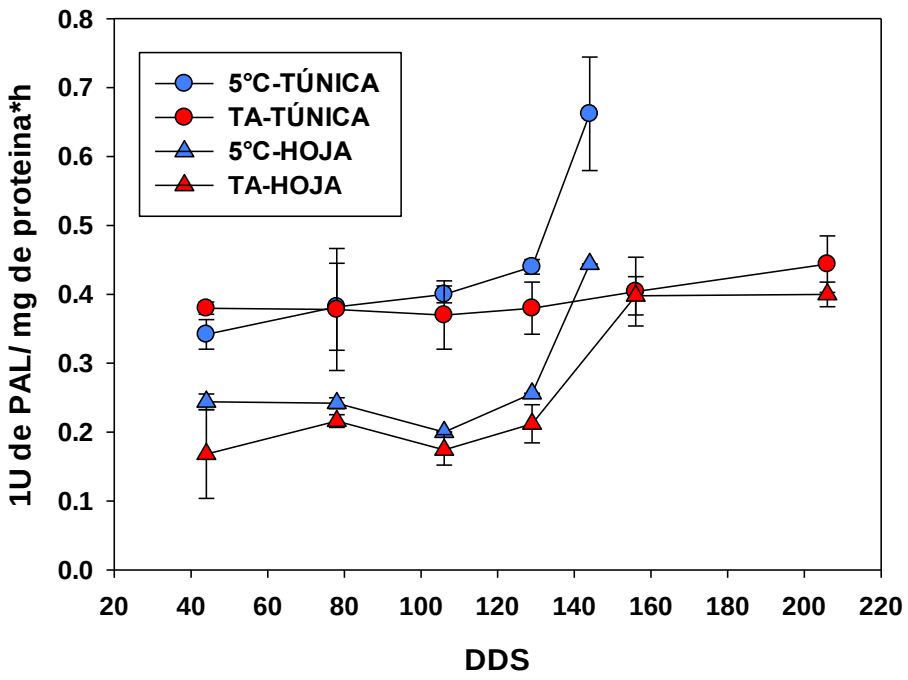


Figura 26. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad específica de PAL (U/mg de proteína*h). DDS=Días después de siembra**.**

En las túnicas la actividad específica de PAL fue estadísticamente igual desde los 44 hasta los 129 DDS en 5ºC y TA (0.342 ± 0.0214, 0.382 ± 0.0631, 0.40 ± 0.0123, 0.404 ± 0.0106 y 0.38 ± 8.98^{-3}, 0.378 ± 0.088,0.37±0.049,0.38 ± 0.037U/mg de proteína*h respectivamente). Al final del desarrollo (144 DDS) en 5ºC se observa un incremento significativo de la actividad específica de PAL (0.662 ± 0.0823 U/mg de proteína*h), mientras que las túnicas de TA al final del desarrollo (209 DDS) obtienen una actividad específica de 0.444 ± 0.041 U/mg de proteína*h. Realizando una correlación entre la actividad específica de PAL y la concentración de compuestos fenólicos totales en túnica durante el desarrollo, se observa que en túnica generadas a partir de semillas almacenadas a 5ºC por 5 semanas se encontró mayor correlación (r^2=0,88) que en las túnicas de TA (r^2=0.61). Lo cual indica que la enzima está sintetizando productos que van a la ruta de los flavonoides como respuesta al estrés provoca por el almacenamiento.

En diferentes estudios se han observado que la actividad de la enzima PAL incrementa su actividad en respuesta a condición de baja temperatura en diferentes especies), estas condiciones provoca una acumulación de la proteína PAL durante la aclimatación al frío en (Graham y Patterson, 1982; Parra *et al*., 1990). Christie *et al*., (1994), observaron una pigmentación morada en el maíz que estuvo en condición de baja temperatura en campo, el cual se correlaciona con un incremento en el contenido y antocianina, esta correlación es inducida por efecto de la baja temperatura el cual provoca una la acumulación de ARNm de Chalcona sintasa y PAL. Además menciona que está enzima aumenta su actividad en respuesta al estrés térmico y es considerada por la mayoría de los autores ser una de las principales líneas de aclimatación celular contra el estrés en las plantas.

A demás los datos de correlación encontrados en este trabajo se relaciona por lo observado por Rivero *et al*., (2001) quienes evaluaron el efecto del frío y calor en la acumulación de compuestos fenólicos en tomate y sandía, encontrando en ambas condiciones de estrés mayor actividad de PAL en las dos muestras, el incremento de la actividad de PAL se correlaciona con la concentración de compuestos fenólicos solubles en tomate (r^2=0.812) y sandía (r^2=0.91) por efecto al estrés por frío, lo cual indica que la enzima PAL produce compuesto para proteger a la planta al estrés por el frío. Estos datos indica el efecto que tiene el almacenamiento a 5ºC de la “semilla” previo a la siembra el cual induce a una mayor actividad específica de PAL en túnicas de ajo durante el desarrollo. La correlación encontrada podría indicar una acumulación de compuestos fenólicos en las túnicas producto del estrés, generando la acumulación de los pigmentos en las túnicas, como el caso de las antocianinas y flavonoides. Por otro lado, el aumento en el contenido de estos compuestos es debido por el estrés durante la exposición a la baja temperatura, que posiblemente está induciendo a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

7.4.2 Cambio en la actividad enzimática de sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa (1-SST)

En la Figura 27 se muestra la actividad específica de la enzima 1-SST expresados mg 1-Kestosa/mg de proteína*h en muestras de disco basal (DB) y bulbo generados de “semillas” almacenadas a 5 ºC y TA durante 5 semanas. A los 44 y 78 DDS, los DB del almacenamiento a 5 ºC, obtuvieron un incremento significativo en la actividad (1.35 ± 0.039 y 1.46 ± 0.04 1-Kestosa/mg proteína*h respectivamente) que los de TA (1.005 ± 0.03 y 1.003 ± 0,07 mg 1-Kestosa/mg proteína*h respectivamente), a los 106, 129 y 144 DDS se observa una disminución en la actividad de la enzima en el DB de 5 ºC (1.35 ± 0.03, 1.13 ± 0.05 y 1.08 ± 0.031 mg 1-Kestosa/mg proteína*h respectivamente) mientras que en TA incrementa a los 106, 129 DDS (1.240 ± 0.033 y 1.405 ± 0,029 mg 1-Kestosa/mg proteína*h respectivamente) y posteriormente disminuye a los 129 y 209 DDS (1.063 ± 0.027y 1.013 ± 0,028 mg 1-Kestosa/mg proteína*h respectivamente).

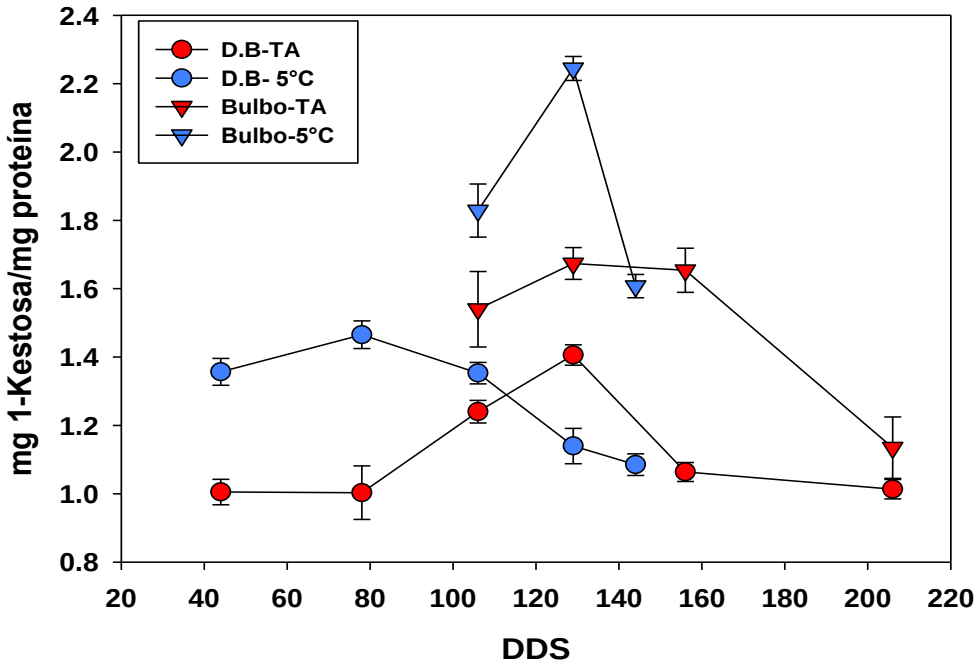


Figura 27. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad específica de 1-SST (mg 1-Kestosa/mg de proteína). DDS=Días después de siembra**.**

A los 109 DDS se obtuvieron los bulbos de ajos generados de “semillas” almacenadas a 5 ºC y TA durante 5 semanas, en la figura 28 se observa un incremento significativo de la actividad específica de 1-SST en los bulbos de 5 ºC (1.828 ± 0.077 mg 1-Kestosa/mg proteína*h) que en TA (1.5401±0.1107 mg 1-Kestosa/mg proteína*h). Posteriormente a los 129 DDS los bulbos del tratamiento de 5 ºC alcanzan su máxima actividad (2.244 ± 0.035 mg 1-Kestosa/mg proteína*h) y al final del desarrollo (144 DDS) disminuye a 1.607 ± 0.034 mg 1-Kestosa/mg proteína*h, mientras que en TA a los 129 y 156 DDS alcanzan valores de 1.673±0,046 y 1,654±0,064 mg 1-Kestosa/mg proteína*h respectivamente y al final de su desarrollo disminuye a 1.134±0,08 mg 1-Kestosa/mg proteína*h.

