



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

**“ACTIVIDAD DE LA SACAROSA-SACAROSA-1- FRUCTOSIL
TRANSFERASA Y SU RELACIÓN CON LA ACUMULACIÓN DE
FRUCTANOS DURANTE EL DESARROLLO DEL AJO”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

IBQ. Daniela Guadalupe Vázquez Mandujano



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

“ACTIVIDAD DE LA SACAROSA-SACAROSA-1- FRUCTOSIL TRANSFERASA Y SU RELACIÓN CON LA ACUMULACIÓN DE FRUCTANOS DURANTE EL DESARROLLO DEL AJO”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

IBQ. Daniela Guadalupe Vázquez Mandujano

Dirigido por:

Dr. Edmundo Mercado Silva

SINODALES

Dr. Edmundo Mercado Silva
Presidente

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios
Secretario

MC. Elena Heredia García
Vocal

Dra. Guadalupe Xochitl Malda Barrera
Suplente

Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche
Suplente

Q.B. Magali Aguilar Olvera
Director de la Facultad

Firma
Firma
Firma
Firma
Firma
Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2009
México

A Jan y Aldo

por siempre y para siempre...

LOS AMO

Agradecimientos

Al departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al Consejo de Productores de Ajo del municipio de Rincón de Romos, Aguascalientes.

A los Doctores Edmundo Mercado y Estela Vázquez por su asesoría y apoyo, pero sobre todo por su amistad.

A mis asesores por su apoyo durante la realización de este trabajo de investigación.

A mis papás quienes siempre están conmigo y siempre estoy con ellos.

A Montse, te quiero chacabula.

A la familia Reyes, gracias por adoptarme.

A todos y cada uno de mis compañeros y amigos del posgrado.

El presente trabajo de investigación se realizó 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 del Dr. Edmundo Mercado Silva

RESUMEN

La materia seca del ajo está constituida por un 70% de fructanos. La formación de bulbos de buena calidad está asociada a estos carbohidratos y a la presencia de horas de frío durante el desarrollo de la planta; pero no se conoce como estos factores ambientales afectan la síntesis que lleva a la acumulación de estos carbohidratos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en la actividad de la enzima 1-SST durante el desarrollo de plantas sometidas a diferentes temperaturas de almacenamiento de las “semillas” y correlacionarla con las condiciones ambientales en el campo. Tres lotes de “semillas” de ajo cv ‘Coreano’ fueron almacenados a TA, 5 y 10 °C por 10 días y sembrados en Cosío, Aguascalientes. Durante el desarrollo se realizaron 7 muestreos mensuales, en cada muestreo se recolectaron cinco plantas por tratamiento para medir su altura, peso, índice de bulbificación, contenido de fructanos y actividad enzimática. Durante el cultivo se monitoreo diariamente la temperatura así como la irradiación lumínica máxima a través de una estación meteorológica cercana al campo de cultivo. No se encontraron efectos significativos de la temperatura de almacenamiento en el crecimiento, actividad enzimática y distribución de fructanos. El crecimiento de la planta fue mayor cuando las temperaturas ambientales y la irradiación lumínica fueron mayores (25-30 °C y 700 W/m²). El IB permaneció constante en los primeros 203 DDS, y aumentó en los últimos 28 días del ciclo de cultivo. La actividad total de la 1-SST en bulbos y pseudo tallos durante los primeros muestreos fue baja y se incremento hacia el final del desarrollo (500 y 400 µg kestosa formada/hr, respectivamente), sin mostrar diferencias significativas lo que sugiere que la actividad de la 1-SST no regula el proceso de síntesis de fructanos. La distribución de fructanos fue aproximadamente constante (33 y 40 g/100gMS) en los primeros 203 DDS en pseudo tallos y bulbos, respectivamente. En los siguientes 28 días, hubo un decremento (13-18 g/100gMS) en pseudo tallos y un incremento (53g/100gMS) en bulbos. Estos resultados indican que durante la diferenciación del bulbo hay un transporte de los fructanos almacenados en el pseudo tallo hacia el bulbo.

(Palabras clave: 1-SST, fructanos, bulbificación)

SUMMARY

The dry matter of garlic is made up of 70% of fructans. The formation of good bulbs quality is associated with these carbohydrates and the presence of chill hours during the plant development; however, is unknown how these environmental factors affect the biochemical processes that lead to the accumulation of these carbohydrates. The aim of this study was to evaluate changes in the activity of the enzyme 1-SST during the development of plants subject to different storage temperatures of the "seed" and correlate these changes with environmental conditions in the field area. Three garlic "seeds" sets cv 'Coreano' were stored at RT, 5 and 10 °C for 10 days and after sown in Cosío, Aguascalientes. During the development were made 7 monthly samplings, of each sampling were collected five plants per treatment to measure height, weight, bulbing index, content of fructans and enzyme activity. During the cultivation, the temperature and the irradiance maximum were registered everyday through a weather station near the crop field. There were no significant effects of storage temperature on growth, enzyme activity and distribution of fructans. The plant growth was higher when the environmental temperatures and the irradiance maximum were higher (25-30 °C and 700 W/m²). The BI remained constant in the first 203 DAS, and increased in the last 28 days of the growing cycle. The total activity of 1-SST in bulbs and pseudo stems during the first sampling dates was low and increased towards the end of development (500 and 400 µg kestose formed/hr, respectively), not showing significant differences it suggests that the activity of 1-SST does not regulate the process of synthesis of fructans. The distribution of fructans was approximately constant (33 and 40 g/100g DM) in the first 203 DAS in pseudo stems and bulbs, respectively. In the next 28 days, there was a decrease (13-18 g/100g DM) in pseudo stems and increased (53g/100gMS) in bulbs. These results show that during the bulb differentiation there was a transport of fructans stored in the pseudo stem towards the bulb.

(Key words: 1-SST, fructans, bulbing)

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. GENERALIDADES DEL AJO	3
2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA	4
2.3. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA	7
2.4. DESARROLLO	9
2.5. COMPOSICIÓN	11
2.6. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DE LOS FRUCTANOS	13
2.6.1. Estructura de los fructanos	13
2.6.2. Biosíntesis de fructanos	16
2.6.3. Degradación de fructanos	19
2.7. FRUCTANOS EN EL MUNDO VEGETAL	20
2.7.1. Fructanos y bulbificación	21
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. OBJETIVOS	24
4.1. OBJETIVO GENERAL	24
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
V. METODOLOGÍA	25
5.1. ESTRATEGIA GENERAL	25
5.2. LOCALIZACIÓN DEL AREA EXPERIMENTAL	27
5.3. ORIGEN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	28
5.4. CLASIFICACIÓN Y PREACONDICIONAMIENTO DE LA SEMILLA	28
5.5. REGISTRO CLIMATOLÓGICO	29
5.5.1. Registro de datos climáticos	29
5.6. REGISTRO DE PARÁMETROS BIOLÓGICOS	30
5.6.1. Medición de variables de respuesta durante el desarrollo de la planta	31
5.6.3. Evaluación de calidad de bulbos	31
5.6.3.1. Clasificación por calibre	32
5.6.3.2. Peso de la cosecha y calibres	33
5.6.3.3. Presencia de defectos	33

5.7. ANÁLISIS BIOQUÍMICO	33
5.7.1. Determinación de fructanos	33
5.7.1.1. Extracción de fructanos	34
5.7.1.2. Remoción de sacarosa, almidón y azúcares reductores	34
5.7.1.3. Hidrólisis y medición de fructanos	35
5.7.2. Actividad enzimática de la 1-SST	38
5.7.2.1. Extracción	41
5.7.2.2. Precipitación de la proteína con actividad de 1-SST	41
5.7.2.3. Medición de actividad enzimática	41
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
6.1. PROGRAMA DE MUESTREOS	44
6.2. ANÁLISIS CLIMÁTICO DE LA ZONA DE PRODUCCIÓN	44
6.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO DE LA “SEMILLA” EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA	48
6.3.1. Correlación de las variables de respuesta	54
6.4. RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LOS BULBOS COSECHADOS	56
6.5. ACUMULACIÓN DE FRUCTANOS EN BULBOS Y PSEUDO TALLOS DE AJO	60
6.6. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SACAROSA-SACAROSA-1-FRUCTOSILTRANSFERASA (1-SST) DURANTE EL DESARROLLO	64
6.7. RELACIÓN ENTRE DESARROLLO DE LA PLANTA Y ACUMULACIÓN DE FRUCTANOS CON LOS FACTORES AMBIENTALES	70
6.7.1. Relación de los factores ambientales con el desarrollo	70
6.7.2. Relación entre los factores ambientales y el contenido de fructanos	76
6.7.3. Relación de los factores ambientales con la actividad de la enzima 1-SST	82
VII. CONCLUSIONES	86
VIII. LITERATURA CITADA	88
IX. ANEXOS	93

ÌNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
2.1	Composición química por 100 g de ajo fresco	11
2.2	Enzimas de la síntesis y degradación de fructanos	16
2.3	Fructanos representativos en algunas especies vegetales	20
5.1	Condiciones de preacondicionamiento para los bulbos	28
5.2	Agroquímicos como tratamiento plaguicida y fungicida	29
5.3	Estaciones climatológicas en el estado de Aguascalientes	30
5.4	Escala de calibres para los bulbos de ajo	32
5.5	Diseño experimental propuesto	43
6.1	Programa de muestreo y días de siembra	44
6.2	Horas frío acumuladas durante el desarrollo	46
6.3	Valores de probabilidad de los factores estudiados	49
6.4	Comparación de medias de la interacción tratamiento*muestreo para cada una de las variables utilizadas	50
6.5	Análisis de correlación entre las diferentes variables respuesta estimadas durante el desarrollo de las plantas y bulbos de ajo	54
6.6	Valores medios de las variables de calidad de la cosecha de ajo producido a partir de “semillas” almacenadas a diferentes temperaturas	57
6.7	Valores de probabilidad del análisis estadístico del contenido de fructanos en bulbos y pseudo tallos de ajo generados de “semillas” almacenadas a diferentes condiciones de temperatura	61
6.8	Valores de probabilidad del análisis estadístico de los datos de actividad total y específica de 1-SST en bulbos de ajo procedentes de “semillas” almacenadas a diferentes temperaturas	64
6.9	Comparación de medias de la interacción tratamiento*muestreo para la actividad total de la 1-SST en bulbos de ajo	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Principales países productores de ajos	5
2.2	Estados productores de ajos en la República Mexicana	6
2.3	Rendimiento de ajo en el estado de Aguascalientes y producción de municipios	7
2.4	Planta de ajo	8
2.5	Estructura del diente de ajo	10
2.6	Estructuras de fructanos cortos	14
2.7	Estructura sugerida para un fructano de ajo	15
2.8	Metabolismo de carbohidratos en células de plantas	17
2.9	Biosíntesis de fructanos	18
5.1	Estrategia experimental	26
5.2	Ubicación del municipio de Cosío, Aguascalientes	27
5.3	Variables medidas en plantas de ajo	31
5.4	Tabla de calibres para bulbos de ajo	32
5.5	Diagrama general de la cuantificación de fructanos	37
5.6	Diagrama general de la determinación de actividad de la 1-SST	40
6.1	Temperaturas registradas durante el desarrollo del cultivo	45
6.2	Registro de horas frío acumulada durante el desarrollo	47
6.3	Registro de la radiación lumínica durante el desarrollo	48
6.4	Cambios en la altura de la planta de ajo durante su desarrollo	51
6.5	Cambios en el peso de la planta de ajo durante su desarrollo	52
6.6	Cambios en el diámetro del bulbo de ajo durante el desarrollo	53
6.7	Comportamiento del índice de bulbificación durante el desarrollo	54
6.8	Rendimiento de los ajos cosechados	58
6.9	Bulbos defectuosos	59
6.10	Producción de ajos de distintos calibres	60
6.11	Distribución porcentual de la cosecha de los diferentes calibres	62
6.12	Contenido de fructanos en bulbos y pseudo tallos durante el desarrollo	64
6.13	Índice de bulbificación y acumulación de fructanos en bulbos y pseudo tallos	67
6.14	Actividad total y específica de la 1-SST en bulbos	68
6.15	Actividad total y específica de la 1-SST en pseudo tallos	69
6.16	Actividad total de la 1-SST y acumulación de fructanos en bulbos y pseudo tallos	70

6.17	Relación entre la temperatura ambiental con altura, peso, diámetro de bulbo e índice de bulbificación	72
6.18	Relación entre acumulación de horas frío con altura, peso, diámetro de bulbo e IB	74
6.19	Relación entre intensidad luminosa con altura, peso, diámetro de bulbo e IB	75
6.20	Relación entre fotoperiodo con altura, peso, diámetro de bulbo e IB	76
6.21	Comparación entre contenido de fructanos en bulbo y pseudo tallos y temperatura ambiental en el desarrollo	78
6.22	Contenido de fructanos en bulbo y pseudo tallo y acumulación de horas frío en el desarrollo	79
6.23	Distribución de fructanos en bulbo y pseudo tallos con intensidad lumínica y fotoperiodo	82
6.24	Comparación entre actividad total de la 1-SST en bulbo y pseudo tallo y temperatura ambiental en el desarrollo	84
6.25	Representación esquemática de la influencia de bajas temperaturas sobre el número de hojas en plantas de ajo	85

I. INTRODUCCIÓN

El ajo es considerado una de las 20 principales hortalizas a nivel mundial. Los principales países productores de ajo a nivel mundial son: China, India, Corea del sur, Estados Unidos, España, Egipto, Rusia. En México las exportaciones de ajo ascienden a 10,682 toneladas, de las cuales se destinan el 89.3% hacia Estados Unidos, asimismo, se exporta a Brasil, Canadá y Francia (SIAP, 2009).

En este cultivo, el órgano de interés comercial es el bulbo formado por bulbillos o dientes, los cuales también son el medio de propagación para generar clones en las siguientes cosechas. Dichos bulbos se generan bajo determinadas condiciones ambientales que deben darse durante el ciclo del cultivo, por ello es fácil deducir que dichos factores son determinantes para lograr una buena calidad del producto o bulbo. No obstante, aunque el régimen de temperaturas y el fotoperiodo son factores que determinan la calidad de los bulbos, en realidad todas las etapas del cultivo y las labores culturales son importantes para lograr esa calidad óptima.

De acuerdo con lo anterior la fecha de siembra, condiciones de luz o fotoperiodo, temperatura durante el desarrollo, programa de fertilización, momento de la cosecha, curado y las condiciones de almacenado de los bulbos afectarán el desarrollo del bulbo y el comportamiento de la dormancia de los bulbos, así como su posterior desarrollo y crecimiento de la planta en el campo (Alvarado, 2000).

Diferentes investigadores indican que la formación de los bulbos consta de dos etapas (Izquierdo y col, 1992) una inductiva en la que los días fríos y el fotoperiodo corto son fundamentales para que en la segunda etapa se propicie el crecimiento del bulbo. Esta segunda etapa la promueven los días con mayor fotoperiodo y mayores temperaturas. El almacenamiento de los dientes “semilla” a temperaturas intermedias promueve la brotación de los dientes y por tanto una

emergencia de plantas más temprana lo cual puede incidir en todas las etapas de desarrollo posteriores de la planta (Racca y col, 1981; Takagi, 1990, Rahim y Fordham, 2001). Otros trabajos indican que este efecto inductivo de almacenamiento en frío no depende solo de la temperatura, sino del tiempo de exposición y de la variedad; por ejemplo del Pozo y González (2005) reportaron una inducción de la bulbificación en las variedades Akukeli y Rosado-INIA debido a fotoperiodos largos (14 horas) y pre almacenamiento en frío a 4 y 7°C.

Por otro lado los fructanos, constituyen 75% de la materia seca de los bulbos de ajo (Baumgartner y col, 2000) y son el segundo componente, después del agua, más importante de este alimento. Si además se considera que el tamaño de los bulbos es el factor de calidad más importante en la comercialización de este producto; se induce que un mayor conocimiento de la acumulación de los fructanos asociado al proceso de bulbificación del ajo permitirá generar bases científico tecnológicas para lograr bulbos de ajo de alta calidad nutricia y comercial.

Por ello en este trabajo de tesis se pretende aportar información respecto del efecto de las condiciones de almacenamiento de los bulbos destinados para siembra en el proceso de acumulación de fructanos y en la actividad de las enzimas asociadas a su síntesis.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Generalidades del ajo

El ajo (*Allium sativum* L.) es una de las plantas cultivadas desde la antigüedad, reconocido mundialmente como un condimento valioso en la cocina y como agente terapéutico en el tratamiento de varios desórdenes alimenticios o enfermedades (Mujica y Pérez, 2006). Esta planta es procedente del centro y sur de Asia desde donde se propagó al área mediterránea y de ahí al resto del mundo, desde hace unos 3.000 años a. C., ya se consumía en la India y en Egipto. A finales del siglo XV los españoles la introdujeron en el continente americano.

Es una especie herbácea de 30 a 60 cm de altura, con raíces adventicias y un tallo discoidal que constituye la base del bulbo, el cual está cubierto de hojas escamosas y secas que forman la base de las hojas funcionales aéreas. Las hojas son planas, rectas y anchas en su base (aprox. 2.5 cm). Los bulbos están formados por una serie de dientes de forma ovoide, rodeados por una túnica membranosa a la cual le sigue la hoja de almacenamiento que constituye la mayor parte del diente y que es el sitio de acumulación de los fructanos, a esta hoja le sigue la hoja de brotación que envuelve a las hojas funcionales que cubren el meristemo. Por arriba de los bulbos las hojas aéreas conforman la estructura cilíndrica y estrecha o pseudo tallo. Desde el tallo discoidal, puede emerger una umbela de flores blancas o rojizas (escapo floral). Cuando los bulbos están intactos su olor es muy poco marcado pero al cortarlos desarrollan inmediatamente un olor intenso, característico (Purseglove, 1985).

El ajo es aprovechado fundamentalmente como ingrediente en diversos alimentos, también es utilizado como planta medicinal, recomendado y empleado contra distintas enfermedades, ya que se ha demostrado la acción bactericida de algunas de las sustancias presentes en sus aceites esenciales, los cuales

destruyen o detienen el desarrollo de bacterias causantes de tuberculosis, tifoidea, disentería, difteria y cólera entre otras. Se usa como tratamiento preventivo contra la arterioesclerosis, catarro, asma, tuberculosis, trastornos del sistema digestivo, además previene la formación de coágulos, disminuye el colesterol, es benéfico para disminuir problemas de várices y hemorroides (Izquierdo y Quiones, 2001).

2.2. Importancia económica

El ajo es una hortaliza extensamente cultivada en el mundo, con una producción mundial de 14 millones de toneladas en 1.13 millones de hectáreas (FAO, 2007). Ésta se genera en cuatro grandes centros mundiales de producción y consumo los cuales son:

- Centro asiático que produce el 86% del ajo del mundo.
- Centro europeo o mediterráneo, conformado por España, Francia e Italia (se anexan Egipto y Turquía por proximidad geográfica), aporta el 6% de la producción.
- Centro norteamericano, que agrupa a México y Estados Unidos que aporta el 3%.
- Centro sudamericano, conformado por Brasil, Argentina y Chile, aporta el 4% de la producción global (Figura 2.1).

De acuerdo con los datos de la SAGARPA (2009), la producción de ajo en nuestro país ha disminuido a una tasa anual de 3.9% en la última década, esto debido al estancamiento del comercio de producto nacional debido a la incursión de ajo procedente de China en los mercados internacionales a precios bajos respecto de otros países productores. Esta situación, también ha generado un mercado ilegal interno que también ha afectado de manera negativa la producción, a pesar de que el producto tiene una pobre calidad y bajas condiciones fitosanitarias (CONAJA, 2009).

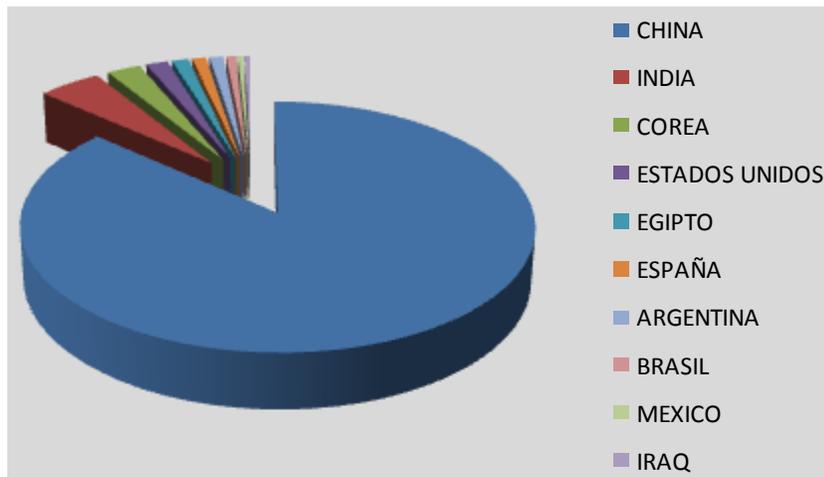


Figura 2.1. Principales países productores de ajos en el mundo reportados para el año 2007 (FAOSTAT, 2008)

En México se cultivan dos tipos de ajo los morados, con sus variedades Chileno, Criollo original, Napuri, Massone, Pocitos y Coreano; y los ajos blancos: Criollo de Aguascalientes, Blanco de Zacatecas, Blanco de Durango, Blanco de Ixmiquilpan y Pro Bajío (SAGARPA, 2008).

Durante 2007 esta hortaliza se sembró en 21 de los 31 estados de la República Mexicana, en una superficie de 4,886 hectáreas y una producción de 46,305 toneladas teniendo un rendimiento promedio de 9.47 t/ha. Esta producción (Figura 2.2) se centra principalmente en los estados de Zacatecas (57%), Guanajuato (18%), Aguascalientes (9%), Baja California (5%), Puebla (5%), Sonora (3%) y Oaxaca (3%) (SIAP, 2009). Las exportaciones de ajo en el periodo correspondiente a Enero – Diciembre de 2008 ascendieron a 18.2 millones de dólares, principalmente a países como Estados Unidos, Brasil, Canadá y Francia. (SIAP, 2009).

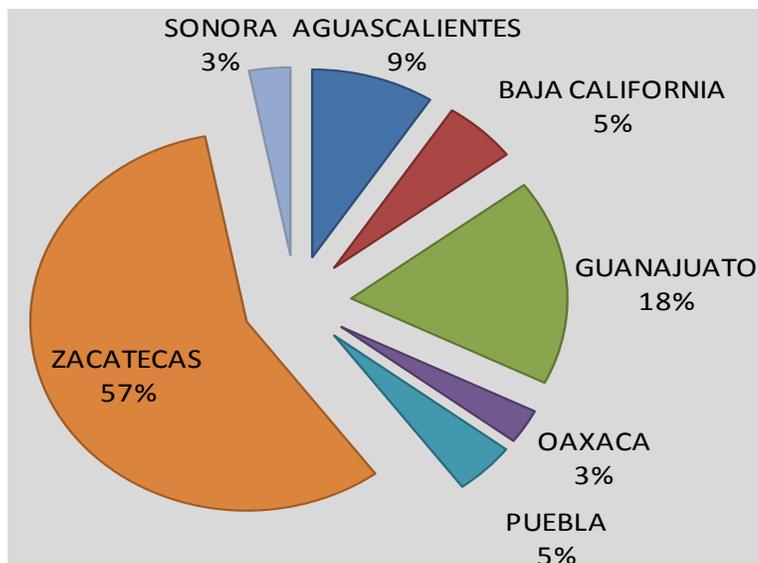


Figura 2.2. Principales estados productores de Ajos en la República Mexicana reportados para el año 2007 (SIAP, 2009).

Aguascalientes ocupa el tercer lugar en la producción de ajo a nivel nacional; en el período 2000-2007 se sembraron en promedio 346 hectáreas anuales, con un rendimiento de 10.92 t/ha, siendo los principales municipios productores Cosío, Asientos, Rincón de Romos, Tepezalá y Pabellón de Arteaga (Figura 2.3) (SIAP, 2009).

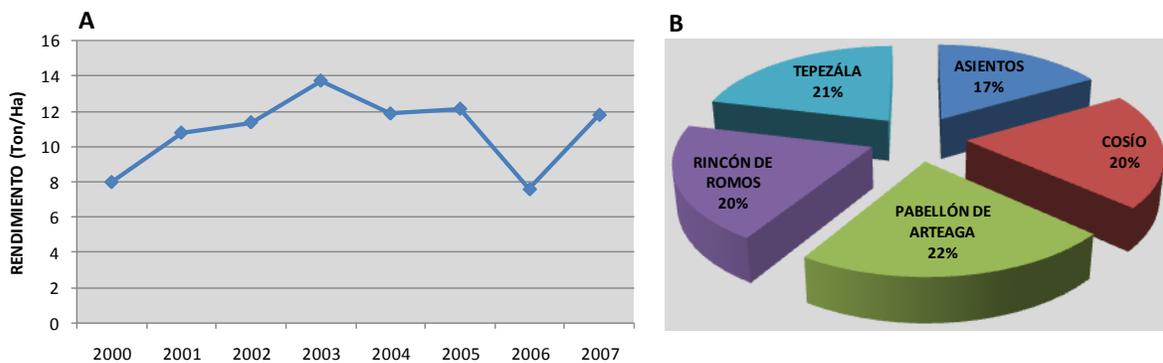


Figura 2.3. (A) Rendimiento (t/ha) de ajo en el estado de Aguascalientes en el periodo 2000 - 2007 y (B) porcentaje de producción de ajo por municipios en el año 2007 (SIAP, 2009).

2.3. Taxonomía y morfología

El ajo pertenece a la familia *Alliaceae*, de nombre científico *Allium sativum* L. El género *Allium* pertenece a la familia Alliacea; entre las especies más populares y domesticadas están la cebolla (*Allium cepa*), el chalote (*Allium ascalonium*), el puerro (*Allium porrum*) y el ajo (*Allium sativum*). De esta última especie no se conocen formas silvestres, sino sólo cultivadas, siendo *Allium longicuspis* su probable ancestro silvestre. La domesticación del ajo desarrolló un camino diferente al de la cebolla y el puerro, que poseen grandes cantidades de semillas para su propagación; éste, en cambio se propaga exclusivamente por vía agámica a través de los bulbillos o dientes. Esta hortaliza presenta una interesante variabilidad en materiales cultivados en el mundo, diferenciándose en madurez, dormancia, requerimientos de frío, tamaño del bulbo y número de bulbillos, color de la hoja protectora, facilidad de emitir escapo floral, entre otras (Izquierdo y Quiones, 2001).

La planta de ajo es bianual, es decir su ciclo de vida dura dos años (García, 1998). De acuerdo con Purseglove (1985), el ajo es una planta herbácea erecta de 30 a 60 cm de altura, de raíces adventicias superficiales, con bulbos compuestos por un tallo discoidal, hojas escamosas delgadas o afiladas y secas que constituyen la base de las hojas fotosintéticamente activas (hojas aéreas), y

bulbillos segmentados o “dientes” formados de yemas axilares de las hojas funcionales más jóvenes (Figura 2.4). Las hojas funcionales son aplanadas, sólidas, con 2.5 cm o menos de ancho, plegadas en forma longitudinal; éstas varían en número, pero generalmente son menos de 10. Algunos clones no producen inflorescencias o escapo floral. Cuando se produce el escapo floral, éste es redondo, sólido y enrollado, en algunas ocasiones, pueden producirse pequeños bulbillos en la inflorescencia, las flores varían en número. Muy rara vez producen semillas.

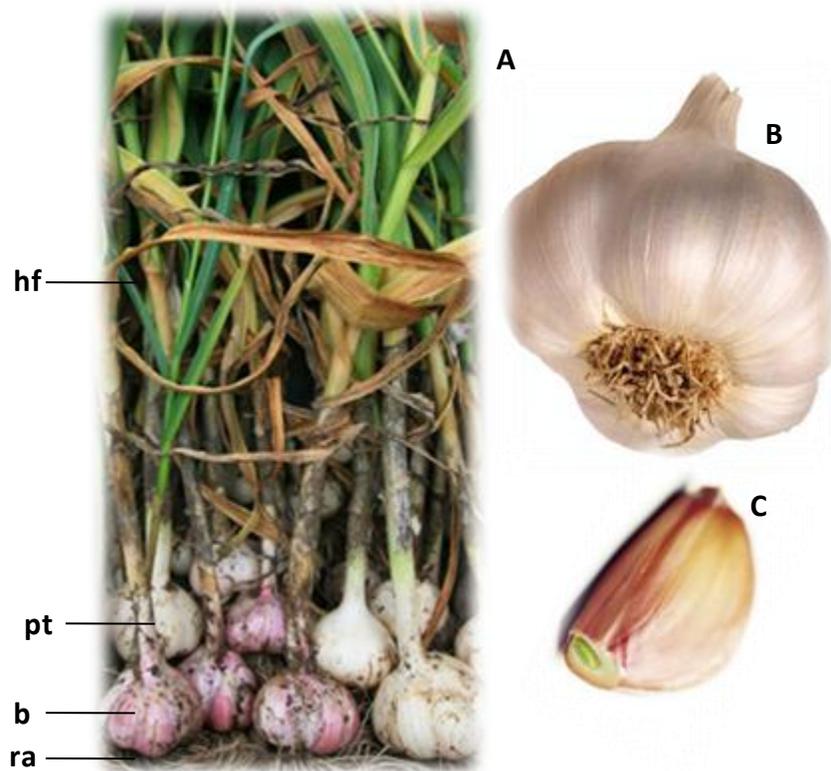


Figura 2.4. (A) Planta joven de ajo, raíces adventicias (ra), pseudo tallo (pt), bulbo (b), hojas funcionarias (hf), (B) bulbo; (C) bulbillo o diente.

