UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

"ESTUDIO DE LAS RELACIONES ENTRE LOS GRADOS DE INFESTACIÓN DE *Sclerotium cepivorum* Y EL CONTENIDO DE FENOLES EN AJO PERLA Y COREANO"

PRESENTA

I.B. Rossana Saavedra García

DIRIGIDA POR

Dr. Edmundo Mercado Silva.

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, DICIEMBRE DEL 2014.

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

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

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

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

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

Bajo los siguientes términos:

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

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

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

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

Avisos:

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

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

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

ESTUDIO DE LAS RELACIONES ENTRE LOS GRADOS DE INFESTACIÓN DE *Sclerotium cepivorum* Y EL CONTENIDO DE FENOLES EN AJO PERLA Y COREANO.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

I.B. Rossana Saavedra García

Dirigido por:

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva

SINODALES

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Presidente — Firma

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios
Secretario — Firma

Dr. Lorenzo Guevara Olvera
Vocal — Firma

Dra. Dulce María Rivera Pastrana
Suplente — Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Suplente — Firma

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

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro Qro.
Enero 2015
México

RESUMEN

El rendimiento y calidad del ajo (*Allium sativum*) disminuyen por efecto del ataque de enfermedades como la pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* que puede destruir el 100% del cultivo. La alta persistencia de este hongo en el suelo (hasta 40 años) limita su uso en este cultivo. Aunque existen procedimientos de control como la aplicación de fungicidas y prácticas de cultivo (aceites sintéticos de *Allium*, rotación de cultivos, inundación del suelo, aplicación de compostas y vermicomposta), su impacto tiene limitaciones. Existen variedades tolerantes ('Perla') y otras susceptibles como 'Taiwan' y 'Coreano'; no obstante, no se conocen cuáles son los factores que inducen tolerancia o susceptibilidad en estas variedades. La presencia de fenoles en los tejidos tiene un efecto fungicida por ello se esperaría que un tejido con mayor contenido de fenoles fuera más tolerante al ataque de enfermedades. Se ha observado que el almacenamiento de "dientes semilla" a 5 °C por 5-6 semanas induce la síntesis de compuestos fenólicos en los bulbos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si el almacenamiento refrigerado induce una mayor o menor tolerancia al ataque de la pudrición blanca en ajo Perla y Coreano. Grupos de dientes de ajo de estas variedades se almacenaron a temperatura ambiente (TA) y 5°C por cinco semanas para posteriormente ser sembrados en Cosío y Rincón de Romos Aguascalientes. Durante el desarrollo, se tomaron muestras de plantas para determinar su contenido de fenoles, antocianinas, giberelinas así como para enfrentar el tejido al ataque del patógeno *Sclerotium cepivorum*. Después de 94, 122 y 149 DDS, el contenido de fenoles en bulbos y raíces de plantas 5°C fue mayor (0.39,0.14 y 0.11 mg EAG/g m.s para cada fecha de muestreo y 0.40, 0.44 y 0.52 mg EAG/g m.s) en comparación con los contenidos de bulbos y raíces de plantas TA, (0.19,0.11 y 0.07 mg EAG/g m.s y 0.31, 0.37 y 0.46 mg EAG/g m.s). Las pruebas de inhibición de crecimiento del hongo indicaron un menor crecimiento micelial en P (Perla) (18.8, 20.3 y 18.2 mm) seguido de 5°C (32.2, 30.6, 28.2mm) y por último TA (40.3, 38.0, 37.1mm) a los 94, 122 y 149 DDS respectivamente. Estos datos sugieren que un mayor contenido de fenoles en 5°C puede influir la inhibición del hongo *Sclerotium cepivorum.* El perfil de fenoles de la raíz sugiere que los picos con tiempos de retención de 19.7, 23.3 y 24.2 min pueden tener un papel en la tolerancia al ataque de la pudrición blanca. El contenido de antocianinas en los bulbos de 5°C (2.49, 0.69, 0.50 y 0.48 mg C3G/g m.s) fue mayor que los de TA (1.67, 0.51, 0.31 y 0.34 mg C3G/g m.s) a los 94, 122, 149 DDS y curados respectivamente, esto concuerda con la tonalidad más violeta de los ajos almacenados a 5°C.La fracción F3 con actividad de giberelinas fue mayor en las muestras 5C (27.31, 21.55, 10.73 y 4.37), respecto de las muestras TA (25.42, 19.02, 7.56, 3.23 mg eq. GA_3/ 100g m.s) al parecer esta fracción tiene alta relación con el adelanto de la cosecha.

Palabras clave: *Allium sativum, Sclerotium cepivorum,* compuestos fenólicos.

SUMMARY

Garlic (*Allium sativum*) yield and quality are affected by the effect of diseases like withe rot caused by fungus *Sclerotium cepivorum* that can destroy 100% of the crop. The high of this fungus in soil (over 40 years) ties the use of these soil for this crop. Although there are methods for control, like fungicide application and other practices (*Allium* synthetic oils, crop rotation, flooding the field, composting and vermin-composting application, antagonists soil incorporation, and solarization), its impact has limitations. Genetically, there are some varieties that are more resistant, Perla, than others, Taiwan and Coreano, nevertheless the factors that cause this tolerance or susceptibility are unknown. It is known that phenol content in the plant tissue has a fungicide effect, by that it would be expected that a tissue with more phenol content could be more tolerant to the disease onset. It also has been observed that garlic cloves stored in low temperatures for 5 to 6 weeks involves a major phenol compound synthesis in garlic bulbs. The objective for this work of the present investigation was to study if low temperature storage causes a high or a low tolerance to white rot development in Perla and Coreano, garlic. Garlic clove groups of these varieties were storage to room temperature (TA) and 5C for five weeks to be later on planted is Cosio and Rincon de Romos, Aguascalientes. During the development, samples were taken from plants to determine phenol, anthocyanin and gibberellin content as well as deal with the pathogen attack *Sclerotium cepivorum* in garlic tissue. After 94, 122 and 149 day after sowing (DDS) phenol content in bulbs and roots from plants 5°C it was more (0.39, 0.14 and 0.11 mg EAG/g m.s for each date sampling and 0.40, 0.44 and 0.52 mg EAG/g m.s) in comparison with the bulbs and roots contents from plants TA (0.19, 0.11 and 0.07 mg EAG/g m.s and 0.31, 0.37 and 0.46 mg EAG/g m.s). Inhibition fungal growth trials shown that a minor micelial growth in P (Perla) (18.8, 20.3 and 18.2 mm) follow by 5°C (32.2, 30.6, 28.2mm) and at last TA (40.3, 38.0, 37.1mm) to 94,122 and 149 DDS respectively. These data suggest that a higher phenol content in 5°C can affect the fungal inhibition *Sclerotium cepivorum*. Root phenol profile suggest that the peaks with the retention time of 19.7, 23.3 and 24.2 min can have a role in tolerance to white rot attack. Anthocyanin content in 5°C bulbs (2.49, 0.69, 0.50 and 0.48 mg C3G/g m.s) were higher than TA bulbs (1.67, 0.51, 0.31 and 0.34 mg C3G/g m.s) to 94, 122 and 149 DDS and cured respectively, this tally with violet tonality in garlic storage at 5°C. Gibberellin activity F3 fraction it was higher in 5°C samples (27.31, 21.55, 10.73 and 4.37), respect to TA samples (25.42, 19.02, 7.56, 3.23 mg eq. GA_3/ 100g m.s) it seems that this fraction has a high relationship with the harvest advancement.

Key words: *Allium sativum, Sclerotium cepivorum*, Phenolics

Lab. de fisiología y bioquímica poscosecha de frutas y hortalizas

"No sabemos de nuestra capacidad,

hasta que un día despertamos y lo intentamos"

Dedicatoria

A mis padres Elva y Julio por creer siempre en mí, por el apoyo, por la confianza que depositaron en mí a pesar de estar sola en un lugar desconocido. LOS AMO..!

A mis hermanas hermosas que amo impresionantemente.

A mi amor Federico, sin ti, sin tu ayuda, sin tu apoyo, sin tu amor no habría podido culminar este logro.

A ustedes les dedico esta meta más en mi vida, este logro también les pertenece. LOS AMO..!!

Agradecimientos

A Dios por permitirme realizar una más de mis metas.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme la oportunidad de realizar una de las metas de mi vida.

Al Consejo de Productores de Ajo del municipio de Rincón de Romos, Aguascalientes, especialmente a los Ingenieros Francisco Ferrel (Pancho) y a Hostilio Torres.

Al Dr. Mercado por hacer de mi estancia en su laboratorio un lugar de aprendizaje tanto personal como profesional. Gracias por todo su apoyo.

A la Dra. Estela por su apoyo incondicional, consejos, paciencia y amistad, muchas gracias. Porque siempre estaba al pendiente si necesitábamos algo tanto profesional como personal. Gracias por ser una gran mujer.

A la Dra. Dulce por sus consejos y apoyo en los momentos más estresantes.

Al Dr. Lorenzo Guevara por su apoyo incondicional al momento de requerir su ayuda.

Al Dr. Ramón Guevara por aceptar ser parte de mi comité de tesis.

A la Dra. Sandra por ser un apoyo para mí, gracias por sus consejos, gracias por las charlas, gracias por todo, no la olvidaré.

A mis padres Julio César Saavedra Leyva y Elva García Nevárez que de no ser por su apoyo no habría podido salir adelante con todo el estrés. LOS AMO CON LOCURA..!!!

A mis hermanas que las amo profundamente.

A Federico Angulo Inzunza por ser parte de mi vida, por su apoyo y amor incondicional, por estar conmigo en todo momento a pesar del tiempo a pesar de todo, muchas gracias mi amor TE AMO.! TE AMO DIJE..!!

A mis compañeros, amigos, hermanos postizos mis Mikos que quiero, adoro y amo Ana Caren (alias la Mika) y Luis (Miko) muchas gracias por estar conmigo en todo momento los extrañare siempre, fueron en todo momento un apoyo para mi les juro que sin ustedes no habría sido lo mismo y no hubiera podido superar tantas cosas, gracias por las aventuras por los buenos y malos momentos, por las risas, los enojos, los días de estudio, los videos, las canciones, las fiestas, gracias por todo de verdad siempre tendrás un cachito de mi corazón. LOS QUIIEROOOO EN ABUNDANCIA..!!!

A Angie por ser una amiga incondicional hermosa te quiero, te amo, te adoro siempre.

A Jimena por ser una gran persona, amiga te quiero muchísimo, gracias por todo el apoyo, por el ánimo y los buenos deseos siempre.

A mis amigos y compañeros del laboratorio especialmente Paco por apoyarme cada vez que lo necesité, Paty, Elier (Duende), Rocío (Ro), Valeria, Ximena, Paz, Mimi, Claudia, Teresita, David y Dalia gracias por todo el apoyo siempre.

A Eli Cadena por estas al pendiente de mí gracias por tu apoyo amiga.

A Cristy y Ximena por ser mis amigas y formar parte de esta aventura.

A todos mis compañeros de generación gracias por formar parte de algo tan especial.

A mi princesa Akemi, mi bebe que amo tanto.

A mis primos y primas que adoro.

A todas mis tías en especial a mi tía Lupita Saavedra por su amor y apoyo siempre y a mi tía Vero por contar siempre en todo momento (protozoarios y mitocondrias).

A mis abuelitos Papa Cuate, Mamá Bella, Abuelita Vero y a mi abuelito Gildardo que amo con locura.

A mis amigos Akemi, David, Ricardo gracias por su apoyo y gran amistad a pesar de la distancia.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN i

SUMMARY ii

Dedicatoria iv

Agradecimientos v

ÍNDICE DE CUADROS x

ÍNDICE DE FIGURAS xii

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN DE LITERATURA 4

2.1 Generalidades del ajo. 4

2.1.1 Taxonomía y distribución. 4

2.1.2. Características morfológicas de la planta de ajo. 6

2.1.3. Estructura y composición química del bulbo. 9

2.1.4. Compuestos fenólicos. 12

2.1.4.1. Ácidos fenólicos. 15

2.1.4.2. Flavonoides. 15

2.1.4.3. Antocianinas. 17

2.1.5. Importancia económica del cultivo de ajo. 18

2.1.6. Generalidades del cultivo. 20

2.1.6.1. Requerimientos del cultivo de ajo. 21

2.1.6.2. Termo periodo. 21

2.1.6.3. Fotoperiodo. 23

2.1.6.4. Prácticas culturales de cultivo. 24

2.1.6.5. Fertilización. 25

2.1.7. Ciclo de desarrollo del cultivo. 26

2.1.8. Bulbificación. 29

2.1.9. Factores físicos involucrados en la bulbificación. 31

2.1.10. Factores bioquímicos que afectan la bulbificación. 33

2.1.10.1. Giberelinas GAs. 33
2.1.10.2. Biosíntesis de GAs. 35
2.1.10.3. Las giberelinas y su relación con la bulbificación. 37

2.2. Pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.). 38
2.2.1. Importancia económica y distribución de la enfermedad. 40
2.2.2. Clasificación taxonómica del fitopatógeno. 40
2.2.3. Características morfológicas, fisiológicas y estructurales. 40
2.2.4. Síntomas de la enfermedad. 41
2.2.5. Manejo y control de la enfermedad. 44

III. JUSTIFICACIÓN _____ 46

IV. HIPÓTESIS _____ 47

V. OBJETIVOS _____ 48

5.1. Objetivo general 48

5.2. Objetivos específicos 48

VI. MATERIALES Y MÉTODOS _____ *49*

6.1 Origen, almacenamiento y manejo del cultivo. 49

6.2. Estrategia experimental.....49

6.4. Análisis estadístico.....54

6.5. Extracción de fenoles, antocianinas y giberelinas. 54
6.5.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales. 55
6.5.2. Cuantificación de antocianinas totales.....56
6.5.3. Separación y cuantificación de fenoles por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). 57
6.5.4. Separación y cuantificación de giberelinas por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). 57