Los datos encontrados en este trabajo son similares a lo reportado por Vázquez-Mandujano (2009), quien evaluó la actividad de la 1-SST y su relación con la acumulación de fructanos durante el desarrollo del ajo, encontrando mayor actividad específica de esta enzima a los 155, 229 y 259 DDS en bulbos proveniente de semillas almacenadas a 5ºC que en 10 ºC y TA. Por otro lado se ha observado El incremento de la actividad específica de 1-SST en el bulbo y disco basal proveniente de “semillas” almacenadas a 5 °C podría indicar la capacidad de las plantas para sintetizar fructanos, al inicio del desarrollo es posible que sea por la inducción de la aclimatación al frío ejerciendo un efecto crio protector en las células de ajo y al final del desarrollo por acumulación en el bulbo como carbohidrato de reserva.

7.5 Análisis de expresión de genes

Se realizó en análisis de expresión de los genes fenilalanina amonio liasa (*AsPAL*), Cinnamato 4-hydroxilasa (*AsC4H*) y 4Cumarato-CoA ligasa (*As4CL*) de la ruta de los fenilpropanoides y sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (*As1-SST*) de la síntesis de fructanos en brote de ajos almacenados a 5ºC y TA durante

cinco semanas, así como de raíz y disco basal durante el desarrollo de semillas proveniente de ambas condiciones de almacenamiento.

7.5.1 ARN total de ajo

En la Figura 28 se observa la calidad de algunos de los ARN totales de ajo obtenidos de los diferentes tejidos a partir del método de Trizol® descrito por Sambrook y Russell., (2001), sin presencia de contaminación por ADN genómico, además se logran distinguir claramente las regiones 28S, 18S y 4-5S ribosomal.

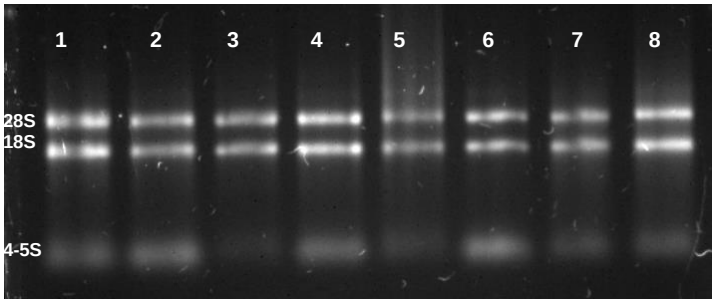


Figura 28. Gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con Gel Red^{TM}, carril 1: Brote 5ºC, carril 2: Brote TA, carril 3: Disco basal 5ºC, carril 4: Disco basal de TA, carril 5: Raíz 5ºC, carril 6: Raíz TA, carril 7: Raíz 5ºC y carril 8: Disco basal 5ºC.

Posterior a la cuantificación de la densidad óptica (D.O.) del ARN, mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm, así como de la pureza del ARN total obtenido de los diferente tejidos y DDS de ajo se realizó la síntesis de la cadena ADNc y la amplificación de los genes de interés por PRC-punto final y PCR en tiempo real.

7.5.2 Análisis y confirmación de genes de ajo por PCR-punto final

Con el objetivo de validar la presencia de los genes (*AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST)* en las muestras de ajo (brote, disco basal y raíz) provenientes de “semillas” almacenadas a 5 °C por 5 semanas se realizó la amplificación mediante

la técnica de PCR punto final. En la Figura 29 se observa la amplificación de los genes *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* a los 44 y 129 DDS provenientes de "semilla" almacenadas a 5 °C y TA, así como el tamaño del amplicón en pares de bases, los productos de la reacción se secuenciaron y se comprobó su homología en NCBI.

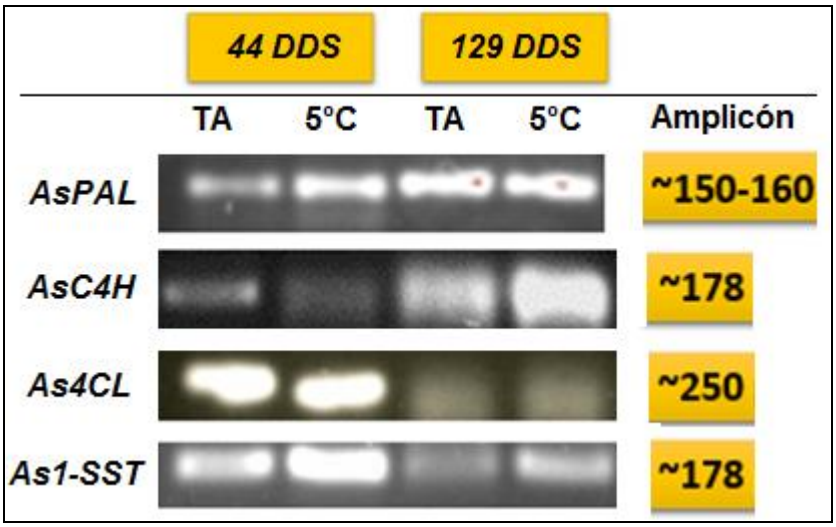


Figura 29. Gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con Gel Red^{TM}. Amplificación de genes *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* en disco basal provenientes de "semillas" almacenadas a 5 °C por 5 semanas. DDS=Días después de siembra.

7.5.3 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la expresión relativa de genes en brotes

En la Figura 30 se compara la expresión relativa de los genes *AsPAL, AsC4H, As4CL* (ruta de fenilpropanoides) y *As1-SST* (síntesis de fructanos) en brote de ajos proveniente de "semilla" almacenadas a 5 ºC con respecto a TA durante 5 semanas, ésta se expresa como el número de veces que cambia la expresión de los genes almacenado a 5ºC respecto a TA. Analizando los genes de la ruta de los fenilpropanoides se observa que el gen *AsPAL* a 5ºC se sobreexpresa 8.91 ± 0.36 veces con respecto a TA, *AsC4H* de la condición de 5ºC sobreexpresa 4,96 ± 0,42 veces respecto a TA, mientras que el *As4CL*

sobreexpresa 24,36±1,83 veces en relación a TA. Para el análisis del gen que codifica la enzima que sintetiza fructanos; *As1-SST* de la condición de 5ºC sobreexpresa 18,13±0,78 veces respecto a la condición de almacenamiento TA.

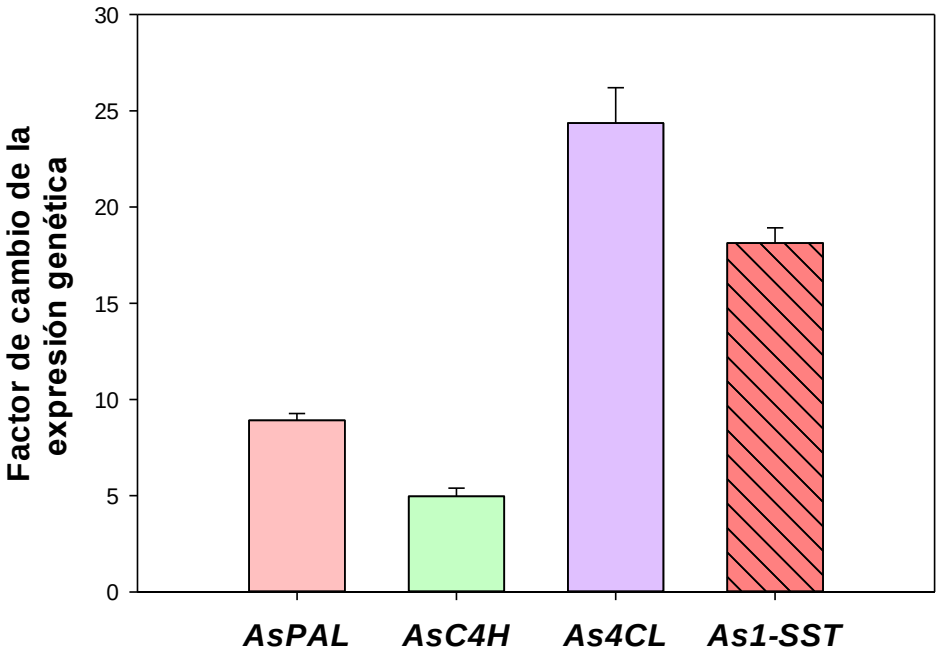


Figura 30. Cambio en el número de veces en la expresión relativa de *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* en brotes provenientes de "semillas" almacenados a 5ºC (experimental) con respecto a brotes a TA (control).