2.4. Desarrollo

La demanda de nutrientes en la planta está en función del crecimiento, por lo tanto los requerimientos son distintos dentro de la planta según el órgano considerado y durante la ontogenia. Prueba de ello lo constituye la relación carbono/nitrógeno, lo cual es un índice de crecimiento que asume valores bajos cuando la planta es joven y aumenta con la ontogenia. En el ajo, los nutrientes se almacenan en la hoja de reserva del “diente semilla”, lo que junto con los carbohidratos permiten el crecimiento de las raíces y hojas profundas durante la etapa de brotación (Ledesma y col, 1997a).

Las sustancias de reserva en el diente son principalmente carbohidratos, llegando a constituir el 30% del peso fresco, correspondiendo la mayor proporción a fructanos del tipo inulina. Estos carbohidratos en los meristemos del género *Allium* son principalmente del tipo estructural y se movilizan dentro de la planta, variando sus contenidos en las distintas partes de la misma durante la evolución del cultivo, esas variaciones se relacionan con el coeficiente de partición (peso seco del bulbo respecto al peso seco del aéreo). De esta manera el contenido de carbohidratos puede constituirse en un índice de la bulbificación. Una vez emergidas las hojas, comienza la etapa de crecimiento de la masa foliar. A nivel cultivo es importante determinar la dinámica y las relaciones de crecimiento de la parte aérea y bulbo (tasa de asimilación neta, índice de área foliar e índice de bulbificación). El conocimiento de la evolución de estos parámetros durante el ciclo del cultivo permitiría detectar los periodos de mayor fotosíntesis y los momentos de transporte de los foto-asimilados a los sitios de acumulación (Ledesma y col, 1997a).

En la etapa de crecimiento del bulbo, se considera en primer término la diferenciación de los dientes que corresponde con la etapa morfogénica (Núñez y col, 1994). La misma se produce por la captación del estímulo termo y fotoperiodico, requisito indispensable para que el fenómeno de bulbificación se

expresé. El estímulo es captado por las primeras hojas expandidas y se traslada a la parte basal de las mismas, donde se origina el bulbo (Ledesma y col, 1997b).

Los bulbillos simples o “dientes”, se originan en la axila de las hojas fértiles o dentadas y están apoyados sobre el tallo anual o “disco”. Cada diente está compuesto por una serie de hojas modificadas, como se ilustra en la Figura 2.5. La hoja externa, denominada *protectora*, consiste sólo de una vaina foliar lignificada y seca, ésta es la responsable del color del diente que caracteriza a los cultivares y que varía desde el blanco al púrpura. Hacia el interior continúa otra hoja sin lámina, de gran espesor, denominada hoja de reserva o de almacenamiento, que representa entre 90 y 95 % del peso total del diente y en la cual los fructanos se acumulan, después de esta hoja se encuentra aquella que envuelve a la hoja de *brotación* o “germinadora”, que es delgada y sin lámina. Ésta se desarrolla durante el almacenamiento y puede ser utilizada como indicadora del estado de letargo (Izquierdo y col, 1992).

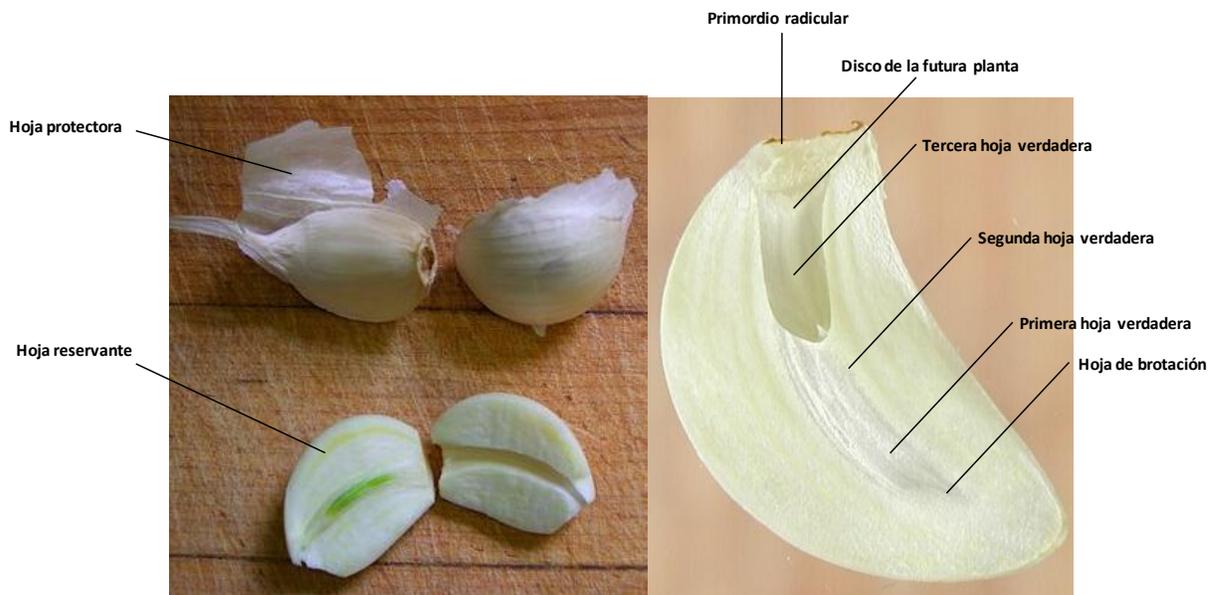


Figura 2.5. Estructura del bulbillo o “diente” de ajo.

Por su estructura, los bulbillos son órganos de propagación de ésta especie, pues son yemas vegetativas en estado de letargo cuando están recién cosechados pero que activan su crecimiento para generar una nueva planta bajo determinadas condiciones ambientales como pre-tratamientos a bajas temperaturas y exposición a fotoperiodos largo. El crecimiento de los dientes está en función de la fitomasa o masa foliar aérea producida y el aporte de los fotoasimilados, este crecimiento puede evaluarse por el incremento de peso seco y el traslado de los fotoasimilados a través de un coeficiente de partición (peso seco del bulbo respecto al peso seco aéreo). Estos fotoasimilados se acumulan principalmente bajo la forma de carbohidratos (Ledesma y col, 1997a).

2.5. Composición

La composición de este producto está determinada por diferentes factores como: el cultivar o variedad, prácticas agronómicas, clima, fertilización y condiciones de almacenamiento durante la poscosecha que determinan la calidad, intensidad del sabor del ajo así como el valor nutracéutico de los bulbos (Cavagnaro y Galmarini, 2007) (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Composición química por 100 g de ajo fresco.

NUTRIENTE	UNIDAD	CANTIDAD
Agua	G	58.58
Energía	Kcal	149
Proteína	G	6.36
Lípidos totales	g	0.50
Ac. Saturados	g	0.089
Monoinsaturados	g	0.011
Poliinsaturados	g	0.249
Cenizas	G	1.50
Carbohidratos	G	33.06
Azúcares totales	G	1.00
Minerales		
Calcio (Ca)	mg	181
Magnesio (Mg)	mg	25
Fosforo (P)	mg	153
Potasio (K)	mg	401

Sodio (Na)	mg	17
Selenio (Se)	mcg	14.2
Vitaminas		
Vitamina C	mg	31.2
Vitamina B ₆	mg	1.235
Vitamina K	mcg	1.7
Aminoácidos		
Leucina	g	0.308
Arginina	g	0.634
Ac. aspártico	g	0.489
Ac. glutámico	g	0.805

Fuente: United States Department of Agriculture (USDA), www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp.

Los carbohidratos más importantes presentes en el ajo son los fructanos, dentro de la dieta humana, estos carbohidratos ayudan a mejorar algunas actividades metabólicas, a fortalecer las funciones inmunes del organismo y a mejorar la biodisponibilidad de nutrientes al ser fermentados. El aumento en las defensas se debe a las capacidades inmunomoduladoras de las bacterias lácticas que crecen a expensas de los fructanos. Debido a su proceso fermentativo, los fructanos pueden afectar el epitelio intestinal favoreciendo el desarrollo de la mucosa y aumentando la resistencia a las enfermedades intestinales por un mecanismo de barrera, por esta razón el consumo de fructanos favorece la no aparición de lesiones intestinales ulcerativas (Augusti, 2005; Chacón, 2006).

El consumir fructanos suele favorecer selectivamente el crecimiento de las bacterias lácticas y del género *Bifidobacterium*, esta capacidad de estimular el crecimiento en el colon de bacterias específicas consideradas beneficiosas y desestimular o hasta anular el crecimiento de bacterias patógenas se conoce como efecto prebiótico. Los fructanos también ayudan a la reducción en los niveles de triglicéridos, colesterol y lipoproteínas, así como a la absorción de minerales tales como el calcio, magnesio, zinc, hierro y cobre (Chacón, 2006; Ritsema y Smeekens, 2003; Segura, y col, 2006).

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, 1998).

Todas las especies del género *Allium* poseen principios activos volátiles que les confieren un aroma y sabores especiales, por lo que son tan apreciadas como condimentos. Las diferencias gustativas entre ellas dependen de la cantidad de radicales metilo o alilo. El ajo posee una gran cantidad de radicales del segundo tipo complementados con cierta proporción de radicales metil-alil, por ello los dientes de ajo no generan cantidad suficiente de principios lacrimales al contrario que la cebolla (García, 1998).

2.6. Aspectos generales del metabolismo de los fructanos

Al menos 40,000 especies de plantas como cebada, trigo, algas (verdes y verde-azules), centeno, cebolla, ajo almacenan fructanos en sus hojas, raíces, tubérculos o bulbos (Roth, y col, 1997; Morcuende y col, 2003; Shiomi, y col, 2005; Praznik y col, 2006; Collins y Rastall 2008). El ajo acumula como sustancia de reserva principalmente carbohidratos no-estructurales tales como fructosa, sacarosa y fructanos. Los fructanos tienen otras funciones además del almacenamiento de carbono, pues están implicados en la protección de la planta contra el déficit de agua debido a la sequía o a las bajas temperaturas (Vijn y Smeekens, 1999).

2.6.1. Estructura de los fructanos

Los fructanos son polímeros lineares o ramificados en los cuales la β -fructofuranosil-fructosa constituye la unidad predominante. En plantas, el grupo incluye oligosacaridos con un grado de polimerización de 3 a 6, o cadenas más

largas que pueden alcanzar un grado de polimerización de aproximadamente 50 en el grupo de inulinas y cadenas más grandes en el caso de levanos (grado de polimerización de cerca de 200) (Vijn y Smeekens, 1999). Las inulinas están compuestas principalmente por unidades de fructosa, unidas por enlaces glicosídicos $\beta(2\rightarrow1)$ y poseen típicamente una glucosa terminal, las cadenas más pequeñas son usualmente denominadas fructooligosacáridos, el más simple de los cuales se denomina comúnmente 1-kestosa (Figura 2.6) y se encuentra formada por una unidad de sacarosa y una de fructosa.

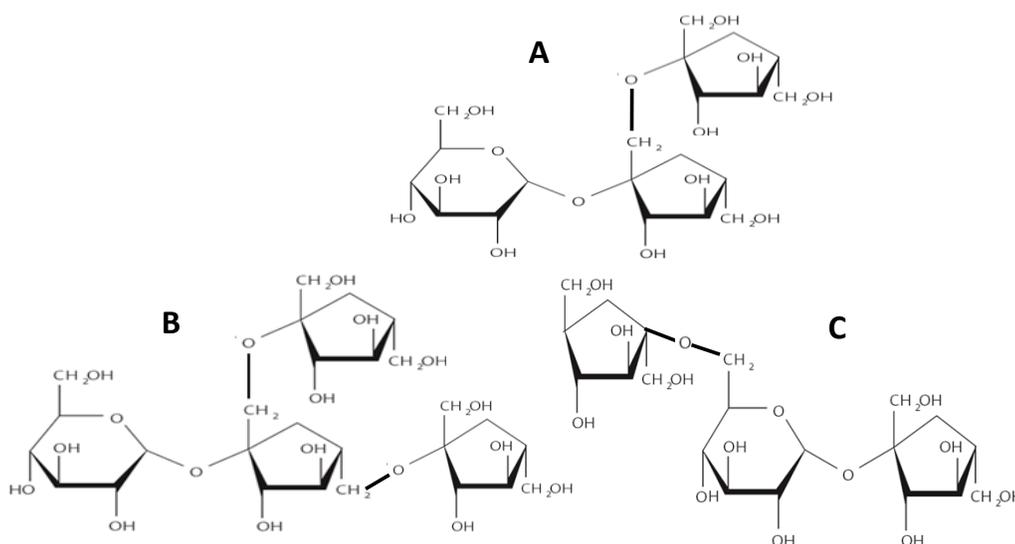


Figura 2.6. Estructuras de fructanos cortos: (A) kestosa, (B) bifurcosa, (C) neokestosa (Vijn y Smeekens, 1999).

La caracterización de un fructano de alto peso molecular aislado de Ajo, fue reportado por Baumgartner y col. en 2000, cuya caracterización fue realizada por medio de técnicas enzimáticas, químicas y espectroscópicas (resonancia magnética nuclear, RMN), indicando que estos fructanos provienen de la familia de neokestosas y son cadenas de fructosas de un grado de polimerización de 58 con enlaces $\beta-2,1$ y ramificaciones $\beta-2,6$ (Figura 2.7).

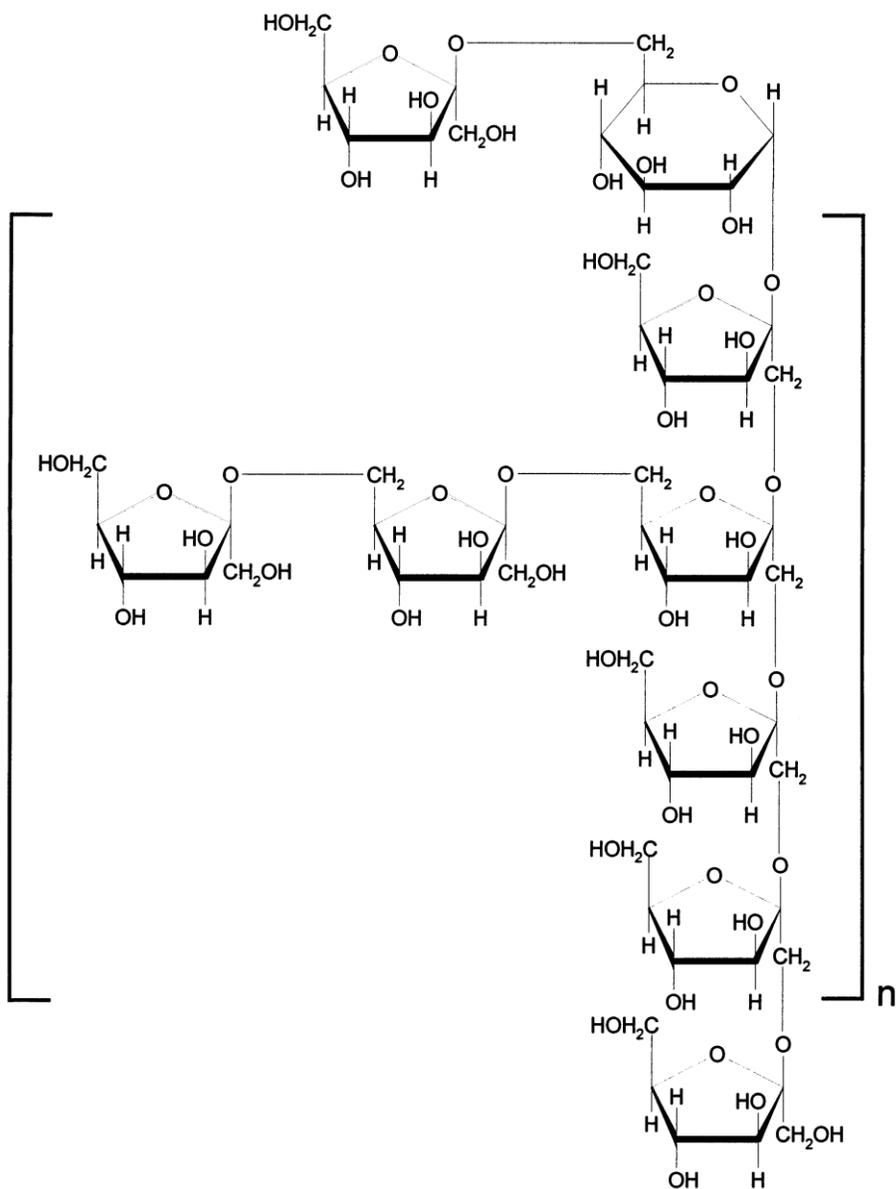


Figura 2.7. Estructura sugerida para un fructano de ajo; $n=9$, para un grado de polimerización= 58 (Baumgartner y col, 2000).

2.6.2. Biosíntesis de los fructanos

El sustrato para la síntesis de fructanos es la sacarosa, y tanto ésta como fructosa son almacenadas en la vacuola (Figura 2.8). 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 (Cuadro 2.2). 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).

Cuadro 2.2. Relación de enzimas fructosiltransferasas involucradas en la síntesis y degradación de fructanos.

ENZIMA	NOMENCLATURA	SUSTRATO	PRODUCTO
sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa	1-SST	sacarosa + sacarosa	1-kestosa + glucosa
sacarosa fructan-6-fructosiltransferasa	6-SFT	sacarosa + 1-kestosa	bifurcosa + glucosa
fructan-fructan-6-glucosa-fructosiltransferasa	6-G-FFT	sacarosa + 1-kestosa	neokestosa + sacarosa
fructano:exohidrolasa	FEH	fructano	fructano + fructosa
fructan-fructan-1-fructosiltransferasa	1-FFT	Elongación del fructano	

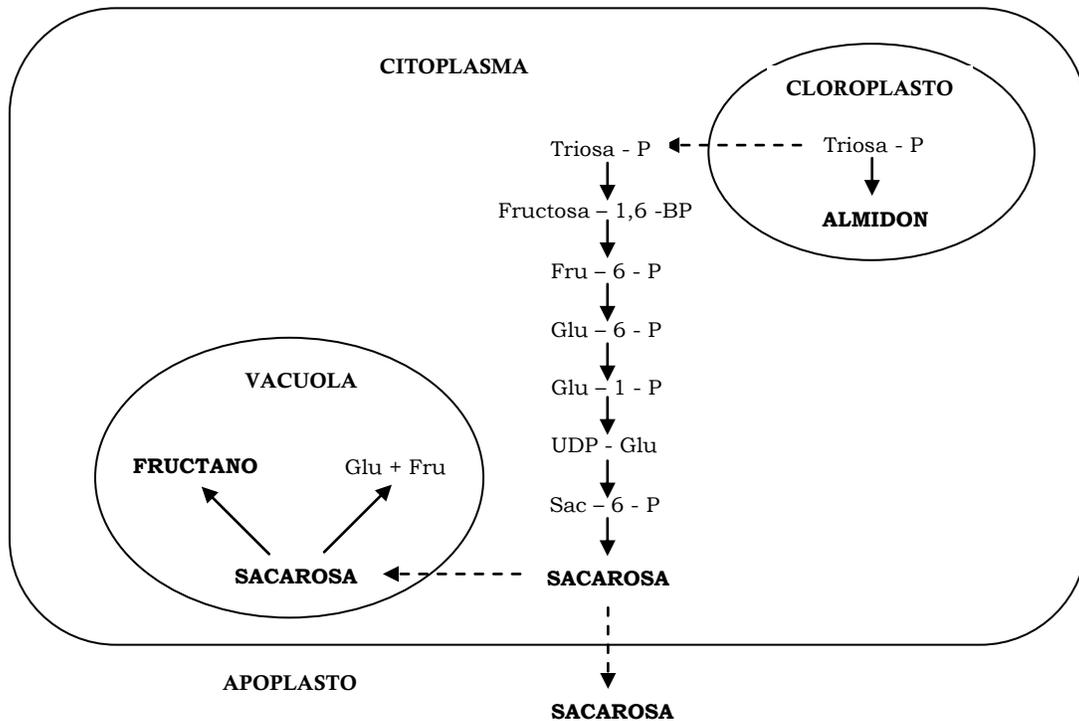


Figura 2.8. Representación esquemática del metabolismo de carbohidratos en células de plantas (Vijn y Smeeckens, 1999).

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) (Figura 2.9); el cual puede ser polimerizado por la participación de la enzima fructosa fructan-fructan-fructosiltransferasa (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. Estas dos enzimas se consideran no usuales dado que no siguen la cinética de Michaelis –Menten pues aunque su actividad depende de la concentración de la enzima y del sustrato son insaturables (Vijn y Smekens 1999). En las especies de la familia de las Liláceas, a las cuales pertenecen el ajo y la cebolla, en adición a la inulina, se pueden sintetizar fructanos del tipo

neoserias 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 neoserias 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.

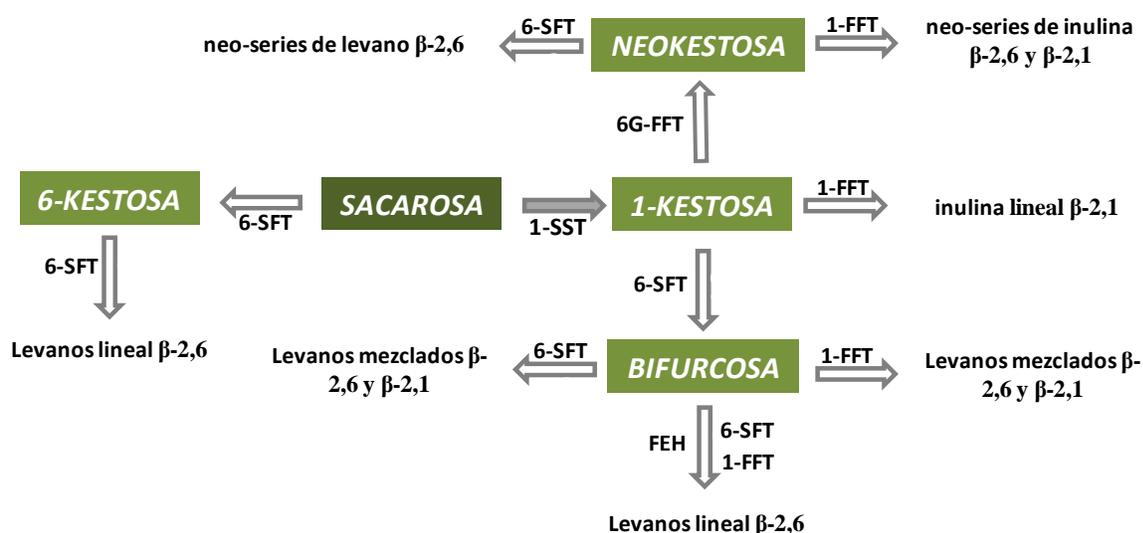


Figura 2.9. Biosíntesis de fructanos en plantas (Vijn y Smeekens, 1999).

No obstante la ruta descrita, es importante señalar que bajo determinadas condiciones fisiológicas, todas las enzimas anteriormente señaladas pueden producir varias moléculas de fructanos dependiendo de la disponibilidad de sustrato; por ejemplo 1-SST puede producir tetra y penta sacáridos a partir de sacarosa y la 6G-FFT produce nistosa además de la neokestosa. También es importante señalar que altas concentraciones de sacarosa promueven que la

invertasa genere actividad de 1-SST lo cual probablemente es importante durante el ciclo diario de síntesis de fructanos en las plantas.

En otro tipo de plantas como la cebada, la enzima 6-SFT puede producir bifurcosa, producto que puede ser elongado por la 1-FFT para generar oligofructanos ramificados. Si el único sustrato disponible es la sacarosa la enzima 6-SFT puede generar levanos a partir de ella. (Banguela y Hernández, 2006; Chacón, 2006; Vijn y Smeekens, 1999).

2.6.3. Degradación de fructanos

Los fructanos pueden ser degradados por igual diversidad de enzimas que las que involucran su síntesis. La ruptura de las inulinas por lo general se lleva a cabo por medio de una hidrólisis ejecutada por fructan-exo-hidrolasas ó FEH (exoinulinasas y exolevanasas como la 2,1- β -D-fructanohidrolasa) que rompe los enlaces $\beta(2 \rightarrow 1)$, liberando fructosa y polisacáridos de cadena corta (Suzuki y Chatterton, 1996).

Investigaciones realizadas en bulbos de cebolla muestran que el metabolismo de los fructooligosacaridos se encuentra relacionado con las etapas de dormancia y brotación (Rutherford, 1981). Durante las primeras semanas posteriores a la cosecha los fructanos presentes en los tejidos son hidrolizados hacia fructanos de bajo grado de polimerización, disacáridos y finalmente monosacáridos; esta hidrólisis tiene lugar en las primeras semanas posteriores a la cosecha y es previo al inicio de la etapa de brotación cuando la actividad de la FEH presenta un pico en su comportamiento debido a la alta demanda de carbohidratos; ésta actividad enzimática es independiente de la temperatura de almacenamiento de los bulbos de cebolla (Shiomi y col, 2005). El comportamiento de la FEH concuerda con resultados obtenidos por Asega y Carvahlo (2004) en *Vermonia herbacea*, aunque biológicamente esta planta sea diferente a las cebollas.

2.7 Fructanos en el mundo vegetal

Los fructanos son carbohidratos de reserva que se encuentran presentes en más de 40000 especies de plantas, en órganos como: hojas, raíces, tubérculos ó bulbos; sin embargo la cantidad, composición y distribución de los fructanos depende de cada especie y del momento de cosecha (Olvera y col, 2007). En el Cuadro 2.3 se muestran las especies más representativas de vegetales productores de fructanos.

Cuadro 2.3. Fructanos representativos en algunas especies vegetales (Olvera y col, 2007).

ORDEN TAXONÓMICO	ESPECIES REPRESENTATIVAS	TIPO DE FRUCTANO	OBSERVACIONES
Asterales	- Chicorea (<i>Chicorium spp.</i>) - Tupinambos (<i>Helianthus tuberosus</i>) - Alcachofa común (<i>Cynara scolymus</i>)	Inulina lineal con \approx 95% enlaces β -2,1	La alcachofa común produce la inulina más larga de origen vegetal, fructanos con más de 100 unidades de fructosa unidas linealmente
Liliales	- Cebolla (<i>Allium cepa</i>) - Ajo (<i>Allium sativum</i>) - Espárrago (<i>Asparagus officinalis</i>) - Agave (<i>Agave spp.</i>)	Neo-series de inulinas, inicia cadena con fructosas unidas sobre C1 y C6 de la glucosa con enlaces β -2,1	Fructanos de origen vegetal de alta variabilidad estructural
Poales	- "Pasto ovillo" (<i>Dactylis glomerata</i>) - Trigo (<i>Triticum spp</i>) - Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) - Avena (<i>Avena spp</i>)	Levano lineal con \approx 95% enlaces β -2,6; levanos mezclados en proporciones equivalentes de enlaces β -2,1 y β -2,6. Neo-series de levanos, inicio de cadena con fructosas unidas sobre C1 y C6 de la glucosa con enlaces β -2,6	Orden taxonómico muy disperso formado por una gran variedad de especies. Fructanos de origen vegetal de alta variabilidad estructural

La distribución global de plantas que almacenan fructanos muestra que éstas son especialmente abundantes en zonas con climas secos o fríos, pero están casi ausentes en regiones tropicales (Hendry y Wallace, 1993). Lo anterior se puede deber a que la síntesis de almidón a temperaturas por debajo de los

10 °C decrece marcadamente mientras que la síntesis y producción de fructanos bajo estas condiciones sí puede realizarse (Pollock, 1986). Koops y Jonker (1996) encontraron que la 1-SST de alcachofa mantenía un 50% de actividad a 5 °C comparado con su actividad a una temperatura de 20 a 25 °C, ésta capacidad de almacenamiento de carbohidratos en condiciones adversas es lo que ha permitido que las plantas sigan con su crecimiento y evolución.