6.6. Aislamiento de hongo *Sclerotium cepivorum* de tierra infestada.....58

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ***60***

7.1. Crecimiento y desarrollo del cultivo. 60

7.2. Aislamiento de *Sclerotium cepivorum* de tierra infestada. 61

7.2.1. Pruebas de reto del crecimiento del *Sclerotium cepivorum* en agar adicionado con extractos fenólicos de raíz de ajo. 62

7.3. Cambios en el Contenido de fenoles en bulbos y raíces durante el desarrollo. 65

7.3.1. Cambios en el Contenido de Fenoles totales en raíz y bulbo de plantas de ajo durante su desarrollo. 66

7.3.2. Perfíl cromatográfico de Fenoles por HPLC. 71

7.4. Cambios en el contenido de antocianinas en los bulbos de ajo. 83

7.5. Cambios en el contenido de Giberelinas (GAs) durante el desarrollo. 86

7.5.1. Cambios en el contenido de GAs durante el desarrollo de la planta. 87

VIII. CONCLUSIONES **91**

X. BIBLIOGRAFÍA **93**

X. ABREVIATURAS **107**

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro Página

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del ajo. 5
Cuadro 2. Composición química del ajo por 100g de peso fresco. 11
Cuadro 3. Compuestos del ajo con efectos benéficos a la salud humana. 12
Cuadro 4. Compuestos fenólicos encontrados en diferentes especies de *Allium*. 14
Cuadro 5. Comparación relativa de diferentes ácidos fenólicos encontrados en ajo y cebolla 15
Cuadro 6. Agroquímicos utilizados como plaguicida, bactericida y fungicida en dientes "semilla" 50
Cuadro 7. Fechas de muestreos del ciclo de cultivo 2013-2014 51
Cuadro 8. Gradiente de concentración para separación de compuestos fenólicos. 57
Cuadro 9. Gradiente de concentración para la separación de GAs por HPLC. 58
Cuadro 10. Parámetros de crecimiento de la planta y bulbo de ajo cv. Coreano durante el ciclo de cultivo a partir de bulbos semilla previamente almacenados a 5°C y TA. 61
Cuadro 11. Crecimiento diametral micelial (mm) *in vitro* de *Sclerotium cepivorum* en raíz liofilizada durante el desarrollo del cultivo. 64
Cuadro 12. Valores de probabilidad de significancia estadística del contenido de fenoles totales en bulbos y raíces de plantas de ajo en diferentes condiciones de estudio. 66
Cuadro 13. Contenido de fenoles en bulbo de ajo en diferentes DDS según el tratamiento. 69
Cuadro 14. Contenido de fenoles en raíz en los diferentes DDS según el tratamiento. 70
Cuadro 15. Resumen de picos de fenoles que aparecen o no durante el desarrollo de bulbos de plantas de ajo generadas de "dientes semilla" almacenados a 5 °C y TA. 81

Cuadro 16. Resumen de picos de fenoles que aparecen o no durante el desarrollo de raíces de plantas de ajo generadas de “dientes semilla” almacenados a 5 °C y TA. 82
Cuadro 17. Comparación de medias del contenido de antocianinas totales en bulbos con túnicas de ajo Coreano y Perla durante su desarrollo del cultivo. 84
Cuadro 18. Contenido de fracciones F2 y F3 durante el desarrollo del cultivo. 88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Página

Figura 1. Distribución mundial de especies del género *Allium*. 6
Figura 2. Estructura de una planta de ajo. 9
Figura 3. Estructura química de Allixina. 13
Figura 4. Ruta de síntesis de compuestos fenólico. 13
Figura 5. Estructura química de antocianinas y antocianidinas. 17
Figura 6. Principales estados productores de ajo en la República Mexicana. 20
Figura 7. Requerimientos termoperiódicos del ajo durante su ciclo vegetativo. 22
Figura 8. Etapas fisiológicas de ajo de tipo blanco y violeta. 30
Figura 9. Efecto de la temperatura en el cultivo de ajo. 32
Figura 10. Efecto de la intensidad luminosa en el cultivo de ajo. 33
Figura 11. Estructura del ácido giberélico. 34
Figura 12. Ruta de biosíntesis de giberelinas. 36
Figura 13. Plantas de ajo con pudrición blanca. 39
Figura 14. Representación esquemática del ciclo de desarrollo de *S. cepivorum*. 43
Figura 15. Diagrama de flujo de la estrategia experimental. 53
Figura 16. Esquema general de extracción de fenoles, antocianinas y giberelinas 55
Figura 17. Aislamiento de esclerocios de *S. cepivorum* de tierra infestada. 59
Figura 18. a) Hongo aislado de suelo infestado 61
Figura 19. Hongo inoculado en placas con agar Czapek-Dox adicionado con raíz liofilizada durante el desarrollo del cultivo. 64
Figura 20. Campo donde se sembraron los ajos almacenados a 5°C libre de pudrición blanca. 65
Figura 21. Contenido de fenoles totales en bulbo durante el desarrollo del cultivo. 69
Figura 22. Contenido de fenoles totales en raíz durante el desarrollo del cultivo. 70
Figura 23. Área total de picos de fenoles a 280nm en bulbos de ajo Coreano de plantas generadas del almacenamiento a 5 °C (B5) o TA (BTA) y bulbos de ajo Perla (BP). 73

Figura 24. Área total de picos de fenoles a 280nm en raíces de ajo Coreano de plantas generadas del almacenamiento a 5 °C (B5) o TA (BTA) y raíces de ajo Perla (BP). 73
Figura 25. Área total de picos de fenoles a 320 nm en bulbos de ajo Coreano de plantas generadas del almacenamiento a 5 °C (B5) o TA (BTA) y bulbos de ajo Perla (BP) 74
Figura 26. Área total de picos de fenoles a 320nm en raíces de ajo Coreano de plantas generadas del almacenamiento a 5 °C (B5) o TA (BTA) y raíces de ajo Perla (BP) 74
Figura 27. Perfiles de los Cromatogramas de fenóles de bulbos de ajo durante el desarrollo a 280nm. 76
Figura 28. Perfiles de los Cromatogramas de fenoles de raíces de ajo durante el desarrollo a 280nm. 77
Figura 29. Perfiles de los Cromatogramas de fenoles de bulbos de ajo durante el desarrollo a 320 nm. 79
Figura 30. Perfiles de los Cromatogramas de fenoles de raíces de ajo durante el desarrollo a 320nm. 80
Figura 31. Tiempos de retención que no aparecen en TA a los 149 DDS. 83
Figura 32. Bulbos de ajo Coreano generados del almacenamiento a 5 °C (a) o almacenados a TA (b) y bulbos de ajo Perla (c). 84
Figura 33. Cambios en el contenido de antocianinas totales durante el desarrollo de bulbos de ajo Coreano y Perla Bajo las tres condiciones de estudio. 85
Figura 34. Cromatograma típico de extracto metanólico de GAs de bulbos de ajo cv. Coreano. 87
Figura 35. Contenido de F2 e índice de bulbificación (IB) en bulbos durante el desarrollo. 89
Figura 36. Contenido de F3 e índice de bulbificación (IB) en bulbos durante el desarrollo. 90

I. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una monocotiledónea de la familia Alliaceae, que se cultiva en México y otros países. Después de la cebolla, el ajo es el segundo producto más importante debido a sus propiedades medicinales y alimenticias. Es considerada una de las 20 principales hortalizas a nivel mundial y en México los principales productores de este cultivo son Zacatecas, Guanajuato, Baja California, Aguascalientes, Sonora, Puebla, y Oaxaca (Reveles-Hernández *et al*., 2009; SIAP, 2011; Zewdea *et al*., 2007).

Sus propiedades culinarias y medicinales dependen de sus compuestos bioactivos, especialmente los compuestos organosulfurados, que son responsables del sabor y aroma del ajo. Además de estos compuestos, el ajo también se caracteriza por su contenido de compuestos fenólicos, que tienen propiedades farmacológicas interesantes y están presentes en cantidades relativamente altas. El ajo se ubica en el segundo lugar de contenido de fenoles totales dentro 23 hortalizas de consumo habitual. Por otra parte, algunos productos de ajo como el extracto de ajo envejecido (AGE) o ajo negro se ha encontrado que contienen un mayor nivel de polifenoles en comparación con el ajo fresco. Se han determinado concentraciones relativamente altas de flavonoides como la miricetina, quercetina y apigenina. Así mismo, se cuantificaron ácidos fenólicos indicando que la suma de los ácidos hidroxicinámicos (caféico, *p*-cumárico, ferúlico, y ácidos sinápico) era dos veces mayor en ajo que en cebolla. Los factores genéticos, agronómicos y ambientales tienen un papel importante en el contenido y composición de fenoles de los cultivos (Beato *et al*., 2011).

Una de las enfermedades más importantes que afecta la producción de ajo es la conocida pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum*, se presenta en la mayoría de las zonas productoras de ajo en el país, causando desde

bajo rendimiento hasta la pérdida total de la producción, lo que constituye el problema fito sanitario más importante de este cultivo. En México se han implementado algunas estrategias para controlar la enfermedad; sin embargo, no se ha logrado un control efectivo, debido a la viabilidad de este fitopatógeno en el suelo (40 años) y a la gran cantidad de esclerocios presentes en los suelos de las regiones productoras (Delgadillo *et al*., 2002; Jiménez *et al*., 2012; Reveles-Hernández *et al*., 2009; Sánchez, 2002). Siendo esta una razón, por la cual su control es difícil y por ello reviste una fuerte importancia económica (Jiménez *et al*., 2012).

Se han recomendado diferentes métodos para su prevención y control, entre ellas se tiene el uso de fungicidas como el Tebuconazol (Delgadillo *et al.,* 2002), la solarización (Ulacio *et al*., 2006), incorporación de materia orgánica al suelo (Ulacio *et al*., 2003), la aplicación de organismos antagonistas como *Trichoderma* (Ulacio *et al*., 2003), la rotación de cultivos utilizando crucíferas, como el brócoli o la aplicación de calcio; las dos últimas prácticas en condiciones experimentales. No obstante, se ha demostrado que una sola alternativa de control no es suficiente para manejar al hongo y por ende, a la enfermedad que produce (Rojas *et al*., 2010).

Dado que el ajo es una planta que se propaga vegetativamente no existe la suficiente variabilidad genética que permita la selección de genotipos resistentes a la pudrición blanca (Rabinowitch y Brewster, 1990). Se han hecho intentos para obtener materiales de ajo resistentes a dicha enfermedad mediante irradiación; sin embargo, no se ha tenido éxito (Pérez-Moreno *et al*., 1995). Aunque si se ha observado en campo que algunas variedades como el Perla manifiestan una menor incidencia de esta enfermedad.

Dentro de las variedades sensibles, no se han detectado genotipos de ajo que muestren resistencia natural a esta enfermedad. Es por ello que se ha planteado obtener materiales modificados genéticamente a través de la ingeniería genética, como una alternativa viable para el mejoramiento genético de ajo y la obtención de semilla resistente a la enfermedad.

Las plantas pueden presentar mecanismos de defensa frente a patógenos como barreras estructurales o físicas (presencia de pelos, cera cuticular, grosor de la cutícula etc.), así como la síntesis de sustancias como respuesta a la presencia del patógeno tales como compuestos fenólicos, saponinas y lectinas (Cruz-Borruel *et al*., 2006). Dentro de la síntesis de compuestos fenólicos, la reacción controlada por la fenilalanina amonio-liasa (PAL) muestra mayor actividad en los tejidos enfermos o en genotipos resistentes; y constituye el paso inicial para síntesis de una amplia variedad de compuestos fenólicos, como las fitoalexinas y la lignina. La síntesis de estas substancias se relaciona con el nivel de resistencia genética de diferentes plantas como la resistencia de la papa al oomiceto (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary) (Lozoya-Saldaña *et al*., 2007).

En el laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la UAQ, se ha encontrado que el almacenamiento refrigerado de los dientes "semilla" de ajo 'Coreano', además de adelantar su ciclo de cultivo provoca un incremento en los contenidos de fenoles y antocianinas. Pero no se ha evaluado si este efecto tiene una respuesta hacia el desarrollo de la pudrición blanca en esta variedad. A nivel de campo se ha observado que la variedad 'Perla' tiene más tolerancia al ataque de este patógeno pero no se ha investigado si existe una relación directa entre esta tolerancia y el contenido de compuestos fenólicos en esta variedad.

Por lo anteriormente indicado, en este trabajo se planteó estudiar si la tolerancia o susceptibilidad al *Sclerotium cepivorum* de ajos Perla y Coreano se ve modificada por efecto del almacenamiento de la semilla a bajas temperaturas y si esta tolerancia o susceptibilidad se correlaciona con el contenido de compuestos fenólicos en ambas variedades o si es la longitud del ciclo de cultivo la que determina que una variedad tenga mayor o menor susceptibilidad a la enfermedad.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del ajo.

El ajo pertenece a la familia botánica de las Alliaceae (*Allium sativum*). Después de la cebolla, el ajo es el segundo producto más importante por su uso en la alimentación. Su principal uso es como saborizante o condimento en la cocina para preparar diversos platillos alrededor del mundo, su principal consumo es en fresco al utilizar los dientes o bulbillos, no obstante también se usa deshidratado o procesado (Reveles-Hernández *et al.,* 2009).

Esta especie ha sido considerada valiosa por su capacidad curativa y entre sus aportaciones a la salud se encuentran sus poder bactericida y anti coagulante, con capacidad para reducir los niveles de colesterol. Además posee efectos benéficos sobre padecimientos como el asma, diabetes y cáncer; se sabe también que estimula la motilidad gástrica. Ayuda a combatir el estrés, aumenta las defensas del organismo y es excelente fuente de vitamina B1 (Reveles-Hernández *et al.,* 2009).