Estos resultados son similar a lo reportado por Zavala Gutiérrez (2011) quien encontró sobreexpresión de los genes *PAL*, *C4H* y *4CL* en brotes de ajos almacenados a 5ºC durante 5 semanas en las clonas K-18, K-65 y K-23 respectivamente. Jae-Han *et al*., (2012) menciona que la aclimatación de ajos a bajas temperaturas induce la síntesis de antocianinas, la cual provoca una señalización a través factores de nodulación de flavonoides, el cual ejerce una protección contra estrés biótico y abiótico.

La sobreexpresión del gen *As4CL* por efecto de la temperatura de almacenamiento (5°C) y el tiempo de exposición (5 semanas) se asocia al incremento del contenido en fenoles totales, flavonoides y antocianinas, aunque el producto de 4CL (*p*-Coumaroyl CoA) pueda dirigirse a síntesis de cumarinas, taninos hidrolizables, benzoatos, monolignoles, lignanos y ligninas. Los resultados obtenidos en este trabajo, así como lo reportado por Dufoo *et al*., (2013) sugieren que la mayor parte de p-Coumaroyl CoA se están dirigiendo hacia la ruta de los flavonoides. En general, en el brote se observa el cambio en el incremento de los genes *AsPAL*, *AsC4H* y sobre todo de *As4CL* lo que indica que se está induciendo la síntesis de los fenilpropanoides y principalmente de compuestos como fenoles, antocianinas y flavonoides por efecto de la aclimatación al frío durante las 5 semanas de almacenamiento.

Por otra parte, la sobreexpresión del gen *As1-SST* es inducida por efecto del almacenamiento de la “semilla” a 5 °C durante 5 semanas. Estos resultados se relacionan con lo reportado por Zavala-Gutiérrez (2011), quien identificó dos genes de isoenzimas del metabolismo de fructanos por la hibridación diferencial en brotes de ajo almacenados a 5ºC durante 5 semanas en comparación con los de TA, encontrando sobreexpresión del gen 1-SST en brotes de ajos almacenados a 5ºC en las clonas K-89 y K-92. Se ha reportado que la actividad de la 1-SST está relacionada a la síntesis de fructanos por efecto de la baja temperatura. González *et al.,* (1990) sugieren que las bajas temperaturas afectan el metabolismo de las plantas produciendo fructanos de alto grado de polimerización constituyendo el principal substrato para la síntesis y acumulación de sacarosa. Muchas gramíneas inducen la expresión de los genes*1-SST*, *FT* y *6-SFT* y acumulan fructanos como polisacáridos de reserva en respuesta al aumento de contenidos de azúcares por efecto de las condiciones de crecimiento sub-óptimas de baja temperatura (Shyama *et al.,* 2011).

7.5.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la expresión relativa de genes en raíz

En la Figura 31 se compara la expresión relativa de los genes *AsPAL, AsC4H, As4CL* (ruta de fenilpropanoides) y *As1-SST* (síntesis de fructanos) en raíz por efecto del almacenamiento de la "semilla" a 5ºC con respecto a TA, se muestra la sobreexpresión como el número de veces que cambia la expresión de los genes de ajos durante el desarrollo. En la figura 31 A se observa la sobreexpresión del gen *AsPAL* por efecto del almacenamiento a 5 °C a los 44DDS (32.86 ± 1.6 veces), 108 DDS (10.53 ± 0.43 veces) y al final del desarrollo (0,61± 0,10 veces) con respecto a TA respectivamente.

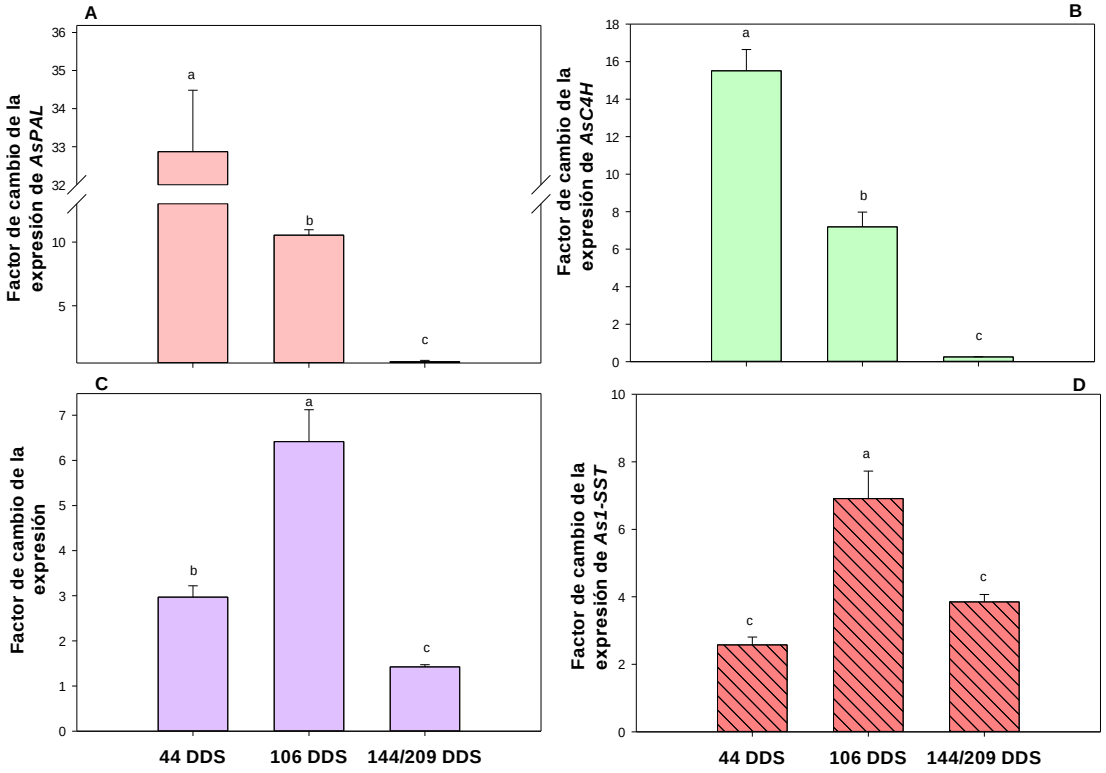


Figura 31. Cambio en la expresión relativa de los genes *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* en raíz durante el desarrollo provenientes de "semillas" almacenadas a 5ºC (experimental) respecto a TA (control) durante 5 semanas. Letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey ≤ 0.05). DDS=Días después de siembra.

En la Figura 31 B se observa una sobreexpresión del gen *AsC4H* de 15.51±1.13 veces por efecto del almacenamiento a 5°C en los primeros 44 DDS, posteriormente a los 106 DDS se reduce (7.18 ± 0.78 veces) con respecto a TA respectivamente, y al final del desarrollo casi iguala la expresión del control (0.25 ±0.011 veces)

Para la Figura 31 C, que corresponde a la expresión del gen *As4CL*, a los 44 DDS se observa una sobreexpresión de 2.96 ± 0.25 veces, a los 106 DDS este gen aumentó a 6.41 ± 0.70 veces y al final del desarrollo este incremento se reduce a 1.42 ± 0.04 veces respecto a TA respectivamente.

En la Figura 31 D se observa la sobreexpresión del gen *As1-SST* durante el desarrollo en campo, a los 44 DDS se observa una sobreexpresión de 2.57±0.23 veces, a los 106 DDS este gen incrementa a 6.90±0.81 veces y al final del desarrollo este incremento se reduce a 3,84±0,22 veces respecto a TA respectivamente.

EL incremento de *AsPAL, AsC4H* y *As4CL* durante los primeros 44 DDS en raíz sugieren que los productos (*p*-coumaroyl CoA) de esta vía pudieran estar dirigiéndose la vía de la síntesis de ligninas. El nivel de expresión de *as4CL* a los 106 DDS en las raíces de *A. sativum* está relacionado con la síntesis de compuestos fenólicos para la producción de lignina, así como de flavonoides debido al estrés inducido y a la interacción con otros factores en campo (Hernández *et al*., 2009; Shivashankara *et al.,* 2004;.Pham *et al*., 2011).

El incremento a los 106 DDS en el factor de cambio de la expresión del gen *As1-SST* en la raíz sugiere que se está sintetizando en exceso compuestos como fructanos los cuales se transportan al bulbo, disco basal y raíz por efecto de almacenamiento de la “semilla” a 5ºC durante 5 semanas.

7.5.4 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la expresión relativa de genes en disco basal

En la Figura 32 se observa la expresión de los genes *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* (ruta de fenilpropanoides) y *As1-SST* (síntesis de fructanos) en disco basal de ajos provenientes de "semillas" almacenadas a 5 ºC con respecto a TA durante 5 semanas. En la Figura 32 A se observa que durante los primeros 44 DDS se sobreexpresa el gen *AsPAL* (4.16±0.08) por efecto del almacenamiento a 5°C, posteriormente a los 106 DDS observa una sobreexpresión de 10,15±0,23 veces y final del desarrollo la expresión es casi igual (1.17±0.19) con respecto a TA respectivamente.