Muchos investigadores concuerdan en que la acumulación de fructanos aumentan la tolerancia de las plantas a un déficit hídrico, pero éste fenómeno ha sido difícil de comprobar (Vijn y Smeekens, 1999). Puebla y col, (1997) compararon la síntesis de fructanos bajo condiciones de estrés hídrico en dos especies de *Bromus* adaptadas a temperaturas templadas y frías, encontrando que las plantas bajo condiciones de frío y sequía tenían una constante síntesis de fructanos mientras que las plantas en condiciones templadas solo aumentaban su síntesis de fructanos al disminuir la temperatura.

2.7.1. Fructanos y bulbificación

El término bulbificación se refiere al proceso de activación de la planta de ajo para que inicie la génesis del bulbo. Este proceso lleva consigo la hipertrófia de las yemas axilares de las hojas y la degeneración de las vainas foliares de la base para formar las túnicas de protección. La bulbificación es promovida por la exposición previa de los dientes “semilla” a bajas temperaturas (almacenamiento en frío) así como de los periodos de frío y fotoperiodo corto seguidos por mayores temperaturas y presencia de fotoperiodos largos durante el desarrollo del cultivo (del Pozo y González, 2005). Esta acumulación de carbohidratos en forma de fructanos es mejorada bajo condiciones como sequía, bajas temperaturas o deficiencia de nitrógeno, las cuales pueden inducir la actividad de 1-SST o 6-SFT (Morcuende, y col, 2005).

Actualmente no existe información suficiente acerca de las condiciones que se requieren para aumentar la actividad de las enzimas que inician la ruta biosintética de fructanos y su acumulación en bulbos de ajo, por lo que éste trabajo intenta aportar información acerca de la influencia del almacenamiento a bajas temperaturas de los dientes “semilla”, así como el de factores ambientales como temperatura y fotoperiodo durante el desarrollo de la planta, sobre la calidad de bulbos, acumulación de fructanos y actividad enzimática de la 1-SST en ajos.

III. JUSTIFICACIÓN

Los fructanos son un compuesto natural presente en diversos productos tales como: cebada, trigo, algas (verdes y verde-azules), centeno, cebolla, ajo. A estos carbohidratos, se les reconoce como un ingrediente de alimentos benéfico para la salud humana, de ahí que se considere que los alimentos que los contienen sean alimentos funcionales. No obstante dentro de la fisiología de la planta, son carbohidratos de reserva que se movilizan cuando el carbono fotosintético es inferior a la demanda de crecimiento.

Durante la etapa de bulbificación del ajo hay una gran acumulación de fructanos, pero esta etapa se encuentra poco estudiada y no se conoce cómo las condiciones de almacenamiento de la semilla puedan alterar su patrón de acumulación o la actividad de las enzimas responsables de su metabolismo.

Trabajos previos indican que el contenido de fructanos se encuentra determinado por bajas temperaturas (5 a 10 °C) y fotoperiodos cortos (8 h) en la primera etapa de desarrollo seguidos por mayores temperaturas y mayores cantidades altas de luz durante las últimas etapas de desarrollo. Otros autores indican la importancia de fotoperiodos largos (16 h) y altas temperaturas durante el desarrollo para inducir el almacenamiento de fructanos en los bulbos. No obstante, es necesario desarrollar más investigación para entender el efecto de esos factores ambientales en el proceso de biosíntesis de estos carbohidratos y así poder entender más el papel fisiológico que cumplen dentro de las plantas.

Por la importancia comercial y nutricional que representa una mayor calidad de los bulbos de ajo, este trabajo pretende aportar información que permita identificar los efectos de las condiciones de pre-almacenamiento de “semillas” sobre el proceso de acumulación de fructanos y en la actividad de la enzima 1-SST en bulbos de ajo cv. Coreano.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar los cambios en la actividad de la sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (1-SST) y su relación con el proceso de síntesis y acumulación de fructanos durante el desarrollo de la planta de ajo.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento de las “semillas” en el crecimiento de la planta y desarrollo del bulbo.
- Evaluar correlaciones en el tiempo entre los factores ambientales presentes en el campo de experimentación, el desarrollo de la planta y la calidad del bulbo.
- Determinar los cambios en el contenido de fructanos durante el desarrollo y crecimiento de la planta de ajo y correlacionarlos con las condiciones de almacenamiento de los dientes “semilla”.
- Determinar los cambios de actividad de la enzima 1-SST en bulbos y pseudo tallos de ajo durante su desarrollo y correlacionarlos con las condiciones de almacenamiento de los dientes “semilla”.
- Establecer las relaciones entre calidad, actividad de la 1-SST y acumulación de fructanos en pseudo tallos y bulbos de ajo.
- Con base en los resultados anteriores, determinar la utilidad del almacenamiento de los dientes “semilla” a bajas temperaturas.

V. METODOLOGÍA

5.1. Estrategia general

La estrategia general realizada en este trabajo se muestra en la figura 5.1. Los trabajos se iniciaron con la localización del área experimental donde se desarrollaron los experimentos y elección de la estación climatológica con la cual se registraron los datos de temperatura e intensidad de radiación máxima durante el ciclo de producción. Después de la obtención del material biológico en conjunto con el planteamiento teórico a desarrollar se procedió a almacenar los bulbos de ajo a las distintas condiciones de pre almacenamiento (TA, 5 y 10 °C durante 10 días); después los bulbos se desgranaron y se seleccionaron los dientes más grandes, firmes y sin defectos visibles; se separaron en tres repeticiones y a cada replica se aplicó una serie de tratamientos con soluciones acuosas de Basudin® y Folicur®; Buffex® y Agrimycín® para evitar el ataque de plagas y enfermedades durante el desarrollo de las plantas. Posteriormente se procedió a la siembra, colocando los dientes de ajo en surcos a doble hilera separados 85 cm entre sí, con una distancia de 7 cm entre cada diente; el protocolo de fertilización, el tipo de riego y su frecuencia fueron similares a los realizados por el productor de ajo donde se ubicó el lote experimental. Durante el desarrollo del cultivo se realizaron siete muestreos mensuales, en los cuales se tomaron cinco plantas al azar de cada réplica de cada uno de los tratamientos; a cada planta se le midió su talla, peso e índice de bulbificación y se tomaron muestras las cuales se mantuvieron a -70 °C hasta el análisis de actividad enzimática y contenido de fructanos en pseudo tallo y bulbo. Al final del periodo de cultivo se tomó el total de plantas producidas en una sección de 5 metros lineales, estas se curaron bajo la sombra y posteriormente se eliminó la parte aérea de cada planta; con los conjuntos de bulbos se determinó el peso total de cada tratamiento y se estimó su rendimiento por hectárea y la calidad de la cosecha (diámetro de bulbo). Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente y correlacionados con los datos de temperatura e irradiación lumínica máxima diaria.

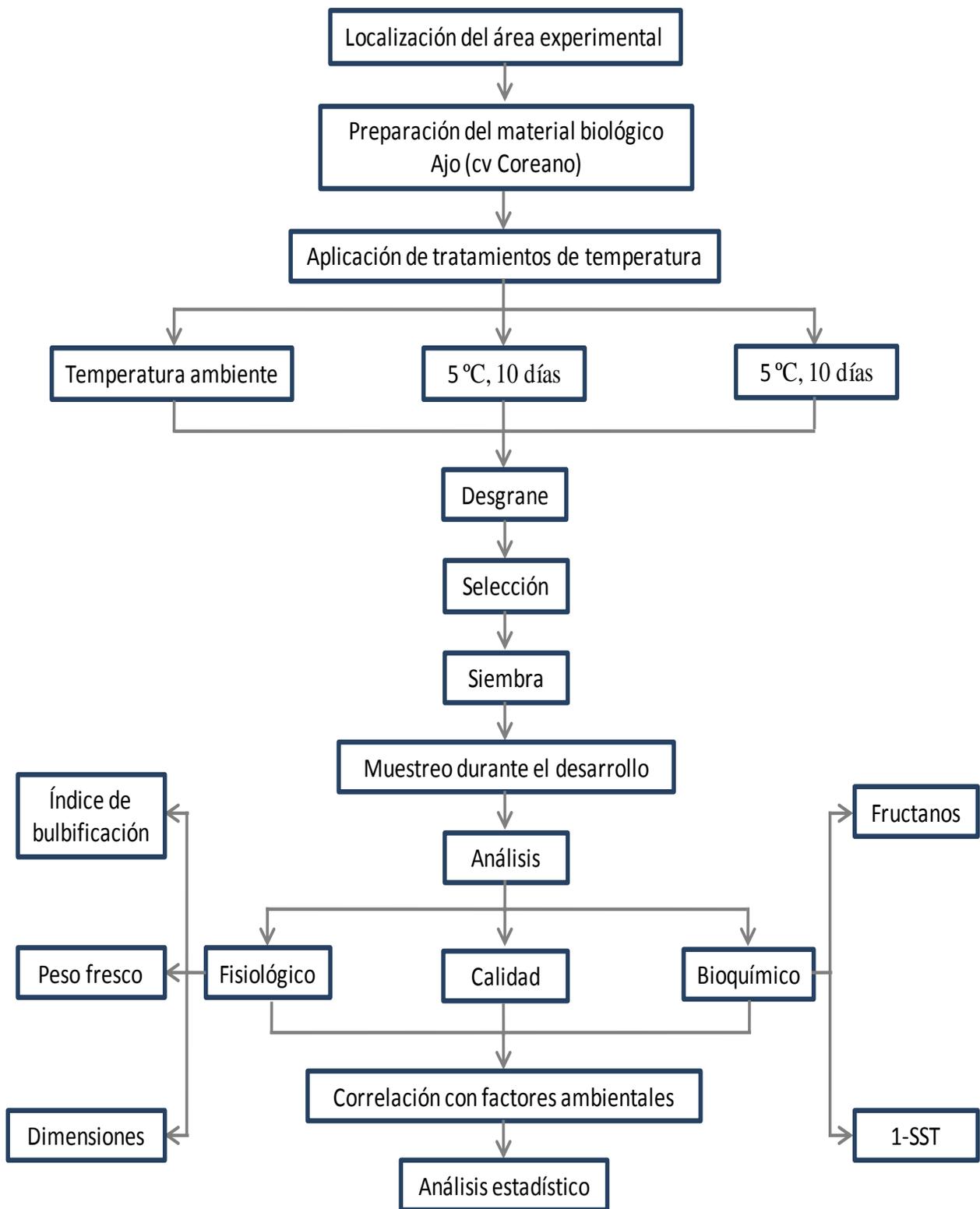


Figura 5.1. Estrategia experimental.

5.2. Localización del área experimental

La siembra se realizó en la Finca “El Bordo”, ubicada en el municipio de Cosío, Aguascalientes, propiedad del Sr. Israel Gutiérrez Palacios. La siembra y la medición de las parcelas se realizaron con ayuda de productores de ajo de la localidad. El sistema de riego utilizado durante todo el desarrollo fue riego rodado.

El municipio de Cosío se localiza al norte del estado de Aguascalientes (Figura 5.2), en las coordenadas 102°18' longitud oeste y 22°22' latitud norte, a una altura de 2,000 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con el estado de Zacatecas; al sur con el municipio de Rincón de Romos y tanto al oriente como al poniente con el estado de Zacatecas y el municipio de Rincón de Romos.

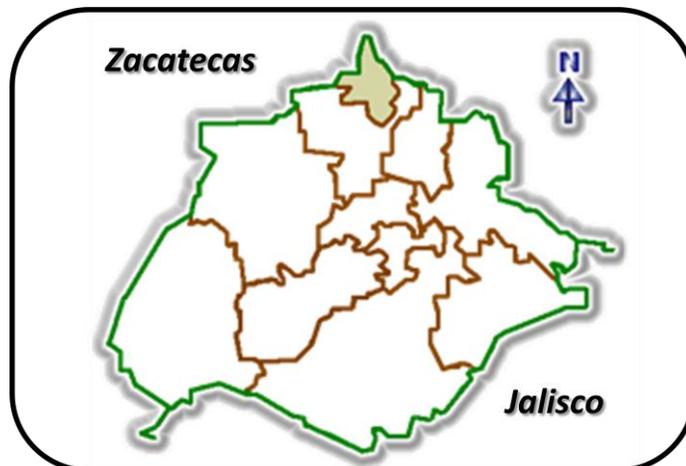


Figura 5.2. Ubicación del municipio de Cosío en el estado de Aguascalientes.

El municipio, tiene un clima templado estepario con verano cálido, una temperatura media anual de 15 °C, registrándose la más alta entre los meses de mayo a agosto, y la más baja entre diciembre, enero y febrero.

5.3. Material biológico

Se utilizó ajo de la variedad 'Coreano' de la cosecha 2006 a 2007 donado por productores de ajo del municipio de Rincón de Romos, Aguascalientes.

El lote de ajos donado fue trasladado al laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro, en donde se realizaron la clasificación y aplicación de los tratamientos experimentales.

5.4. Clasificación y preacondicionamiento de la semilla

Para el experimento únicamente se seleccionarán aquellos bulbos que presentaron características de firmeza, tamaño uniforme y ausencia de defectos mecánicos; posterior a la selección, aproximadamente 900 bulbos de ajo fueron divididos en tres lotes (Cuadro 5.1) y almacenados durante 10 días a tres diferentes temperaturas.

Cuadro 5.1. Condiciones de preacondicionamiento para los bulbos de ajo.

LOTE	TEMPERATURA	DIAS
1	Ambiente	10
2	5 °C	10
3	10 °C	10

Después del almacenamiento a diferentes temperaturas, cada uno de los lotes experimentales fue desgranado e identificados de acuerdo al tratamiento; posteriormente se les aplicó un tratamiento plaguicida y fungicida con diferentes productos agroquímicos (Cuadro 5.2). El número de dientes que conformaron cada réplica fue de 172.

Cuadro 5.2. Agroquímicos utilizados como tratamiento plaguicida, bactericida y fungicida.

AGROQUIMICO	TIEMPO DE APLICACIÓN
Basudin® + Folicur®	15 min.
Buffex®	50 min
Agrimycin®	15 min

Estos tratamientos se aplicaron tomando como base las recomendaciones de los productores de ajo para proteger los dientes sembrados del ataque de patógenos y plagas. Estos procedimientos se aplicaron por inmersión en las soluciones de los distintos productos químicos disueltos en agua por los periodos de tiempo señalados. Una vez transcurrido el tiempo de aplicación los dientes se escurrieron en mallas de plástico para eliminar el exceso de agua y posteriormente fueron trasladados al campo de cultivo para su siembra de acuerdo a lo establecido en el primer párrafo de este capítulo.

5.5. Registro climatológico

5.5.1. Registro de datos climáticos

Durante el desarrollo del cultivo se colectaron los datos diarios de temperaturas (media, máxima y mínima) de la región de estudio, a partir de datos proporcionados por medio del Laboratorio de Modelaje y Sensores Remotos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en su campo experimental de Pabellón de Arteaga a través de la página <http://clima.inifap.gob.mx/redclima/>. En el cuadro 5.3 se muestran las estaciones climatológicas más cercanas al campo de experimentación de acuerdo a sus coordenadas geográficas.

Cuadro 5.3. Estaciones climatológicas en el estado de Aguascalientes cercanas a la parcela experimental.

ESTACIÓN	LATITUD	LONGITUD	MUNICIPIO	PRODUCTOR
Los Pinos	22° 19' 13"	102° 13' 30"	Rincón de Romos	José Ramírez
Potreritos	22° 21' 49"	102° 17' 30"	Cosío	INAGUA

Debido a la cercanía al campo de cultivo experimental, se decidió utilizar los datos de la estación climatológica Los Pinos.

El fotoperiodo se determinó a partir de las coordenadas geográficas de la estación climatológica Los Pinos, las cuales fueron alimentadas al programa de cálculo del Astronomical Applications Department del Observatorio Naval de los Estados Unidos en la página http://aa.usno.navy.mil/cgi-bin/aa_durtablew.pl.

5.6. Registro de parámetros biológicos.

5.6.1. Medición de variables de respuesta durante el desarrollo de la planta.

A partir de la completa emergencia de las plantas y durante el desarrollo de las mismas se realizaron 7 muestreos mensuales; en cada uno de los cuales se tomaron 5 plantas de cada réplica, a cada una de ellas se les determinaron las siguientes variables de respuesta (Figura 5.3):

- **Peso fresco.** Para su determinación se eliminó la tierra presente en las plantas para posteriormente pesarlas utilizando una balanza digital.
- **Altura de planta.** Se determinó desde la base del bulbo de ajo, sin considerar las raíces, hasta el final de la hoja más larga.
- **Diámetro del bulbo.** Se midió el diámetro ecuatorial del bulbo de ajo utilizando un Vernier digital.

- **Diámetro del cuello.** Con el Vernier digital se tomó la medida del cuello o inicio del pseudo tallo.
- **Índice de bulbificación.** Esta variable fue calculada de acuerdo a la relación entre el diámetro del cuello y diámetro del bulbo (Mann, 1952). Un valor superior a 2, señala que el proceso de bulbificación ha iniciado.

$$IB = \frac{\text{diámetro del cuello}}{\text{diámetro del bulbo}}$$

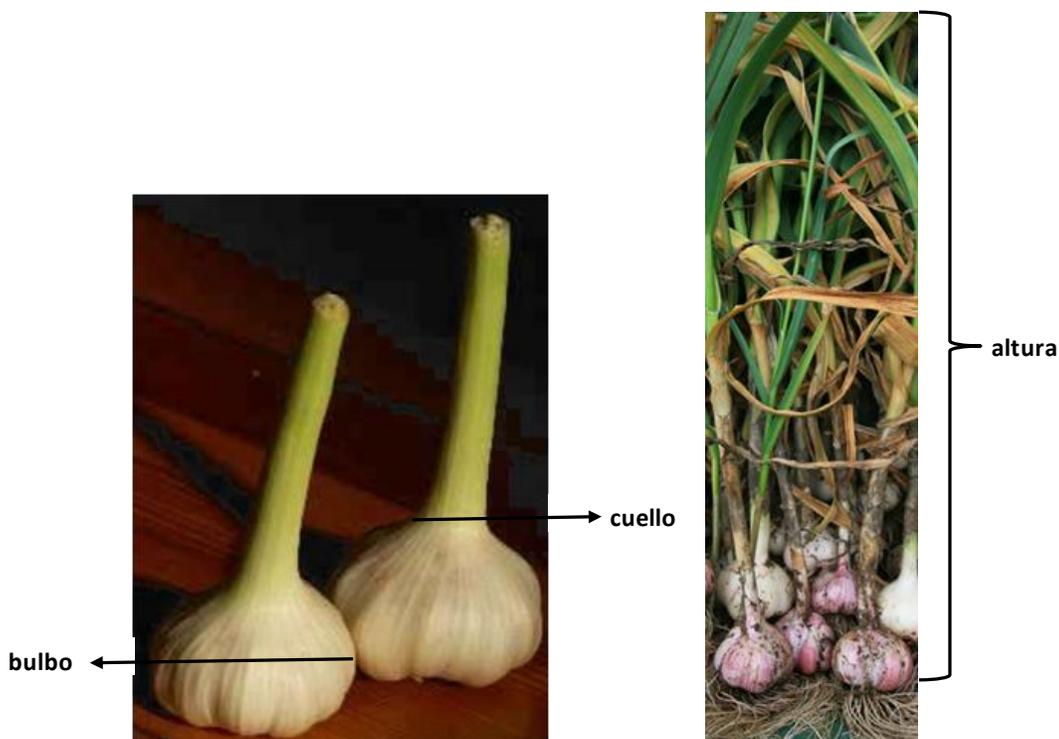


Figura 5.3. Localización de algunas de las variables medidas en plantas de ajo.

5.6.3. Evaluación de calidad de bulbos

Al final del ciclo de cultivo, se realizaron las siguientes evaluaciones en los bulbos cosechados.

5.6.3.1. Clasificación por calibre

El tamaño o calibre de los bulbos se determinó utilizando una carta de calibres de los bulbos (Figura 5.4), la cual consiste en una placa de papel grueso con círculos perforados de distintos de diámetros que corresponden a los distintos calibres comerciales establecidos; los cuales se muestran en el cuadro 5.4.

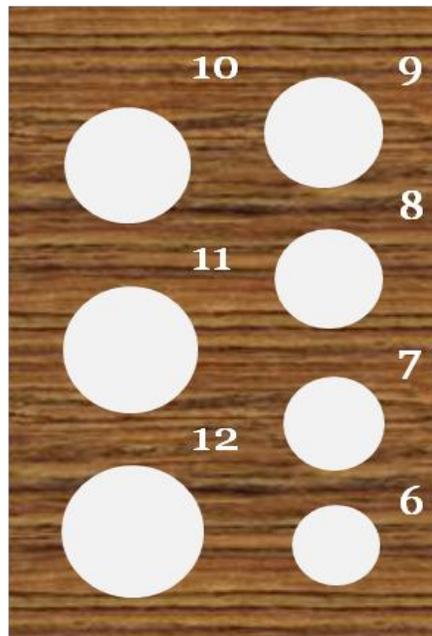


Figura 5.4. Tabla de calibres para bulbos de ajo.

Cuadro 5.4. Escala de calibres comerciales determinados de acuerdo al diámetro del bulbo de ajo.

CALIBRES	DIAMETRO (cm)
< 6	< 4.5
6	4.5
7	5.0
8	5.5
9	6.0
10	6.5
11	7.0
12	7.5
>12	> 7.5

5.6.3.2. 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 ellos.

5.6.3.3. 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 formados, 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.

5.7. Análisis bioquímicos

5.7.1. Determinación de fructanos en la materia seca de bulbos y pseudo tallos

La distribución de fructanos totales de bulbos y hojas, se realizó mediante el método enzimático y espectrofotométrico de la AOAC usando el Kit de Megazyme fructans HK assay. (McCleary y Murphy, 2000).

El procedimiento involucra 3 reacciones paralelas (Figura 5.5):

(1) hidrólisis de la sacarosa a D-fructosa y D-glucosa mediante el uso de la enzima sacarasa,

(2) hidrólisis del almidón y los maltosacaridos presentes en la muestra a D-glucosa por la acción combinada de β -amilasas, pululanasas y maltasas altamente purificadas e

(3) hidrólisis de los fructanos a D-fructosa y D-glucosa, usando fructanasa purificada.

5.7.1.1. Extracción de fructanos

Las muestras a analizar fueron liofilizadas y molidas en un molino Krups F203, hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm. Se mezcló 100 mg de la muestra y 40 ml de H₂O destilada a 80 °C en un vaso de precipitado, la mezcla se mantuvo con agitación y calentamiento (80 °C) durante 15 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforo a un volumen de 100 ml.

5.7.1.2. Remoción de sacarosa, almidón y azúcares reductores

En un tubo de precipitado se colocó 0.2 ml de la solución a analizar y 0.2 ml de una solución de sacarasa/amilasa, la mezcla se incubó a una temperatura de 40 °C durante 30 minutos, para lograr una completa hidrólisis enzimática del almidón y la sacarosa presentes en la muestra. Al finalizar el tiempo de incubación se añadió al tubo 0.2 ml de borohidruro alcalino, se agitó en un vortex y se incubó a 40 °C por 30 minutos, esto se hizo para completar la reducción de azúcares reductores a azúcares alcoholes. Posterior a la incubación se añadió 0.5 ml de ácido acético 2 M y se agitó vigorosamente con ayuda de un Vortex, (este tratamiento remueve el exceso de borohidruro y ajusta el pH a 4.5).

5.7.1.3. Hidrólisis y medición de fructanos

Alícuotas de 0.2 ml de la solución anterior se colocaron en 3 tubos de ensayo. A los tubos *A* y *B* se les añadió 0.1 ml de fructanasa, para hidrolizar el fructano contenido en las muestras de ajo a azúcares reductores (glucosa y fructosa), mientras que al tubo *C* se le añadió 0.2 ml de buffer acetato de sodio 0.1 M que se usó como blanco. Todos los tubos fueron incubados a 40 °C durante 20 minutos. Se añadió 5 ml de ácido *para*-hidroxibenzoico hidrazida (PAHBAH) a los tubos *A*, *B* y *C* y se incubaron en baño de agua a 100 °C por 6 minutos, tiempo necesario para que el reactivo PAHBAH reaccione con los azúcares reductores presentes en las muestras evidenciándose por el desarrollo de color amarillo. Después de remover los tubos del baño de agua a 100 °C se colocaron inmediatamente en baño de agua fría (18 – 20°C) por 5 minutos.

La determinación de glucosa y fructosa (azúcares reductores) presentes en la muestra se realizó mediante la lectura de la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA). El porcentaje de fructanos (p/p) presentes en las muestras se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\%fructanos(p/p) = \Delta_A \times F \times 5 \times V \times \frac{1.1}{0.2} \times \frac{100}{W} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180}$$

$$\%fructanos(p/p) = \Delta_A \times F \times \frac{V}{W} \times 2.48$$

Donde:

Δ_A = [promedio de la absorbancia de la muestra (tubos *A* y *B*)] – [absorbancia del blanco (tubo *C*)].

F = Factor para convertir valores de absorbancia a µg de D-fructosa (McCleary y Murphy, 2000)

$$F = (54.5 \mu\text{g D - fructosa}) / (\text{absorbancia para } 54.5 \mu\text{g D - fructosa}).$$

5 = Factor para convertir de 0.2 ml analizados a 1.0 mL.

V = Volumen (mL) de extracto usado.

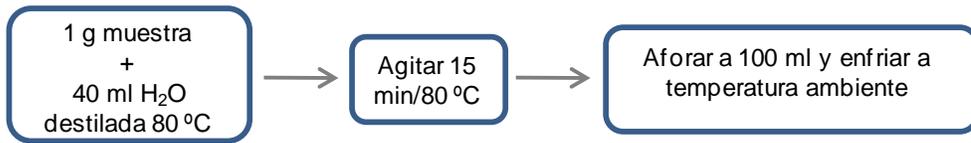
W = Peso (mg) de muestra extraída.

100/W = Factor para expresar los fructanos como porcentaje de peso de la muestra.

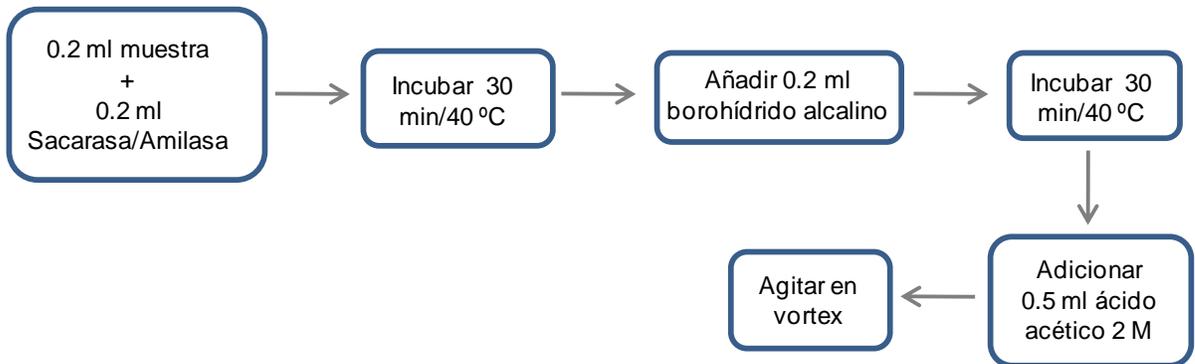
1/1000 = Factor de conversión de μg a mg.

162/180 = Factor para convertir de D-fructosa libre a anhidrofructosa e hidroglicosa como ocurre en fructanos (McCleary y Murphy, 2000).