2.1.1 Taxonomía y distribución.

Al ajo, se le relacionan los siguientes acontecimientos de acuerdo a su clasificación taxonómica de las angiospermas realizada por Melchior en 1964; citado por Brewster, 2002. Ese autor lo ubicó dentro el género *Allium* y en la familia Liliaceae; clasificaciones realizadas posteriormente, ubicaron al ajo en la familia Amarillidaceae, con base en la estructura de su inflorescencia y en la clasificación de las monocotiledoneas se ha aceptado incluirla dentro de la familia Alliaceaea. Por ello Takhtajan en 1997; citado por Rabinowitch y Currah, (2002) propone la siguiente clasificación taxonómica (Cuadro 1):

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del ajo.

Clase	*Liliopsida*
Subclase	*Liliidae*
Superorden	*Liliianae*
Orden	*Amaryllidales*
Familia	*Alliaceae*
Subfamilia	*Allioideae*
Tribu	*Allieae*
Género	*Allium*
Especie	*Allium sativum*

Es importante conocer a las especies miembros de la familia, ya que para fines orgánicos prácticos, son ellos los posibles huéspedes de los mismos organismos dañinos como plagas o enfermedades y por lo tanto dignos de tomar en cuenta en actividades de manejo integrado de estos organismos (Reveles-Hernández *et al.,* 2009).

Las especies de ajo se encuentran ampliamente distribuidas en zonas templadas y boreales del hemisferio norte, no obstante cuando se encuentra en zonas tropicales, su desarrollo se confina a las regiones montañosas. Es por ello que la región que presenta la mayor diversidad de especies del genero *Allium* comprende desde el Mediterráneo hasta Asia Central y Pakistán, siendo Norteamérica un segundo centro de diversidad de este género (Figura 1) (Rabinowich y Currah, 2002).

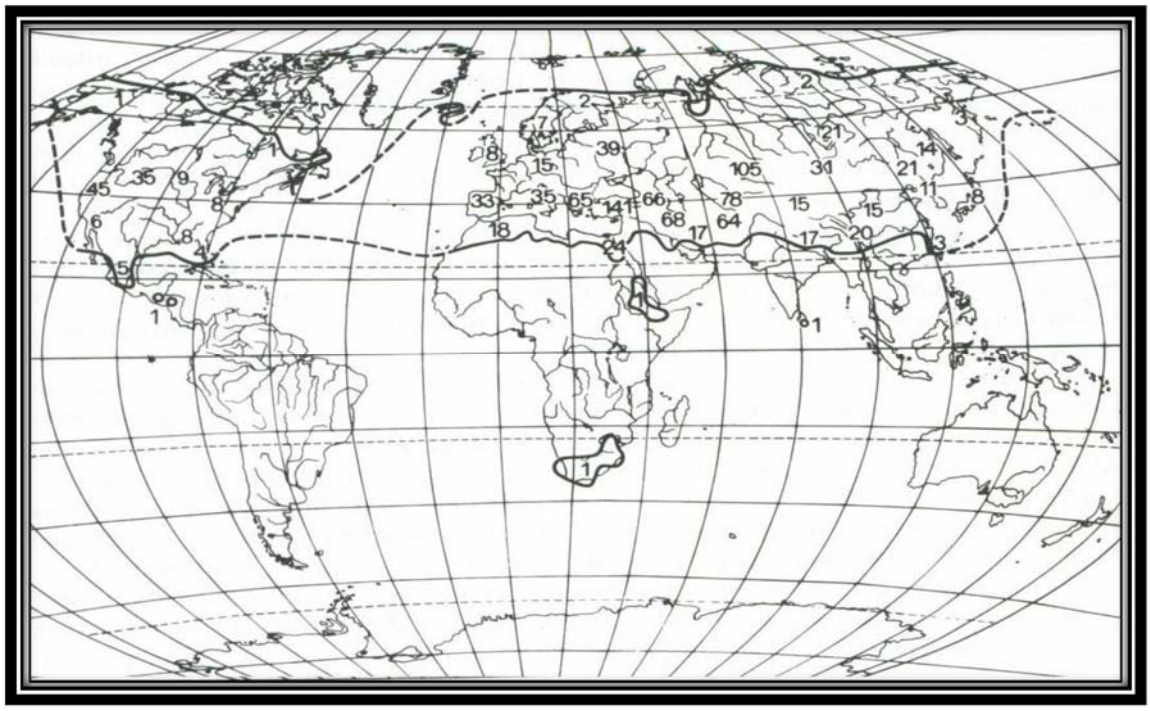


Figura 1. Distribución mundial de especies del género *Allium*. Los números en el mapa indica el número de especies encontradas en cada región (Rabinowich y Currah, 2002).

2.1.2. Características morfológicas de la planta de ajo.

Purseglove (1985) describe la estructura de la planta de ajo como se muestra en la Figura 2. Es una planta herbácea erecta que llega a medir desde 30 hasta cerca de 60 centímetros de altura, y sus bulbos son odoríferos. Dentro de las características morfológicas más importantes se encuentran:

- **Hojas**

Hojas escamosas secas y delgadas que constituyen la base de las hojas fotosintéticamente funcionales (hojas aéreas), las hojas funcionales son aplanadas, sólidas, con 2.5 cm o menos de ancho, plegadas en forma longitudinal. De acuerdo a Takagi, (1990) éstas varían en número, pero generalmente no son menos de 10, y se encargan de llevar a cabo la fotosíntesis de la planta.

- **Tallo o disco basal**

El verdadero tallo mide cerca de 30 milímetros de diámetro y 5 milímetros de altura y tiene forma de plato, del cual nacen las hojas y raíces, las hojas miden de uno a tres centímetros de ancho y de 20 a 50 centímetros de largo, están formadas por una vaina y un limbo aplanado, estrecho, largo, y fistuloso, con una nervadura central bien desarrollada y con terminación en punta.

- **Pseudo tallo**

El falso tallo es corto y erecto y está constituido por las vainas de las hojas. En la base de las vainas de las hojas no se acumulan sustancias nutritivas y al morir se convierten en túnicas protectoras (llamadas catáfilas) del bulbo (Reveles-Hernández *et al*., 2009).

- **Bulbos y bulbillos**

El bulbo está compuesto de varios bulbillos o diente, unidos en su base al tallo discoidal formando todo un conjunto al que se conoce como “cabeza de ajos”. El número de dientes puede variar desde seis hasta 20, aunque se pueden encontrar bulbos con 40 o más dientes, de poco valor comercial como es el caso de materiales criollos de los estados de San Luis Potosí o Nuevo León.

Los bulbillos se encuentran unidos en la base y se forman en las axilas de las hojas por lo que se les considera hojas transformadas que sirven para almacenar reservas de la planta; los bulbillos están envueltos de manera individual por túnicas interiores, mientras que el bulbo completo está envuelto por túnicas exteriores membranosas de diferentes coloraciones que van del blanco al rojizo o púrpura (Kamenetsky y Rabinowich, 2006; Reveles-Hernández *et al*., 2009).

Cuando los bulbos están intactos su olor es muy poco marcado pero al cortarlos desarrollan un olor intenso y característico (Purseglove, 1985). El bulbo en su conjunto, está formado de un tallo discoidal que constituye la base del bulbo, los

tallos secundarios brotan de las axilas de las hojas, las cuales son radiales, largas, alternas, comprimidas y sin nervaduras aparentes.

- **Raíces**

De la parte inferior del bulbo y en particular del disco basal nacen las raíces, que se introducen en la tierra para alimentar y anclar la planta al suelo. Sus raíces son adventicias que se localizan a una profundidad de 5 y 45 centímetros, aunque llegan a medir hasta 70 y 80 centímetros de longitud. Este órgano es importante en los procesos de infección por hongos ya que es la primera vía de entrada del patógeno (Velásquez-Valle *et al.,* 2011).

- **Otras características**

La planta de ajo puede producir un tallo o escapo floral (lo cual depende de la variedad y de las condiciones climáticas en el ciclo de cultivo) en cuya parte superior aparece la inflorescencia en forma de umbela esferoidal cubierta por una bráctea grande, membranosa y caduca. La umbela está constituida por flores pequeñas con seis sépalos y pétalos de color rosado o blanco así como seis estambres y un pistilo que al madurar dan origen a un fruto con tres cavidades, cada uno con dos semillas, que rara vez se reproducen (Reveles-Hernández *et al*., 2009).

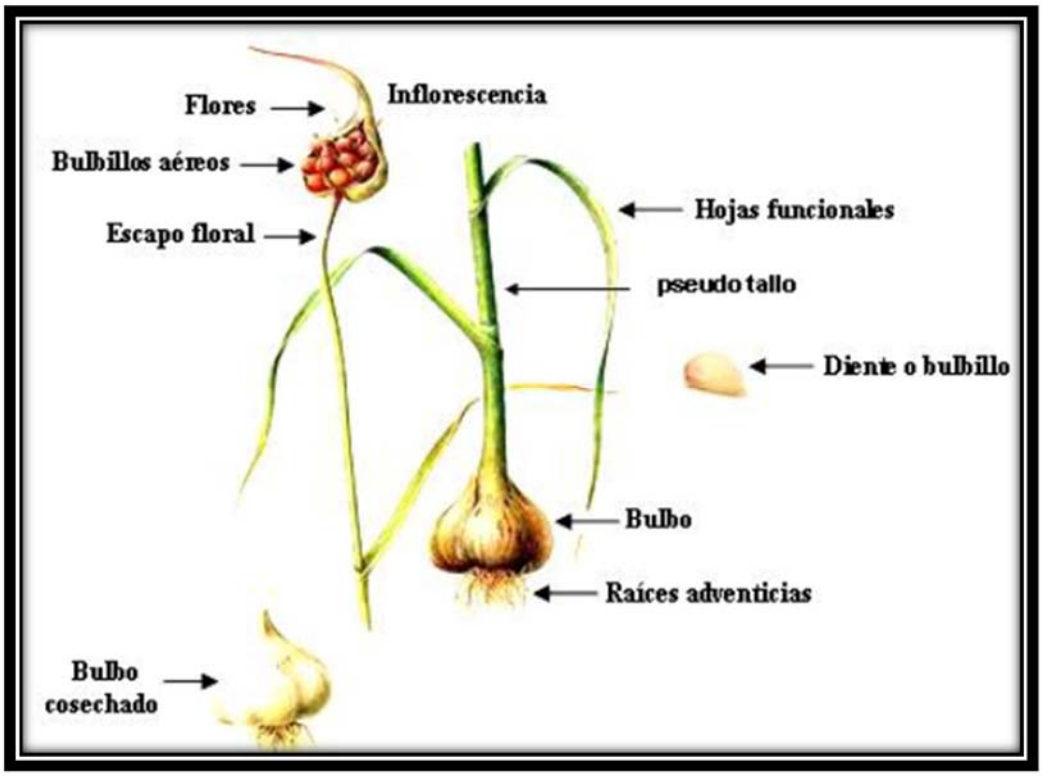


Figura 2. Estructura de una planta de ajo (Purseglove, 1985).

2.1.3. Estructura y composición química del bulbo.

Los bulbos están envueltos por túnicas membranosas o tépalos libres. Pueden estar conformados por una unidad larga o por pequeñas unidades, formando agrupaciones (clusters) que van desde tamaños de 2-3 mm hasta 8-10 cm de diámetro.

El bulbo desarrollado presenta un tallo comprimido en forma de disco, plato o menisco (denominado disco basal), donde se apoyan las hojas, muchas de las cuales están fuertemente modificadas. En algunos ecotipos el tallo se prolonga en forma de escapo y puede o no emerger de entre el falso tallo (pseudo tallo) compuesto por la porción superior de las vainas de las hojas. Dicho escapo puede rematar en una inflorescencia en forma de umbela que tiene flores (por lo general estériles), las que pueden ser reemplazadas por bulbillos aéreos. Solo algunos ecotipos son capaces de dar semillas verdaderas (Burba, 2003).

El falso tallo y las hojas con sus láminas planas y cerosas son responsables de la arquitectura de la planta. Apoyadas sobre el disco se encuentran las hojas estériles o no dentadas (aquellas que envuelven al bulbo y no poseen “dientes” en sus axilas), y hojas fértiles o dentadas (que poseen dientes en sus axilas). (Burba, 2003).

Las hojas envolventes del bulbo son generalmente blancas cuando ya se encuentran secas o poseen vetas con tintes violáceos. Tanto estos pigmentos como los de los bulbillos son responsables de la denominación comercial de los ajos (Burba, 2003).

El bulbo es un órgano de reserva, dado que la planta no produce semilla, se propaga de manera vegetativa (reproducción agámica) a través de la siembra de los bulbillos o dientes (López-Hernández, 2010). En las axilas de cada túnica se desarrollan de dos a cinco yemas colaterales que forman bulbillos, cada uno con una sola túnica carnosa alrededor de la yema terminal (González y Arbo, 2006).

En el Cuadro 2 se muestra la composición química general del bulbo de ajo; el componente principal es el agua (56-68%), seguido por los carbohidratos (26-30%). Los componentes con propiedades nutracéuticas, son los compuestos sulfurados (11-35 mg/100g de ajo fresco). Otros componentes son las vitaminas (ácido ascórbico, 30mg/100g peso fresco; vitamina E, 9.4 µg/g) y minerales como el Selenio (0.014 mg/100g) (Lawson, 1993).

Desde 1844 hasta la fecha se han descrito más de 200 diferentes compuestos, algunos de ellos con efectos biológicos benéficos para el hombre. La composición del bulbo de ajo, es muy variable y depende de muchos factores como: el cultivar o variedad, prácticas agronómicas, clima, fertilidad del suelo y las condiciones de almacenamiento poscosecha que determinan la calidad e intensidad del sabor así como su valor nutracéutico (Fenwick y Hanley, 1990).

Cuadro 2. Composición química del ajo por 100g de peso fresco.