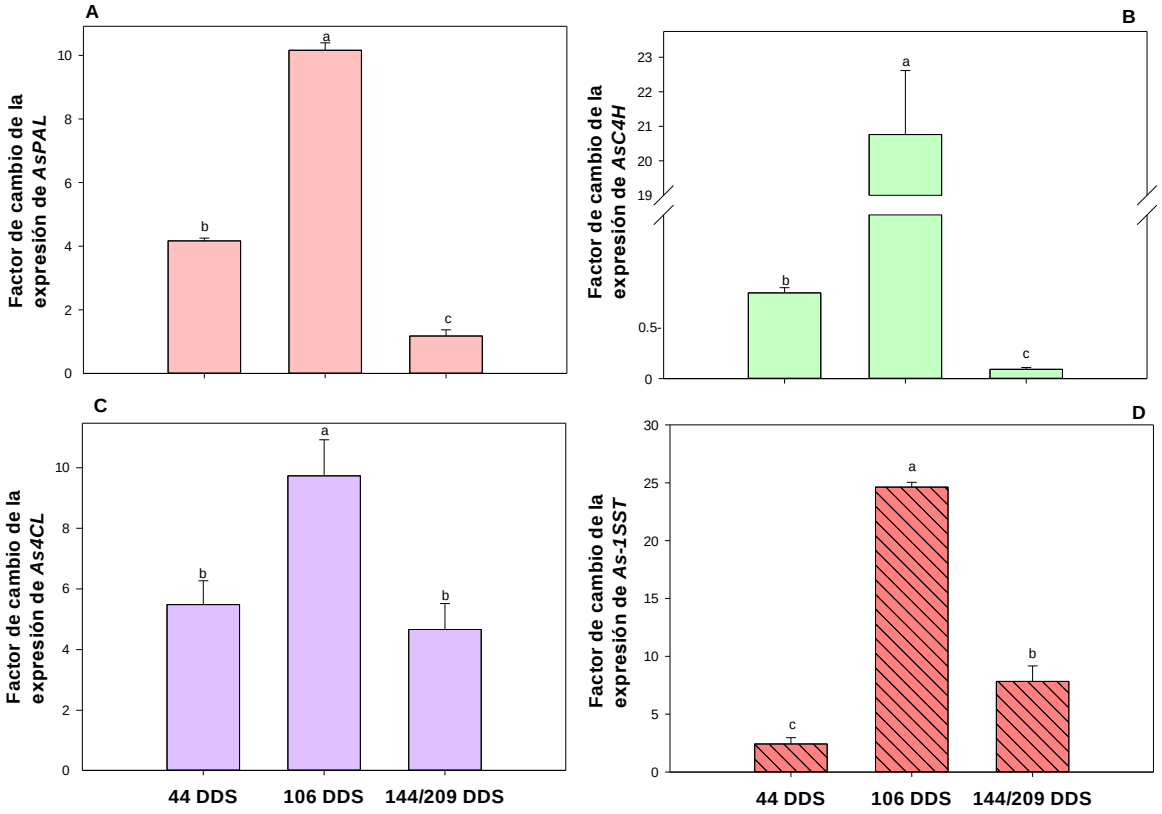


Figura 32. Cambio expresión relativa de *AsPAL*, *AsC4H*, *As4CL* y *As1-SST* en disco basal durante el desarrollo de "semillas" almacenadas a 5ºC (experimental) respecto a TA (control) durante cinco semanas. Letras diferente presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey=0.05). DDS=Días después de siembra.

En la figura 32 B se observa la expresión a los primero 44 DDS del gen *AsC4H* de 1.04 ± 0.06 veces por efecto del almacenamiento de la “semilla” a 5 °C previo a la siembra, posteriormente a los 106 DDS incrementa la sobreexpresión a 20.76±1.85 y final del reduce el factor de cambio a 0.11 ± 0.02 con respecto a TA respectivamente. Para Figura 32 C corresponde al gen *As4CL*, a los 44 DDS se observa un incremento en la expresión de 5.46 ± 0.78 veces, mientras que a los 106 DDS este gen se sobreexpresa 9.71 ± 1.18 veces y al final del desarrollo la expresión se redujo a 4.64 ± 0.85 veces respecto a TA respectivamente. En la Figura 32 D se observa el comportamiento del gen *As1-SST* durante el desarrollo en campo, a los 44 DDS se observa un ligero incremento en la expresión de 2.42 ± 0.54 veces, a los 106 DDS este gen se sobreexpresa a 24.62 ± 0.41 veces y al final del desarrollo la expresión se reduce a 7.83 ± 1.33 veces respecto a TA respectivamente.

La sobreexpresión de los genes *AsPAL*, *AsC4H*, y *As4CL*a los 44 DDS en disco basal sugieren que el almacenamiento a 5 °C provoca una señal temprana que induce la biosíntesis de compuestos fenólicos y antocianinas en los tejidos. Pero a los 106 DDS se relaciona con el incremento en el contenido de fenoles totales y flavonoides encontrados en túnica, esto indica que los productos de 4CL (*p*-Coumaroyl CoA) se están dirigiendo a las vía de la síntesis de los flavonoides, estos datos se relaciona con lo encontrado por Dufoo *et al*., 2013, quienes observaron mayor contenido de antocianinas en los bulbos provenientes de semilla almacenadas a 5ºC que en TA en específico cianidin-3-O-glucósido, cianidin-3-O-(3-malonil) glucósido, cianidin-3-O-(3-acetoil) glucósido, cyanidin-3-O-(6-malonil) glucósido y cianidin-3-O-(6-malonyl acetoil) glucósido.

En general la sobreexpresión de los genes *AsPAL*, *AsC4H* y *As4CL* en el disco basal provenientes de semillas almacenadas a 5ºC durante 5 semanas se relaciona con el aumento del contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante, así como la actividad específica de la enzima PAL durante el

desarrollo de diferentes tejidos encontrados en este trabajo. Unos de los efectos que causa la aplicación del almacenamiento a 5ºC durante cinco semanas es la activación de estos genes de enzimas de la ruta de los fenilpropanoides como respuestas al estrés.

En diferentes estudios se ha observado la expresión de algunos genes de la ruta de los fenilpropanoides por efecto de la aclimatación al frío, lo que provoca una condición de estrés en la planta generando especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuáles causan daños en algunos componentes celulares, la planta responde a este estrés generando compuestos como fenoles y flavonoides, debido a que ejercen una acción antioxidante (Hernández *et al*., 2009; Shivashankara *et al.,* 2004); por otra parte se ha observado la sobreexpresión de los genes de la ruta de los fenilpropanoides durante el desarrollo, Christelle M. *et al*., (2009) quienes realizaron un estudio sobre biosíntesis de polifenoles y genes reguladores, que podría ser útil en el desarrollo de variedades de papa, encontraron una expresión en los genes que codifican para *PAL* y *C4H* a los 15 DDS en diferentes variedades de papas el cual se está correlacionado con el contenido de polifenoles en condiciones normales y en condiciones de estrés de sequía. Esta buena correspondencia entre el nivel de transcripción y el nivel de metabolito sugiere que estas enzimas están regulando, al menos en parte, en el nivel transcripcional y que el control de la expresión de genes juega un papel esencial en la vía de biosíntesis de polifenoles. Salvatierra *et al*., (2010) encontraron una sobreexpresión de los genes *PAL, CHS, CHI* y *F3H* durante las etapas de desarrollo y maduración de frutos de fresa de un cultivar nativo Chileno, pero estos genes se sobreexpresaron al final del desarrollo de las frutillas, debido a que los genes de los flavonoides implicados en la biosíntesis de antocianinas muestran sobreexpresión durante la maduración que conduce a la pigmentación de la fruta en *F. ananassa* estableciendo así una correlación positiva entre los niveles de transcripción de los genes de flavonoides y la acumulación de antocianinas. Por otra parte, se ha observado que existen factores de transcripción que regulan la expresión del gen *PAL*. Por ejemplo en Arabidopsis, un complejo

R2R3-MYB y proteínas WD-repeat controlan la biosíntesis de antocianinas (Ramsay y Glover, 2005). Además dos factores de transcripción tipo MYB, PAP1/MYB75 y PAP2/MYB90, están involucrados en la regulación de la síntesis de antocianinas (Borevitz *et al*., 2000).

Con respecto al gen *As1-SST* se observó una sobreexpresión en el disco basal de ajos provenientes semillas almacenadas a 5ºC durante 5 semanas que se relaciona con el incremento en el contenido de fructanos totales en disco basal y bulbo de ajos generados de la condición de 5ºC, así como la actividad específica de la enzima 1-SST encontrados en este trabajo. Se sabe que los fructanos son considerados carbohidratos de reserva y se han relacionado con un alto grado de resistencia al frío, se sugiere que además de ser carbohidratos de reserva tienen otra función importante como regulador osmótico durante la bulbificación.