(1) EXTRACCIÓN DE FRUCTANOS



(2) REMOCIÓN DE SACAROSA, ALMIDÓN Y AZUCARES REDUCTORES



(3) HIDRÓLISIS Y MEDICIÓN DE FRUCTANOS

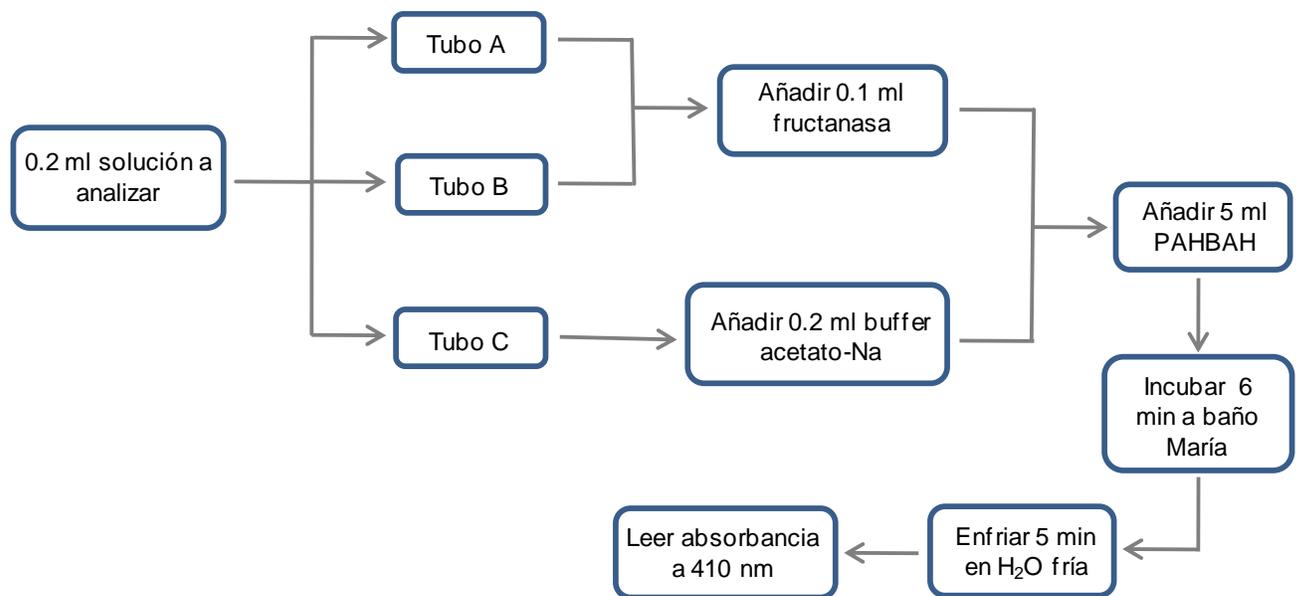


Figura 5.5. Diagrama general de la cuantificación de fructanos.

5.7.2. Actividad enzimática de la sacarosa-sacarosa-1-fructosil transferasa (1-SST)

La actividad de la enzima 1-SST, responsable de la biosíntesis de fructanos, se realizó con modificaciones a los métodos descritos por Jeong y Housley (1990), Puebla y col. (1999) y Van den Ende y col. (1999).

Jeong y Housley (1990) midieron la actividad de la enzima 1-SST presente en hojas de trigo (*Triticum aestivum* L. cv Caldwell). La extracción de las proteínas presentes fue realizada con nitrógeno líquido y buffer acetato-Na (pH 5), seguido de una centrifugación por 10 min a 4 °C a 20 000 g, las proteínas presentes en el sobrenadante fueron precipitadas con sulfato de amonio al 60% y agitadas durante 24 h, al finalizar el tiempo de agitación las muestras se centrifugaron por 5 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en buffer de extracción. Para medir la actividad de la 1-SST, se agregó sacarosa al medio y fue incubado 1 hora a 30 °C, finalmente se cuantificaron la sacarosa y glucosa presentes en la reacción por medio de la formación de NADPH mediante un ensayo enzimático acoplado.

En el trabajo descrito por Puebla y col. (1999) se realiza una cuantificación de la actividad de la 1-SST de *Bromus pictus* L., *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L. y *Helianthus tuberosus* L. Las proteínas fueron extraídas con buffer citrato-malato (pH 5.2) y centrifugados a 20 000 g por 30 minutos a 4 °C. A la solución con la 1-SST presente se le añadió sacarosa e incubó a 30 °C por 4 horas. Posterior a esta incubación se añadió una solución de enzima sacarasa al medio para hidrolizar la sacarosa sin reaccionar y los monosacáridos obtenidos después de una incubación a 40 °C por 1 hora fueron eliminados con la adición de hidróxido de sodio (NaOH) y calentamiento. La cantidad de fructano formado fue determinado con la adición de ácido tiobarbiturico en medio ácido (TBA-HCl) y calentamiento a 100 °C. Finalmente la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro.

La actividad de la 1-SST de *Chycoreium intybus* fue descrita por Van den Ende y col. (1999). La extracción proteínica fue realizada en tejidos de raíces con adición de buffer de acetato-Na (pH 5) con adición de fenilmetilsulfonil fluorido, bisulfito sódico y mercaptoetanol. El homogenado fue centrifugado a 10 000 g por 5 minutos. A las muestras se les añadieron sulfato de amonio saturado, después de media hora de incubación sobre hielo los precipitados fueron colectados por centrifugación a 10 000 g por 5 minutos. Subsecuentemente los precipitados fueron lavados con sulfato de amonio seguido de centrifugaciones. Los ensayos para medir la actividad enzimática se hicieron por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

El método utilizado en este trabajo (Figura 5.6) 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.

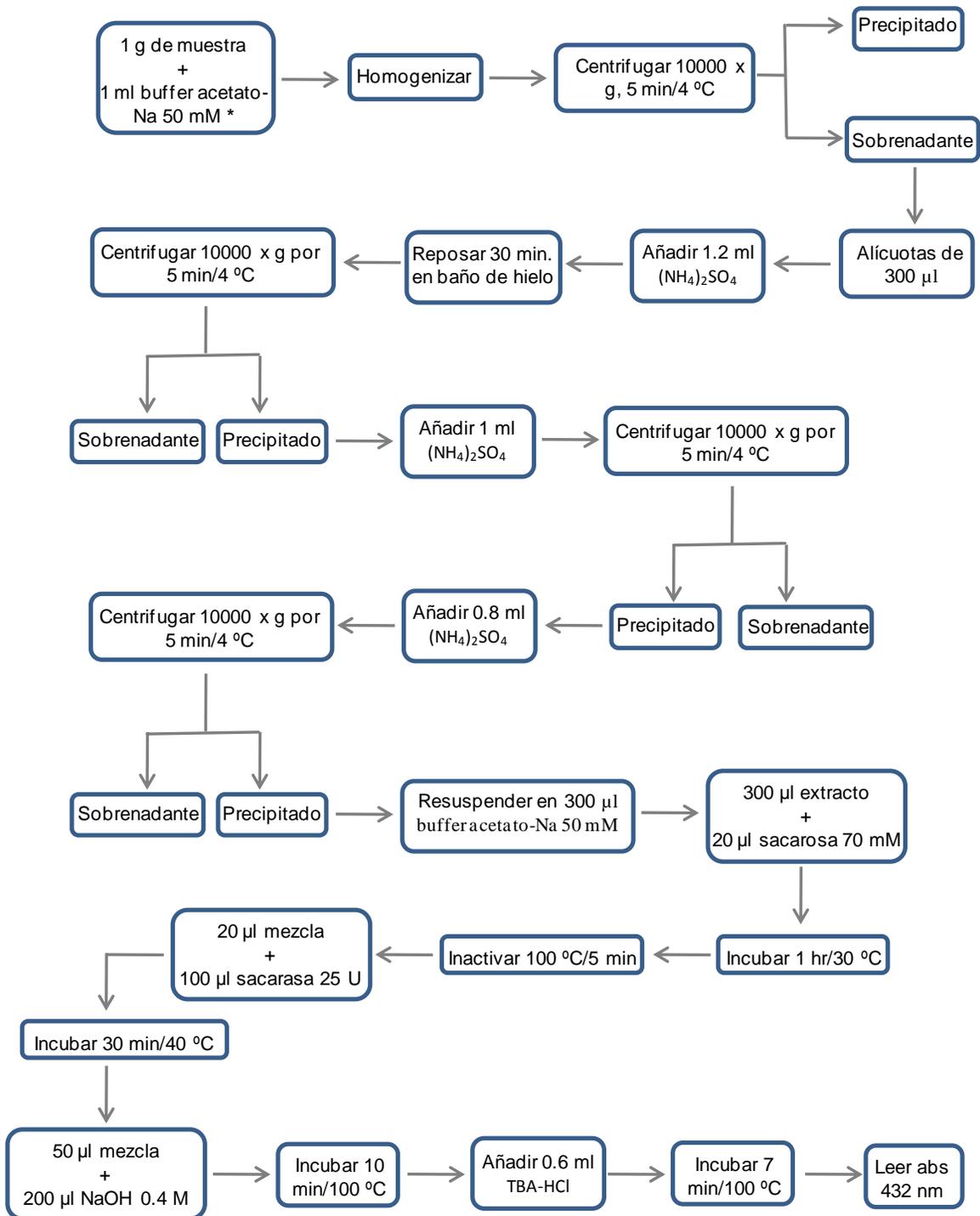


Figura 5.6. Diagrama general de la determinación de actividad de la 1-SST.

5.7.2.1. Extracción

Un gramo de la muestra congelada a analizar fue homogenizado en mortero y pistilo usando una cantidad igual de buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5) compuesto por citrato-malato, polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 1%, β -mercaptoetanol 10 mM, bisulfito de sodio (NaHSO₃) 10 mM, fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF) 0.1 mM y 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pepstatina. Estos últimos se añadieron por su acción como inhibidores de proteasas mientras que la adición de PVPP se hizo para eliminar fenoles que pudieran estar presentes en las muestras.

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

El homogenado anterior fue centrifugado en una microcentrifuga Beckman Coulter Microfuge® 18 (California, USA) durante 5 minutos a 10,000 x g a 4 °C. Alícuotas (300 μl) de el sobrenadante fueron mezcladas con 1.2 ml de sulfato de amonio al 80%, la mezcla se incubó media hora sobre baño de hielo. Después de la incubación se colectaron los precipitados por centrifugación a 10,000 x g a 4 °C por 5 minutos. Subsecuentemente, los precipitados fueron lavados con sulfato de amonio al 80%. Después de una tercera centrifugación a 10,000 x g a 4 °C por 5 minutos, los dos precipitados fueron resuspendidos en 300 μl de buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5).

5.7.2.3. Medición de actividad enzimática

En tubos eppendorf con capacidad de 2500 μl , se colocaron alícuotas de 300 μl del extracto enzimático anterior mas 20 μl de sacarosa 70 mM, esta concentración de sacarosa se determinó con ayuda de una curva de actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato (Figura A.1). La mezcla se incubó por 1 hora a 30 °C, obteniéndose glucosa y fructosilsacarosa por la acción de 1-SST. Al finalizar el tiempo de incubación la reacción fue detenida por calentamiento a 100 °C por 5 minutos.

En una segunda incubación de 20 μl de la solución anterior y 100 μl de sacarasa 25 U a 40 °C por 30 minutos, la sacarosa sin reaccionar fue hidrolizada por la acción de la sacarasa específica. Los monosacáridos obtenidos fueron destruidos por calentamiento a 100 °C por 10 min, con 200 μl de hidróxido de sodio (NaOH) 0.4 M.

La cantidad de 1-kestosa formada se determinó utilizando un método colorimétrico adicionando 600 μl de ácido tiobarbitúrico en medio ácido (TBA-HCl) e incubando en baño de agua a 100 °C durante 7 minutos. 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 (Figura A.2).

Para estimar la actividad específica de la enzima se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford (1976). El método involucra la unión de un colorante, el Coomassie Brilliant Blue G-250 (Figura A.3) a las proteínas. La solución de colorante libre es de color rojizo (máxima absorción a 465 nm) y cambia al azul (máxima absorción a 595 nm). La unión es un proceso rápido (aproximadamente 2 minutos) y el complejo colorante-proteína se mantiene estable hasta una hora después de producido. Para el análisis cuantitativo fue utilizada una curva estándar de albumina bovina (Figura A.4). 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).

5.8. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño unifactorial con tres niveles, con mediciones repetidas en el tiempo de desarrollo de la planta, siendo el factor de estudio la temperatura de almacenamiento de los dientes “semilla” con tres niveles de experimentación y

utilizando tres repeticiones de los mismos. Durante el periodo de desarrollo fueron realizados siete muestreos distribuidos homogéneamente durante el ciclo de cultivo y en cada muestreo se tomaron cinco plantas al azar, cada planta se consideró como la unidad experimental (Cuadro 5.5).

Cuadro 5.5. Diseño del experimento.

Factor	Nivel	Número de repeticiones	Número de muestreo ¹	Plantas por muestreo
Temperatura de almacenamiento	TA	3	8	5
	5 °C	3	8	5
	10 °C	3	8	5

¹ Tiempo cero y 7 muestreos aproximadamente cada 30 días

Las variables de respuesta fueron las siguientes:

- Índice de bulbificación.
- Dimensiones de la planta.
- Calidad.
- Contenido de fructanos.
- Actividad enzimática.

Los datos obtenidos de cada muestreo se examinaron a través de un análisis de varianza en diferentes periodos de tiempo y la correspondiente comparación de medias utilizando la prueba de Tuckey con α 0.05, utilizando el paquete estadístico JMP 5.0.1.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Programa de muestreos

Las semillas se sembraron el 19 de Septiembre de 2007 en la finca “El Bordo” ubicada en el municipio de Cosío en el estado de Aguascalientes. En el cuadro 6.1 se muestran las fechas en que se realizaron los muestreos y los días después de siembra (DDS) que les corresponden.

Cuadro 6.1. Programa de muestreo y días después de siembra.

MUESTREO	FECHA	DDS
Siembra	19 – Sep - 2007	0
1	03 – Dic – 2008	75
2	15 – Ene – 2008	118
3	21 – Feb – 2008	155
4	12 – Mar – 2008	175
5	09 – Abr – 2008	203
6	05 – May – 2008	229
Cosecha	04 – Jun – 2008	259

6.2 Análisis climático de la zona de producción

Como se indicó en la metodología, el registro meteorológico se realizó a través de los datos obtenidos de la estación climatológica de Los Pinos utilizando la página web <http://clima.inifap.gob.mx/redclima/est.asp?numest=13473> del Laboratorio de Modelaje y Sensores Remotos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

La figura 6.1 muestra los cambios de las temperaturas máxima, mínima y media registrada durante el periodo de cultivo correspondiente al 19 de Septiembre de 2007 al 4 de Junio de 2008.

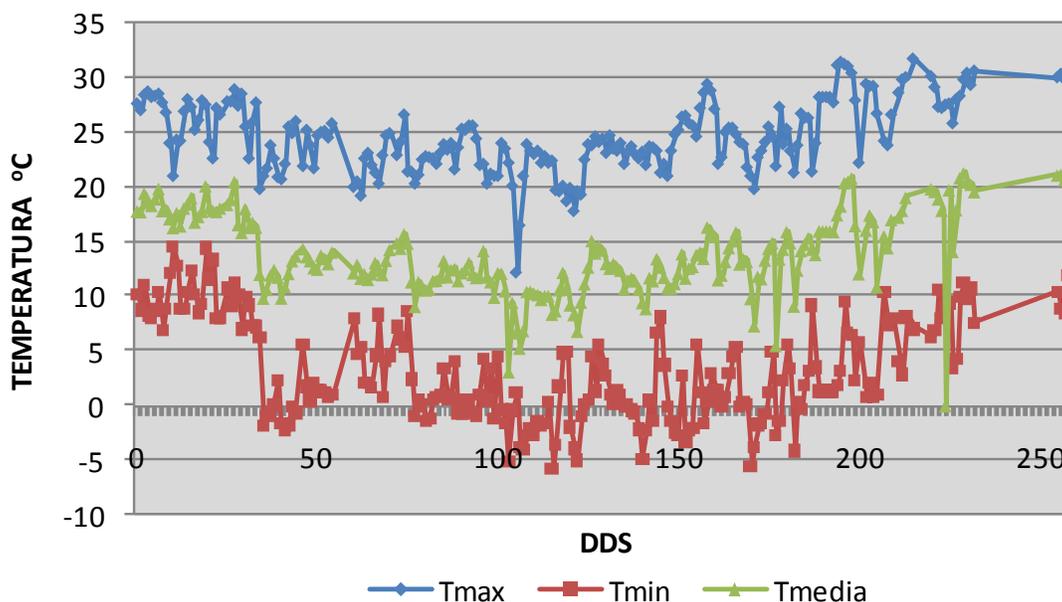


Figura 6.1. Temperatura máxima, mínima y media registradas en la estación Los Pinos durante el desarrollo del cultivo de ajo.

Los registros de temperatura de esta estación durante los 259 días monitoreados mostraron temperaturas promedio de las máximas de 24.6 °C, de las mínimas de 3.2 °C y de las medias de 14 °C.

La consulta diaria de los datos climáticos en la página mencionada permitió registrar los cambios de temperatura ocurridos en esa región cada 15 minutos los cuales eran mostrados en forma gráfica en tiempo real con la que era posible estimar el número de horas que determinado rango de temperatura prevalecía en la zona. Con estas gráficas y tomando en consideración lo anotado por Izquierdo y Quiones (2001) en el sentido que temperaturas por debajo de 7 °C inducen un mejor desarrollo de los bulbos, se contabilizaron el número de horas frío acumuladas menores a 5 y 7 °C durante los 259 días monitoreados los cuales se muestran en el cuadro 6.2 para diferentes meses del año.

Cuadro 6.2. Horas frío menores a 5 y 7 °C acumuladas durante el desarrollo.

MES	AÑO	HORAS < 5 °C	HORAS < 7 °C
Noviembre	2007	54	95
Diciembre	2007	160	215
Enero	2008	145	198
Febrero	2008	156	195
Marzo	2008	92	144
Abril	2008	17	23
Mayo	2008	2	5
Junio	2008	0	0
TOTAL	2007-2008	626	875

En total se observaron 626 horas por debajo de 5 °C y 875 horas menores a 7 °C, siendo los meses de Diciembre, Enero y Febrero los que acumularon un mayor número de horas frío, el comportamiento de la acumulación de horas frío durante el desarrollo se muestra en la figura 6.2.

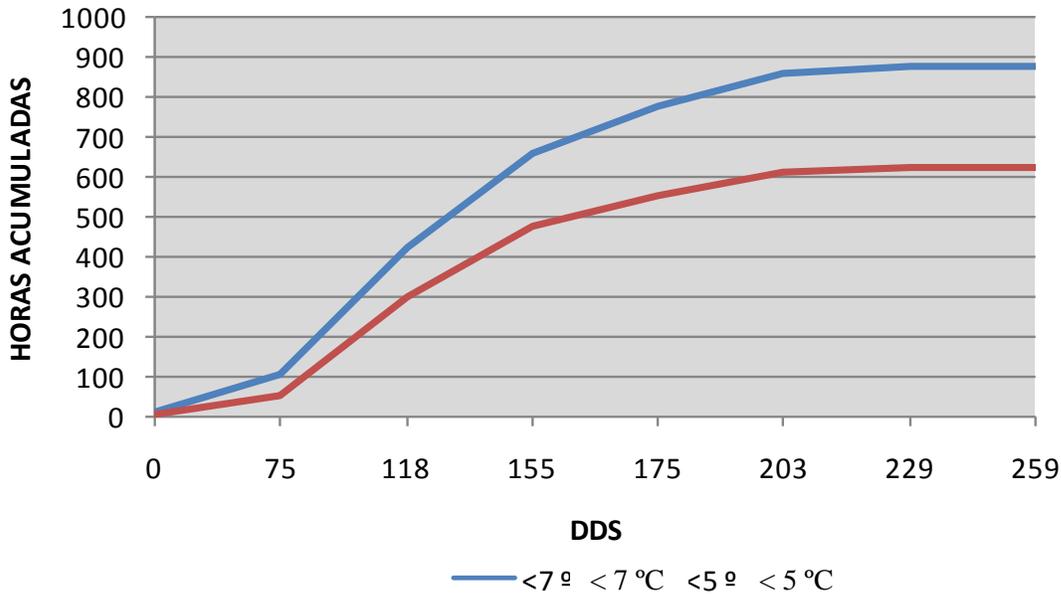


Figura 6.2. Registro de horas frío acumuladas durante el desarrollo del cultivo.

De acuerdo con algunos autores, la planta de ajo necesita acumular una cierta cantidad de horas frío para diferenciar las yemas axilares en dientes y formar el bulbo. En general se considera que temperaturas por debajo de los 7 °C son óptimas para generar plantas capaces de desarrollar bulbos de mayor calidad (Messiaen, C., 1975; García-Alonso, 1998; Pérez-Moreno y col, 2003).

Durante el desarrollo del cultivo se realizó el monitoreo de la radiación lumínica máxima (Figura 6.3) de la localidad de estudio, el comportamiento de la intensidad lumínica sigue un comportamiento similar al fotoperiodo: en los meses de menor fotoperiodo (diciembre y enero) se registraron las menores intensidades lumínicas (alrededor de 400 W/m²), mientras que en la época de siembra y cosecha se registraron las máximas intensidades (alrededor de 700 W/m²) el promedio de radiación en el ciclo fue de 546 W/m².

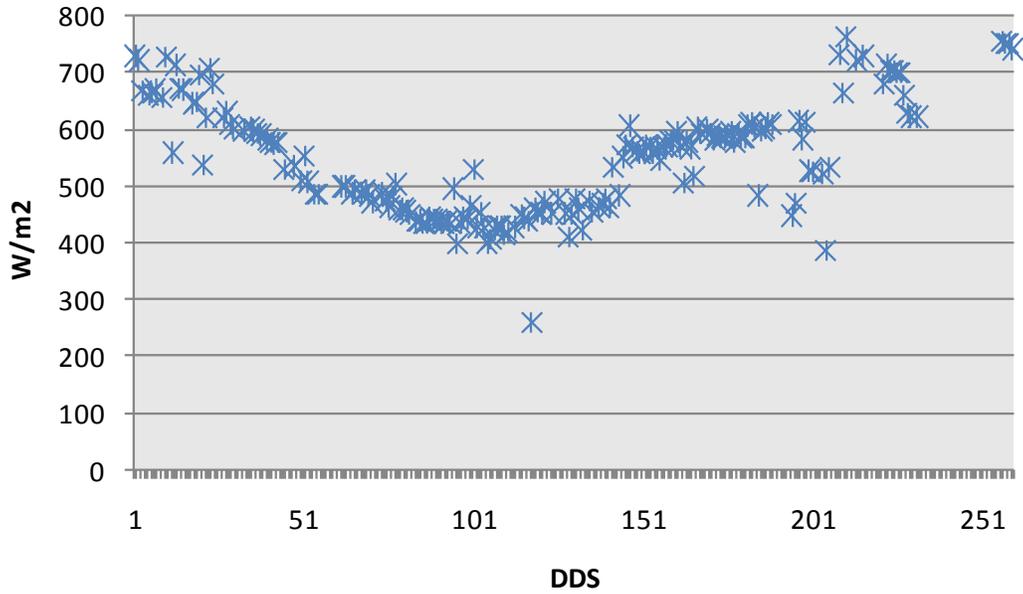


Figura 6.3. Registro de la radiación lumínica máxima diaria (W/m^2) durante el desarrollo del cultivo.

6.3 Efecto de la temperatura de almacenamiento de la “semilla” en el desarrollo de la planta

En el cuadro 6.3 se observan los valores P del análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) aplicados para determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento de las semillas (5 y 10 °C) sobre las variables de respuesta analizadas que fueron altura de la planta, peso de la planta, diámetro del cuello, diámetro del bulbo e índice de bulbificación (IB).

Cuadro 6.3. Valores probabilidad del efecto del factor temperatura de almacenamiento, muestreo y su interacción en las diferentes variables respuesta.

FACTORES	VARIABLE				
	Altura	Peso	∅ cuello	∅ bulbo	IB
Muestreo	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***
Tratamiento	0.1657 NS	0.0007***	<0.0001***	0.0081**	0.3598 NS
Muestreo*Tratamiento	0.0006***	0.1819 NS	0.1285 NS	0.1177 NS	0.9961 NS

***= altamente significativo, **= significativo, *= poco significativo, NS= no significativo, IB= Índice de bulbificación

A nivel general se observó que los tratamientos de almacenamiento a diferentes temperaturas no tuvieron efecto significativo en la altura de la planta ni en el índice de bulbificación (IB), pero si lo tuvieron en el diámetro del bulbo, donde los bulbos almacenados a TA (22 °C) mostraron un mayor diámetro (35.9 mm) en comparación con los almacenados a 5 y 10 °C que fueron iguales entre sí (33.2 y 33.7 mm). De igual forma el diámetro del cuello fue mayor para TA (15.9 mm) en comparación a los tratamientos a 5 y 10 °C (14.1 mm); el peso también mostró ser mayor a TA (97 g) en comparación de los otros dos tratamientos (81.1 y 82.2 g). Como era de esperar, el muestreo indicó diferencias significativas en todas las variables respuesta dado que las variables debían de cambiar conforme transcurrió el ciclo de cultivo. La interacción tratamiento muestreo nos indicó que solamente en la altura de la planta hubo un efecto significativo entre los tratamientos lo cual señala que fue más importante el efecto del muestreo que los tratamientos aplicados. El cuadro 6.4 muestra la comparación de medias para cada uno de los tratamientos en los diferentes muestreos donde se aprecia lo expresado anteriormente en el sentido que el muestreo fue el de mayor significancia y no los tratamientos de almacenamiento.

Cuadro 6.4. Comparación de medias de la interacción tratamiento*muestreo para cada una de las variables analizadas.

MUESTREO	TRATAMIENTO	ALTURA	PESO	Ø CUELLO	Ø BULBO	IB
1	TA	38.13 ef	24.12 hi	10.01 fgh	18.26 h	1.83 b
1	5 °C	34.13 f	18.44 i	8.4 g	16.53 h	1.98 b
1	10 °C	37.53 ef	23.15 hi	9.82 gh	18.51 h	1.91 b
2	TA	44.33 e	40.89 fghi	12.95 defg	24.31 efgh	1.90 b
2	5 °C	40 ef	30.57 ghi	11.23 efgh	22.35 gh	1.99 b
2	10 °C	43.07 e	32.88 ghi	11.08 efgh	22.6 fgh	2.03 b
3	TA	60.27 cd	78.46 def	17.92 ab	30.6 de	1.73 b
3	5 °C	55.39 d	68.47 defg	15.41 bcd	30.33 def	1.99 b
3	10 °C	53.17 d	62.39 efgh	14.29 bcde	28.05 defg	1.99 b
4	TA	72.73 b	139.48 ab	20.47 a	38.68 bc	1.88 b
4	5 °C	66.93 bc	105.02 bcd	17.51 ab	34.97 cd	2.06 b
4	10 °C	70.87 b	96.21 cde	16.76 abc	32,69 cd	1.99 b
5	TA	85.53 a	152,36 a	20.53 a	46.03 b	2.29 b
5	5 °C	87.4 a	120.93 abc	17.81 ab	39.17 bc	2.34 b
5	10 °C	89 a	142.22 ab	19.55 a	46.01 b	2.35 b
6	TA	84.26 a	147.05 a	13.41 cdef	57.59 a	4.4 a
6	5 °C	91.07 a	143.47 ab	13.65 cdef	56.11 a	4.32 a
6	10 °C	88.2 a	136.33 ab	13.2 cdefg	54.48 a	4.6 a

*Letras diferentes por columna muestran diferencias estadísticas significativas (Tuckey $\alpha= 0.05$), Ø cuello= diámetro del cuello, Ø bulbo = diámetro del bulbo, IB= índice de bulbificación, TA= 22 °C.

Los datos de altura, peso, diámetro del bulbo e índice de bulbificación, se muestran gráficamente en las figuras 6.4; 6.5; 6.6 y 6.7 respectivamente. Al final del ciclo de cultivo; las plantas que provenían de bulbos almacenados a TA tendieron a mostrar una menor altura (84 a 85 cm) respecto de aquellos cuyos bulbos estuvieron almacenados a bajas temperaturas (88 a 91 cm). Aunque, como ya se ha anotado no se observaron diferencias entre los tratamientos.

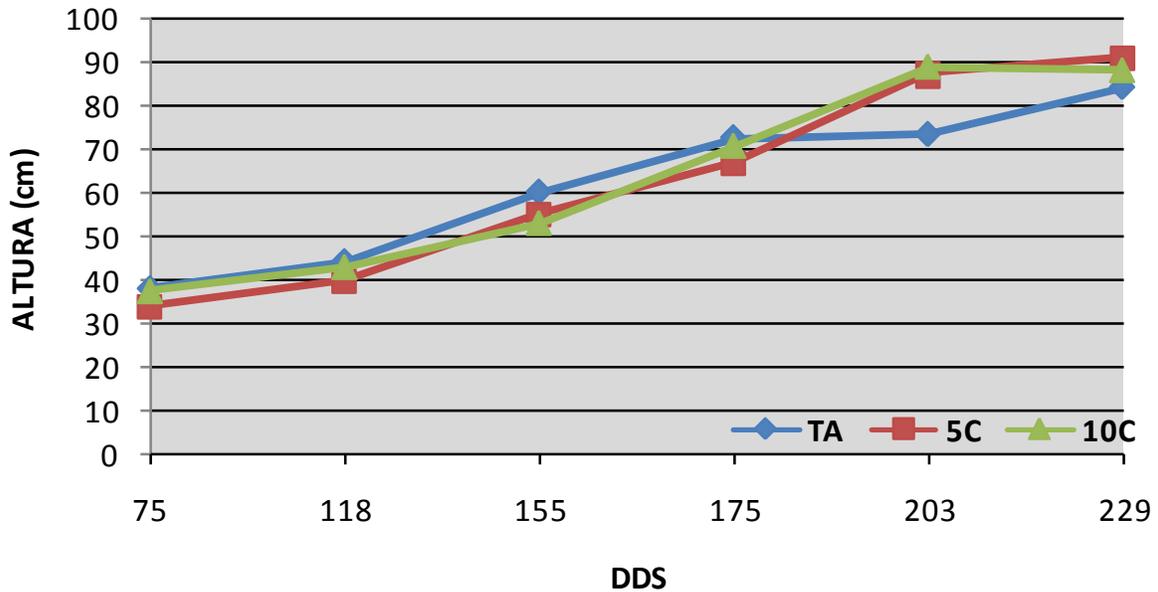


Figura 6.4. Cambios en la altura de la planta de ajo durante su desarrollo.