Nutriente	Cantidad	Unidad
Agua	62.5	%
Proteína	4.0	g
Grasa	0.2	g
Hidratos de carbono	20.0	g
Celulosa	1.2	g
Ceniza	1.1	g
Calcio	37.0	mg
Fósforo	118	mg
Hierro	0.9	mg
Tiamina	0.19	mg
Rivoflavina	0.07	mg
Niacina	0.04	mg
Ácido ascórbico	13.0	mg

(Terán-Quiroga, 1976)

Los compuestos fenólicos presentes en el ajo tienen diferentes actividades biológicas de gran beneficio para el consumidor como su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, antimicrobiana y antifúngica (García y Sánchez, 2000; Ferri *et al*., 2003). Los compuestos fenólicos y azufrados del ajo actúan sinérgicamente bloqueando la actividad de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas, lípidos y ADN, brindándole al ajo propiedades antioxidantes (Espinosa-Cásares *et al*., 2010). En el cuadro 3 se observan algunos compuestos de ajo benéficos para la salud humana.

Cuadro 3. Compuestos del ajo con efectos benéficos a la salud humana.

Compuestos	Actividad biológica
Compuestos fenólicos (Allixina)	Antioxidante, antiinflamatorios, antivirales y antimicrobianas
Adenosina	Vasodilatador, hipotensor, miorelajante y estimulante de la síntesis de hormonas esteroídeas
Polisacáridos (Fructanos)	Cardioprotectores, antioxidante y estimulante del sistema inmunológico
Quercetina	Efectos benéficos contra el asma y algunas alergias
Saponinas	Hipotensora y antibacteriana

(García y Sánchez, 2000; Ferri *et al*., 2003).

2.1.4. Compuestos fenólicos.

La presencia de fenoles en plantas, se relaciona con la resistencia del vegetal a una diversidad de microorganismos. Estas sustancias pueden actuar como fito alexinas que funcionan como protectoras de plantas. Hoy en día se acepta que las fito alexinas son compuestos tóxicos de bajo peso molecular, que no se encuentran en los tejidos sanos, sino que se forman cuando el tejido sufre algún daño, y se acumulan en los lugares próximos a la infección, contribuyendo a la limitación del desarrollo del patógeno. Todas las fito alexinas (Figura 3) son producto del metabolismo secundario, y la inmensa mayoría son compuestos fenólicos (Durán *et al*., 1993).

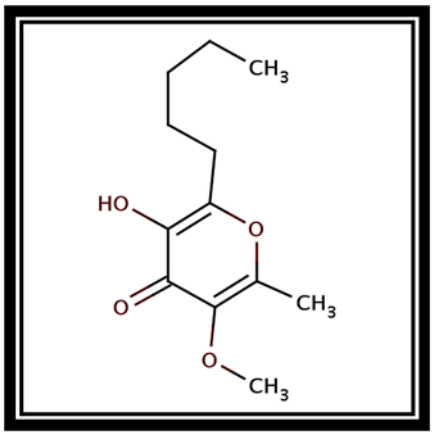


Figura 3. Estructura química de Allixina (fitoalexina encontrada en ajo).

El ajo y la cebolla sintetizan fenoles a través de las rutas del ácido siquímico y del ácido mevalónico (Figura 4), por lo tanto, son fuente importante de compuestos fenólicos que incluyen una amplia gama de flavonoides y ácidos fenólicos. Aunque sus contenidos varían considerablemente en función de las variedades. En cebolla los fenoles totales varían de 200 a 2950 mg kg^{-1} peso fresco, mientras que en ajo se ha informado de contenidos de 1450 mg kg^{-1} de peso fresco (Benkeblia, 2007).

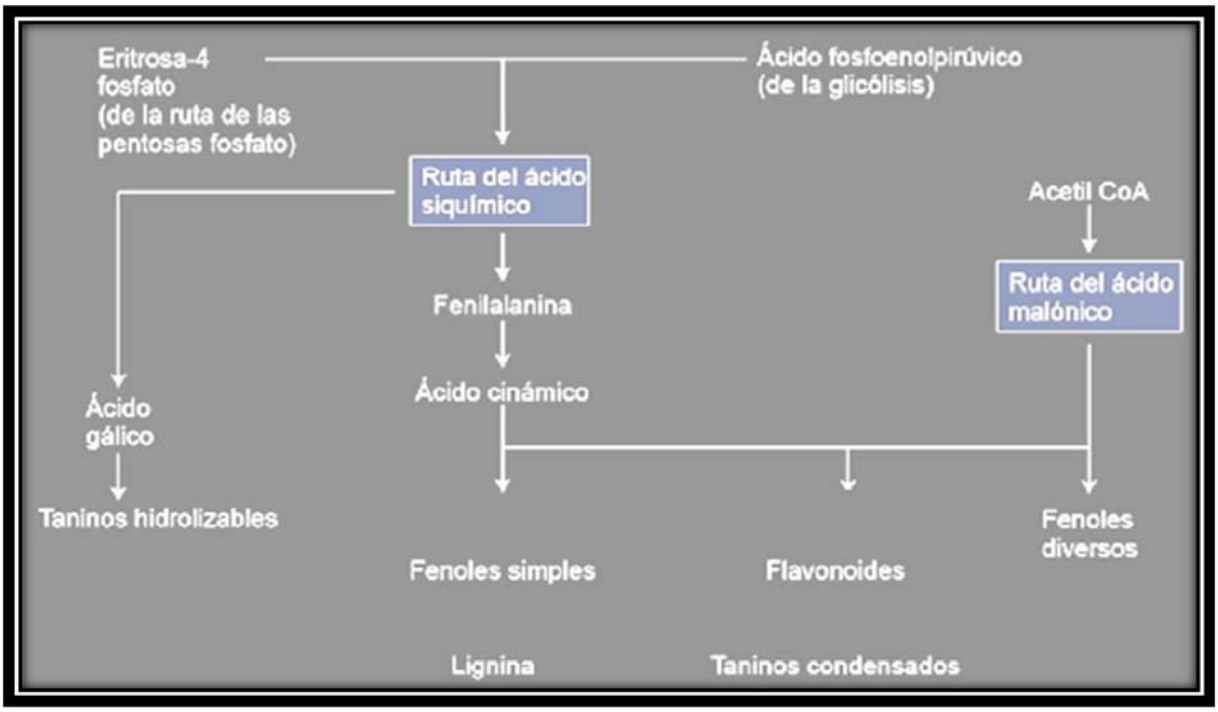


Figura 4. Ruta de síntesis de compuestos fenólicos (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Los compuestos fenólicos (Cuadro 4) están constituidos por grandes y complejas moléculas naturales producidas por el metabolismo intermedio y secundario. Constituyen una amplia categoría de compuestos que incluye; los flavonoides, ácidos fenólicos (ácido elágico, ácido tánico y vainillina) y derivados de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, clorogénico y ferúlico, curcumina, cumarinas).

Los lignanos también constituyen otra clase de compuestos fenólicos. Se encuentra en casi todas las frutas, verduras y granos (Benkeblia, 2007).

En cebolla, ajo y otros *Alliums* comestibles, éstos compuestos son variables y pertenecen a diversas clases, pero los compuestos principales se componen de antocianinas y flavonoides, en particular quercetinas. Estos compuestos han demostrado poseer muchas actividades biológicas, como la actividad antibacteriana y antioxidante, así como un papel en la resistencia de la planta (Benkeblia, 2007).

Cuadro 4. Compuestos fenólicos encontrados en diferentes especies de *Allium.*

Compuestos
Ácidos fenólicos
-Ácidos hidroxibenzóico
-Ácido protocatéquico
-Ácido floroglucinol
-Pirocatecol
Flavoniodes
-Quercetina
-Quercetina-glicósidos
-Isorhamnetina glicósidos
-Kampferol grlicósidos
Antocianinas
-Cianidian glicósidos
-Peonidin glicósidos
-Pelargonidin glisósidos

(Benkeblia, 2007)

2.1.4.1. Ácidos fenólicos.

Los ácidos fenólicos en cebolla (*Allium cepa*) contiene casi exclusivamente ácido protocatéquico junto a pequeñas cantidades de p- hidroxybenzóico y ácido vainíllinico. En las capas secas exteriores de color, ácido protocatéquico alcanza concentraciones de hasta 2% de material vegetal, mientras que el tejidos carnosos internos muestran concentraciones más bajas (20 mg / kg). Por el contrario los bulbos y las hojas verdes, contienen casi exclusivamente compuestos de ácido ferúlico y *p*-cumárico, mientras que el ajo muestra un patrón de ácidos fenólicos diferente en pieles y tejidos internos (Cuadro 5) (Benkeblia, 2007).

Cuadro 5. Comparación relativa de diferentes ácidos fenólicos encontrados en ajo y cebolla (mg/kg de peso fresco).

Compuesto	**Ajo (*Allium sativum*)**	**Cebolla(*Allium cepa*)**
p-cumárico	++	+
Caféico	++	+
Ferúlico	++	++
Sinapínico	++	+
p-hidroxibenzóico	++	+++
Floroglucinol	-	+
Protocateico	-	+++
Gálico	-	-
Vanillinico	-	+++

(-): No encontrado, (+): <0.5mg/kg, (++): 1-20mg/kg, (+++): >20mg/kg, esta información se obtuvo de diferentes cultivares (Benkeblia, 2007).

2.1.4.2. Flavonoides.

El esqueleto carbonado de los flavonoides contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (C6C3C6). Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los principales flavonoides las antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre las funciones a los que estos compuestos se les asocia están la defensa y la pigmentación (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

En la ruta de biosíntesis de flavonoides, la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por la enzima chalcon sintasa (EC-2.3.1.74) y da lugar a naringerin chalcona, precursor de los flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la enzima estilbeno sintasa conduce a la formación estilbenos implicados en mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Los flavonoides son compuestos que han sido propuestos con efectos benéficos para la salud, los cuales pueden ser medidos por su actividad antioxidante en los alimentos (Slimenstad *et al.,* 2008). Una de las mayores fuentes de flavonoides en la dieta de la sociedad europea está en el género *Allium* (Diez *et al.*, 2010). El ajo contiene altas concentraciones de flavonoides, especialmente el flavonol quercetina asociado a diferentes moléculas de azúcar (Miean y Mohamed, 2001). Se ha demostrado que la presencia del grupo glicosido a la aglicona de la quercetina en *Allium* da mayor actividad antioxidante que la aglicona libre.

Horbowicz y Kotlinska (2004) determinaron niveles entre 147 y 828 $mg.kg^{-1}$ de masa fresca de quercetina y trazas de 173 $mg.kg^{-1}$ de masa fresca de kempferol en bulbos de *Allium* (*A. ampeloprasum, A. caesium y A. ledebourianum*).

Por su parte, Kim *et al.* (2003) aislaron 4 compuestos flavonoides a partir de hojas y brotes de ajo, los mismos fueron identificados como isoquercetina, quercetina, kempferol e isorhamnetina, estos presentaron una alta actividad antioxidante hacia la enzima lipoxigenasa e hialuronidasa de soya, sugiriendo que estos compuestos del ajo pudieran ser utilizadas como alimento o ingredientes funcionales.

Miean y Mohamed (2001) encontraron 1497 $mg.kg^{-1}$ de quercetina, 391 $mg.kg^{-1}$ de luteolina y 832 $mg.kg^{-1}$ de kempferol en hojas de cebolla y 217 $mg.kg^{-1}$ de apigenina en ajo.

2.1.4.3. Antocianinas.

Las antocianinas son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos. Por ello son importantes en la polinización y en la dispersión de semillas. Son glicósidos con un azúcar en posición 3. Cuando las antocianinas no están glicosiladas se denominan antocianidinas (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

El color de las antocianinas depende del número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B y del pH de las vacuolas en las que se almacenan. Algunos ejemplos son pelargonidina (rojo-naranja), cianidina (rojo púrpura) y delfinidina (azul púrpura) (Figura 5).

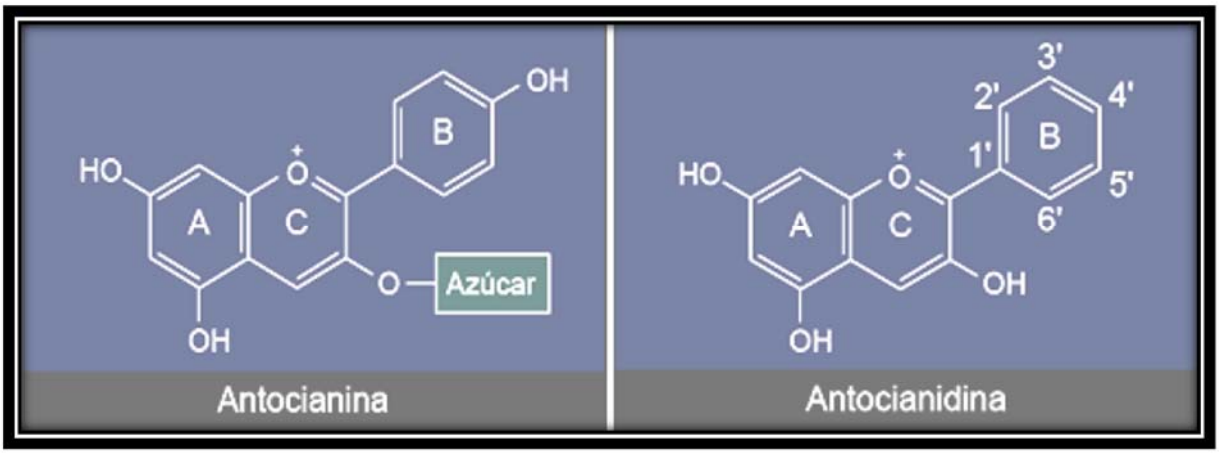


Figura 5. Estructura química de antocianinas y antocianidinas (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

En investigaciones realizadas en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro, se ha demostrado que el almacenamiento a bajas temperaturas de bulbos de ajo “semilla” incrementan la expresión de genes asociados a la síntesis de fenoles y antocianinas (Zavala-Gutiérrez, 2011) y también se ha demostrado que este almacenamiento también incrementó el contenido de fenoles y antocianinas totales (Dufoo-Hurtado

et al., 2013); lo cual podría representar una ventaja a la planta para superar el ataque de microorganismos en campo.