La sobreexpresión de este gen a los 106 DDS indica que el producto de la enzima 1-SST (1-kestosa) se está dirigiendo a la síntesis de fructanos, el cual se está almacenando con mayor cantidad en los bulbos de 5°C que en los de TA. Hasta el momento no existen reportes del efecto de estrés por frío en el contenido y perfil de fructanos en ajo. Sin embargo, ésta acumulación en los bulbos indica una respuesta por efecto de la temperatura de almacenamiento que posiblemente este incrementando el grado de polimerización de los mismos. Sabine *et al*., (2000) han reportado que el ajo (*Allium sativum*) tiene un grado de polimerización cercano a 58, dependiendo del grado de polimerización de los fructanos, éstos ejercen un efecto prebiótico en el colon produciendo ácidos grasos de cadena corta y lactato causada por la fermentación anaeróbica de las bacterias presentes. En especies de gramíneas se ha encontrado una inducción transcripcional de los genes 1-SST y 6-SFT en respuesta al frío y los niveles de transcripción de *wft1* (6-SFT) y *wft2* (1-SST) aumentan en el trigo de octubre a diciembre (meses fríos) en Sapporo, Japón (Kawakami and Yoshida, 2002). Recientemente se ha encontrado en trigo que existen tres factores transcripcionales que pueden regular

la síntesis de fructanos (TaMYB13-1, TaMYB13-2 y TaMYB13-3), estos factores se unen a la región promotora de los genes de las plantas productoras de fructanos 1-SST, 1-FFT y 6-SFT y estimulan su expresión (Xue *et al.*, 2011; Kooiker *et al.*, 2013).

El efecto encontrado en la vía de síntesis de los fenilpropanoides de ajo proveniente de semilla almacenada a 5 ºC indica que este almacenamiento induce la sobreexpresión de las enzimas involucradas en la ruta al inicio del cultivo y durante el desarrollo en campo, lo cual se traduce en un aumento de la actividad enzimática y por tanto la producción y acumulación de metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides y antocianinas). Estos metabolitos secundarios por su capacidad antioxidante, tienen un papel importante en la regulación de las especies reactivas de oxígeno, generadas por el estrés por frío.

El almacenamiento de la “semilla” a 5 °C durante 5 semanas induce la sobreexpresión del gen *As1-SST* en diferentes tejidos, la cual se traduce en el aumento de la actividad enzimática de 1-SST y por tanto de la producción y acumulación de fructanos totales al final del desarrollo. Durante el desarrollo en campo, la acumulación de fructanos se debe a que la planta ocupará estos carbohidratos como nutriente para producir un nuevo organismo, y en condiciones de estrés por frío, el contenido se ve aumentado, lo cual sugiere que pueden además participar en el mecanismo de aclimatación al frío regulando el equilibrio osmótico.

VIII. CONCLUSIONES

Los ajos de cv. “Coreano” generados de “semillas” almacenadas a 5 °C por 5 semanas adelantaron su ciclo de cultivo 62 días, presentaron una rápida diferenciación y mayor coloración en comparación con los almacenados a TA.

El acondicionamiento en frío de la “semilla” induce la sobreexpresión de los genes *AsPAL, AsC4H, As4CL* de la ruta de los fenilpropanoides, la cual se traduce a un aumento en la actividad enzimática, producción y acumulación de fenoles totales y flavonoides durante el desarrollo de las plantas en campo.

El gen *As1-SST* de la ruta de los fructanos se sobreexpresó en las plantas provenientes de semillas almacenadas a 5 °C, lo cual provoca una mayor actividad específica de la enzima 1-SST y por tanto mayor acumulación de fructanos totales en plantas de ésta condición con respecto a las de TA.

El acondicionamiento a 5 °C de la “semilla” por 5 semanas en general fue suficiente para inducir una respuesta de defensa contra el estrés oxidativo en la nueva planta durante todo el desarrollo, lo cual podría llevar a una mayor tolerancia a otros tipos de estrés y/o enfermedades en campo.

IX. LITERATURA CITADA

Allen D.J., Ort D.R. 2002, Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends Plant Sci., 6 ,pp. 36–42

Batchvarov, S. 1993. Garlic: *Allium sativum L*. En G. a. Kallo, Genetic improvement of vegetable crops. Ed. Pergamon Press. New York. 15-27.

Bertoni G., Morard P., Soubieille C., Llorens J. M. 1992. Growth and nitrogen nutrition of garlic (*Allium sativum* L.) during bulb development Scientia Horticulturae, Volume 50, Issue 3, Pages 187 195

Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., Lamb, C., 2000. Activation tagging identi-fies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell 12,2383–2393.

Bradford, M. M. 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. Analytical biochem. 72: 248-254.

Braz L. T., E.J. da Silva, and Castellane, P. D. 1997. The effect of pre planting refrigeration on bulbs over the development and yield of garlic ‘chines’,‘Contestado’ and ‘Quiteria’. Acta. Hort. 433: 499-505.

Breslauer K J, R Frank, H Blöcker and L A Marky.1986. Predicting DNA duplexstability from the base sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry. Vol. 83, pp. 3746-3750.

Brewster, J.L. 1994. Onions and other vegetable alliums. Ed. CAB International.236 p.

Burba J.L. 1992. Producción, propagación y utilización del ajo (*Alium Sativum*) en producción poscosecha procesamiento y comercialización del ajo cebolla ytomates. Santiago de Chile FAO. 63-126.

Cabrera E. and Elliot P. 1996. La cabeza que solo tiene dientes. 1er encuentro sobre agricultura urbana y su impacto en la alimentación de la comunidad 1 (5): 22-23.

Christelle M. André, Roland Schafleitner, Sylvain Legay, Isabelle Lefèvre, Carlos A. Alvarado Aliaga, GianninaNomberto, Lucien Hoffmann, Jean François Hausman, YvanLarondelle, Danièle Evers. 2009. Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. Phytochemistry 70, 1107–1116

Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V., 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. Planta 194:541-549

CONAJO. Consejo Nacional de Productores de Ajo. Consulta: Agosto 2009. URL: http://www.conajo.com.mx.

Del Pozo, A. y González, M. I. 2005. Developmental responses of garlic to temperature and photoperiod. Agricultura Técnica 65(2):119-126.

Dufoo-Hurtado MD, Zavala-Gutiérrez KG, Cao CM, Cisneros-Zevallos L, Guevara-González RG, Torres-Pacheco I, Vázquez-Barrios ME, Rivera-Pastrana DM, Mercado-Silva EM. 2013. Low-temperature conditioning of "seed" cloves enhances the expression of phenolic metabolism related genes and anthocyanin content in 'Coreano' garlic (*Allium sativum*) during plant development. J Agric Food Chem.;61: 10439-46

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Databas. Reference. Consulta: 2011. URL: http:// faostat3.fao.org /home/index_es. html?l ocale =es# VISUALIZE_BY_DOMAIN.

Fenwick, G.R., Hanley, A.B., 1990. Processing of alliums; use in food manufacture. In: Rabinowitch, H.D., Brewster, J.L. (Eds.), Onions and Allied Crops, vol. III. CRC Press Inc., Boca Rat´on, Florida, pp. 73–91.

Ferreira, F. A., Casali, V.W.D., and Rezende, G.M., 1987. Uso da frigorificao na adaptacao a cultivar Quitériaem Minas Gerais. Horticultura Brasileira 5(1):

Galaz-Pérez, E. 2008. Efecto de factores ambientales precosecha en el desarrollo de la planta, bulbificación, calidad y acumulación de fructanos en ajo. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 106 p.

García-Alonso, C. R. 1998. El ajo: cultivo y aprovechamiento. Mundi-Prensa 2ª ed. Madrid, España.p 41-42.

Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W, Toneva V, Minkov I (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. J Plant Physiol 160:509–515

Giaconi M. y Escaff M. 1993. Cultivo de hortalizas., Editorial Universitaria.Santiago, Chile. 332 p.

González B.B., Boucaud J. Salette J. and Langlois J.,1990. Fructan and cryoprotection in ryegrass (*Loliumperenne* L.) New Phytol. 115: 319-323

Graham D, Patterson BD., 1982. Responses of plants to low, non freezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation. Annu Rev Plant Physiol33:347-372

Hanelt, P. 1990. Taxonomy, evolution and History. En H. D. Rabinowitch, Onionsand allied cropsI. Florida: CRC Press. 1-26.

Henderson, I. R. and Dean, C., 2004. Control of Arabidopsis flowering: the chillbefore the bloom. Development 131, 3829-3838.

Hendry G.A.F. and Wallace, R.K. 1993. The origin, distribution and evolutionary significance of fructanos. In: Vijn, I. and Smeekens, S. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate?. Plant Physiol. 120: 351-359.

Henry, B. B., 1978. The distribution of fructans in oinions.New Phytol. 81: 29-34.

Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F., Munné-Bosch S., 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? Trends Plant Sci. 14,125e132.

Hernández R. P. and Gómez Ramírez A 2012. Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations. In Tech Open, Published, 05-30.

Hisano H, Kanazawa A, Kawakami A, Yoshida M, Shimamoto Y, Yamada T (2004) Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. Plant Sci 167: 861–868

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem. 53, 1841-1856.

Izquierdo J., Paltrinieri G. y Arias C. 1992. Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización del ajo, cebolla y tomate. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. 413 p.

Jae-Han Son, Kyong-Cheul Park, Sung-Il Lee, Haeng-Hoon Kim, Jong-HwaKim. Sun-Hyung Kim, Nam-Soo Kim. 2012. Isolation of cold-responsive genesfrom garlic, *Allium sativum.* Genes & Genomics 34: 93-101.

Javanmardi J., Stushnoff C., E. Locke, J.M. Vivanco., 2003. Antioxidant activityand total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. Food Chem., 83, pp.547em.