Para el caso del peso de la planta la figura 6.5 muestra que las plantas generadas de “semillas” cuyos bulbos fueron almacenados a temperatura ambiente mostraron una mayor tendencia a registrar mayores pesos (152 g) durante los primeros 203 días después de siembra (DDS); aunque al final del desarrollo todos los tratamientos mostraron un rango desde 137 a 147 g. En esta figura también se puede observar que el incremento de peso fue más acelerado a partir del día 118 después de siembra hasta los 203 días lo cual coincidió con la máxima acumulación de horas frío (Figura 6.2); el incremento de temperaturas ambientales y la intensidad luminosa así como el incremento en el fotoperiodo. La relación anterior es lógica dado que todo el crecimiento de la planta está directamente relacionado con la fotosíntesis y acumulación de asimilados, funciones que están reguladas por la temperatura y la luz ambiental; aunque no es muy claro explicar el efecto de horas frío.

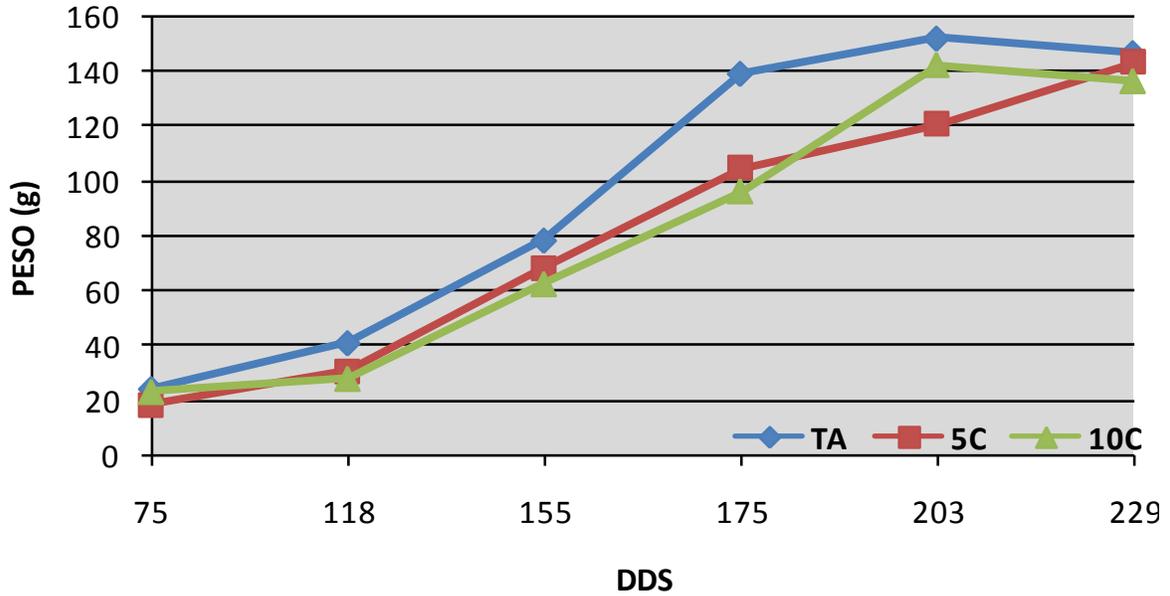


Figura 6.5. Cambios en el peso de la planta de ajo durante su desarrollo.

Mientras que el incremento del peso de la planta tuvo un incremento exponencial durante el ciclo de cultivo: el incremento del diámetro del bulbo mostro un crecimiento prácticamente lineal dentro de los 229 días de registro de datos alcanzándose un diámetro de 55 cm promedio para los tres tratamientos (Figura 6.6), también se observa que los valores fueron muy similares entre los tres tratamientos, lo demuestra lo señalado por el análisis estadístico

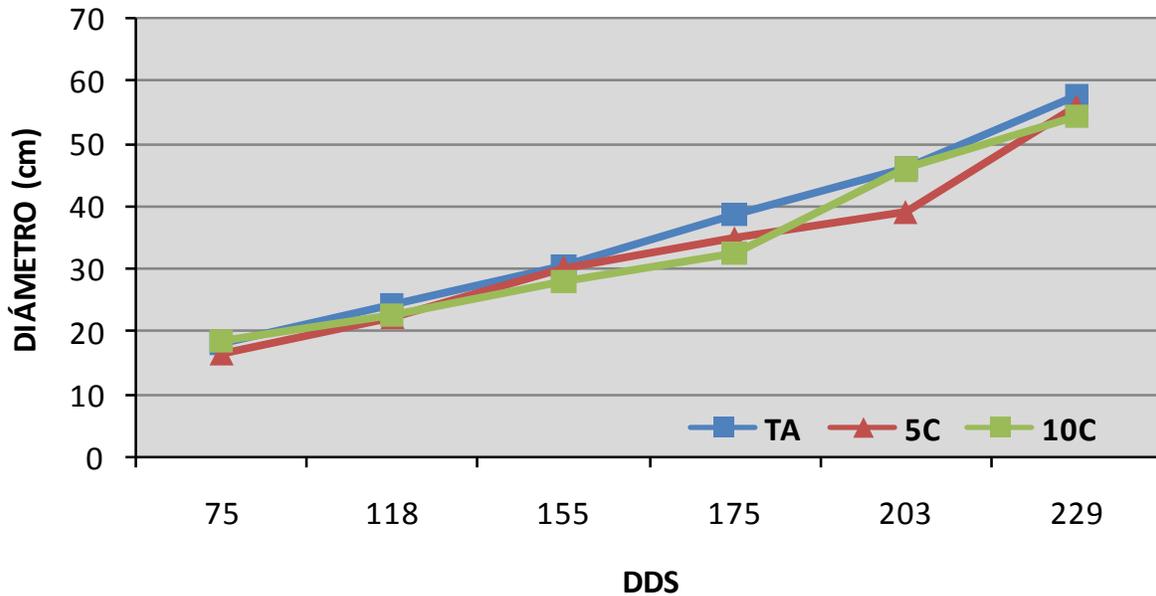


Figura 6.6. Cambios en el diámetro del bulbo de ajo durante el desarrollo.

El momento del inicio de la bulbificación se determina mediante el cálculo del Índice de bulbificación (IB), si éste índice es mayor de dos se considera iniciada la bulbificación. En la figura 6.7 se observa que el IB se incrementa de valores de 2 a 4.5 a partir del día 203, lo cual indica que la bulbificación del ajo ocurre al final del desarrollo.

Los tratamientos de almacenamiento en frío previo a la siembra no tuvieron un efecto significativo sobre el inicio de la bulbificación de los ajos, estos resultados difieren de los reportados por del Pozo y González (2005) quienes encontraron que almacenar “semillas” a 4 y 7 °C por 30 días previo a la siembra estimula la bulbificación de ajos cv. Akukeli y Rosado-INIA. Es posible que el número de días que fueron almacenados los bulbos “semilla” no fueron suficientes para impactar en el desarrollo del bulbo.

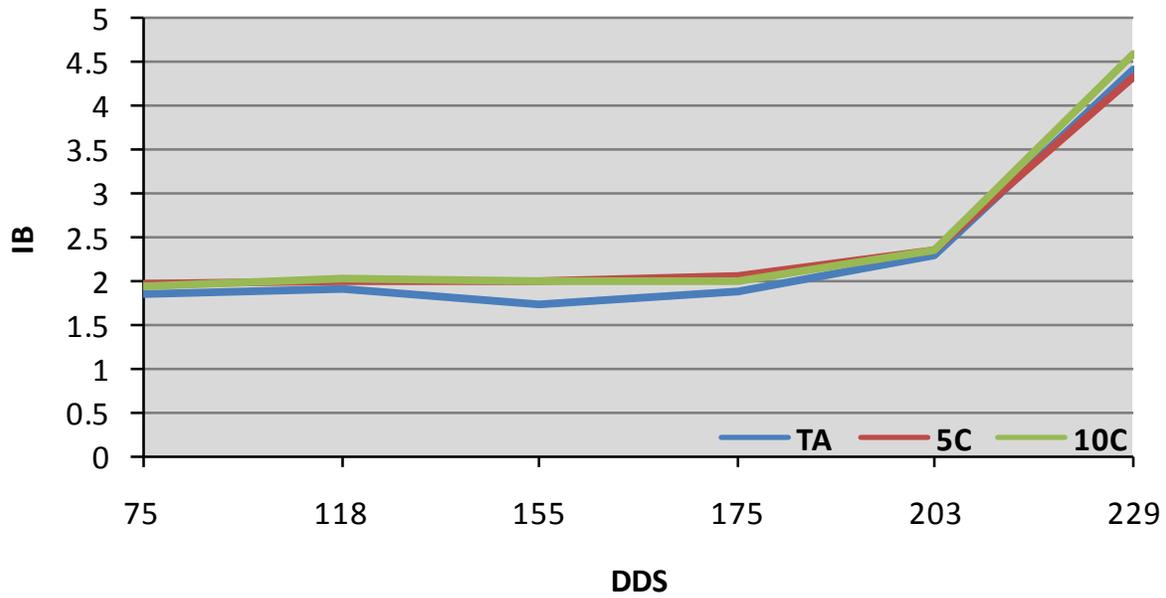


Figura 6.7. Comportamiento del índice de bulbificación durante el desarrollo.

6.3.1 Correlación de las variables de respuesta

Las variables respuesta utilizadas para hacer el seguimiento del proceso de desarrollo de los bulbos son variables que pueden estar asociadas entre sí. Es por ello que se realizó un análisis de correlación entre las distintas variables para observar un grado de asociación entre ellas. El cuadro 6.5 muestra la matriz de correlación obtenida del análisis estadístico general de los datos.

Cuadro 6.5. Análisis de correlación entre las diferentes variables respuesta estimadas durante el desarrollo de plantas y bulbos de ajo.

	ALTURA	Ø BULBO	Ø CUELLO	IB	PESO
ALTURA	1	0.856812	0.584455	0.464617	0.863992
Ø BULBO		1	0.530217	0.508126	0.893198
Ø CUELLO			1	-0.258574	0.752252
IB				1	0.253587
PESO					1

Las variables que mostraron mayores valores de coeficiente de correlación positiva fueron el peso de la planta con el diámetro del bulbo (0.8931) y con la altura de la planta (0.8639); así mismo, también hubo una correlación positiva de la altura de la planta con el diámetro del bulbo (0.8568). Llama la atención que el índice de bulbificación mostró bajos valores de correlación con el diámetro del cuello y del bulbo aunque por expresión matemática el IB está asociado a estas dos variables. La explicación a este hecho es que el IB permanece constante durante gran parte del ciclo de cultivo y solo cambia al final del mismo.

Los coeficientes de correlación se hacen mayores si el análisis se realiza por separado para cada una de las condiciones de almacenamiento de los dientes “semilla”. Estas correlaciones sugieren que las variables interrelacionadas podrían ser estimadas en función de su correspondiente variable correlacionada; es decir que el diámetro del bulbo y altura de la planta podrían ser estimados a partir de una relación lineal con el peso de la planta; o también que el peso de la planta y el diámetro del bulbo podrían ser estimados a partir de la altura de la planta. Aunque estas relaciones podrían tener cierta utilidad; al realizar el análisis de correlación en función de las fechas de muestreo, se observó que cuando el bulbo crece notablemente al final del ciclo de cultivo estas correlaciones dejan de tener una significancia, puesto que el bulbo crece de forma independiente al crecimiento de la planta.

Ledesma y col. (1997b) describieron el desarrollo de las plantas de ajo ‘Rosado Paraguayo’ en donde también señalan una estrecha relación entre el peso seco de la planta y el peso seco de los bulbos dentro de los primeros 160 días después de siembra y que posteriormente se pierde esta relación debido a que el peso seco de la parte aérea disminuye aunque el peso del bulbo continua aumentando; lo cual coincide con el de estos autores dado que el índice de bulbificación señalado por estos autores muestra cambios durante la primera etapa de desarrollo mientras que la variedad ‘Coreano’ no presentó cambios importantes hasta que el bulbo se empezó a diferenciar. Esto señala que pueden

existir diferencias relativas a la variedad además de las diferencias que pueden tener los ambientes donde se desarrolla el cultivo.

Por su parte Braz y col. (1997) al evaluar el efecto de distintos periodos de almacenamiento a 4 °C (0 hasta 40 días) en diferentes variedades de ajo cultivadas en Brasil indicaron que la respuesta fue dependiente de la variedad; para ajo 'Chino' no hubo efectos en el peso de la planta y el bulbo así como el rendimiento obtenido; mientras que para otra variedad ('Contestado') se detectaron diferencias hasta los 40 días de almacenamiento.

Estos resultados hacen notar nuevamente que el proceso fisiológico de formación del bulbo se separa en una etapa determinada del mecanismo que controla el crecimiento de la planta.

6.4. Rendimiento y calidad de los bulbos cosechados

La calidad de la cosecha se evaluó por la producción en toneladas por hectárea de las variables respuesta; rendimiento total, producción de bulbos acebollados, bulbos con defectos; y la producción de calibres 6 (C6), 7 (C7), 8 (C8), 9 (C9), 10 (C10), 11 (C11), 12 (C12), menores de 6 (<C6) y mayores de 12 (>C12). Dado que cada tratamiento fue sembrado por triplicado, se obtuvieron para cada tratamiento de almacenamiento tres datos de cada una de las variables respuesta. El análisis estadístico general indicó que no hubo un efecto significativo ($p=0.4191$) de los tratamientos en ninguna de las variables respuestas estimadas. En el cuadro 6.6 se indican las medias de cada una de las variables estimadas para cada uno de los tratamientos aplicados.

Cuadro 6.6. Valores medios de las variables de calidad de la cosecha de ajo producido a partir de dientes “semilla” almacenados a diferentes temperaturas.

VARIABLE	TA	10d 5°C	10d 10°C
Rendimiento	17.7a	18.0a	15.7a
Acebollados	0.10a	0.04a	0.18a
Defectos (total)	0.75a	0.53a	0.89a
C6	0.78a	1.40a	1.19a
C7	1.65a	1.96a	1.49a
C8	2.96a	4.41a	2.02a
C9	2.91a	4.10a	2.74a
C10	3.56a	3.33a	2.79a
C11	2.21a	1.98a	2.29a
C12	0.84a	0.30a	0.64a
<C6	0.71a	0.85a	1.04a
>C12	0.22a	0.08a	0.38a

C= calibres

Valores en toneladas por hectárea

Letras iguales en la misma fila indica no diferencia entre los tratamientos

En la figura 6.8 se muestra el rendimiento total obtenido para los tratamientos de temperatura aplicados. En términos generales hubo una tendencia a mostrar mayores rendimientos en los tratamientos a bajas temperaturas (18 y 17 t/ha) respecto de los almacenados a TA (15 t/ha). La figura 6.9 muestra los bulbos defectuosos para cada tratamiento, el tratamiento a 10 °C mostró una mayor tendencia a producir mayores defectos 1.06 t/ha, mientras que el tratamiento de 5 °C solamente fue de 0.561 t/ha.

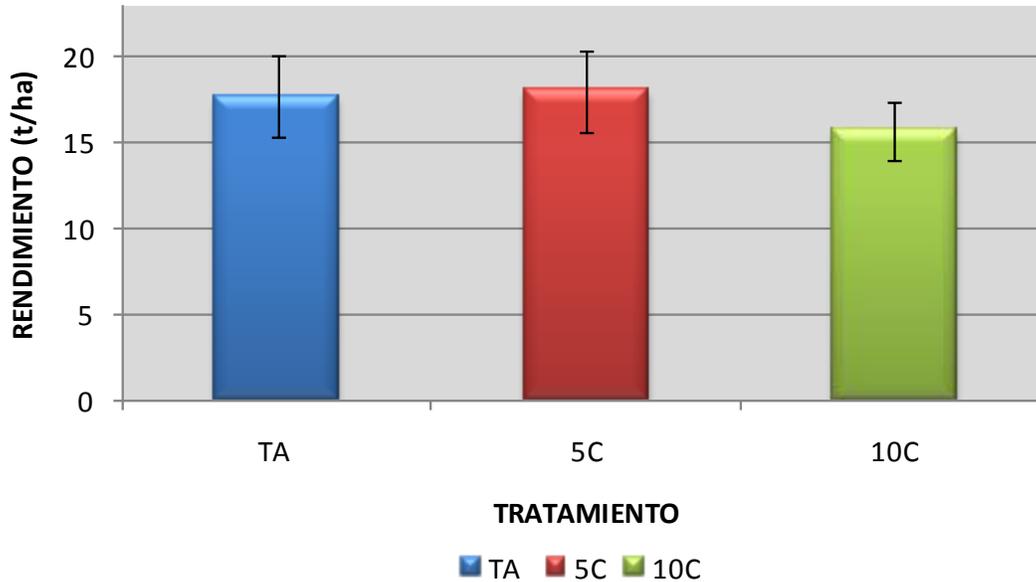


Figura 6.8. Rendimiento de los ajos cosechados en las tres condiciones de almacenamiento de los dientes “semilla”.

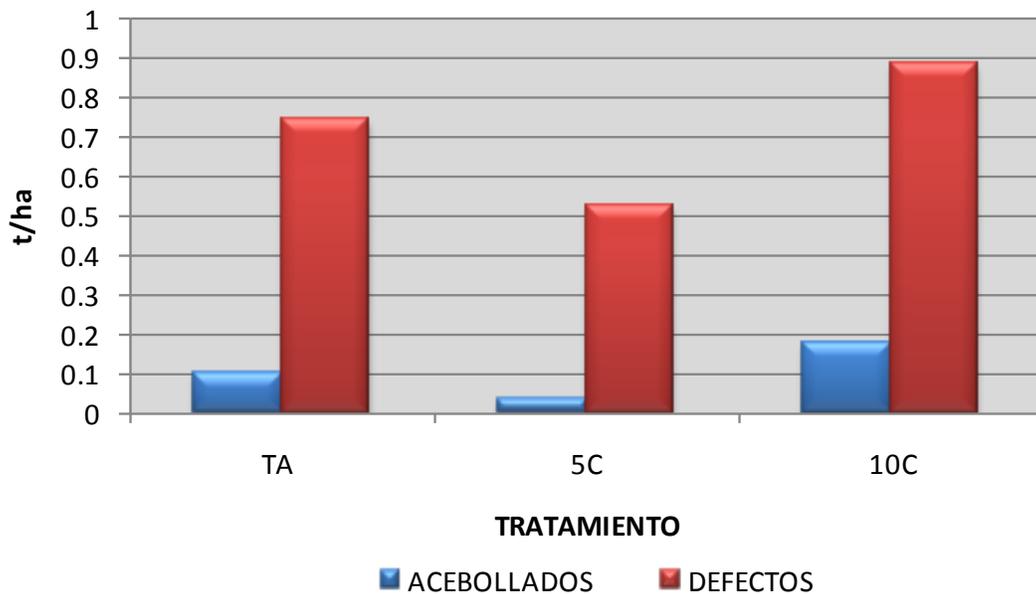


Figura 6.9. Bulbos defectuosos obtenidos en los tres tratamientos analizados.

El valor comercial de los bulbos de ajo se establece en función del tamaño del bulbo, siendo los más pequeños los de menor valor comercial (calibre 6 con diámetro= 4.5 cm) y los de mayor valor los de calibre 12 (diámetro= 8 cm). El tratamiento de almacenamiento de las “semillas” a 5 °C presentó un rendimiento de 11.8 t/ha de ajos calibre 8, 9 y 10 (Figura 6.10), para el tratamiento a 10 °C fue

de 7.8 t/ha para ajos de calibre 9, 10 y 11, mientras que para el tratamiento a temperatura ambiente (control) se tuvo un rendimiento de 9.4 t/ha principalmente en los calibres 8, 9 y 10.

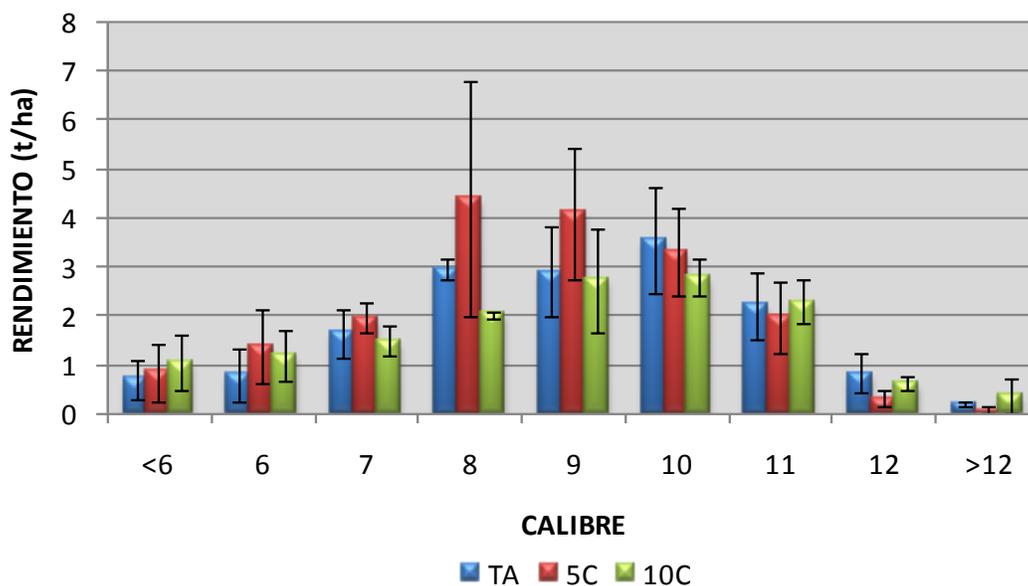


Figura 6.10. Producción (t/ha) de ajos de distintos calibres para los tratamientos de temperatura analizados.

En la figura 6.11 se muestra el porcentaje de bulbos de ajo para cada calibre comercial de cada tratamiento de temperatura. El tratamiento a 10 °C mostró 20% de bulbos de calibre menor a 6 y los tratamientos a 5 °C y TA presentaron 19% de bulbos calibre 8 y 9. Comercialmente es mejor almacenar a 5 °C o mantener las ‘semillas’ a temperatura ambiente previo a la siembra debido a que se obtienen más bulbos de mayor valor comercial.

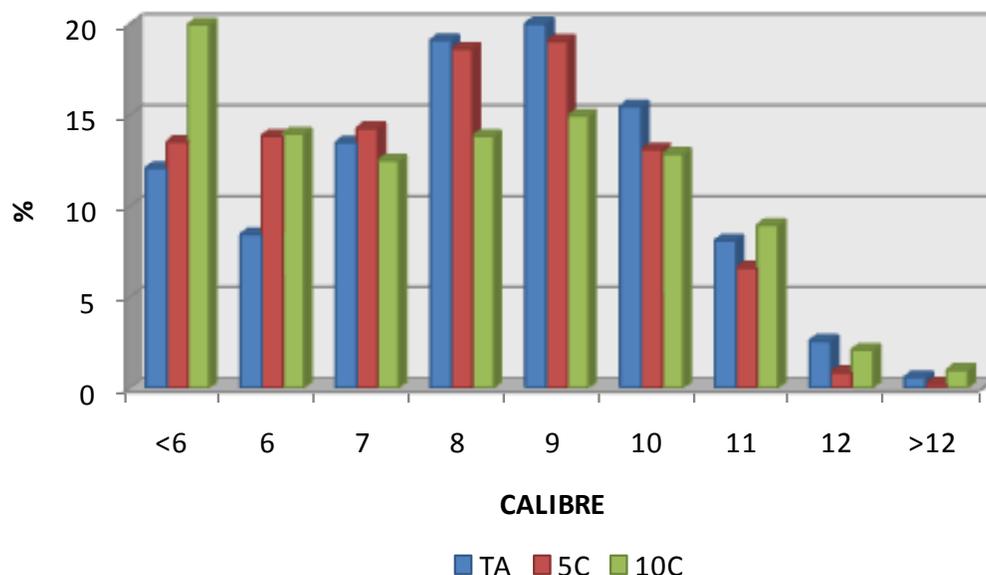


Figura 6.11. Distribución porcentual de la cosecha de los diferentes calibres de bulbos de ajo obtenidos de ajos cuya “semilla” fue almacenada a diferentes temperaturas.

Los datos de la literatura respecto al efecto del pre almacenamiento de los bulbos “semilla” a bajas temperaturas, indican de forma general que la emergencia de las plantas se apresura y que el ciclo de cultivo se acorta, pero que dependiendo de la temperatura empleada también pueden presentarse una mayor producción de bulbos con defectos (Brewster, 1994; Braz y col, 1997; Ledesma y col, 1997a y b); aunque el análisis estadístico no permite hacer estas aseveraciones, la tendencia general de los datos parecen confirmar las mismas observaciones hechas por dichos autores.

6.5. Acumulación de fructanos en bulbos y pseudo tallos de ajo

El análisis estadístico general de los datos de contenido de fructanos tanto en bulbos como en pseudo tallos indicó que tanto los tratamientos de almacenamiento a bajas temperaturas de los dientes “semilla” no tuvo efectos significativos en la acumulación de estos carbohidratos (Cuadro 6.8). También se observó que el muestreo si tuvo un efecto significativo, mientras que la interacción muestreo*tratamiento no fueron significativos. Esto indicó que aunque no hubo

efectos de los tratamientos, si se presentaron cambios de estos carbohidratos durante el desarrollo independientes de los tratamientos aplicados.

Cuadro 6.7. Valores de probabilidad del análisis estadístico del contenido de fructanos en bulbos y pseudo tallos durante el desarrollo de plantas de ajo generadas de bulbos “semilla” almacenadas a diferentes condiciones de temperatura de almacenamiento.

FACTOR	FRUCTANOS BULBO	FRUCTANOS PSEUDO TALLO
Tratamiento	0.9116	0.2578
Muestreo	<0.0001	<0.0001
Tratamiento*Muestreo	0.4878	0.7126

El contenido de fructanos en los bulbos antes de la siembra fue de 52 g/100g y fue estadísticamente igual al alcanzado por los bulbos al final del ciclo de cultivo y en los bulbos ya cosechados (50 – 52 g/100g). A los 75 DDS se registró el valor mínimo (35.1 g/100g) de estos fructanos; después de esa fecha y dentro del periodo de los 118 a 203 DDS hubo un incremento del contenido de estos carbohidratos que varió entre 40 y 44 g/100g. Ledesma y col. (1997a y b) al analizar el desarrollo de los bulbos y parte aérea de las plantas de ajo ‘Rosado Paraguayo’, también describen un descenso del contenido de fructanos en los bulbos en los primeros 40 DDS que atribuyen al gasto de carbohidratos necesarios para el desarrollo de las raíces y de las primeras hojas de la planta; estos mismos autores muestran incrementos discretos de los carbohidratos en este órgano desde los 40 hasta 140 DDS y un posterior incremento mayor de los mismos hasta el final del ciclo de cultivo (190 DDS). Lo anterior sugiere un patrón similar de acumulación de carbohidratos en la variedad ‘Coreano’ estudiada en el presente trabajo.

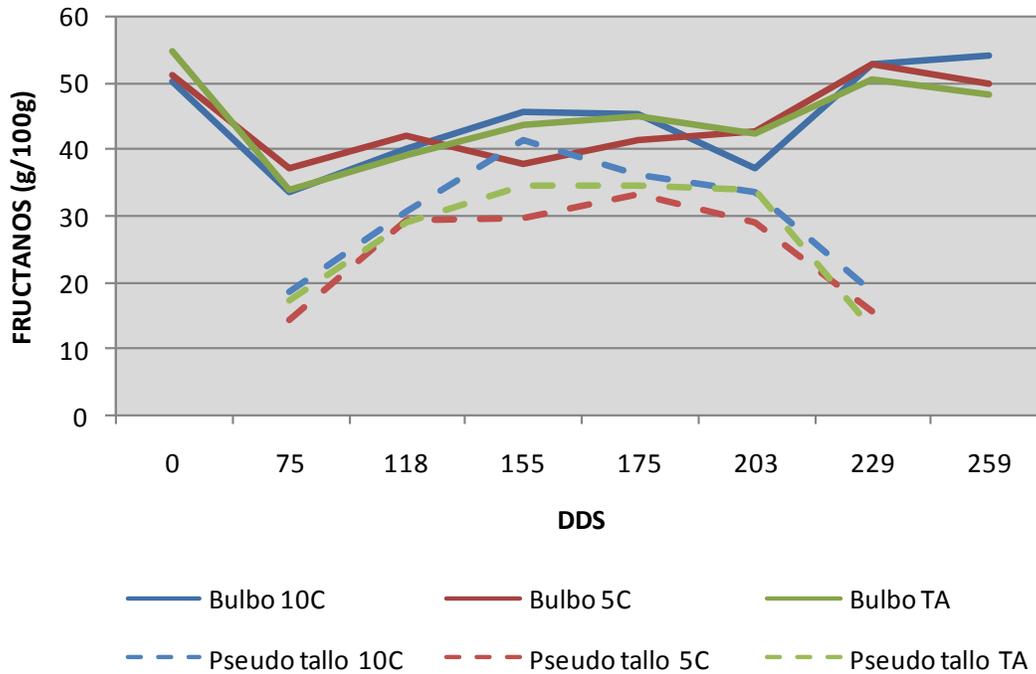


Figura 6.12. Contenido de fructanos en bulbos y pseudo tallos durante el desarrollo de plantas de ajo cuyos bulbos “semilla” fueron almacenados a diferentes temperaturas.