2.1.5. Importancia económica del cultivo de ajo.

El mercado mundial de ajo ha crecido gracias a los cambios producidos en los hábitos de consumo. Se reconocen cuatro grandes centros de producción y consumo: el primero es el centro asiático, formado por China, India, Indonesia, las dos Coreas y Tailandia que producen el 89.15% del ajo del mundo; seguido por el centro europeo integrado por España, Francia e Italia (a los que se agregan Egipto y Turquía por su proximidad geográfica) que aportan el 4.29% de la producción mundial: el tercer grupo está conformado por África con 3.14% y finalmente América cuyo aporte es 3.41%, de esta cantidad Brasil, Argentina y Chile, producen alrededor del 1.5% (FAOSTAT, 2011).

Considerando los volúmenes de producción a nivel mundial durante los últimos años, ésta se ha incrementado en los países asiáticos, en tanto que hay una notable disminución en los países de América del Sur, con un rendimiento promedio de 13958 kg. ha^{-1}.

Para el año 2011, México ocupó el 21° lugar con una producción de 58,065 ton. Por su calidad el ajo mexicano es muy apreciado en el extranjero, prueba de ello es que México es el 6° país exportador de ajo a nivel mundial (12,526 ton) lo cual le generó ganancias de $ US 13"297,000 (FAOSTAT, 2011).

La producción de ajo en México se destina en un 68% al mercado interno, 22% a la exportación en fresco y 10% restante se destina para "semilla" y uso industrial. Se estima que el consumo de ajo en México es de 400 g/año per capita (Macías-Valdez *et al*., 2007).

El principal país productor de ajo en el mundo es China (13, 664, 069 de toneladas), seguido por India (833.970 toneladas) y la República de Corea (271.560 toneladas), desplazando a países como España (Flaño-Ipinza, 2012). En México, se cultivan dos tipos de ajo: los morados, con sus variedades (Chileno, Criollo Original, Napuri, Massone, Positos y Taiwán) y los ajos blancos (Criollo de Aguascalientes, Blanco de Zacatecas, Blanco de Durango, Blanco de Ixmiquilpan y Pro Bajío). Los estados productores más importantes en México son Zacatecas que aporta el 49%, seguido de Guanajuato con el 20% y Baja California con 9.8% (Figura 6).

La geografía productiva del ajo en nuestro país está bien definida, no sólo por las regiones que lo componen, sino también por el tipo de ajo que se produce; en la zona del Bajío-Centro que abarca los estados de Guanajuato y Querétaro se produce ajo del tipo morado que se siembra entre los meses de Septiembre a Octubre, a fin de cosechar durante el periodo de febrero a mayo. La zona Centro-Norte, que abarca a los estados de Aguascalientes y Zacatecas, se dedican a la producción de ajo del tipo blanco, el cual se siembra en Octubre y Noviembre y se cosecha en los meses de Mayo a Junio (Lagunes, 2009).

Del total de la producción anual de ajo, aproximadamente el 63% se destina al consumo interno en fresco, mientras que el 10% es utilizado para la industria en la obtención de aceites, polvo, saborizantes, medicamentos, etc., y el 27% restante se destina a la exportación (Lagunes, 2009).

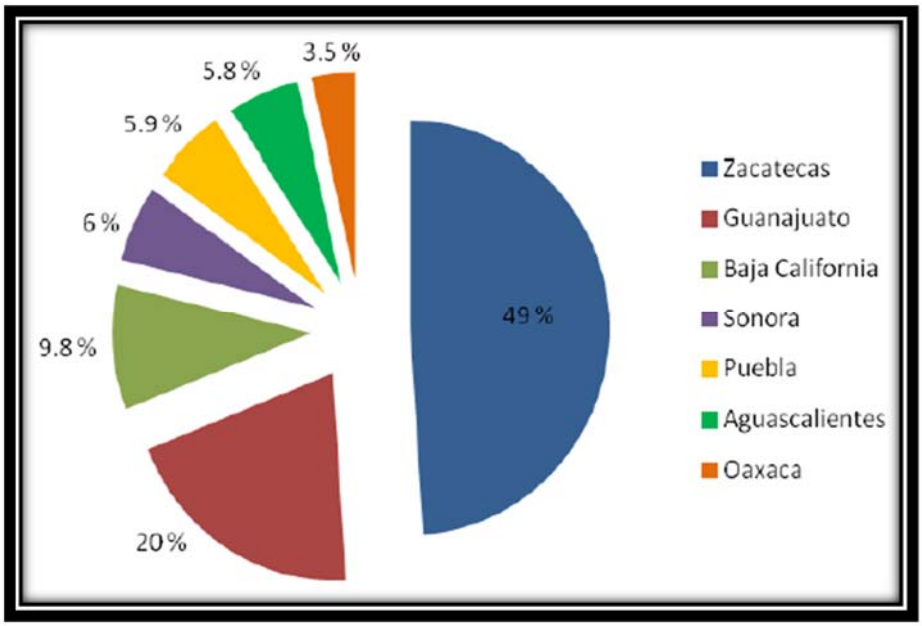


Figura 6. Principales estados productores de ajo en la República Mexicana (SIAP, 2011).

2.1.6. Generalidades del cultivo.

La siembra del ajo en la zona del Bajío es una actividad que ha tendido a mecanizarse; se considera que la siembra mecánica es la forma más común, haciéndose a través de máquinas sembradoras específicas para el ajo, lo que permite reducir de 4 a 6 veces el tiempo requerido para la siembra comparado con los métodos manual y semi-mecanizado; los que son utilizados en extensiones de superficies pequeñas y medianas, y que a pesar de no ser generalizados, aún están presentes en la región (Lagunes, 2009). No obstante, en esta región se ha regresado a la siembra manual debido a que los tiempos de emergencia de las plantas son mayores cuando la siembra es mecánica.

Por ello se demanda una gran cantidad de mano de obra en la siembra y cosecha, la primera operación que es el aflojado se hace de forma mecánica; las actividades siguientes como es arrancar las plantas y acomodarlas en el lomo del surco para taparlas con un poco de tierra y con el mismo follaje (enchufado), se realizan a mano. La labor de enchufado es fundamental, ya que se considera que evita que los ajos se decoloren, permitiendo que los bulbos se sequen y terminen de

madurar. El ajo se deja en estas condiciones durante un periodo de 8 a 15 días para posteriormente ser llevado a las empacadoras donde terminan de secarse a 60°C por unas horas (Lagunes, 2009).

2.1.6.1. Requerimientos del cultivo de ajo.

La capacidad del bulbillo o diente para transformarse en una planta completa está fuertemente influenciada por el ambiente. La brotación y emergencia de la planta, el crecimiento vegetativo, la bulbificación y diferenciación de los dientes, la senescencia de la planta y letargo o dormición de los bulbos son etapas del ciclo de desarrollo de este cultivo, cuyos requerimientos ambientales son marcadamente distintos entre diferentes variedades (Burba, 2003).

Un “diente” separado del bulbo “madre” recién cosechado es incapaz de brotar en condiciones ambientales normales debido al estado de letargo en que se encuentra. Este periodo de letargo es variable según los cultivares y las condiciones de almacenamiento de los bulbos (temperatura y humedad relativa del ambiente).

2.1.6.2. Termo periodo.

El ajo es una especie de cultivo otoño-invierno-primavera resistente a heladas. Llega a soportar inviernos rigurosos con una media mínima de -4.0 a -2.5°C y media máxima de 30°C, existiendo cultivares adaptados a un amplio rango de condiciones térmicas (Ávila, 2007). Este cultivo requiere clima de fresco a frío durante el desarrollo inicial y caluroso y luminoso cuando comienza a formarse el nuevo bulbo hasta su cosecha (Giaconi y Escaff, 1993).

El termo periodo es el principal factor climático durante el crecimiento de esta especie. Temperaturas medias mensuales por debajo de los 10°C son adecuadas para la etapa que va de la plantación a la bulbificación, combinadas con una disminución gradual del largo del día (Burba, 1992). Se consideran óptimos los registros térmicos entre 15 a 25°C desde la bulbificación hasta la cosecha, asociado

a días más largos. El termo y el fotoperiodo interaccionan para inducir la bulbificación, siendo más importantes las temperaturas que el fotoperiodo (duración del día) (Figura 7). Por tanto, el ajo requiere para su bulbificación cumplir con al menos dos requisitos (ambos variables según el cultivar): acumular determinadas horas de frío y crecer con días relativamente largos.

Evidencias experimentales muestran que cuanto mayor son las horas de frío acumuladas, menor es el requerimiento fotoperiódico y la bulbificación se induce con días de umbral más corto (Ávila, 2007). El periodo de tiempo necesario para inducir la bulbificación depende fundamentalmente de la variedad y puede variar entre uno y varios meses. Para el caso del ajo Coreano se requieren más de 550 h de frío (López- Hernández, 2010).

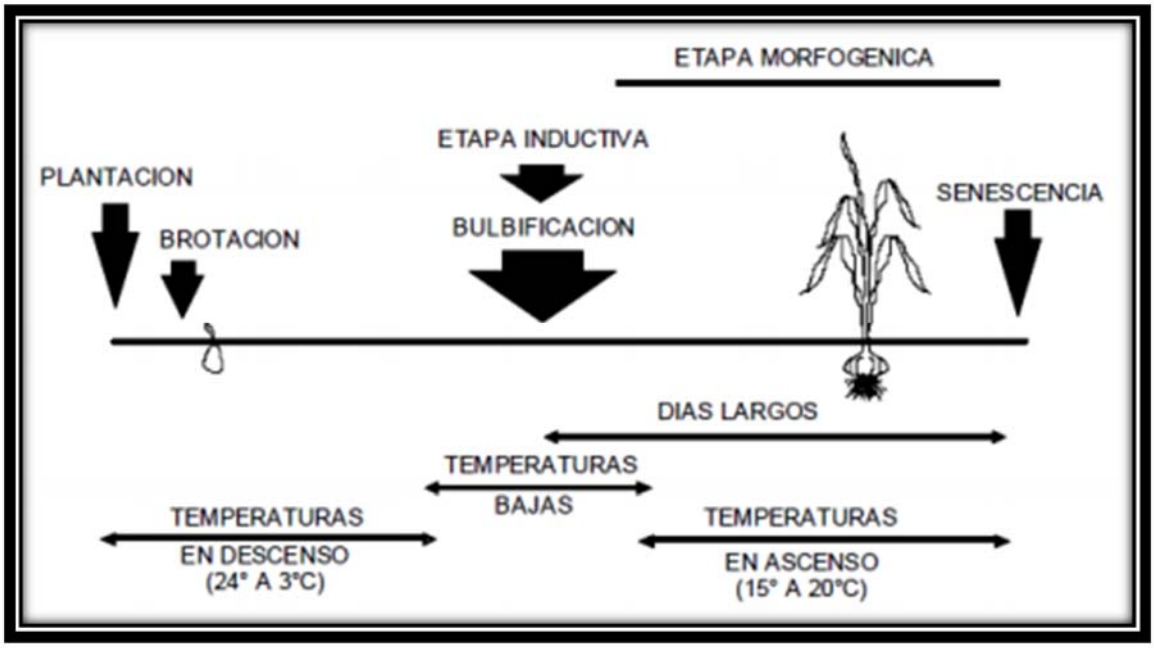


Figura 7. Requerimientos termoperiódicos del ajo durante su ciclo vegetativo (Burba, 2003).

La acción de las bajas temperaturas determina un comportamiento particular en relación a la altura alcanzada por las plantas antes de la bulbificación y aquella lograda al momento de la cosecha (Burba, 2003). A mayor duración del frío de pre-plantación se producen una mayor velocidad de crecimiento, expresada en altura de

planta/tiempo. Esta velocidad decrece considerablemente luego del inicio de la formación del bulbo (Ledesma *et al.,* 1997; Guevara-Figueroa *et al*., datos no publicados).

Rahim y Fordham (2001) estudiaron la bulbificación de ajo cv. “Bangladesh Local‟, en condiciones controladas de temperatura, encontrado que los rendimientos de plantas desarrolladas en condiciones de15°C/10°C (día/noche) fueron mayores que las plantas desarrolladas a temperaturas superiores a 20°C/15°C (día/noche). Además observaron que las plantas mostraban un desarrollo más lento en comparación con las desarrolladas a mayores temperaturas últimas (20/15°C).

2.1.6.3. Fotoperiodo.

Algunos componentes agronómicos de la luz, como son duración, intensidad y calidad, afectan de una u otra manera la calidad del producto a cosechar, alterando sus procesos fisiológicos (Ávila, 2007).

Rahim y Fordham (2001) sembraron “semillas” de ajo en tres distintas condiciones de fotoperiodo (8, 12 y 16 h de luz) observando que el inicio de la bulbificación fue más rápido en aquellas plantas con fotoperiodo de 16 h, mientras que los rendimientos fueron más altos con 12 h de luz. Además indicaron que con 16 h de fotoperiodo se redujo el tiempo requerido para la maduración del bulbo.

Por otro lado, la longitud de onda de luz dentro de la porción biológicamente activa (430 a 730 nm) puede ser un factor determinante en la inducción fotoperiódica. En condiciones controladas, bajo luz blanca artificial, longitudes de onda de 700 a 730 nm son esenciales para la formación de bulbos (Ávila, 2007).

Takagi y Qu, (1995) estudiaron la bulbificación de ajo *in vitro* y encontraron que dicho fenómeno se promovió con el uso de luz con longitudes de onda en el rojo-lejano (600-900 nm). Además observaron que los bulbos que se formaron más rápido

fueron aquellos desarrollados a partir de explantes de dientes sometidos a tratamientos de 5°C por 30 días y crecidos bajo un fotoperiodo de 16 h, por lo que concluyeron que tanto la fuente de luz como el fotoperiodo afectan fuertemente la morfogénesis *in vitro* de plántulas de ajo

El ajo es una especie que puede considerarse heliófila, ya que con condiciones de escasa intensidad lumínica, desarrolla un follaje excesivo y bulbifica con dificultad (Burba, 1992). Esto indica que para obtener bulbos grandes y bien formados como exigen los mercados de exportación, se deben presentar días cortos con menor intensidad de luz para que los "dientes semilla" broten y se desarrollen mientras que para inducir la bulbificación y crecimiento del bulbo se requieren días más largos; es decir, con intensidades lumínicas también mayores (Ávila, 2007).