Joyce C. Pennycooke, Sam Cox, 2005. Cecil Stushnoff Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia hybrida*) Environmental and Experimental Botany. Volume 53, Issue 2, April, Pages 225 Expe.

Kamenetsky R., Shafir I.L, Zemah H., Barzilay A. and Rabinowitch H.D. 2004. Environmental control or garlic growth and florogenesis. J. of the American Society for Horticulral Science 129: 144-151.

Kawakami A, Yoshida M. 2002. Molecular characterization of sucrose: sucrose 1 fructosyltransferase and sucrose: fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. Biosci Biotechnol Biochem; 66:2297–305.

Kim, D. H., Doyle, M. R., Sung, S. and Amasino, R. M., **2009.** Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 25, 277-299.

Kim, S. M., Kubota, K., & Kobayashi, A. 1997. Antioxidative activity of sulfur containing flavor compounds in garlic. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 1482–1485.

Kooiker, M., Drenth, J., Glassop, D., McIntyre, C.L., Xue, G., 2013. TaMYB13-1, aR2R3 MYB transcription factor, regulates the fructan synthetic pathway and contributes to enhanced fructan accumulation in bread wheat. J. Exp. Bot. 64, 3681–3696.

Kubista, M., Andrade, J., Bengsston, M., Foorotan, M., Jonák, J., Lind, K.,Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Sthåhlberg, A., Zoric,N., 2006, The real-time polymerase chain reaction, Molecular Aspects ofMedicine, Vol 27, pg: 95-125.

Lampe, J. W., 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. American Journal of Clinical Nutrition, 70,475S–490S.

Ledesma A, Reale M. I, Racea R and Burba J. L. 1980. Efecto de bajas temperaturas y periodos de almacenaje de preplantacion sobre diversas manifestaciones del crecimiento en ajo (*Allium sativum* L.) tipo clonal Rosado Paraguayo. Phyton. 39: 37-48.

Lee B. Y, and Moon W. 1982. Effect of night breaks with intermittent or continuoslight on the growth and bulbing of garlic plants. J. Korean Soc. F Hort. 23: 1-17.

Leyva A., Jarrillo J.A., Salinas J., Martínez-Zapater M. 1995. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA of *Arabidopsis thaliana* in light-dependent manner, Plant Physiol. 108, 39 –46.

Livak, K., Schmittgen, T., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCt Method, Methods, Vol 25, pg: 405-408.

López-Hernández, L. E., 2010. “Efecto del almacenamiento a baja temperatura y aplicación de paclobutrazol a bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. ‘Coreano´ en su crecimiento, calidad de cosecha y perfil de fructanos”**.** Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos*.* Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Macheix J.J., Sapis J.C., 1991. Fleuriet APhenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines Crit. Rev. Food Sci.Nutr., 30 pp. 441se in

Mann, L. K. 1952. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. Hilgardia , 21(8):195-251.

Martínez-Téllez MA, La fuente MT. 1997. Effect of high temperature condition in gon ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of `Fortune’ mandarin fruit. J Plant Physiol 150: 674-678.

Mc Collin G.D. 1976. Onion and Allies, *Alluim* (*Liliaceae*) Evolution of corps plantsEdSimond London. p. 186-190.

McCleary BV, Murphy A, Mugford DC. (2000). Measurement of total fructans in food by enzymic/spectrophotometric method; collaborative study. J AOAC Int 83(2):356–364

Messiaen, C.M., Cohat, J., Pichon, M.: Leuroux, J.P., and Beyres, A. 1993. Les *allium s*alimentaires, reproduits par voie vegetative. Paris. INRA. 228.

Miean K.H., Mohamed S., 2001.Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. J. Agric. Food Chem. 49 (6) 3106.

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. J Exp Bot 53:1237–1247

Nellaepalli S., Kodru S., Subramanyam R., 2012. Effect of cold temperature on regulation of state transitions in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 112, 23–30.

Nuutila A. M., Puupponen-Pimia R., MarjukkaAarni,Kirsi-MarjaOksman-Caldentey., 2003. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. Food Chemistry81 485–493

Parra C, Sdez J, Pérez H, Alberdi M, Delseny M, Hubert E, Meza-Basso L., 1990. Cold resistance in rapeseed *(Brassicunupus)* seed lings. Searching biochemical markers of cold-tolerance. Arch Biol Med Exp23**:**187-194

Patil, B. S.; Pike, L. M., 1995. Distribution of quercetin content in different rings of various coloured onion (*Allium cepa* L.) cultivars. J.Am. Soc. Hortic. Sci. 70,643−650.

Pękal A. & Pyrzynska K., 2014. Evaluation of *Aluminium* Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. Food Anal. Methods 7:1776–1782.

Pham Anh Tuan1, Xiaohua Li1, Nam Il Park1, Sook Young Lee2, HaengHoonKim3,*, and Sang Un Park. 2011. Molecular cloning of 4-

coumarate: CoA ligaseand total phenolic content in garlic (*Allium sativum*), Plant Omics Journal: 25-28

Pilon S., E. A. H., Ebskamp, M. J. M., Paul, M. J., Jeuken, M. J. W., Weisbeek, P. J. and Smeekens, S. C. M. 1995. Improved performance of transgenic fructano accumulating tobacco under drought stress. Plant Physiology 120: 351-359.

Pollock, C. J. (1986). Tansley review no. 5. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. New Phytologist, 104(1), 1–24.

Portela J. A. 1996. El ambiente como regulador del desarrollo de las plantas. Suefecto sobre el ajo (*Allium sativum* L.) Avances en Horticultura 1:19-40.

Portela, J. A. 1997. Anormalidades fisiogeneticas en el cultivo de ajo: malformaciones. In: 50 temas sobre producción de ajo. Vol 3: 294 - 311. Mendoza, Argentina

Portela, J. A. 1998. Factores involucrados en el rebrote del ajo (*Allium sativum* L.) e implicaciones en el manejo del cultivo. Avances en Horticultura 3: 1-12.

Portela J.A. and J. B. Cavagnaro. 2005. Growing phases of the white garlic (*Allium sativum*) plant in relation to field temperature and day length, Acta Hort. (ISHS) 688, págs. 239-246.

Prasad T.K. 1996, Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury andtolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system,

oxidationof proteins and lipids and protease activitiesPlant J., 10 pp. 1017–1026

Puebla AF, Battaglia ME, Salerno GL, Pontis HG. (1999). Sucrose-sucrose fructosyltransferase activity: a direct and rapid colorimetric procedure for the assay of plant extracts. Plant Physiol Biochem 37:699–702

Puebla AF, Salerno GL, Pontis HG., 1997.Fructan metabolism in two species of *Bromus* subjected to chilling and water stress. New Phytol136:123–129

Purseglove, J. 1985. Tropical crops: Monocotyledons I. En: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 22 23.

Racca, R. W., Ledesma, A., Reale, M. I., and Collino, D. 1981. Efecto de bajas temperaturas en almacenaje de preplantacion y condiciones termofotoperiodicasde cultivo en la bulbificacion de ajo (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo.*Phyton.*, 41: 77-82.

Rahim, M. A., and Fordham, R. 2001. Environmental manipulation for controlling bulbing in garlic. Acta Hortic., 555: 181-188.

Rahim, M.A. and R. Fordham. 1988. Effects of storage temperature on the initiation and development of garlic cloves (*Allium sativum* L.). Scientia Hort., 37: 25-38.

Ramsay, N.A., Glover, B.J., 2005. MYB-b HLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. Trends Plant Sci. 10, 63–70.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds Trends Plant Sci., 2, pp. 152ant S

Rivera-Pastrana Dulce M. & Gardea Alfonso A. &. Yahia Elhadi M & Martínez-Téllez Miguel A. &. González-Aguilar Gustavo A. 2013.Effect of UV-C irradiation and low temperature storage on bioactive compounds, antioxidant enzymes and radical scavenging activity of papaya fruit. J Food Sci Technology.

Rivero Rosa M., Ruiz Juan M., García Pablo C., López-Lefebre Luis R.,Sánchez Esteban, Romero Luis., 2001.Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. PlantScience 160: 315–321

Rizzalli, R. H., Villalobos, F. J., and Orgaz, F. 2002. Radiation interception, radiation-use efficiency and dry matter partitioning in garlic (*Allium sativum* L.), Eur. J. Agron., 18, 33-43,

Sabine B, Thomas G D, Werner P, Heinz F. 2000. Characterization of the high molecule weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). Carbohydr Res, 328: 177-183

Salvatierra A., Pimentel P., Moya-Leon M. A., Peter D.S. Caligari, Herrera Raul. 2010. Comparison of transcriptional profiles of flavonoid genes and

anthocyanin contents during fruit development of two botanical form sof Fragaria chiloensis ssp. Chiloensis. Phytochemistry 71, 1839–1847

Sambrook J., y Rusell D.W. 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual; 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratories Press. New York, USA.

Shivashankara KS, Isobe S, Al-Haq MM, Takenaka M, Shiina T., 2004.Fruitantioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of Irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pretreatment. J Agric Food Chem 52 (5):1281–1286

Shyama Prasad Rao R., Jeppe Reitan Andersen, Giuseppe Dionisio, BirteBoelt., 2011. Fructan accumulation and transcription of candidate genes during-cold-acclimation in three varieties of Poapratensis Journal of Plant Physiology 168, 344–351

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Estadística básica: Agricultura. Consultas: 2012 - 2013. URL: http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp.