La acumulación de fructanos en los pseudo tallos (Figura 6.12) registró valores mínimos al inicio y final del desarrollo de la planta (16 a 18 g/100g); el incremento inicial (entre los 75 y 118 DDS) coincide con el incremento mostrado por los bulbos, mientras que dentro de los 118 a 203 DDS estos contenidos fueron mayores y se encontraron dentro de un intervalo de 30 a 35 g/100g. La observación de esta misma figura, muestra que en ambas regiones de la planta hubo acumulación simultanea de fructanos durante los primeros 203 DDS seguido de un incremento rápido de la acumulación en el bulbo mientras que lo contrario ocurrió en los pseudo tallos. Los menores contenidos de fructanos en pseudo tallos respecto de los bulbos parecen sugerir un gradiente del contenido de estos carbohidratos en las diferentes regiones de las hojas; es decir que probablemente en el limbo de las hojas se encuentren los menores contenidos y que estos aumentan a medida que se aproxima al bulbo. El notable decremento de fructanos en los pseudo tallos parece sugerir que los fructanos acumulados en esta región de las hojas son transportados o relocalizados hacia el bulbo al final de la etapa de crecimiento. Otro aspecto que es importante señalar, es que la capacidad para

acumular fructanos fue menor en los pseudo tallos y mayor en los bulbos lo cual parece indicar una mayor capacidad de transporte de carbohidratos de los pseudo tallos.

Una vez identificada una relación de acumulación de fructanos entre los pseudo tallos y los bulbos, es importante correlacionar estos dos procesos con la diferenciación del bulbo o el índice de bulbificación. La figura 6.13 muestra que a partir del día 203 se presentan tres fenómenos de manera simultánea, el inicio de la bulbificación de los ajos, el incremento en el contenido de fructanos en los bulbos y la disminución de fructanos en los pseudo tallos de los ajos. Este comportamiento indicaría que los fructanos acumulados en pseudo tallos son transportados hacia los bulbos hacia el final del desarrollo dando como resultado el notable incremento en el IB. Este comportamiento coincide con lo reportado por Utrilla-Vázquez (2008), quien encontró una coincidencia entre el inicio de la bulbificación y un aumento en la acumulación de fructanos en bulbos de ajo cv “Retinto” cultivada en la misma zona de cultivo donde se desarrolló este experimento.

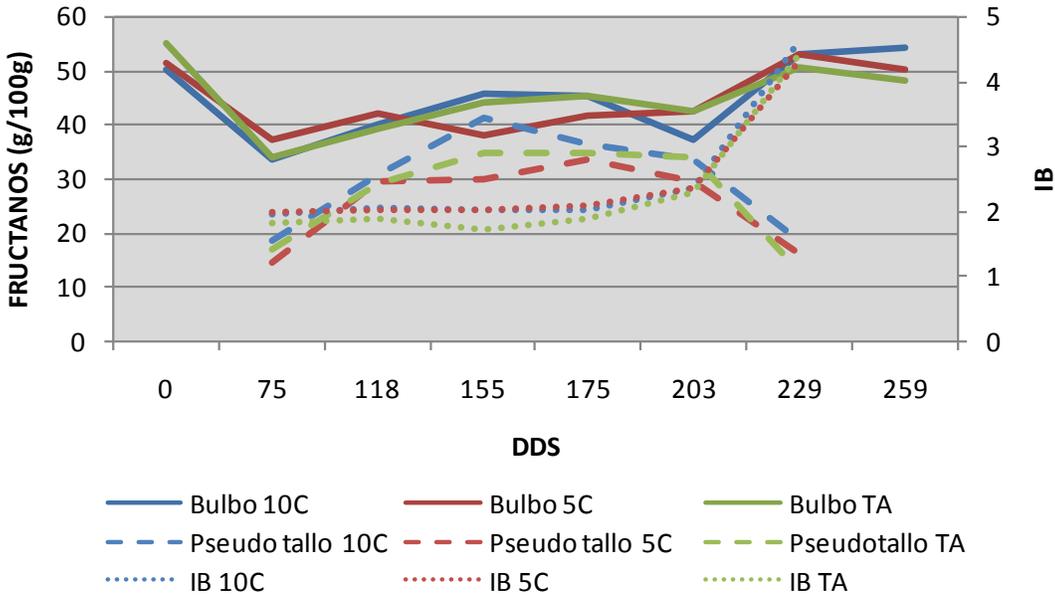


Figura 6.13. Comportamiento del índice de bulbificación y de la acumulación de fructanos en bulbos y pseudo tallos de plantas de ajo ‘Coreano’.

6.6. Actividad enzimática de la sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (1-SST) durante el desarrollo

El análisis estadístico de los datos de actividad total y específica de la enzima 1-SST en bulbos indicó que el tratamiento de almacenamiento de los bulbos “semilla” a diferentes temperaturas y la interacción muestreo*tratamiento no tuvieron efectos significativos mientras que si hubo un efecto significativo del periodo de muestreo (Cuadro 6.8), mientras que en la actividad específica, ninguno de los factores considerados tuvo un efecto significativo.

Cuadro 6.8. Valores de probabilidad del análisis estadístico de los datos de actividad total y específica de 1-SST en bulbos de ajo procedentes de bulbos “semilla” almacenados a diferentes temperaturas.

FACTOR	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECÍFICA
TRATAMIENTO	0.7636 NS	0.9963 NS
MUESTREO	<0.0001 **	0,1030 NS
TRATAMIENTO*MUESTREO	0.4464 NS	0.7696 NS

NS= no significativo

**= altamente significativo

En el cuadro 6.9 se resumen los valores medios de la actividad total de la enzima, en el se observa que la actividad total de la enzima es baja cuando el bulbo se encuentra almacenado (tiempo cero) y que una vez que los dientes “semilla” son sembrados y la planta se encuentra en desarrollo la actividad es mayor y estadísticamente se mantiene al mismo nivel durante todo el ciclo. El hecho que no se detectaran diferencias en la actividad específica parece mostrar que esta enzima se encuentra permanentemente presente en el tejido y que por tanto no es una enzima reguladora en el proceso de síntesis de fructanos al nivel de este órgano.

Cuadro 6.9. Comparación de medias de la interacción tratamiento*muestreo para la actividad total de 1-SST en bulbos de ajos.

DDS	TRATAMIENTO	ACTIVIDAD TOTAL
0	TA	118.93f
0	5 °C	111.47f
0	10 °C	171.11ef
75	TA	424.55abcde
75	5 °C	331.99bcdef
75	10 °C	266.22cdef
118	TA	398.25abcde
118	5 °C	316.45cdef
118	10 °C	280.77def
155	TA	463.18abcd
155	5 °C	577.43a
155	10 °C	376.43bcde
229	TA	342.2bcdef
229	5 °C	486.48abc
229	10 °C	563.59ab
259	TA	384.48abcde
259	5 °C	438.46abcd
259	10 °C	398.43bcd

Valores en $\mu\text{g1-kestosa formada/hora}$

Letras iguales en la misma fila indica no diferencia entre los tratamientos

La figura 6.14 muestra las tendencias de la actividad total y específica de esta enzima en los bulbos, se observa como se ha anotado anteriormente, que la actividad total en los bulbos antes de la siembra es la más baja y fue significativamente diferente a las actividades registradas en los siguientes muestreos; esta misma tendencia se observa en la actividad específica pero

debido a la dispersión de datos no se registraron diferencias significativas. A este respecto llama la atención la heterogeneidad de datos que se presentan en las muestras, pues hubo registros de actividades muy diferentes en bulbos de distintas muestras para el mismo periodo de muestreo.

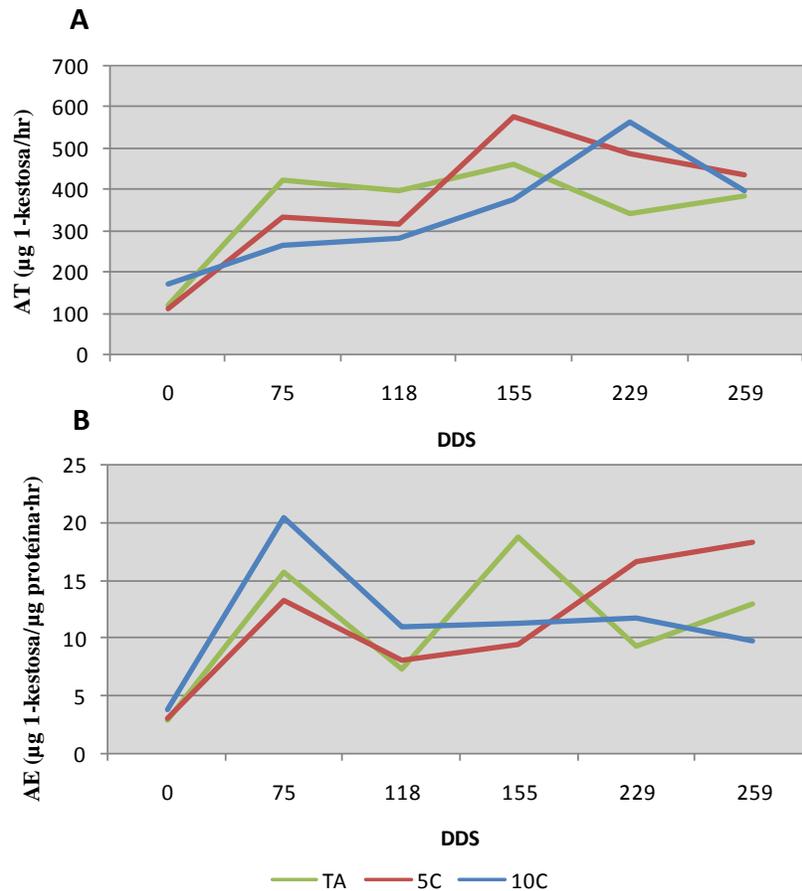


Figura 6.14. Actividad total (A) y específica (B) de la sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa en bulbos de ajo durante el desarrollo (AE= actividad específica, AT= actividad total).

Para el caso de los pseudo tallos, por falta de un número adecuado de muestras, no pudo realizarse el mismo análisis estadístico. No obstante, en la Figura 6.15 se muestran las actividades totales y específicas para los diferentes muestreos realizados; estas muestran que la actividad total tiende a disminuir dentro de los 75 y 203 DDS con un incremento en el muestreo 229 (al final del ciclo de cultivo). La actividad específica muestra una actividad casi constante

dentro de los 75 y 203 DDS y finalmente muestra un incremento en aquellas muestras que provenían de bulbos que estuvieron almacenados a baja temperatura. Estos datos parecen indicar que la enzima 1-SST también se encuentra activa y presente en este órgano durante todo el ciclo de cultivo. Lo anterior parece confirmar que esta enzima no es reguladora de la acumulación de fructanos en pseudo tallos.

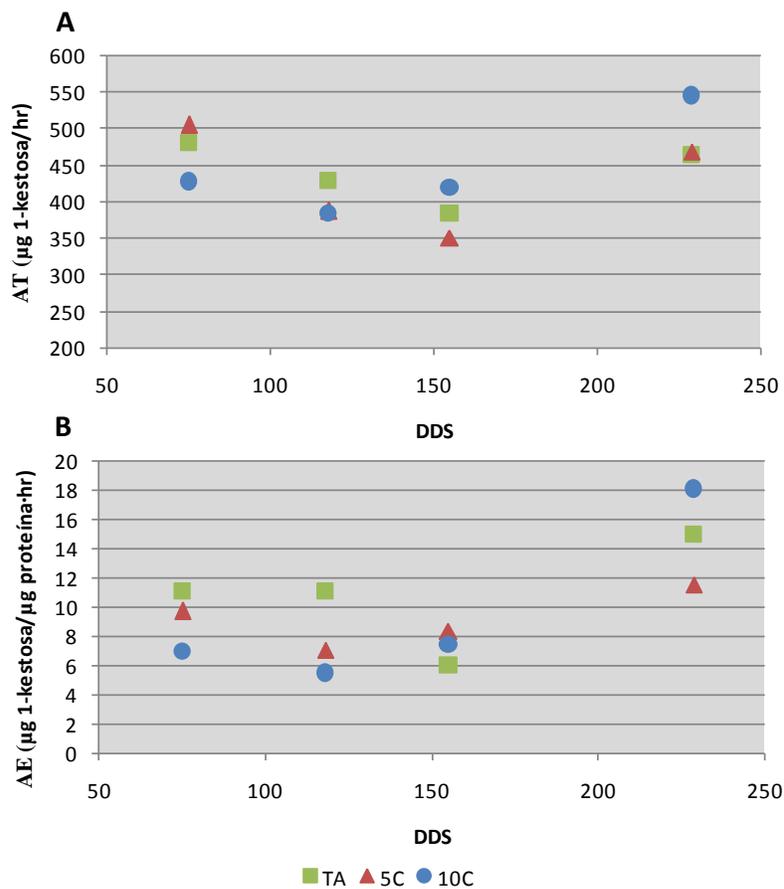


Figura 6.15. Actividad total (A) y específica (B) de la sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (1-SST) en pseudo tallos de ajo durante el desarrollo (AE= actividad específica, AT= actividad total).

En la figura 6.16 se muestra el comportamiento de la actividad total de la enzima 1-SST en bulbos de ajo y pseudo tallos asociadas a la acumulación de fructanos en ambos órganos durante los 259 días del desarrollo. Para el caso de los bulbos, aunque parece observarse una relación entre la actividad total de la

enzima y la acumulación de fructanos, la correlación entre ambos conjuntos de datos no muestra una clara relación, es decir, que una alta o baja actividad de la enzima no se relaciona con una mayor o menor acumulación de fructanos, lo cual confirma que la actividad de esta enzima no es reguladora de la acumulación de fructanos en los órganos estudiados y que esta actividad debe estar controlada por otros pasos en la vía metabólica. Para los pseudo tallos, tampoco se observó una estrecha correlación entre esos conjuntos de datos dado que cuando hubo una máxima acumulación de fructanos la actividad se encontraba en valores intermedios y cuando estos disminuyeron la actividad se incrementó.

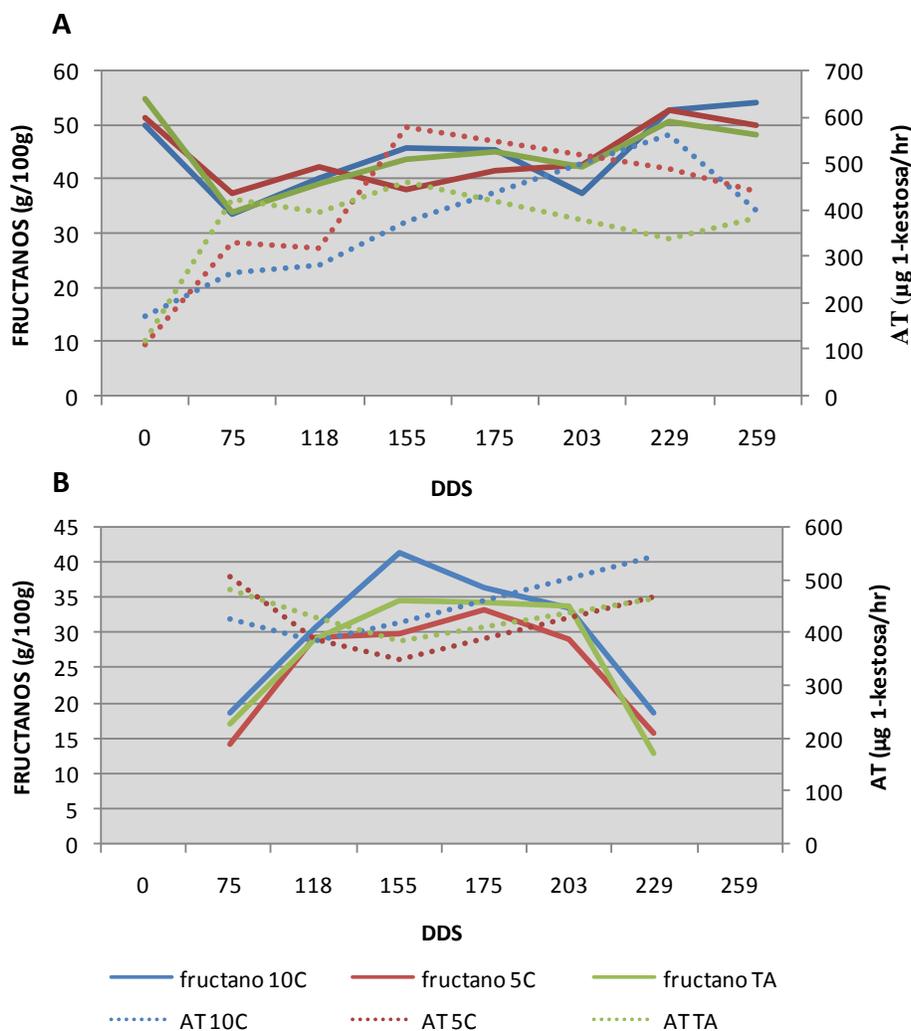


Figura 6.16. Actividad total de la sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (1-SST) y acumulación de fructanos en bulbos (A) y pseudo tallos (B) de plantas de ajo durante el desarrollo (AT= actividad total).

Esta movilización de los fructanos también se encuentra reportada por Dias-Tagliacozzo y col. (1999) quienes observaron en plantas de *Vernonia herbaceae*, un incremento en el contenido de fructanos debido a la translocación de los asimilados de la parte aérea senescente hacia los órganos de reserva. Existen trabajos previos (Asega y Carvahlo, 2004; Benkeblia y col, 2005) que estudian el comportamiento de la 1-FEH durante el almacenamiento poscosecha en productos como bulbos de cebolla y *Vernonia herbacea*, pero no hay reportes del comportamiento de esta enzima durante las etapas del desarrollo que pudieran explicar cómo se lleva a cabo la traslocación de estos carbohidratos.

6.7. Relación entre desarrollo de la planta y acumulación de fructanos con los factores ambientales

Los resultados señalados y discutidos en las secciones anteriores indicaron que exponer a los bulbos 'semilla' a bajas temperaturas no afectó el crecimiento de la planta ni el proceso de síntesis y acumulación de fructanos. En esta sección se trata de mostrar las relaciones que existen entre el proceso de desarrollo y la consecuente acumulación de fructanos con los factores ambientales con el objeto de poder entender un poco más de esta dinámica de acumulación de estos carbohidratos.

6.7.1 Relación de los factores ambientales con el desarrollo

La Figura 6.17 a, b y c muestra la relación entre la altura, peso de la planta e índice de bulbificación respectivamente con las temperaturas ambientales. Los incrementos de las temperaturas ambientales estuvieron directamente asociados a los incrementos en la altura y peso de la planta observándose que el crecimiento acelerado de la planta se inició cuando el rango de temperatura máxima era de 20 a 25 °C; de 10 a 15°C y de 0 a 5°C para la media y mínima respectivamente. Las máximas alturas y pesos de la planta se lograron cuando la temperatura máxima alcanzó los 30 °C, la media alrededor de 18 °C y la mínima cercana a los 10 °C. El índice de bulbificación no mostró esas relaciones tan estrechas aunque el proceso se presentó cuando los rangos de temperaturas máximas, medias y mínimas se encontraron entre 25 a 30; 15 a 20 y 5 a 10 °C respectivamente.

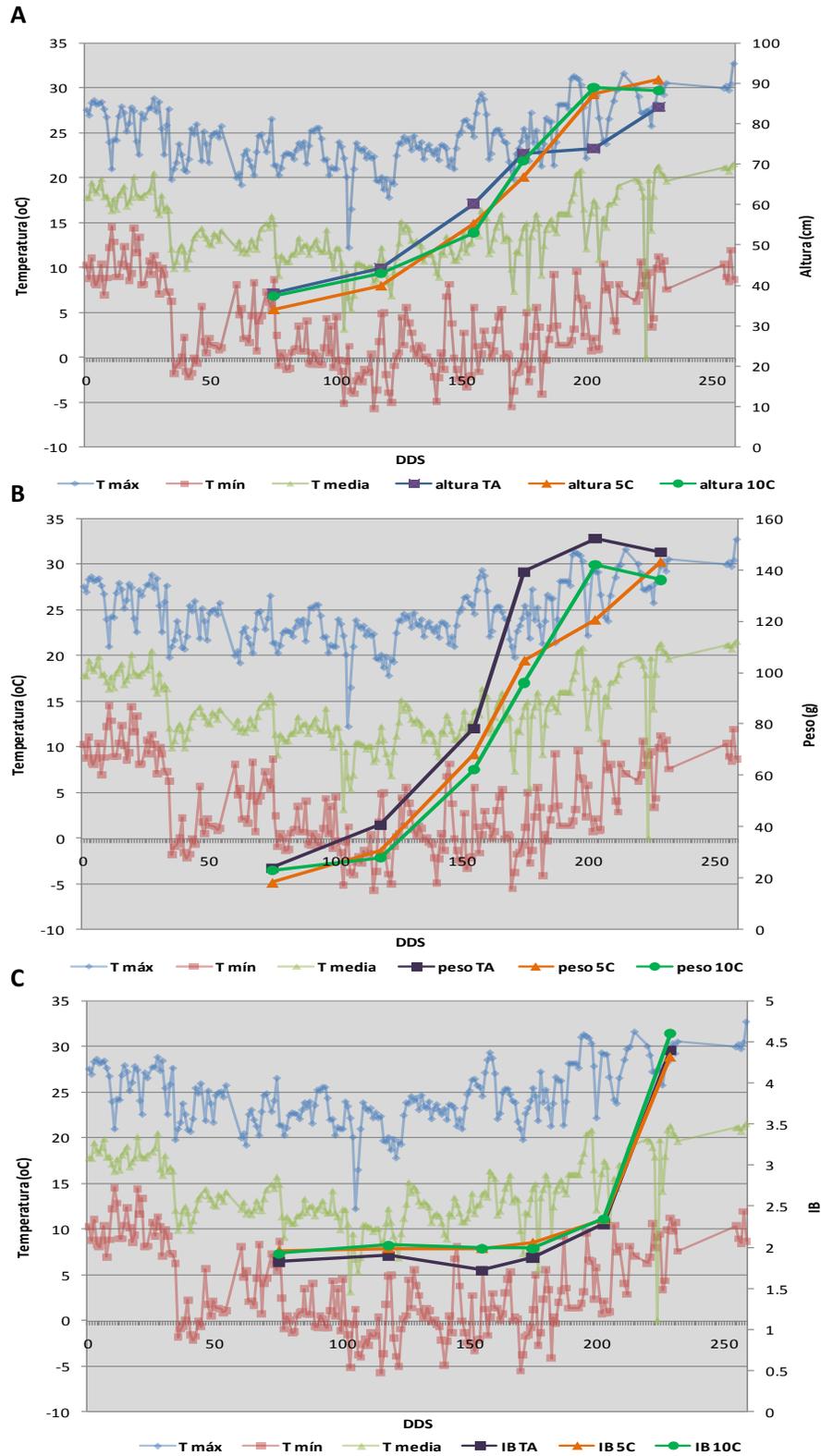


Figura 6.17. Relación de las temperaturas ambientales con la altura de la planta (A), peso (B) e índice de bulbificación (C) durante el desarrollo.

Dada la percepción general de que en este cultivo es necesaria una determinada acumulación de horas de frío; gráficamente se asociaron las variables de crecimiento de la planta, el bulbo y el índice de bulbificación con la acumulación de horas frío y se muestran en la figura 6.18. La altura y peso de la planta parecieron estar controladas por la acumulación de horas frío hasta que se alcanzó una acumulación de 500 horas de frío a 5 °C o 700 horas a 7 °C donde se observó un posterior crecimiento menos controlado por la acumulación de frío mostrando un crecimiento mayor cuando la acumulación de frío alcanzó 600 o 850 horas a 5 y 7 °C respectivamente. La diferenciación del bulbo ocurrió cuando se acumularon 600 u 850 horas de frío a 5 y 7 °C respectivamente.

La actividad fotosintética, la irradiación solar y el fotoperiodo se encuentran altamente relacionados con el crecimiento de las plantas. En las figuras 6.19 y 6.20 se puede observar que a valores de irradiación bajos y fotoperiodo corto hubo menor crecimiento de la planta en altura, peso y diámetro del bulbo, y conforme la irradiación y el fotoperiodo aumentaron también aumentó el crecimiento de la planta. Esto indica que el desarrollo de este cultivo se encuentra altamente relacionado con el régimen de temperaturas y con la intensidad de irradiación lumínica captada por la planta para desarrollar actividad fotosintética. No obstante, el índice de bulbificación no siguió ese patrón indicando que la manifestación de este evento fisiológico lo desencadenó otro evento probablemente menos relacionado con los factores ambientales.

El índice de bulbificación no mostró tener una relación directa con la intensidad lumínica aunque es lógico pensar que la síntesis de fructanos tiene relación con la fotosíntesis y con la intensidad de luz; por ello lo observado aquí parece indicar que la fotosíntesis no es una función reguladora de la diferenciación de los bulbos.