2.1.6.4. Prácticas culturales de cultivo.

En cuanto al tipo de suelo, hay que considerar su profundidad y fertilidad, consistencia media, permeabilidad (buen drenado) y con una proporción equilibrada de nitrógeno, fósforo y potasio. Los suelos ligeros o sueltos y permeables, son los recomendados para evitar los encharcamientos de agua, ya que el ajo es muy susceptible a la podredumbre. Generalmente se obtienen altos rendimientos y buena calidad de los bulbos en suelos areno-arcilloso-calcáreos, fértiles, permeables y con buenas labores de preparación de suelo (Sarita, 1995). El ajo está clasificado como planta moderadamente tolerante a la acidez en un rango de pH de 5.5 a 7.0, siendo este un factor dependiente de la variedad. Para los ajos Coreanos el pH óptimo del suelo es 6.5. Por otro lado, los riegos deben controlarse de modo que las condiciones del suelo se mantengan durante todo el ciclo de cultivo, la forma de riego más común para este cultivo es por cintilla (Warade y Shinde, 1998).

Las fechas de siembra son otro factor importante, para el hemisferio norte las mejores fechas de plantación se encuentran entre Septiembre y Octubre aunque esto depende de los requerimientos climáticos de cada variedad.

Otro aspecto de suma importancia es el manejo sanitario tanto de la “semilla” como del cultivo a lo largo del ciclo, para reducir ataques por plagas o patógenos. Los principales hongos observados en los cultivos de ajo son: *Sclerotium cepivorum* que ocasiona la “pudrición blanca”, *Penicilium viridicatum* o *corymbiferum*, responsable de la “pudrición verde”, *Fusarium oxisporum* que provoca la “raíz rosada”, *Helminthosporium allii* o “carbonilla” y *Botritis allii* o “podredumbre gris del cuello”. La presencia de nematodos es un gran problema, siendo el nematodo de los bulbos *Ditylenchus dipsaci* el más importante (Ávila, 2007). Éste nemátodo es transportadoen los “dientes” que se emplean como semilla y puede subsistir durante largos periodos en estado de latencia entre las hojas envolventes de los bulbillos. Una planta de ajo infestada por nematodos pierde altura y gana grosor debido a la hipertrofia de sus tejidos, que se tornan esponjosos y poco consistentes.

2.1.6.5. Fertilización.

La respuesta a la aplicación de nitrógeno, fósforo y potasio está condicionada a los niveles edáficos. La planta de ajo extrae de forma diferencial los nutrientes existentes en el suelo, según la etapa fenológica en que se encuentre. Durante la primer etapa, al estar aun alimentándose a partir de las sustancias de reserva del “diente”, no absorbe prácticamente ningún nutriente. Motivo por el cual la efectividad de fertilizantes en formas muy solubles en pre-plantación o simultánea a ésta es escasa. El nitrógeno y potasio son absorbidos en cantidades mayores que otros nutrientes (Ávila, 2007). A pesar de que existen programas de fertilización, resulta complicado apegarse a ellos ya que el mismo depende de las características fisicoquímicas del suelo, de las condiciones climáticas, de los requerimientos del ecotipo, de la calidad del agua, etc.

Los macronutrientes nitrógeno, fósforo y potasio tienen una destacada importancia en el cultivo de ajo. El exceso de nitrógeno se manifiesta muchas veces ante la deficiencia de boro (< 5 ppm), que es el micronutriente más importante para el ajo. Produce además exceso de brotación en bulbillos recién formados, aun dentro

del bulbo (antes de la maduración). El fósforo acelera el crecimiento del follaje y promueve la diferenciación temprana del bulbo. En caso de deficiencia, el ciclo vegetativo tiende a alargarse, el cuello se ensancha y las hojas inferiores se marchitan. El potasio influye en la producción y calidad de los bulbos, provocando un amarillamiento de las hojas más viejas (Sarita, 1995).

El nitrógeno es el elemento más extraído del suelo por el cultivo de ajo. La mayoría de los trabajos señalan que el ajo responde a la fertilización nitrogenada en casi todos los suelos, aunque la magnitud de la respuesta estará condicionada por los niveles naturales de nitrógeno en el suelo. Lipinski y Gaviola de Heras (1997) realizaron un ensayo de campo en un suelo aluvial de Mendoza, Argentina. La respuesta del ajo “blanco” a la fertilización nitrogenada y fosfórica mostró un aumento en la producción del 45% (7.5 ton/ha de bulbos secos y limpios) con respecto al testigo no fertilizado cuando se utilizó una dosis de 140 kg de N/ha y 40 kg de P/ha. En otros ensayos realizados con ajo “blanco” con las mimas dosis de N-P y en condiciones de un mejor manejo de riego con respecto al anterior, se obtuvo un rendimiento de 11.8 ton/ha de ajo seco y limpio. De acuerdo a estos antecedentes los autores realizaron la recomendación de fertilizar el ajo “blanco” con 100 a 150 kg/ha de fosfato diamónico (DAP) y con 230 a 250 kg/ha de urea en suelo poco a medianamente provistos de N y P. Por otro lado dichos autores realizaron un ensayo con ajo “colorado” con el objeto de evaluar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno (urea, sulfato de amonio, sulfonitrato de amonio y nitrato de potasio) observando que no hubo diferencias significativas en rendimiento debidas a la fuente de nitrógeno pero sí a la dosis de aplicación, siendo 160 kg de N/ha la dosis recomendada para esa variedad de ajo.

2.1.7. Ciclo de desarrollo del cultivo.

Dado que la reproducción del ajo se realiza por vía agámica, cada bulbillo (módulo multiplicativo) será una copia fiel del individuo que le dio origen y su

desarrollo posterior como nueva planta estará fuertemente supeditado a las condiciones ambientales en las que transcurrió su ontogenia.

Durante un desarrollo normal de la nueva planta de ajo pasará por etapas fisiológicas sucesivas, estrictamente ligadas al nuevo ambiente imperante; por lo tanto, la probabilidad para que esta planta prospere en el medio en el cual fue situada, va estar dada por el efecto conjunto de los factores ambientales condicionantes actuales y anteriores.

En las zonas templadas donde se cultiva el ajo se planta desde mediados del verano o en otoño y se cosecha desde el comienzo hasta el final de la primavera, según la región y tipo de ajo considerado (Ledesma *et al.,* 1983).

Durante su ciclo de desarrollo, la planta de ajo presenta una primera etapa llamada de crecimiento vegetativo, en la cual los procesos metabólicos y fisiológicos de la planta están orientados a formar el sistema radicular y las hojas. Normalmente, esta etapa ocurre durante el otoño y gran parte del invierno. En ese período no hay desarrollo del bulbo ni del escapo floral. La emisión y alargamiento de las raíces desde la base del diente es una de las primeras manifestaciones del crecimiento luego de la plantación.

Paralelamente se produce el crecimiento de la hoja de brotación y de los primordios de hojas contenidos en la yema axilar ubicada en el interior de la hoja de reserva (Takagi, 1990). La primera etapa de crecimiento de la planta es dependiente de las sustancias liberadas por la hoja de reserva del bulbillo o diente. El crecimiento en las primeras semanas de desarrollo está directamente relacionado con la disminución del peso seco del diente madre.

El aporte de reservas por parte del diente se mantiene por mucho tiempo, aún después de que las plantas han emergido y se encuentran realizando

fotosíntesis. La etapa de crecimiento vegetativo se realiza en condiciones de días cortos y con temperaturas en paulatino descenso (Recca *et al*., 1981).

Desde el punto de vista vegetativo, la etapa de brotación se ha definido como la emergencia de las raíces y primeras hojas a expensas de las sustancias de reserva del "diente", diferenciado potencialmente durante la poscosecha (Argüello *et al.,* 1997). Luego de la emergencia de las hojas, comienza la etapa de crecimiento de la masa foliar, la cual se puede evaluar mediante diferentes variables como número de hojas, altura de la planta, materia seca, y sus interrelaciones (Ledesma *et al.,* 1997).

La temperatura de almacenaje de los bulbos antes de la siembra afecta la velocidad de germinación del diente luego de la misma, así como el vigor de crecimiento y la forma de la planta (Del Pozo *et al.,* 1997). Algunos cultivares almacenados a 20°C o más retrasan la germinación y crecen lentamente después de este proceso, mientras que los bulbos almacenados a 5 y 10°C germinan rápidamente y producen plantas con hojas anchas y buen cuello (Argüello *et al.,* 1997).

Los factores que afectan el desarrollo y duración del crecimiento del área foliar y de las raíces, tendrán una influencia decisiva en el rendimiento final del cultivo. La inducción y el desarrollo del bulbo y el escapo floral requieren del cumplimiento de una etapa de vernalización (bajas temperaturas) seguida de fotoperiodos largos (Rahim y Fordham, 2001).

Los ajos recién cosechados son incapaces de germinar para formar una nueva planta debido a que se encuentran en un periodo de letargo que depende de la variedad y temperatura de almacenamiento (Portela, 1996).

2.1.8. Bulbificación.

El periodo de crecimiento y bulbificación varía mucho entre años, fechas de siembra y localización, indicando una fuerte interacción genotipo-ambiente (Del Pozo *et al.,* 1997).

Con respecto a la formación del bulbo, Shah y Kothari (1997) afirman que es un procesos morfogénico en el cual las hojas de reserva, conocidas como dientes, se desarrollan de las yemas axilares de las hojas envainadoras, estableciéndose dos estados: una etapa inductiva controlada por bajas temperaturas y días cortos, y otra morfogénica cuantitativamente dependiente de las condiciones termo y fotoperiódicas.

La bulbificación comienza con el hinchamiento de la base de las hojas y luego con el llenado de los primeros dientes formados. Los dientes se desarrollan en las axilas de las hojas internas del follaje conforme avanza el desarrollo del bulbo. La bulbificación se puede caracterizar por un incremento en la relación del diámetro máximo del bulbo con respecto al diámetro mínimo del cuello del bulbo, ésta relación se denomina índice de bulbificación.

Portela y Cavagnaro (2005) elaboraron una gráfica-escala del desarrollo de plantas de ajo blanco y violeta (Figura 8) que integra las etapas más importantes del ciclo del cultivo (crecimiento de la parte aérea y del bulbo).

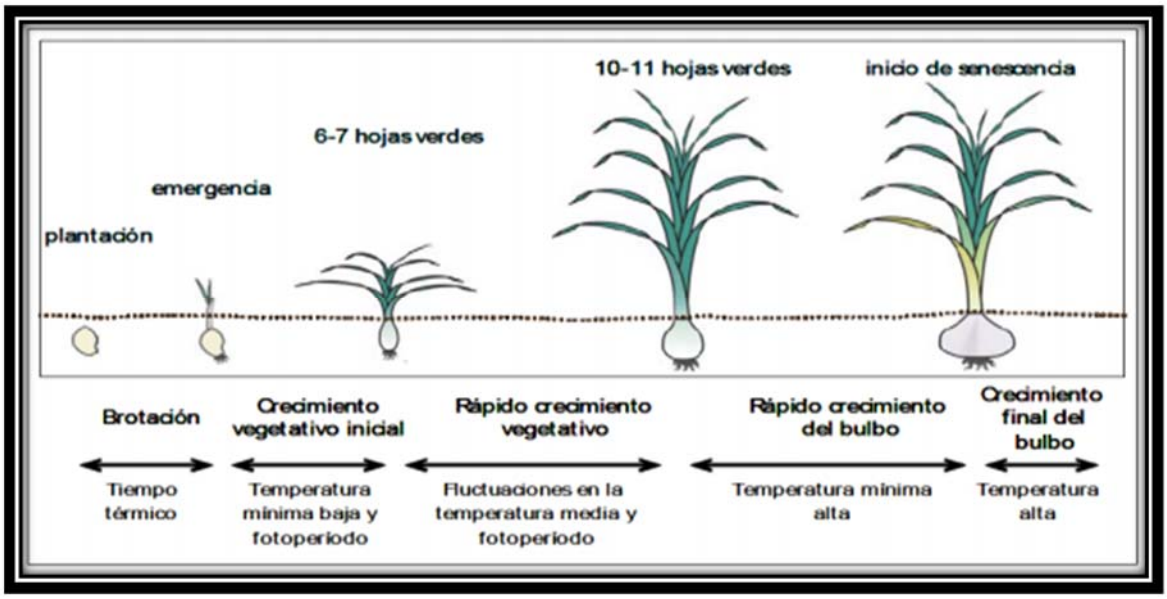


Figura 8. Etapas fisiológicas de ajo de tipo blanco y violeta. (Portela y Cavagnaro, 2005).

El crecimiento de los dientes está en función de la biomasa aérea producida y del aporte de los fotoasimilados, y puede ser evaluado por el incremento de la materia seca y el traslado de asimilados mediante un coeficiente de partición (Brewster, 2001). Diversos estudios fisiológicos en condiciones controladas han demostrado que el diente de ajo puede presentar diferentes grados de desarrollo, dependiendo de las condiciones ambientales de cultivo, el genotipo y el tamaño del diente “semilla” (Del Pozo *et al.,* 1997, Nuñez *et al.,* 1997, Huchette *et al.,* 2005).