Simon, P.W., 2001. The origins and distribution of garlic: how many garlics arethere? http://www.hort.wisc.edu/usdavcru/simon/garlic origins.html.

Stahlschmidt, O. M. 1989. Manejo de la dormición/brotación en bulbos de ajo. In: Curso Taller sobre Producción. Comercialización e Industrialización del Ajo. (1 y 2,1989 y 1991. Mendoza). Mendoza INTA Centro Regional Cuyo. 6-11.

Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G (2011) ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. Plant Cell Environ 35:259–270

Takagi, H. 1990. Garlic *Allium sativum* L. In: Onions and allied crops. Boca Raton,Florida, CRC Press. Vol. 3, Cap. 109-157.

Takhtajan, A., 1997. Diversity and Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York.

USDA. National Nutrient Database for Standar Reference. Consultas: 2010 y 2014.URL:http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp. http://www.ams.usda.gov.

Utrilla-Vazquez, M. 2008. Efecto del almacenamiento de la "semilla" y del metiljasmonato en el desarrollo y calidad de bulbos de ajo. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Van den Ende W, De Roover J, Van Laere A (1999). Effect of nitrogen concentration on fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). Physiol Plant 105: 2-8

Vázquez-Mandujano D. G. 2009. "Actividad de la Sacarosa-Sacarosa-1- fructosil transferasa y su relación con la acumulación de fructanos durante el desarrollo del ajo" Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Vijn I. and Smeekens Sjef, 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? Plant Physiol. 120: 351-359.

Volk, G.M., Henk, A.D., Richards, C.M., 2004. Genetic diversity among U.S.A. garlic clones as detected using AFLP methods. J. Am. Soc. Hort. Sci. 129 (4), 559–569.

Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Curr Opin Plant Biol.;5 (3):218-23.

Wong, **M., Medrano, J., 2005**, Real-time PCR for mRNA quantitation, Biotechniques Vol. 39, pg: 1-11

Xue, G.-P., Kooiker, M., Drenth, J., McIntyre, C.L., 2011. TaMYB13 is a transcriptional activator of fructosyl transferase genes involved in 2,6-linked fructano synthesis in wheat. Plant J. 68, 857–870.

Zavala-Gutiérrez, K. G. 2011. Estudio de los cambios del perfil transcriptómico en brotes de ajo (*Allium sativum* L.) cv. Coreano procedentes de “semillas” almacenadas a diferentes temperaturas. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzhum, F., 2004, Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications, Nucleic Acids Research, Vol 32, pg: 1-10.

X. ABREVIATURAS

1-FFT: proteína de fructan-fructan-fructosil transferasa.

1-SST: proteína sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa.

4CL: proteína de 4Cumarato-CoA ligasa.

6G-FFT: proteína de 6 glucosa fructan-fructan-fructosil transferasa

6-SFT: sacarosa-6-fructosiltransferasa

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

As1-SST: gen sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa reportado para *Allium sativum.*

As4CL: gen de 4Cumarato-CoA ligasa reportado para *Allium sativum.*

AsC4H: gen de Cinnamato 4-hydroxilasa reportado para *Allium sativum.*

AsPAL: gen de fenilalanina amonio liasa reportado para *Allium sativum.*

C4H: proteína de Cinnamato 4-hydroxilasa.

D.B: disco basal.

DAP: day after planting.

DD-PCR: Differential Display- polymerase chain reaction.

DDS: días después de siembra.

DPPH: 2,2-difenil-1-picril hidrailo.

FAOSAT: Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database

IPICYT: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológico.

PAL: proteína de fenilalanina amonio liasa.

Q-PCR: Quantitativa - polymerase chain reaction.

RT-PCR: Transcripción inversa - polymerase chain reaction.

SIAP: Sistema de Información de Agentes promotores

TA: temperatura ambiente.

XI. ANEXOS

Cuadro A.1. Protocolo para la elaboración de curva estándar de ácido gálico (AG).

Tubo	µL (5mg/mL)	agua (µL)	mg/mL	Absorbancia (nm)
1	0	3000	0	0
2	15	2985	0.025	0.02
3	30	2970	0.05	0.0389
4	45	2955	0.075	0.06315
5	60	2940	0.1	0.08905
6	75	2925	0.125	0.1195

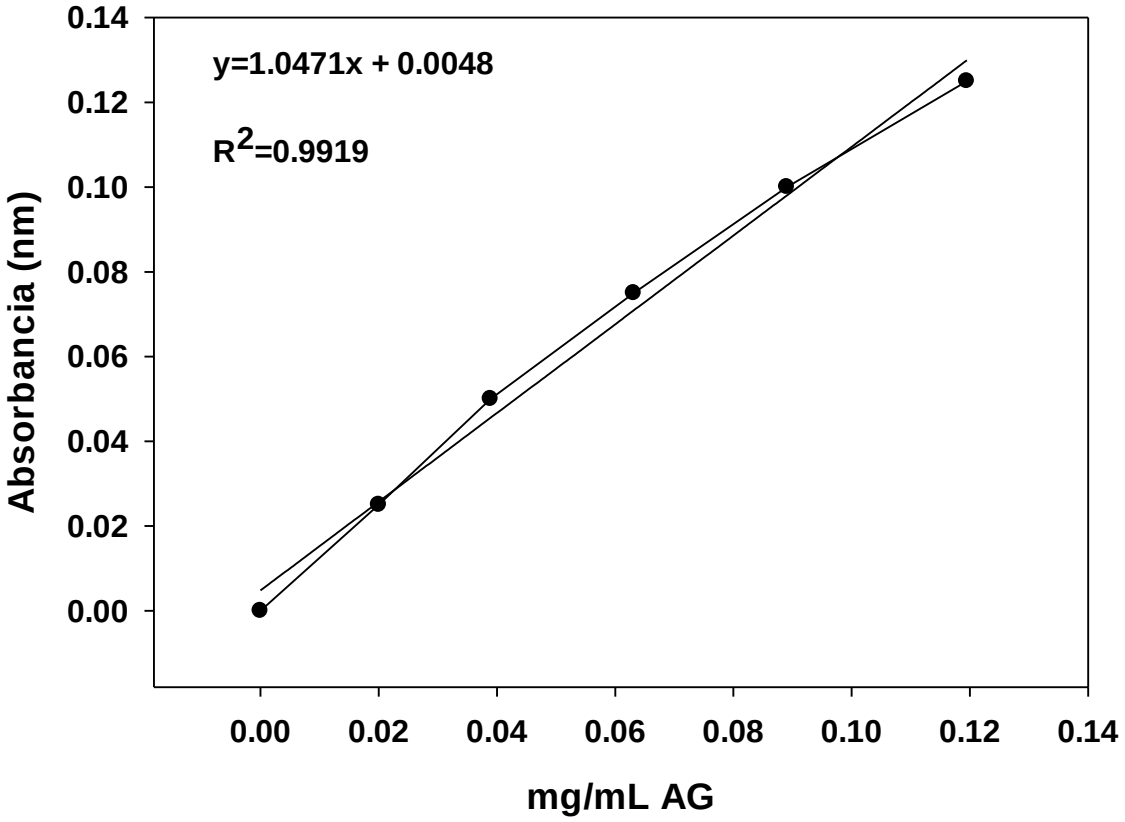


Figura A.1. Curva estándar de ácido gálico (AG).

Cuadro A.2. Protocolo para la elaboración de curva estándar de Quercetina.

Tubo	µL (1mg/mL)	agua (µL)	mg/mL	Absorbancia (nm)
1	0	3000	0	0
2	10	2990	0,0033	0,011
3	15	2985	0,005	0,01945
4	30	2970	0,01	0,0486
5	45	2955	0,015	0,08115
6	60	2940	0,02	0,1136