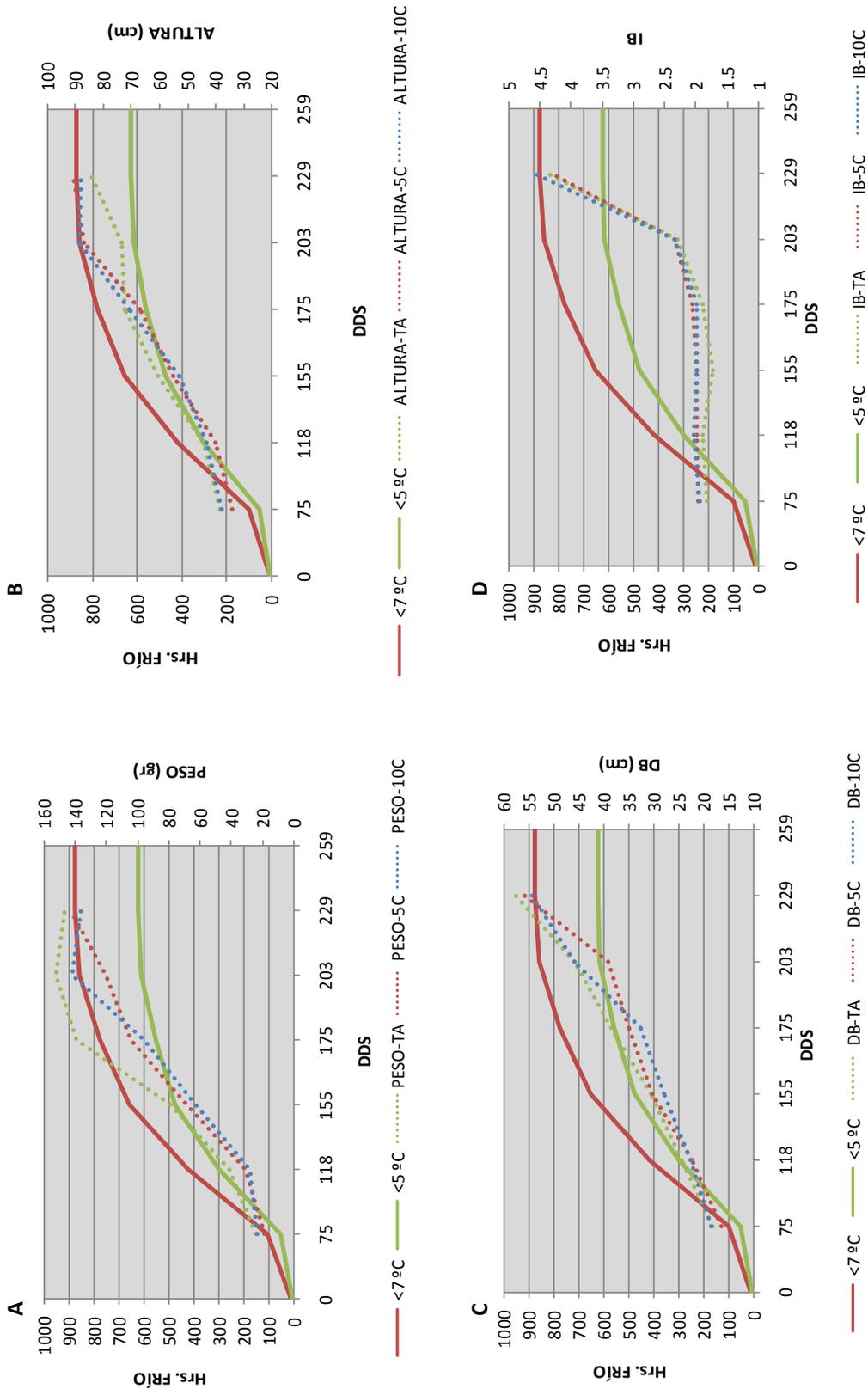


Figura 6.18. Relación entre la acumulación de horas de frío con altura de la planta (A), peso (B), diámetro del bulbo (C) e índice de bulbificación (D). DB= diámetro del bulbo, IB= índice de bulbificación

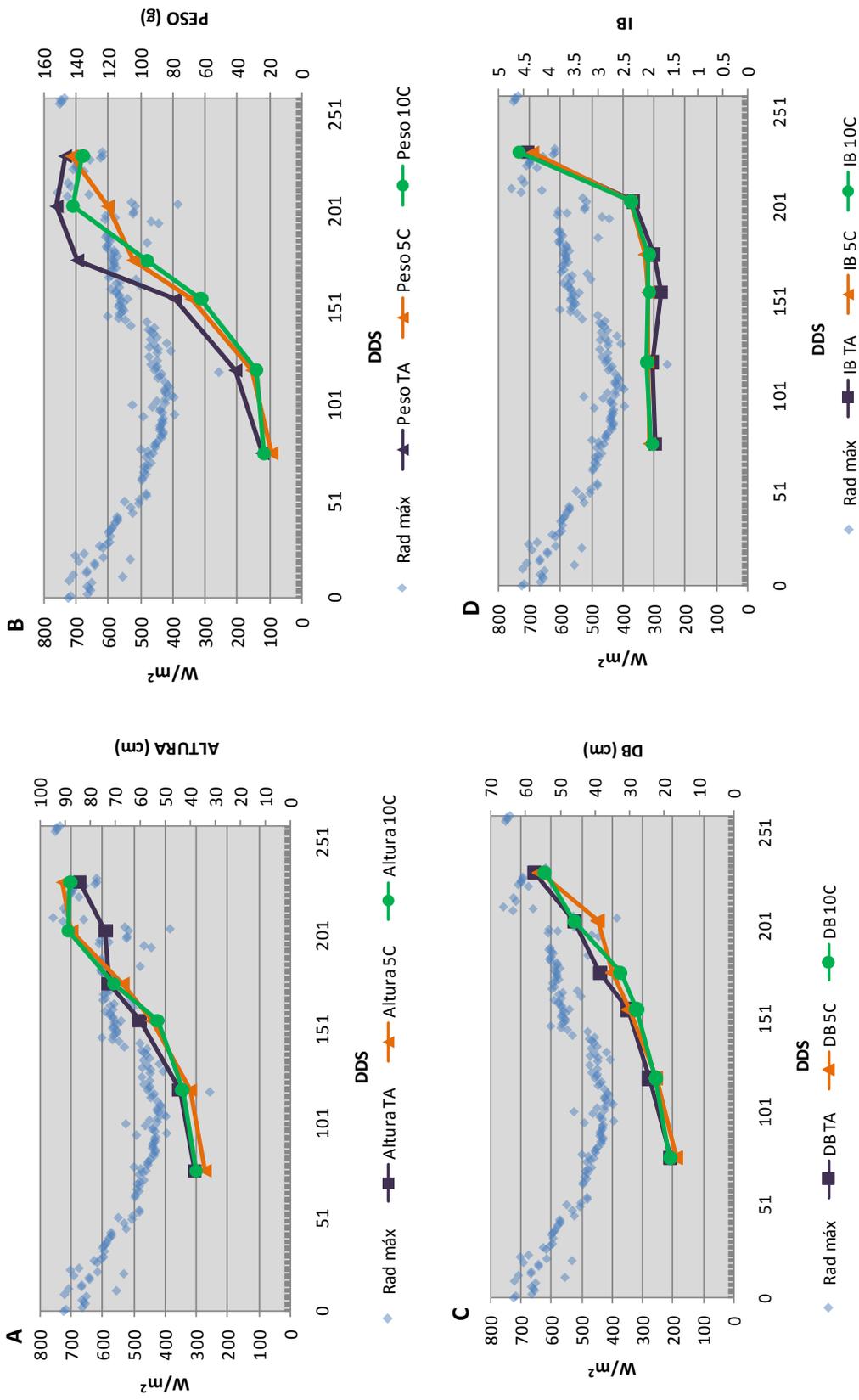


Figura 6.19. Relación de la intensidad luminosa diaria en el campo de cultivo con altura de la planta (A), peso (B), diámetro del bulbo (C) e índice de bulbificación (D). DB= diámetro del bulbo, IB= índice de bulbificación

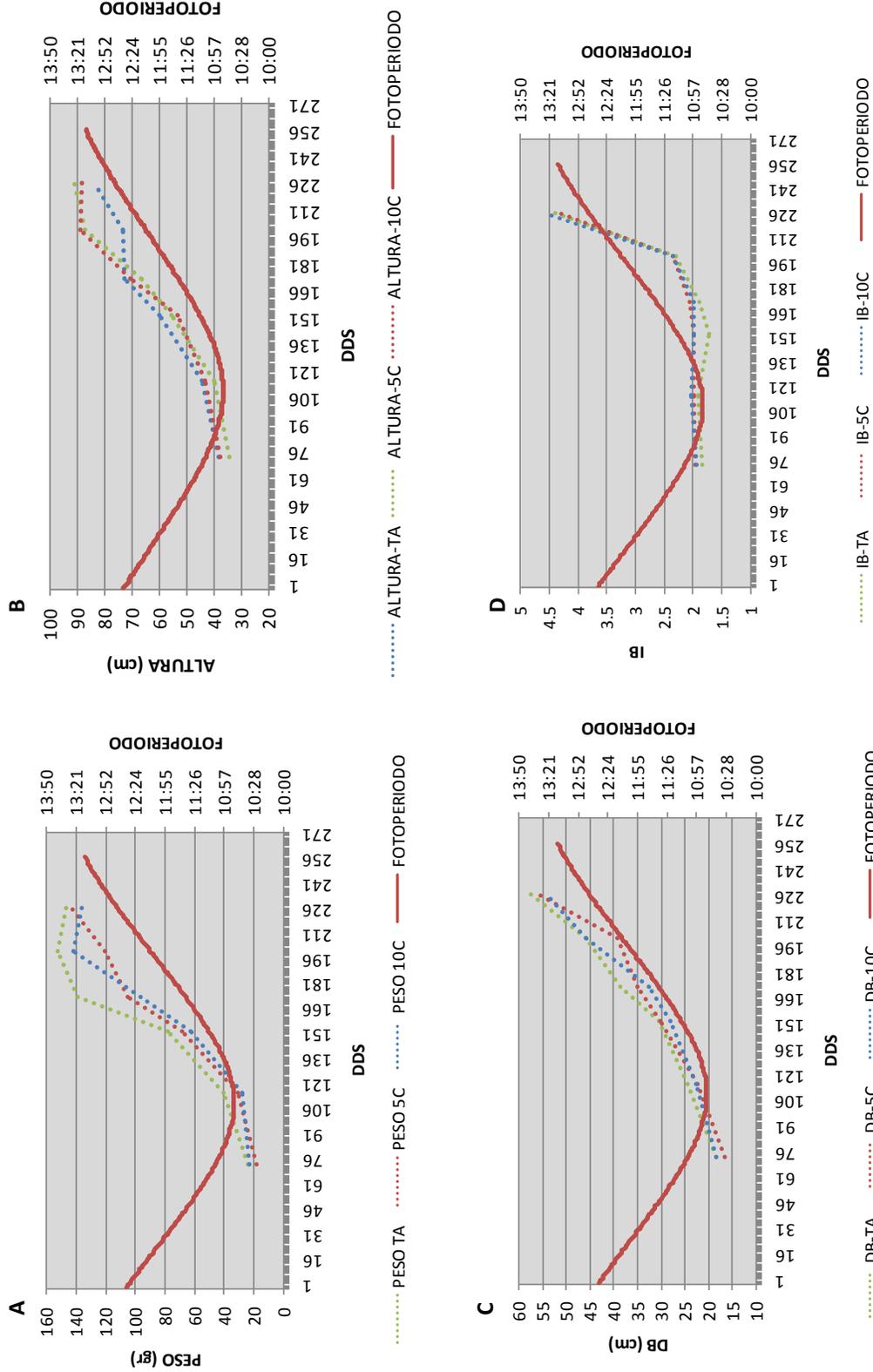


Figura 6.20. Relación del fotoperiodo en el campo de cultivo con altura de la planta (A), peso (B), diámetro del bulbo (C) e índice de bulbificación (D). DB= diámetro del bulbo, IB= índice de bulbificación

6.7.2 Relación entre los factores ambientales y el contenido de fructanos

La figura 6.21 muestra el proceso de acumulación de fructanos en bulbos y pseudo tallos en relación con las temperaturas ambientales. Para la acumulación en bulbos, el incremento inicial observado (entre los días 75 y 118 DDS) estuvo asociado a un periodo de descenso de las temperaturas (25 a 20; de 10 a 7 y de 10 a -5 °C para máximas, medias y mínimas respectivamente), posteriormente aunque hubo cambios en las temperaturas ambientales estos se mantuvieron prácticamente constantes hasta los 203 DDS para finalmente incrementarse cuando las temperaturas también se incrementaron. Para el caso de los pseudo tallos, el inicio de la mayor acumulación de fructanos empezó cuando las temperaturas ambientales se encontraban en descenso (25 a 20, 10 a 7 y 10 a -5 °C para máximas, medias y mínimas respectivamente) los contenidos fueron máximos cuando las temperaturas aun no alcanzaban sus registros máximos del ciclo y finalmente, después de esta acumulación máxima, le siguió un descenso que coincidió con las máximas temperaturas registradas. Por lo anterior se puede observar que la acumulación de fructanos en los pseudo tallos no puede ser explicada por el comportamiento que muestran los registros de las temperaturas ambientales y que probablemente esté involucrado otro mecanismo que opere durante cada día del ciclo de cultivo.

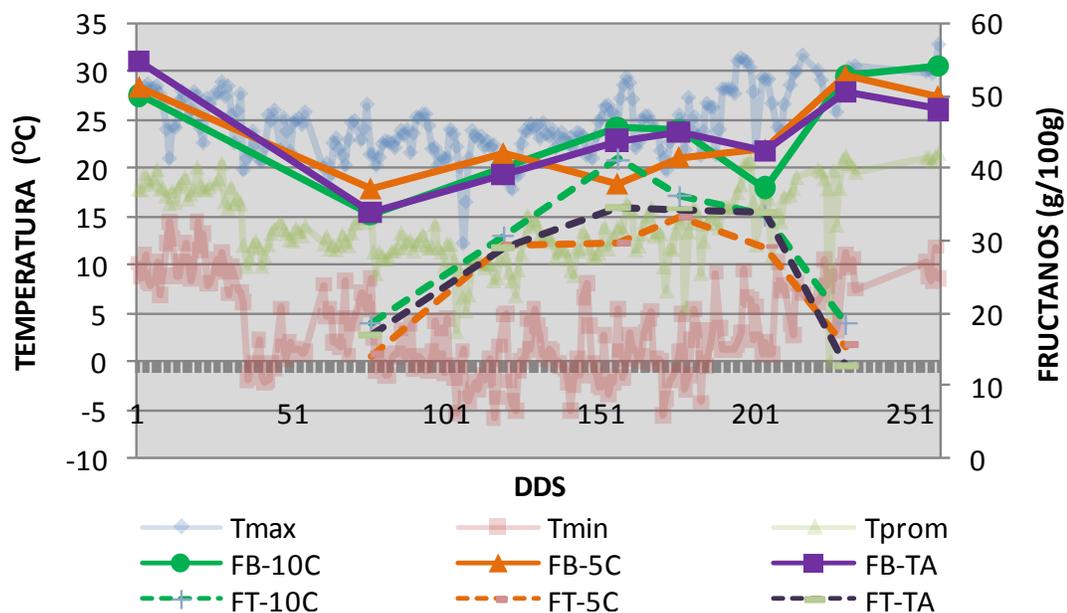


Figura 6.21. Comparación entre el contenido de fructanos en bulbo, pseudo tallo y temperaturas (máxima, media y mínima) presentes durante el desarrollo (FB= fructano en bulbo, FT= fructano en pseudo tallo).

La figura 6.22 relaciona la distribución de fructanos en la materia seca de bulbos y pseudo tallos asociada a la acumulación de horas frío a 5 y 7 °C. en ambos tipos de muestras el contenido de fructanos pareció ser incrementada por la acumulación de 300 horas de frío a 5 °C o 400 horas a 7 °C. Después de este periodo, el contenido de fructanos parece estabilizarse, independientemente de que se hayan acumulado más horas de frío para finalmente mostrar un importante incremento en los bulbos y un decremento en los pseudo tallos cuando la acumulación de horas frío alcanzó las 600 horas a 5 °C o 800 horas a 7 °C. Estos datos sugieren que la prevalencia de bajas temperaturas durante las primeras etapas del desarrollo de la planta parece tener mucha importancia en los patrones de distribución de fructanos y que estos se vean reflejados en las últimas etapas de la misma.

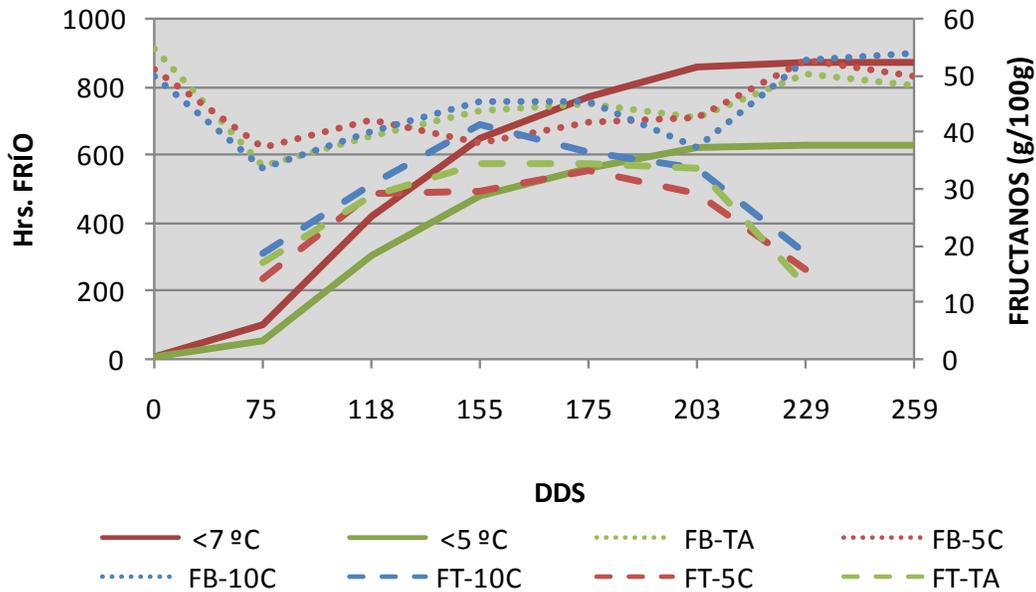


Figura 6.22. Comparación entre el contenido de fructanos en bulbo, pseudo tallo y acumulación de horas de frío presentes durante el desarrollo (FB= fructano en bulbo, FT= fructano en pseudo tallo).

Solhaug (1991) trabajó con plantas de césped (*Poa pratensis*) en ambientes controlados a diferentes fotoperiodos y diferentes temperaturas y evaluó tasa de crecimiento y la distribución de carbohidratos asimilados en distintas partes de la planta en diferentes periodos de desarrollo indicando que la tasa de crecimiento fue mayor para las plantas crecidas bajo regímenes de fotoperiodo largo (lo cual coincide con este trabajo) y que la concentración de fructanos y azúcares fue mayor en condiciones de baja temperatura. También indicó que la acumulación de carbohidratos fue 175% mayor en las vainas de las hojas y los tallos respecto de la raíz en las plantas cultivadas en fotoperiodos cortos, pero que después este patrón de acumulación cambio cuando modificaron las condiciones a fotoperiodo largo. Esto parece señalar que hay un patrón de acumulación de fructanos en otras partes de la planta que finalmente son transportados a los órganos de almacenamiento bajo condiciones ambientales específicas.

Ese mismo autor señala que la acumulación de asimilados en las hojas en lugar de los órganos de reserva puede ser un aspecto importante para la

estimulación de la acumulación de materia seca durante el periodo de días largos. El proceso de acumulación de fructanos podría estar relacionado con las bajas temperaturas presentes al inicio del desarrollo, ya que cuando las temperaturas mínimas se encuentran alrededor de -5 y 5 °C se observa un incremento en el contenido de fructanos. Este comportamiento coincide con lo reportado por Pontis y del Campillo (1985), quienes indican que existe un incremento en la acumulación de fructanos en partes aéreas de pastos debido a una exposición a bajas temperaturas, tal vez como consecuencia de la baja demanda de fotosintatos por parte de la planta en esas condiciones ambientales (Pollock. 1986).

La acumulación de fructanos al final del ciclo de cultivo coincide con los datos de Kamenetsky y col. (2004) quienes indicaron que la traslocación de materiales de reserva se ve favorecida por temperaturas cálidas y fotoperiodos largos tal y como se describe en el presente trabajo.

Un aspecto importante de la influencia que tiene la temperatura durante las primeras etapas de desarrollo de la planta en la acumulación de fructanos lo señaló Galaz (2008) quien mostró que una exposición durante un mes a 0 °C y fotoperiodo corto y posteriormente transferencia a temperaturas más alta y fotoperiodos largos provocó una mayor acumulación de fructanos en sus hojas en comparación de aquellas expuestas a 5 y 10 °C; esto parece apoyar la idea que las condiciones de crecimiento de la planta en sus primeras etapas son muy importantes en el posterior desarrollo del bulbo.

Kamenetsky y col. (2004) indicaron que el almacenamiento de las “semillas” de ajo por 60 días a bajas temperaturas (-2 a 9 °C) crecidos inicialmente en fotoperiodos cortos y termoperiodo 17/9 seguidos de fotoperiodos largos; generaron mayor número de hojas y mayor longitud lo cual seguramente tiene un impacto en la cantidad de sustratos generados por la fotosíntesis para la formación posterior de fructanos. Esto parece indicar nuevamente que las condiciones de temperatura iniciales del crecimiento tienen un efecto importante

en la formación de las hojas que a su vez impactará el proceso de síntesis de los fructanos. Algunas observaciones parecidas las hizo Galaz-Pérez (datos no publicados) al encontrar que las plantas de ajo sometidas a bajas temperaturas (0 a 10 °C) durante 30 días con termo periodo de 13/11 horas, tenían un mayor número de hojas con mayor capacidad de síntesis de sacarosa.

En otra especie de planta Dias-Tagliacozzo y col. (1999) estudiando el metabolismo de fructanos en los rizomas de *Vermonia herbacea* (Vell.) Rusby almacenadas durante una y cuatro semanas a 5 y 25 °C en diferentes etapas del desarrollo, identificaron que las bajas temperaturas por si solas no alteran la dirección del metabolismo de fructanos (las características de polimerización) pero sí parecen modular la velocidad de esos cambios.

Para nuevamente señalar la importancia que tiene la luz en el proceso de distribución de fructanos durante el desarrollo de la planta, la figura 6.23 muestra los cambios que tuvieron estos carbohidratos respecto de la intensidad de luz y el fotoperiodo. Para el caso de bulbos hubo una estrecha relación entre el incremento en la intensidad luminosa o el fotoperiodo con el incremento de los fructanos. No obstante, para el caso de los pseudo tallos la mayor distribución de fructanos no coincidió con las máximas intensidades lumínicas ni con la mayor amplitud del fotoperiodo pues este se presentó cuando la intensidad máxima registró valores de 600 Watts/m² y cuando la intensidad fue máxima el contenido de fructanos disminuyó drásticamente. Los anteriores datos coinciden con lo reportado por Kamenetsky y col. (2004) quienes señalaron que las temperaturas más cálidas y fotoperiodos largos promueven la traslocación de reservas a los dientes, lo cual apoya lo que se ha mencionado en el sentido que hay una traslocación de carbohidratos desde el pseudo tallo al bulbo y en particular a los dientes.

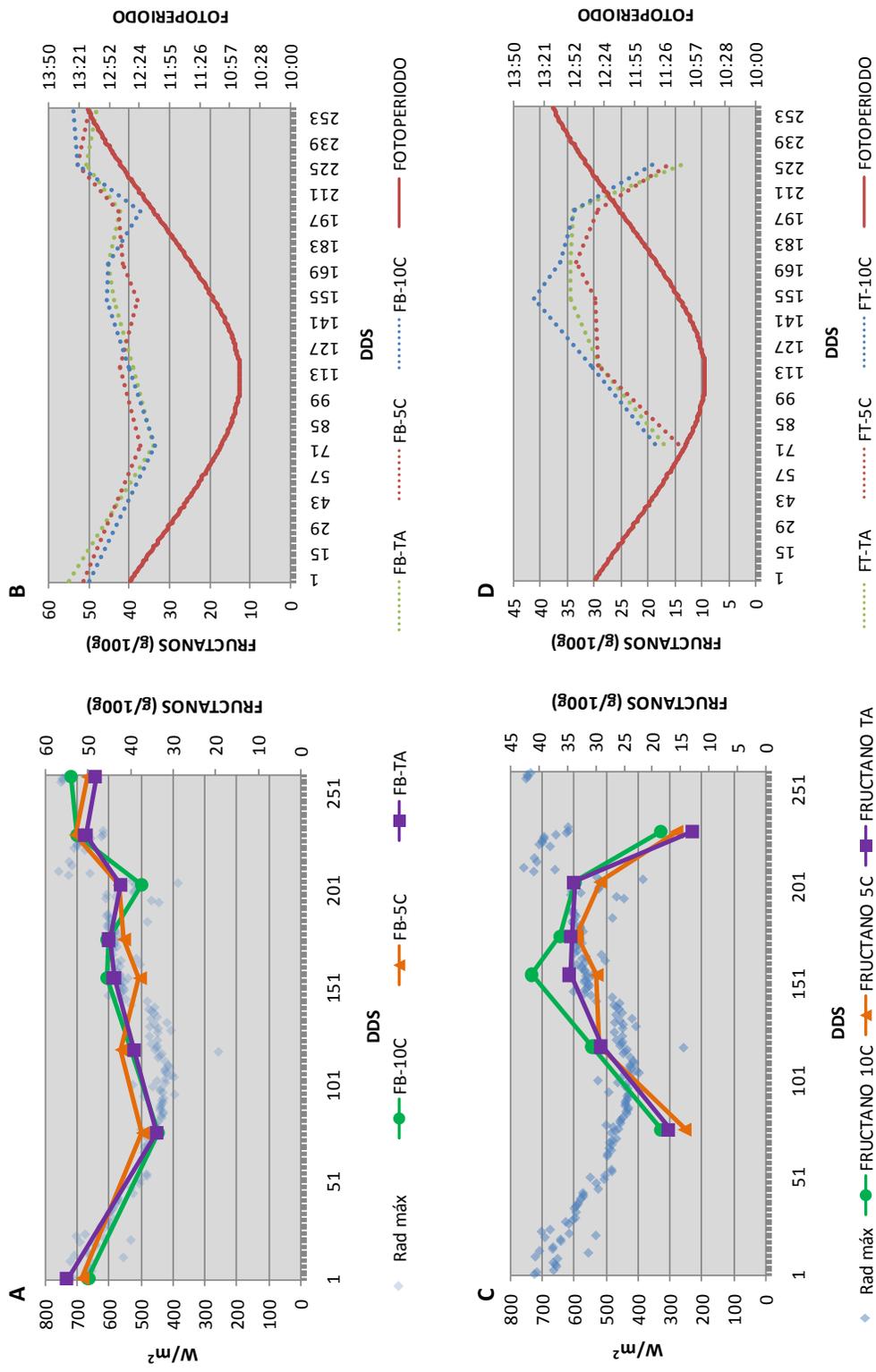


Figura 6.23. Distribución de los fructanos en tallos con la intensidad lumínica (A) y con el fotoperiodo (B) así como en pseudo tallos con la intensidad lumínica (C) y fotoperiodo (D).

6.7.3 Relación de los factores ambientales con la actividad de la enzima 1-SST

La Figura 6.24 muestra las relaciones de la actividad de la enzima 1-SST en bulbos y pseudo tallos con los factores ambientales. Aunque esta figura muestra las tendencias generales de las actividades debido a que los datos mostraron actividades variables que no permitieron ver diferencias durante el desarrollo; se observa que la actividad total tanto en bulbos como en pseudo tallos muestra incrementos conforme la temperatura y la intensidad lumínica se incrementan lo cual es lógico especialmente para el caso de los bulbos pues la mayor temperatura favorece una mayor fotosíntesis y por lo tanto, se suministrarían sustratos suficientes (sacarosa) para que la enzima lleve a cabo su función la cual también tiene una temperatura óptima de 30 °C.. Para el caso de pseudo tallos, también se observan mayores actividades cuando las temperaturas son mayores y la irradiación es máxima aunque no corresponde con la mayor distribución de fructanos por lo que esto parece señalar que aunque los factores ambientales pudieran estar afectando la función de esta enzima parece que este control solo es parcial y no controla la actividad de la misma.

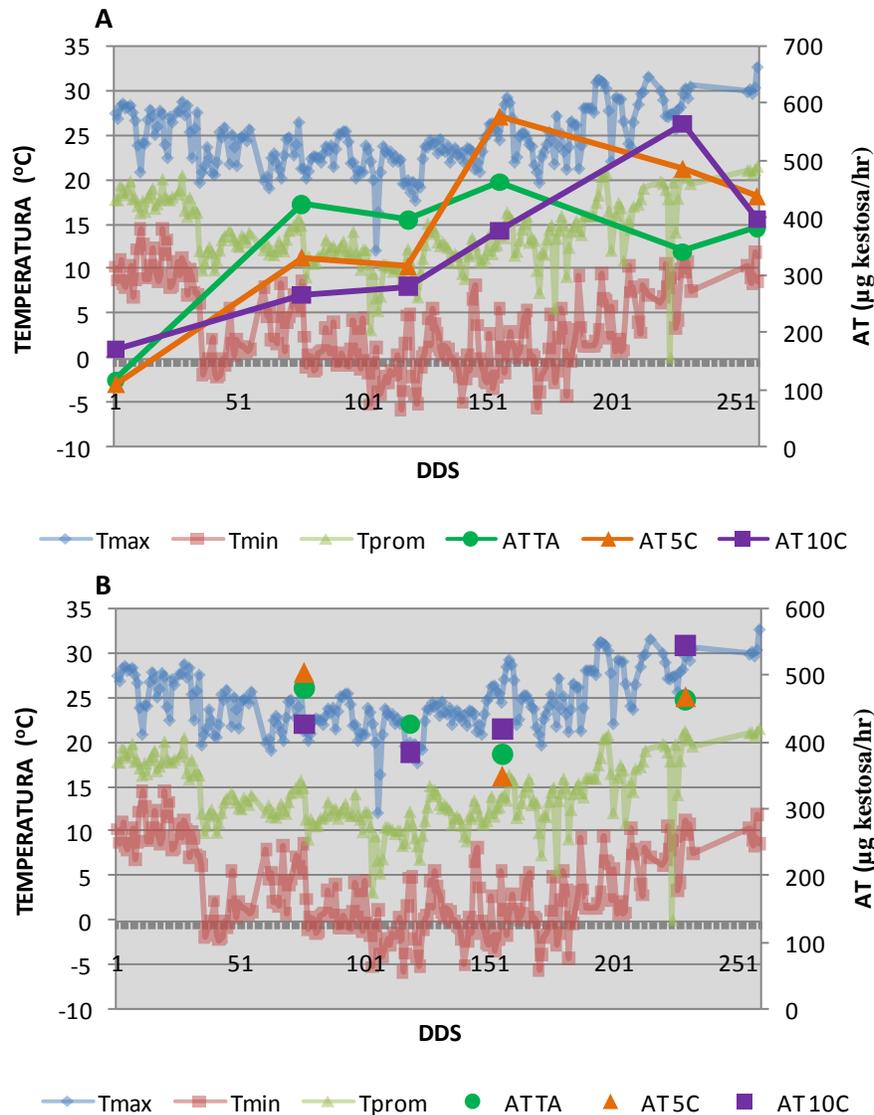


Figura 6.24. Comparación de la actividad total de la 1-SST en bulbo (A) y pseudo tallo (B) contra las temperaturas (máxima, mínima y media) presentes durante el desarrollo.