La formación del bulbo de ajo es estimulada por la longitud del día, la temperatura y el espectro de luz. Los fotoperiodos largos y las altas temperaturas inmediatamente después de la siembra promueven la rápida diferenciación y formación de los primeros dientes antes de la ramificación axilar resultando en un bulbo con uno o pocos dientes (Del Pozo y González, 2005). Por el contrario, la formación de las yemas axilares se favorece con temperaturas bajas y fotoperiodos cortos después de la siembra, seguida de un incremento de éstos lo que promueve la diferenciación de las yemas y el desarrollo de un bulbo con muchos dientes (Ledesma *et al.,* 1997, Huchette *et al.,* 2005). Para ello tiene que ocurrir el rompimiento de la dormancia apical lo cual permite la formación de las yemas axilares

con la consiguiente diferenciación de varias hojas de almacenamiento que se transforman en dientes (Nuñez *et al.,* 1997, Shah y Kothari, 1997).

Al respecto, Del Pozo y González (2005) reportaron que todas las plantas de ajo chileno blanco formaron bulbos cuando el fotoperiodo estuvo sobre 14 h y la temperatura de almacenaje fue de 4 o 7°C, mientras que aquellas cultivadas con fotoperiodos de 8, 10 o 12 h, con cualquiera de las temperaturas probadas no bulbificaron. En experimento bajo invernadero, Del Pozo *et al,* (1997) trabajaron con 13 clones y encontraron que el almacenaje de los bulbos a 4°C durante 4 semanas redujo el tiempo desde la siembra hasta la emergencia de los brotes en todos los clones, mientras que el almacenamiento a 12-15°C retrasó este proceso y solo 3 de ellos formaron bulbos.

Cuando el bulbo "madura" (bulbo bien formado y llenado), las hojas de cubierta más externas se secan, adelgazan y protegen al bulbo, a estas hojas se les denomina túnicas o catáfilas u hojas protectoras. Ya que las hojas afiladas dejan de formarse en las hojas internas del bulbo, el pseudotallo queda vacío, los tejidos de la cubierta en la región media del cuello se ablandan y pierden turgencia ocasionando la senescencia y la caída del follaje. Esta caída de follaje, es un indicador útil de la "madurez" del bulbo y por tanto un índice de cosecha (Brewster, 1994).

2.1.9. Factores físicos involucrados en la bulbificación.

Se ha señalado que la planta necesita acumular una cierta cantidad de horas frío (> 550 h a 5°C) para diferenciar las yemas axilares en dientes y formar el bulbo (Figura 9). Una vez plantados, los dientes que están expuestos a temperaturas entre 5 y 10°C generan plantas capaces de desarrollar bulbos (García, 1998; Ávila, 2007). El periodo de tiempo necesario para que el proceso tenga éxito depende fundamentalmente de la variedad y puede durar entre uno y varios meses.

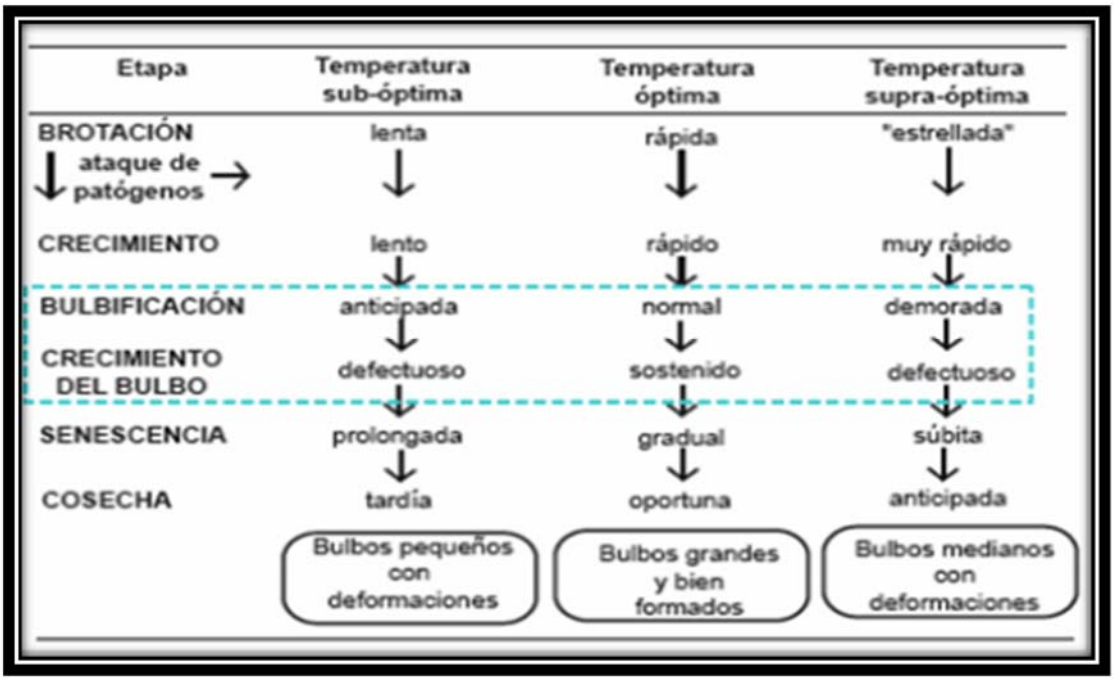


Figura 9. Efecto de la temperatura en el cultivo de ajo (Ávila, 2007).

La luz natural ejerce un papel muy importante en la formación del bulbo bajo sus modalidades de fotoperiodo e intensidad luminosa (Figura 10). En un estudio del efecto de la sombra y condiciones ambientales en la iniciación y desarrollo de dientes de ajo cv. “Bangladesh‟ y “Fructidor‟, se reportó que la tasa de diferenciación y desarrollo de dientes de ajo varió entre 90 días a condiciones de 100% de luz y 140 días con 25% de luz, es decir, la diferenciación es directamente proporcional al aumentó la transmisión de luz (Rahim y Fordham, 1990).

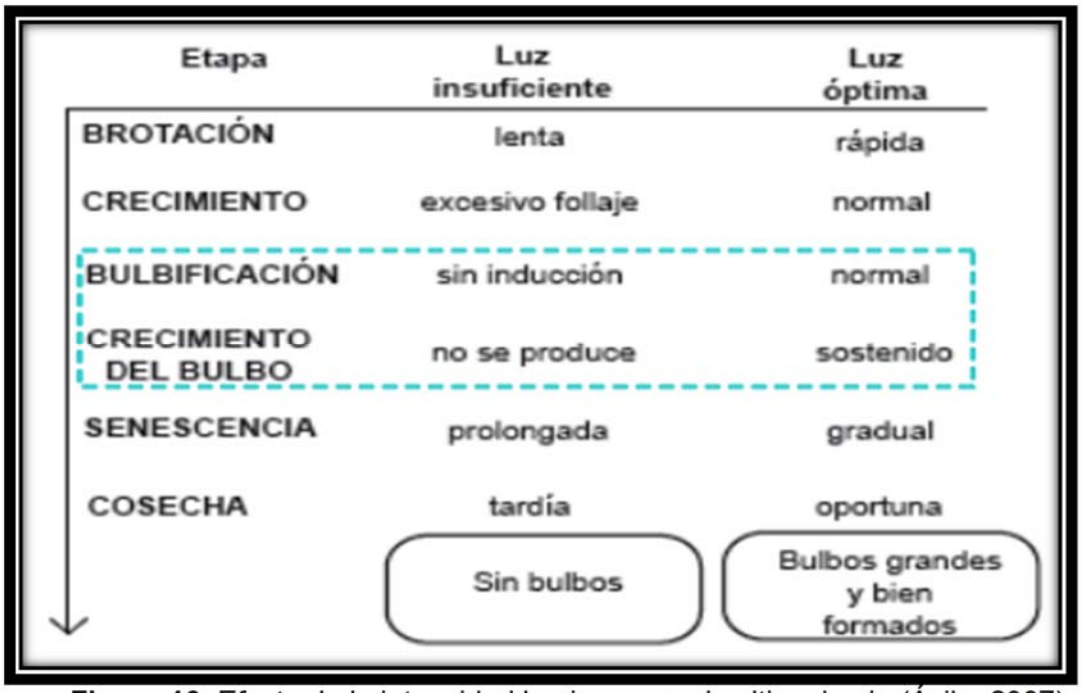


Figura 10. Efecto de la intensidad luminosa en el cultivo de ajo (Ávila, 2007).

2.1.10. Factores bioquímicos que afectan la bulbificación.

2.1.10.1. Giberelinas GAs.

Las giberelinas son fitohormonas naturales sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces y en semillas en desarrollo (Rademacher, 2000). Se encuentran en diferentes concentraciones, dependiendo de las etapas de desarrollo de las semillas, ya sea en letargo o no. Actúan a lo largo del ciclo de vida de las plantas teniendo influencia en la germinación de semillas, promoción del crecimiento longitudinal, elongación del tallo, inducción de flores, desarrollo de anteras, crecimiento de semilla y pericarpio; y la promoción de formación y desarrollo del fruto (Hedden y Kamiya, 1997).

Se han identificado 136 diferentes giberelinas en las plantas superiores y hongos. Solo un pequeño número de ellas poseen una actividad biológica, mientras que la mayoría son precursores o metabolitos de la propia ruta de síntesis (Thomas *et al.,* 2005).

La molécula básica de las diferentes formas de giberelinas, es un diterpenoide tetracíclico (Figura 11). De acuerdo a la nomenclatura, este sistema se conoce como ent-giberelano. Las giberelinas se clasifican en dos grupos, las giberelinas de 20 carbonos (C_{20}), las cuales poseen el esqueleto diterpenoide completo y las giberelinas C_{19}, en las cuales el C_{20} ha sido reemplazado por un anillo γ-lactona. Éstas últimas son las que presentan mayor actividad biológica siendo GA_1, GA_2, GA_3, GA_4, GA_7 y GA_9 las más importantes (George, 2008).

La brotación y el letargo en *Allium* parecen estar bajo control de una compleja interacción de promotores e inhibidores endógenos de crecimiento, algunos de los cuales han sido aislados e identificados (Brewster, 1986).

Rakhimbaev y Ol´shanskaya (1981) reportaron un incremento en la actividad de las GAs al comparar ajos en estado de letargo con otros cuyo proceso de brotación estaba adelantado. Estos autores indicaron la posibilidad de que las GAs se encontraran preformadas ligadas a un azúcar y que, probablemente, éstas solo pasaban de un estado inactivo (ligadas) a activo (libres) durante el rompimiento del letargo.

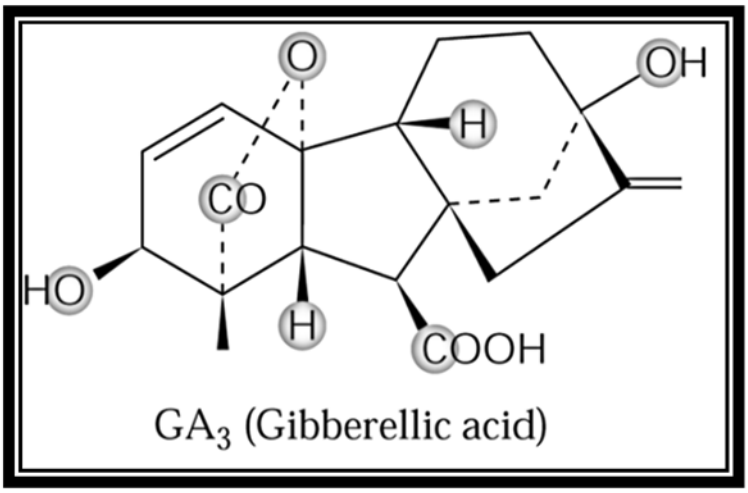


Figura 11. Estructura del ácido giberélico.

2.1.10.2. Biosíntesis de GAs.

La biosíntesis de las giberelinas se puede producir en muchas partes de la planta, pero especialmente en partes aéreas de crecimiento activo tales como tejido embrionario, meristemático o de desarrollo. Aparentemente se desplazan pasivamente en el flujo de transporte, ya sea por el floema o por el xilema (George, 2008).

La biosíntesis de giberelinas está regulada por un sistema de retroalimentación, es decir, que la oxidación del kaureno en las primeras etapas de la ruta es inhibida por las mismas giberelinas (George, 2008).

Esta ruta puede ser separada en tres etapas de acuerdo con la naturaleza de la enzima involucrada y su localización dentro de la célula, las terpeno ciclasas actúan en los protoplástidos, las mono-oxigenasas están asociadas con el retículo endoplásmico y las dioxigenasas se encuentran localizadas en el citosol (George, 2008).

La ruta general de biosíntesis de giberelinas ocurre a partir del ácido mevalónico y por una serie de reacciones de fosforilación y descarboxilación se obtiene el ent-kaureno, que se oxida a aldehído GA_{12}, el cual se considera el primer intermediario específico para la síntesis de GAs. Por último el aldehído GA_{12} es oxidado nuevamente por mono o dioxigenasas para formar diferentes GAs (Figura 12).