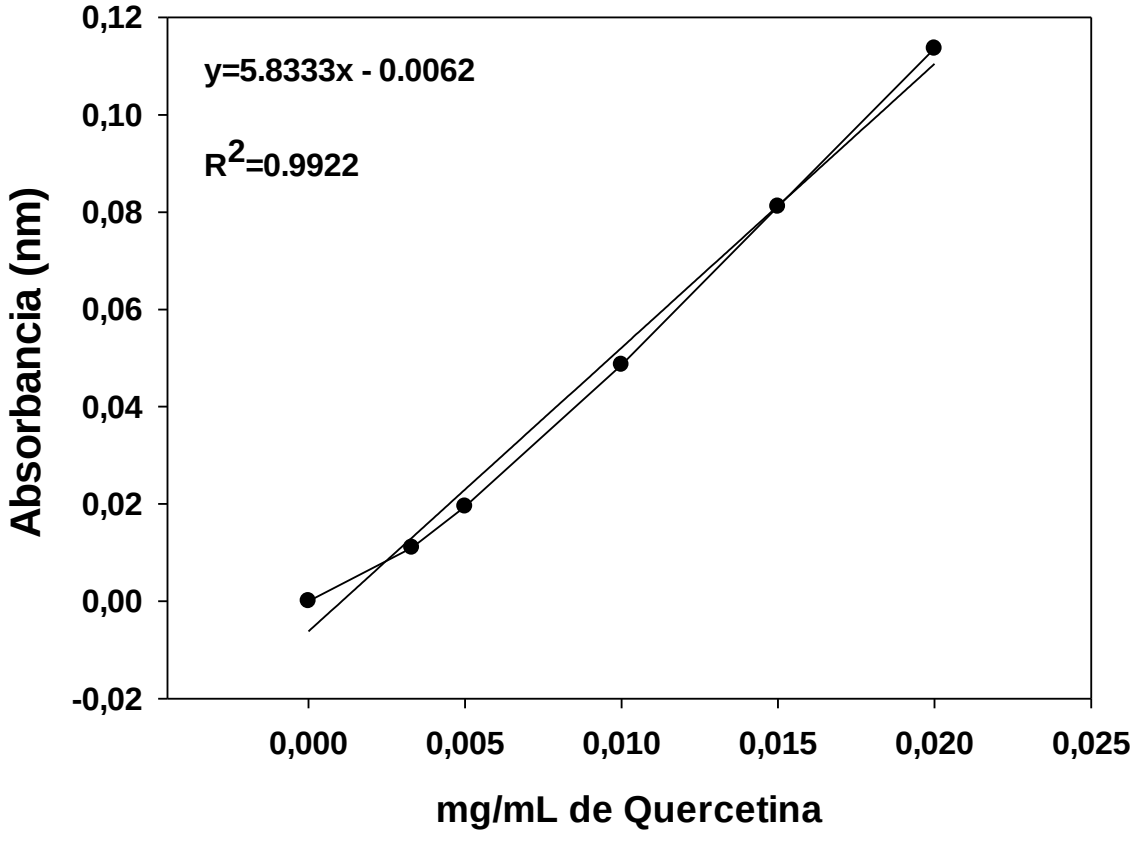


Figura A.2. Curva estándar de Quercetina.

Cuadro A.3. Protocolo para la elaboración de curva de ácido cinámico.

Tubo	µL(1.1881 µmol/mL)	Buffer fosfato (mL)	Concentración (µmol ác. Cinamico/mL)	Absorbancia(nm)
1	0	5	0	0
2	55	4,945	0,0200035	0,1634
3	110	4,89	0,040007	0,3394
4	165	4,835	0,06001	0,5238
5	220	4,78	0,080014	0,6947
6	275	4,725	0,1000175	0,8425

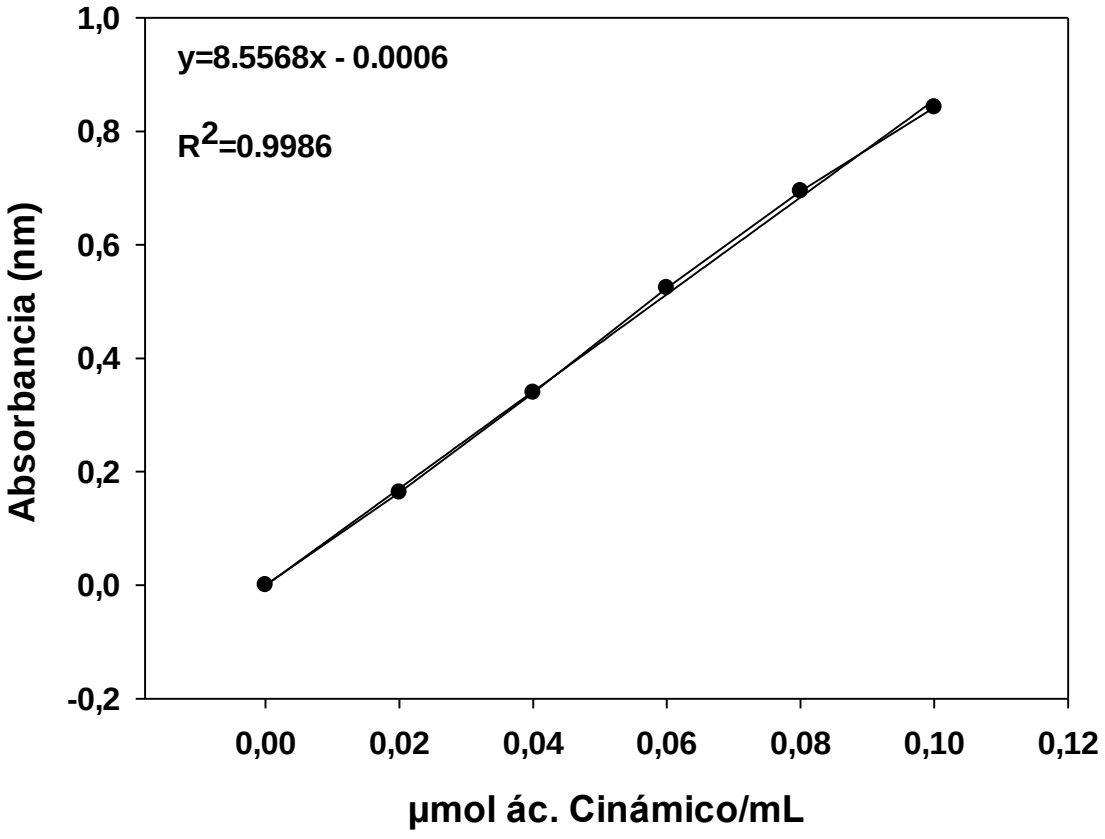


Figura A.4. Curva estándar de ácido cinámico.

Cuadro A.4. Protocolo para la elaboración de curva estándar de 1-Kestosa.

Tubo	µL (5mg/mL)	agua µL	mg/mL	Absorbancia (nm)
1	0	0	0	0
2	0,2	49,8	0,02	0,032232
3	0,4	49,6	0,04	0,0983292
4	0,6	49,4	0,06	0,1651965
5	0,7	49,3	0,07	0,2032785
6	0,9	49,1	0,09	0,277411
7	1,1	48,9	0,11	0,345599
8	1,3	48,7	0,13	0,451258
9	1,5	48,5	0,15	0,5323175
10	1,7	48,3	0,17	0,6155138

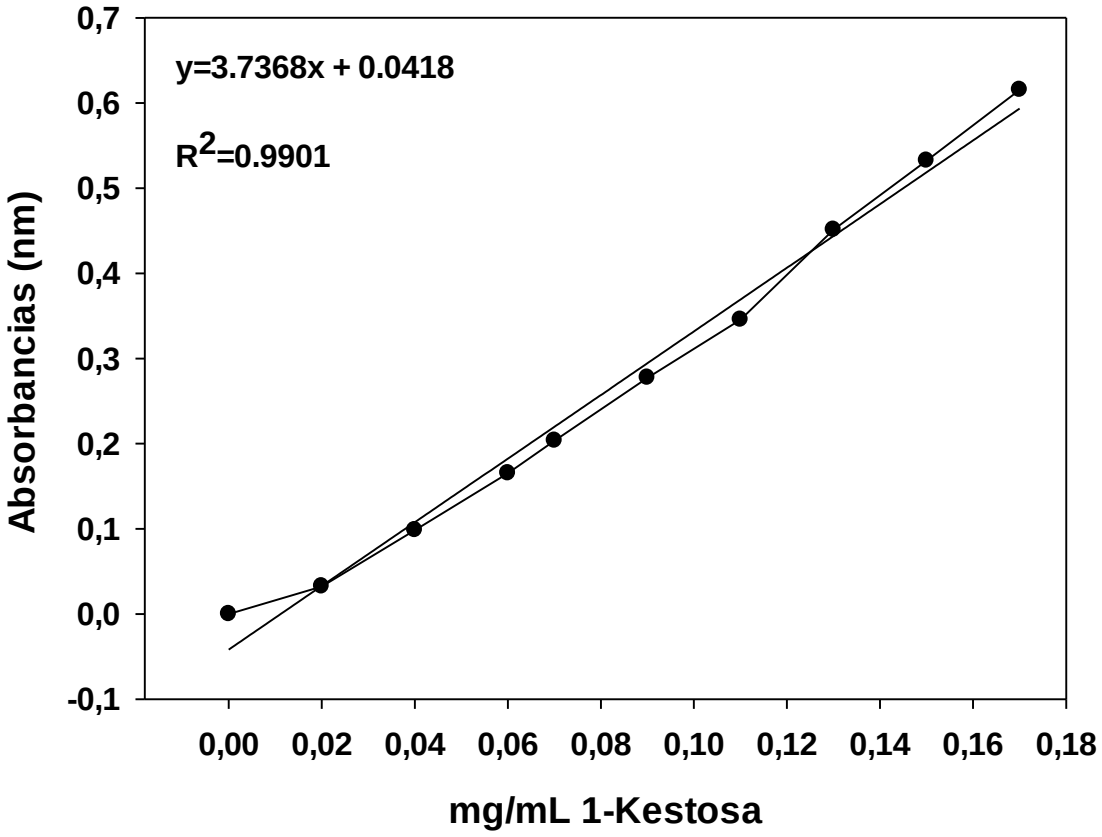


Figura A.4. Curva estándar de 1-Kestosa.