En ese mismo sentido, otros reportes indicaron que el metabolismo de los fructanos en bulbos de cebolla previo a la cosecha se realiza bajo la influencia de los factores ambientales, los cuales actúan durante las etapas de bulbificación y maduración y que después de la cosecha dicho metabolismo es independiente de la temperatura de almacenamiento y únicamente se encuentra asociado con las etapas de dormancia y brotación (Shiomi, 2005),

En este trabajo de tesis se han mencionado diversos trabajos que puntualizan la importancia de las bajas temperaturas durante las primeras etapas del desarrollo del ajo; sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos durante esta investigación la exposición a bajas temperaturas previo a la siembra no influye en la acumulación de carbohidratos ni en la calidad final del producto.

Crespi y col. (1991), Mahfoozi y col. (2001) y Yu-Chun y col. (2002), estudiaron la relación entre bajas temperaturas y un incremento en la producción de sacarosa debido a un aumento en la actividad de la sacarosa sintasa; éste fenómeno podría explicar lo observado en el cultivo de ajo, debido a que un incremento en la concentración de sacarosa durante el desarrollo podría traducirse en una mayor cantidad de fructanos sintetizados y por consiguiente en ajos de mayores calibres comerciales.

De acuerdo con Kamenetsky y col. (2004), la acumulación de horas frío durante el desarrollo influye en el número de hojas de la planta (Fig. 6.25). Por lo que temperaturas por debajo de los 5 °C en las primeras etapas del desarrollo darían una mayor cantidad de hojas, lo cual provocaría que al aumentar la temperatura ambiental también se incrementaría la tasa fotosintética, dando como resultado una tasa más elevada de producción de carbohidratos y un mayor valor comercial de los bulbos cosechados.

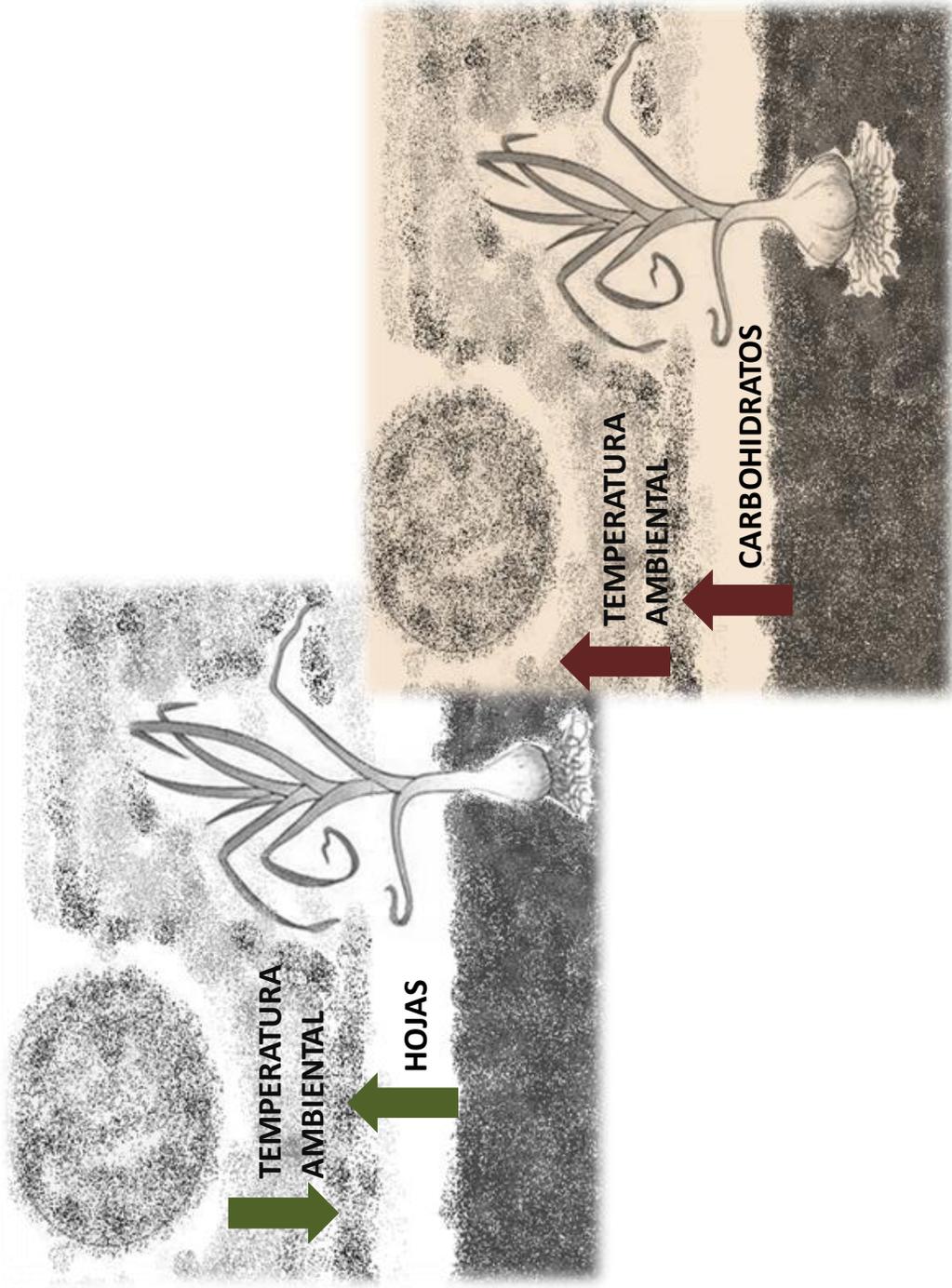


Figura 6.25. Representación esquemática de la influencia de bajas temperaturas durante las primeras etapas del desarrollo sobre el número de hojas en plantas de ajo.

VII. CONCLUSIONES

- El almacenamiento de los dientes “semilla” durante 10 días a 5 y 10 °C no indujo diferencias significativas en el crecimiento y desarrollo de las plantas de ajo y sus bulbos durante el ciclo de cultivo, esto en comparación con el crecimiento y desarrollo de las “semillas” almacenadas a TA.
- Hubo una mayor calidad en los bulbos que provenían de dientes “semilla” almacenadas a TA (22 °C) o 10 días a 5 °C, aunque estadísticamente no existieron diferencias significativas.
- Los pretratamientos de almacenamiento de los dientes “semilla” a diferentes temperaturas no tuvieron efecto en los patrones de síntesis y acumulación de fructanos tanto en pseudo tallos como en bulbos durante el desarrollo del cultivo.
- El mayor contenido de fructanos almacenados en los bulbos se presentó al final del ciclo de cultivo y coincidió con el inicio de la diferenciación de los bulbos.
- Aunque en los pseudo tallos también existió una acumulación de fructanos como en los bulbos, éstos disminuyeron su concentración cuando se inició la diferenciación del bulbo, lo que sugiere un posible transporte de carbohidratos hacia los bulbos en esa etapa del desarrollo.
- Los incrementos de las temperaturas ambientales estuvieron directamente asociados a los incrementos en la altura y peso de la planta. El crecimiento acelerado de la planta se inició cuando el rango de temperatura máxima fue de 20 a 25 °C, de 10 a 15 °C y de 0 a 5 °C para la media y mínima respectivamente. Las máximas alturas y pesos de la planta se registraron

cuando la temperatura máxima alcanzó 30 °C, la media alrededor de 18 °C y la mínima cercana a los 10 °C.

- El índice de bulbificación no mostró una relación tan estrecha con la temperatura ambiental, aunque el proceso de diferenciación se presentó cuando los rangos de temperaturas máximas, medias y mínimas se encontraron entre 25 a 30, 15 a 20 y 5 a 10 °C.
- La actividad total de la enzima 1-SST fue baja en los bulbos almacenados antes de su siembra y mayor durante el ciclo de cultivo, no encontrándose diferencias significativas por efecto del almacenamiento. No obstante, la actividad específica fue estadísticamente similar en todo el ciclo de cultivo.
- La actividad de la enzima 1-SST no es un paso regulador de la acumulación de fructanos en los bulbos y pseudo tallos de ajo.
- Los resultados aquí encontrados, indican que el almacenamiento por 10 días a 10 y 5 °C no tiene efectos significativos en la calidad de los bulbos ni en el crecimiento y distribución de fructanos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Alvarado, P. 2000.** Consultoría: Monitoreo de la producción y comercio de ajo y cebolla en Chile. Programa de reconversión y desarrollo de la granja, proyecto BID-MGAP 1063/OC-UR.
- Asega, A. F. and Carvahlo, M. A. M. 2004.** Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 313-319.
- Augusti, K. T. 2005.** Role of garlic (*Allium sativum* L.) and onions (*Allium cepa* L.) in health management. *Acta Horticulturae* 668:143-150 (Abstr).
- Banguela, A. and Hernández, L. 2006.** Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnología Aplicada* 23:202-210.
- Baugartner, S., Dax, T. G., Praznik, W. and Falk, H. 2000.** Characterization of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). *Carbohydrate Research.* 328 (2): 177-183.
- 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 P. D. Castellane. 1997.** The effects of pre-planting refrigeration on bulbs over the development and yield of garlic 'Chines', 'Contestado' and 'Quiteria'. *Acta Horticulturae* 433:499-503.
- Brewster, J. L. 1994.** Onions and other vegetable *alliums*. CABI Publishing. CAB International. Wallingford, United Kingdom. p 256
- Cavagnaro, P. F. y Galmarini, C. R. 2007.** Garlic en Cai, H.; Hormaza, J.; Ratnaparkhe, M. y Wünsch, A. Genome mapping and molecular breeding in plants; Vegetables. Vol. V, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, p 349
- Chacón, A. 2006.** Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacaridos (FOS). *Agronomía mesoamericana* 17(2): 265-286.
- Collins, M. and Rastall, R. 2008.** Oligosaccharides in food and agriculture; *Glycoscience.* p 1185-1204. Springer Berlin Heidelberg.
- CONAJO.** Consejo Nacional de Productores de Ajo. Consulta: Agosto 2009. URL: <http://www.conajo.com.mx>.

- Crespi, D. M., Zabaleta, J. E., Pontis, G. H. and Salerno, G. 1991.** Sucrose Synthase Expression during Cold Acclimation in Wheat. *Plant physiology* 96:887-891.
- del Pozo, A. y González, M. I. 2005.** Developmental responses of garlic to temperature and photoperiod. *Agricultura Técnica* 65(2):119-126.
- Dias-Tagliacozzo, G. M.; Figueiredo-Ribeiro, R.; Carvalho, A. y Dietrich, S. 1999.** Fructan variation in the rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, as influenced by temperature. *Revta Brasil. Bot.*, Sao Paulo. 22(2): 267-273.
- FAOSTAT. FAO Dirección de Estadística. 2008.** Producción: ProdSTAT. Consulta: Julio 2009.
URL: <http://www.faostat.fao.org>
- 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.
- Hendry, G. A. F. and Wallace, R. K. 1993.** The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. *In* Vjin, I. y Smeekens, S. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant physiology* 120:351-359.
- Izquierdo, J., Paltrinieri, G. y Arias C. 1992.** Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización del ajo, cebolla y tomate. FAO. pp: 63-126.
- Izquierdo, O. H. y Quiones, O. Y. 2001.** Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas. Consulta: Julio 2009
URL://<http://www.utm.mx/temas-docs/nfnotas15R2.pdf>
- Jeong, B. R. y Housley, L. T. 1990.** Fructan metabolism in wheat in alternating warm and cold temperatures. *Plant. Physiology* 93: 902-906.
- Kamenetsky, R., Shafir, I. L., Zemah, H., Barzilay, A. and Rabinowitch, H. D. 2004.** Environmental control of garlic growth and florogenesis. *Journal of American Society of Horticultural Science* 129(2): 144-151 (Abstr).
- Ledesma, A., Núñez, S. B. and Argüello, J. A. 1997a.** Bulbing physiology in garlic (*Allium sativum* L.) cv. "Rosado paraguayo"II. Characterization of ontogenic stages by shoot growth dynamics and its relation to bulbing. *Acta Horticulturae* 433:405-416.

- Ledesma, A., Núñez, S. B. and Argüello, J. A. 1997b.** Bulbing physiology in garlic (*Allium sativum* L.) cv. "Rosado paraguayo"III. Nutrient content in garlic plants: its relation to growth dynamics and bulb morphogenesis. *Acta Horticulturae*. 433:417-425.
- Mahfoozi, S., Limin, A. E. and Fowler D. B. 2001.** Developmental Regulation of Low-temperature Tolerance in Winter Wheat. *Annals of Botany* 87:751-757.
- Mann, L. K. 1952.** Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. *Hilgardia*. 21: 195-251.
- McCleary, V. B. and Murphy, A. 2000.** Measurement of total fructan in foods by enzymatic/spectrophotometric method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 83(2): 356-364.
- Messiaen, C. M. 1975.** Las hortalizas. Ed. Blume Distribuidora, S. A. Colección agricultura tropical. pp. 54-72.
- Morcuende, R., Kostadinova, S., Pérez, P., del Molino, I. y Martínez, R. 2003.** Nitrate is a negative signal for fructan synthesis, and the fructosyltransferase-inducing trehalose inhibits nitrogen and carbon assimilation in excised barley leaves. *New Phytologist* 161: 749-759.
- Morcuende, R., Kostadinova, S., Pérez, P. and Martínez, R. 2005.** Fructan synthesis is inhibited by phosphate in warm-grown, but not in cold treated, excised barley leaves. *New Phytologist* 168: 567–574.
- Mujica, H. y Pérez, M. 2006.** Características físicas y químicas de ajo cosechado en dos estados de madurez y almacenado en condiciones ambientales. *Bioagro* 18(3): 171-175.
- Núñez, S. B., Ledesma, A., Milanesi, E., Dubois, M. E., Cerana, M. M. y Argüello, J. A. 1994.** Bulbing physiology in garlic (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo I. Morphophysiological characterization of the inductive and morphological stages of bulbing. *ISHS Acta Hort.* 433: I International Symposium on Edible Alliaceae.
- Olvera, C., Castillo, E. y López-Munguía, A. 2007.** Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotechnología*. 14: 327-346.
- Pérez, M. L., García, R. M., Ramírez, M. R. y Barrera, G. L. 2003.** Evaluación de cultivares de ajo morado y blanco por su rendimiento agronómico e industrial en Irapuato, Guanajuato. *Acta Universitaria* 13: 57-65.
- Pollock, C. J. 1986.** Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist*. 104: 1-24.

- Praznik, W., Huber, A. and Löppert, R. 2006.** Characterization of carbohydrates, occurrence and potential of fructan plants. IP: Renewable biomaterials Ghent p 8.
- Puebla, A., Battaglia, M., Salerno, G. y Pontis, H. 1999.** Sucrose-sucrose fructosyl transferase activity: a direct and rapid colorimetric procedure for the assay of plants extracts. *Plant Physiology Biochemistry* 37(9): 699-702.
- Puebla, A., Salerno, G. y Pontis, H. 1997.** Fructan metabolism in two species of *Bromus* submitted to chilling and water stress. *New Phytologist* 136(1): 123-127
- Purseglove, J. 1985.** Tropical crops: Monocotyledons I. *In: 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., A. Ledesma, M.I. Reale, y D. Collino. 1981.** Efecto de bajas temperaturas en almacenaje de preplantación y condiciones termofotoperiódicas de cultivo en la bulbificación de ajo (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo. *Phyton* 41:77-82.
- Rahim, M.A., and R. Fordham. 2001.** Environmental manipulation for controlling bulbing in garlic. *Acta Horticulturae* 555:181-188.
- Ritsema, T. and Smeekens, S. C. M. 2003.** Engineering fructan metabolism in plants *Journal of Plant Physiology* 160. 811–820.
- Roth, A., Lüscher, M., Sprenger, N., Boller, T. and Wiemken, A. 1997.** Fructan and fructan-metabolizing enzymes in the growth zone of barley leaves. *New Phytologist* 136: 73-79.
- Rutherford, P. P. 1981.** Some biochemical changes in vegetables during storage. *Annual Applied Biology* 98: 538-541.
- SAGARPA.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Estadística básica: Agricultura. Consulta: Agosto 2009.
URL: <http://www.sagarpa.gob.mx>
- SIAP 2009.** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Estadística básica: Agricultura. Consulta: Agosto 2009.
URL: <http://www.siap.gob.mx>
- Segura, O. J., Villaseñor, B. S. y Ontiveros, E. C. 2006.** Estrategias de prevención y tratamiento de la obesidad en regiones geográficas definidas de México. *Investigación en salud* 8(2): 72-73.

- Shiomi, N., Benkeblia, N. and Onodera, S. 2005.** The metabolism of fructooligosaccharides in onion bulbs: a comprehensive review. *Journal Applied Glycoscience*. 52(2): 121-127.
- Solhaug, K. A. 1991.** Effects of photoperiod and temperature on sugars and fructans in leaf blades, leaf sheaths and stems and roots in relation to growth of *Poa pratensis*. *Physiology Plantarum* 82: 171-178
- Suzuki, M. and Chatterton, N. J. 1996.** Science and technology of fructans. CRC Press USA. 193-199.
- Takagi, H. 1990.** Garlic (*Allium sativum* L.). In J.L. Brewster and H.D Rabinowitch (eds.) Onions and allied crops. CRC. p 109. Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- USDA.** National Nutrient Database for Standar Reference. Consulta: Junio 2008. URL: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>
- Utrilla- Vázquez, M. 2008.** Efecto del almacenamiento de la “semilla” y del metil jasmonato en el desarrollo y la calidad de bulbos de ajo (*Allium sativum*). Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 95 p.
- Van den Ende, W., De Roover, J. y Van Laere, A. 1999.** Effect of nitrogen concentration of fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum*. 105: 2-8.
- Vjin, I. y Smeekens, S. 1999.** Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant physiology* 120:351-359.
- Yu-Chun, D. and Nose, A. 2002.** Effects of chilling temperature on the activity of enzymes of sucrose synthesis and the acculation of saccharides in leaves of three sugarcane cultivars differing in cold sensitivity. *Photosynthetica* 40(3):389-395.

IX. ANEXOS

Cuadro A.1. Concentraciones evaluadas de sacarosa para la máxima producción de 1-kestosa.

TUBO	EXTRACTO ENZIMÁTICO	20 μ L SACAROSA (mM)	VOLUMEN FINAL (μ L)
1	300 (μ L)	10	320
2	300 (μ L)	30	320
3	300 (μ L)	50	320
4	300 (μ L)	70	320
5	300 (μ L)	90	320
6	300 (μ L)	100	320

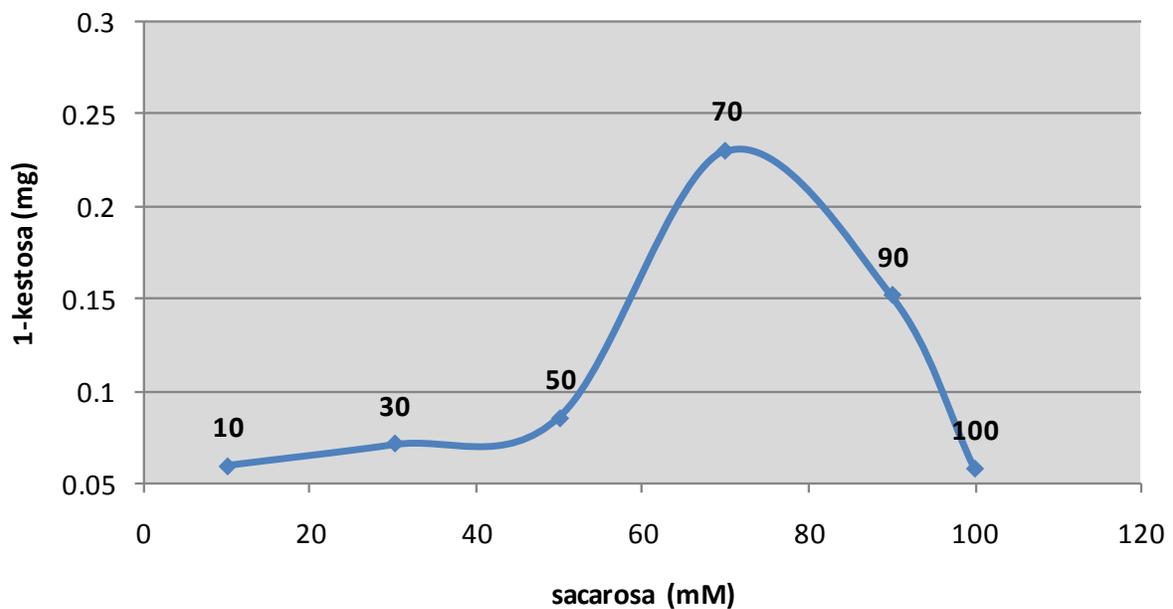


Figura A.1. Curva de producción de 1-kestosa utilizando como sustrato sacarosa a diferentes concentraciones.

Cuadro A.2. Protocolo para la elaboración de curva estándar de 1-kestosa.

TUBO	AGUA (μL)	KESTOSA (μL)	KESTOSA (mM)	KESTOSA (mg)
1	49.9	0.1	0.2	0.2154
2	49.8	0.2	0.4	0.4308
3	49.6	0.4	0.8	0.8616
4	49.4	0.6	1.2	1.2924
5	49.2	0.8	1.6	1.7232
6	49.0	1.0	2	2.154

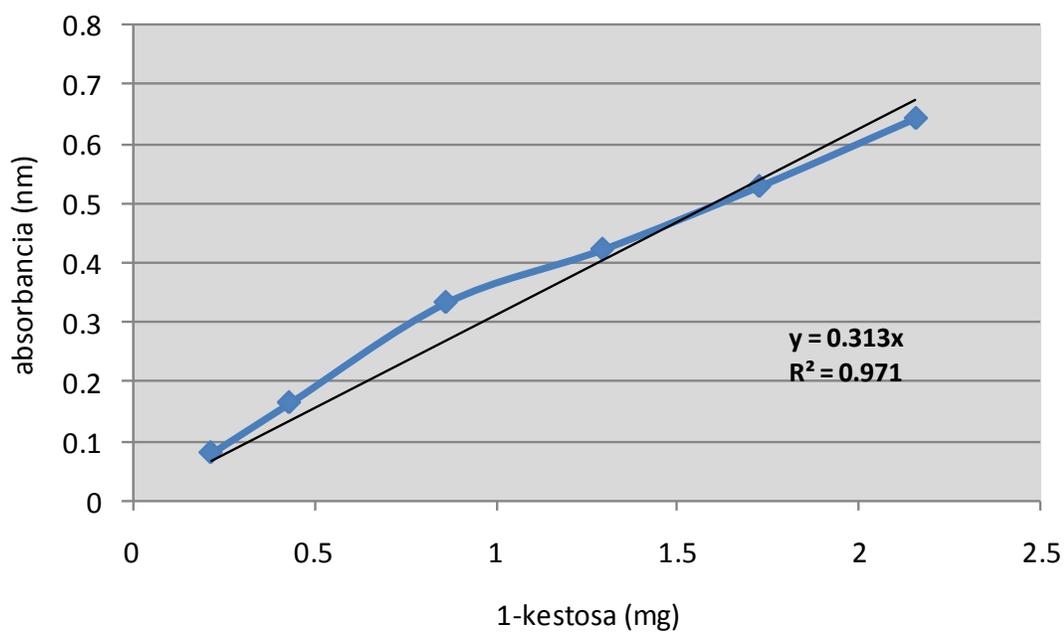


Figura A.2. Curva estándar de kestosa.

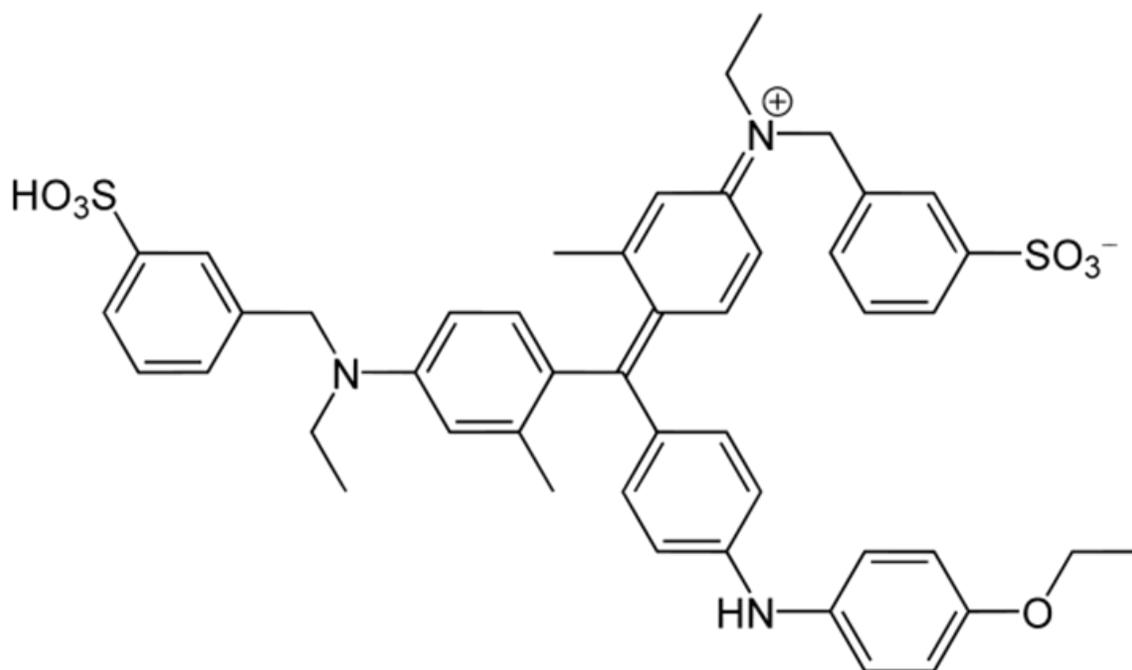


Figura A.3. Estructura química del colorante Coomassie brilliant blue G-250.

Cuadro A.3. Protocolo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

TUBO	ESTÁNDAR (0.56 mg/mL)	AGUA (mL)	BRADFORD (mL)
1	0	100	1
2	25	75	1
3	50	50	1
4	75	25	1
5	100	0	1

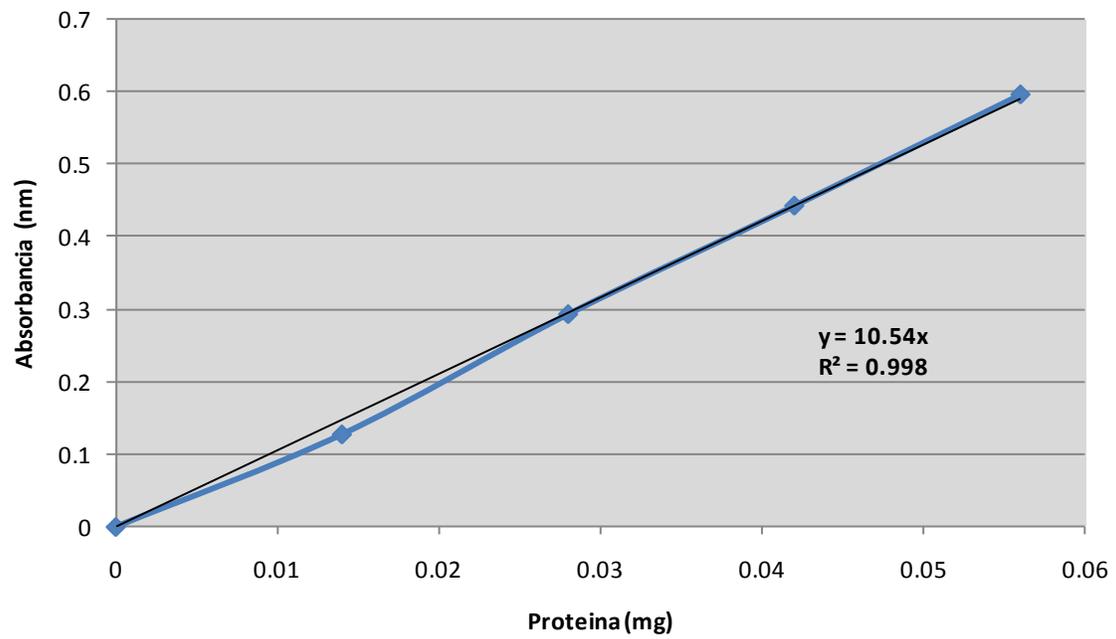


Figura A.4. Curva estándar de albumina bovina.