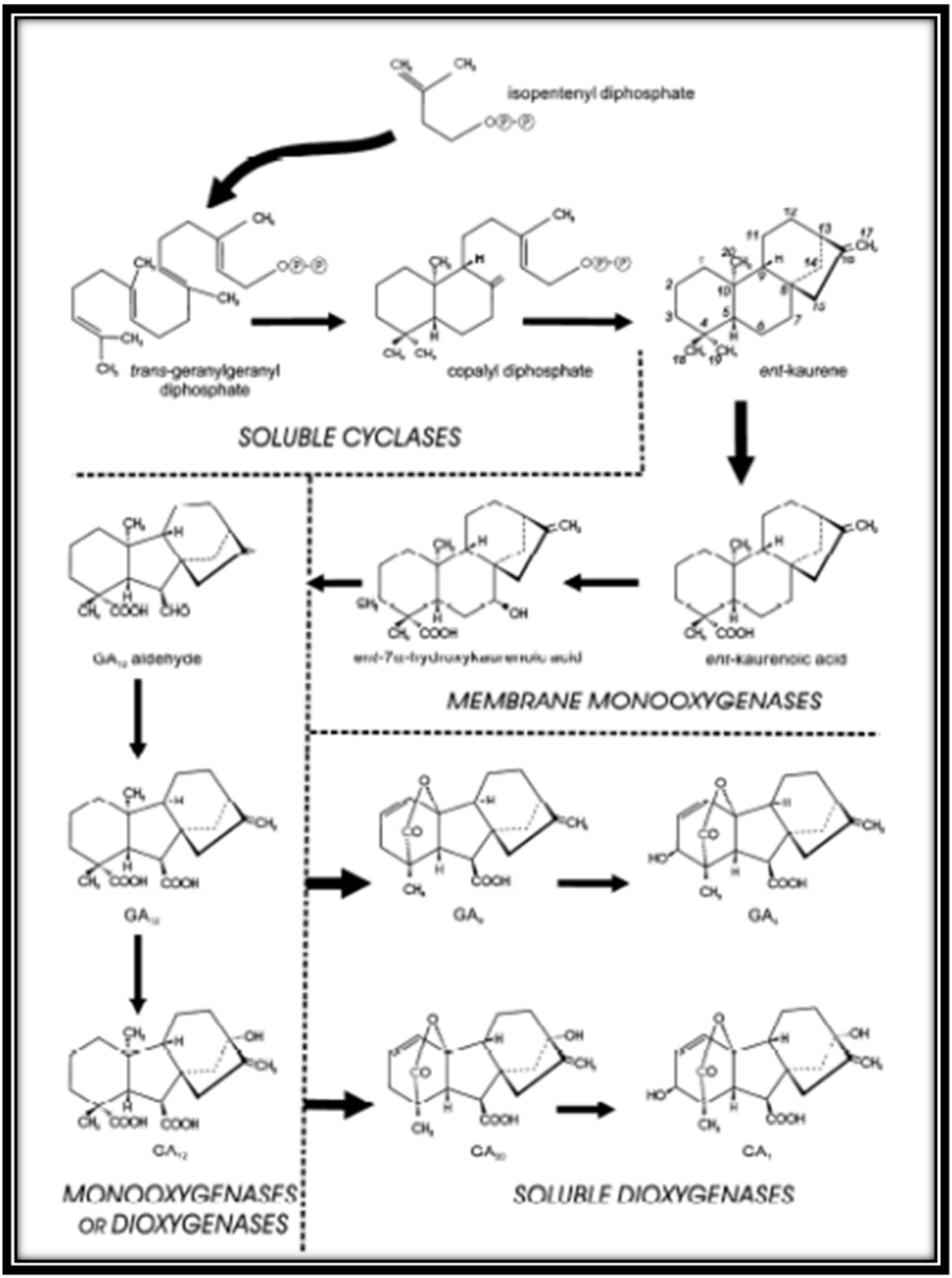


Figura 12. Ruta de biosíntesis de giberelinas (George, 2008).

2.1.10.3. Las giberelinas y su relación con la bulbificación.

Las GAs juegan un papel clave en los procesos de formación de órganos de almacenamiento. La formación de bulbos se considera un proceso morfogénico influido por hormonas al igual que el desarrollo de tubérculos, donde se considera que es esencial una reducción en los niveles de GAs (Jakson *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003). Se ha comprobado que la tuberización se retrasa con la aplicación de GAs y se promueve utilizando retardantes de crecimiento que inhiben su biosíntesis (Jakson *et al.*, 2000), confirmando que este proceso es controlado por una adecuada relación de esta fitohormona (Achard *et al.*, 2006).

En el caso de *Allium*, se ha determinado que la bulbificación de cebolla (*Allium cepa* L.) está controlada por el fotoperíodo y los niveles de GAs (Yamaguchi *et al.*, 2008). Estos autores reportaron que las GAs estabilizan los microtúbulos y actúan de manera opuesta al estímulo del día largo, lo cual redujo el número de los microtúbulos y alteró su orientación transversal, sugiriendo una acción en contra del proceso de formación del bulbo.

Kim *et al.*, (2003) encontraron que la adición de GA_3 al medio suprimió significativamente la formación de los dientes en ajo *in vitro*, por lo tanto sugieren que este proceso puede ser alterado por el desbalance de los reguladores de crecimiento utilizados para inducir la formación del bulbo.

Los sistemas de biosíntesis *in vitro* han sido usados para identificar el punto de interacción de los inhibidores en la ruta de síntesis de GAs (Rademacher, 2000).

Diversos estudios han demostrado la presencia de GAs en extractos metanólicos de ajo cvs Taiwán (López, 2004), Chino (Meza-Hernández, 2005), , Retinto (Utrilla-Vázquez, 2008), Coreano (Rodríguez-Lerma, 2013). Vázquez-Barrios, (2005) determinó dos fracciones que mostraron un espectro similar al de los estándares comerciales de GAs (GA_3, GA_4, GA_7 y GA_9), denominándolas F_2 y F_3 con un tiempo de retención de 24,6 min y 25,6 min, respectivamente. Para estas

fracciones ha sido demostrada su actividad de giberelinas mediante un bioensayo con semillas de trigo desembrionados (Vázquez-Barrios, 2005; Rodríguez-Lerma, 2013).

Aunque se han observado correlaciones negativas del contenido de GAs en el tejido de ajo con el desarrollo del bulbo (Utrilla-Vázquez, 2008), no se ha establecido como este patrón de correlación cambia por efecto del almacenamiento de los dientes “semilla” a bajas temperaturas y como a su vez cambian las relaciones de crecimiento de la planta con la susceptibilidad a las enfermedades.

2.2. Pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.).

La enfermedad conocida como pudrición blanca (Figura 13) representa la principal amenaza para los cultivos de ajo y cebolla en los estados de Zacatecas y Aguascalientes. De acuerdo con algunos reportes la enfermedad se registró en Zacatecas desde inicios de la década de 1990; desde entonces, los esclerocios que provocan la enfermedad se han encontrado en más del 90% de las parcelas agrícolas que se pueden destinar a la producción de ajo y/o cebolla tanto en Zacatecas como en Aguascalientes aunque la densidad de esclerocios en cada una de ellas es variable (Reveles-Hernández *et al*., 2009; Velásquez-Valle *et al*., 2011). La enfermedad se caracteriza por mostrar un moho blanco alrededor y encima del bulbo, ocasionalmente sobre las raíces y cuello en las plantas, que después de cierto tiempo, aparecen pequeñas esferas negras y rugosas, de alrededor de 0.3 a 0.55mm de diámetro conocidas como esclerocios. Éstas esferas son las estructuras de resistencia y diseminación del hongo, las cuales le sirven para diseminarse dentro de una parcela a grandes distancias y a través de varios ciclos de cultivo (Reveles-Hernández *et al*., 2009).

Los esclerocios tienen la función de garantizar la sobrevivencia del hongo por largos periodos de hasta 10 años o más, aun en ausencia de los cultivos como ajo y cebolla que producen compuestos volátiles y solubles en agua, que estimulan

la germinación de estas estructuras, aunque estén a 10 cm de distancia. Las condiciones óptimas para la germinación de estos es mayor con temperaturas entre 14 y 18°C, siempre que se tengan bajos contenidos de humedad en el suelo, cercanos a 15%. El desarrollo óptimo de la enfermedad se asocia con temperaturas entre 17 y 20°C (Reveles-Hernández *et al*., 2009).

Las plantas enfermas pueden arrancarse fácilmente porque carecen de raíces, detienen su crecimiento y se tornan amarillentas. Las hojas basales son las primeras en manifestar el amarillamiento. La presencia de micelio blanco con aspecto algodonoso es un síntoma inicial, que se observa encima y alrededor de los bulbos. En las parcelas infestadas, la enfermedad forma manchones que crecen y avanzan en dirección del agua de riego (cuando se aplica riego por gravedad); en ellos las plantas del centro del manchón son las primeras en morir.

El hongo se transmite mediante los bulbos y dientes de las plantas enfermas, usadas como semilla. Otra manera de dispersión es mediante el agua de riego, así como la maquinaria, herramientas, calzado e implementos usados en parcelas contaminadas (Reveles-Hernández *et al*., 2009).

Figura 13. Plantas de ajo con pudrición blanca.

2.2.1. Importancia económica y distribución de la enfermedad.

La pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk, es una de las enfermedades más importantes y destructivas de las plantas del género *Allium*, ya que ocasiona pérdidas tanto en la calidad y como en el rendimiento de estos cultivos. Esta enfermedad se reportó por primera vez en cebolla en el Reino Unido en 1841 y en ajo en Italia en 1909, causado grandes pérdidas en ambos cultivos en muchas regiones de Europa, Asia, África, América del Norte, América Central, América del Sur, Australia y Nueva Zelanda (APS, 1995).

2.2.2. Clasificación taxonómica del fitopatógeno.

Sclerotium cepivorum Berk, está incluido taxonómicamente dentro de la clase Deuteromycetes, en el Orden o Grupo Especial Micelia Sterilia, el cual ha sido denominado como Orden Aganomycetales (Myceliales), *Athelia* ha sido señalado como el estado perfecto de *Sclerotium* (Agríos, 2006). Actualmente sólo se conoce la reproducción asexual de *S. cepivorum*, en algún tiempo durante su evolución pudo haber presentado un ciclo sexual, además estudios de DNA sugieren que está relacionado con *Sclerotinia sclerotiorum* (Ascomicete), correspondiendo a un miembro asexual de la familia *Sclerotiniaceae*.

2.2.3. Características morfológicas, fisiológicas y estructurales.

S. cepivorum sobrevive en el suelo en forma de esclerocios en estado latente, los cuales pueden permanecer viables en ausencia de plantas hospedantes hasta por 40 años. La germinación de estas estructuras de resistencia es estimulada por compuestos de azufre (sulfóxidos de alquenilo y alquilo) presentes en los exudados radicales de especies de *Allium* (Coley-Smith, *et al*., 1987). El hongo emite micelio abundante de color blanco, velloso y ramificado; además de esclerocios, en ocasiones produce también conidios en esporodoquios, pero no forma esporas funcionales conocidas (Agríos, 2006; APS, 1995), aunque presenta pequeños espermacios semejantes a phialosporas que han sido producidos en agar-agua (APS, 1995). Se considera que estas estructuras se forman durante condiciones

ambientales especiales en laboratorio o son extremadamente raras en la naturaleza y por lo tanto son de poco valor en el diagnóstico del hongo (Agríos, 2006).

Las estructuras reproductivas, los esclerocios, son uniformemente redondeados y miden de 0.25 a 0.6 mm de diámetro, aunque se han señalado esclerocios más grandes y de forma irregular (APS, 1995). Muchos de los hongos contienen quitina en su pared celular, en un rango que va del 22 al 40% Muzzarelli, 1977 citado por Gohel *et al*., 2006, menciona que esta característica es importante como criterio para su clasificación taxonómica al igual que la presencia de otros polisacáridos.

La pared celular de los hongos filamentosos está compuesta principalmente por diferentes polisacáridos de acuerdo a su grupo taxonómico (quitina, glucano, proteínas, manosa, quitosan, ácido galacturónico o celulosa), juntos o en pequeñas cantidades de proteínas y glicoproteínas (Kavanagh, 2005).

2.2.4. Síntomas de la enfermedad.

Los esclerocios de *S. cepivorum* producen micelio en respuesta a los exudados radicales de las plantas del genero *Allium*; después de la penetración de la epidermis de la raíz, *S. cepivorum* invade inter e intracelularmente el parénquima cortical causando la degradación extensiva del tejido (Metcalf y Wilson, 2001). *S. cepivorum* produce la fitotoxina ácido oxálico e isoenzimas degradadoras de pectinas, de poligalacturonasas (PGs) y pectinesterasas (PEs). No está claro como ocurre, con las cuales se expanden algunos milímetros más allá de la hifa de infección, mismos que se asocian con la desintegración extensiva de tejidos corticales. La epidermis adyacente y el tejido estelar permanece intacto (Metcalf y Wilson, 2001). La zona de células muertas y debilitadas en la vía de infección de hifas es protegida del suelo por la epidermis intacta, la cual provee a las hifas de un claro y seguro camino para infectar la base del bulbo (Metcalf y Wilson, 1999).

Las hojas más viejas de las plantas de ajo o cebolla que se infectan por este hongo toman una coloración café y van muriendo hasta que solo quedan vivas las hojas más jóvenes de la planta que muestran una coloración verde opaco. En este punto las envolturas externas del bulbo de las plantas enfermas han sido colonizadas por el algodoncillo del hongo y los esclerocios que se produjeron entre el algodoncillo se encuentran listos para ser liberados al suelo donde podrán permanecer viables hasta 40 años aun cuando no se planten ajos o cebollas durante ese tiempo (Velásquez-Valle *et al*., 2011).

Velásquez-Valle *et al*., 2011 han mencionado que la persistencia de los esclerocios no es afectada por la acidez o alcalinidad (pH), estado nutricional o suplementación inorgánica del suelo. Las plantas enfermas son capaces de retener los esclerocios unidos al bulbo por un periodo corto; al secarse las envolturas del bulbo donde se encuentran adheridos serán fácilmente liberados hacia el suelo. Bajo condiciones óptimas de desarrollo de la enfermedad (temperaturas relativamente bajas), los esclerocios del hongo germinan y producen cordones miceliales que avanzan hacia la planta del ajo para iniciar la infección en la raíz o en el tallo; un bulbo de cebolla puede ser completamente colonizado en un periodo de cinco a siete días.

La naturaleza del ataque de *S. cepivorum* combina la acción de compuestos químicos y factores físicos sobre el tejido de la raíz o tallo. Se ha reportado que la destrucción de los tejidos de las plantas de cebolla colonizados por este hongo se debe a la acción combinada de ácido oxálico y enzimas como la endopoligalacturonasa. La concentración de ácido oxálico se incrementa hasta 3.3 mg por gramo de peso seco de tejido de cebolla por lo que se considera que esta sustancia está involucrada en la patogenicidad del hongo (Velásquez-Valle *et al*., 2011).

La distribución de los esclerocios en suelos infestados por primera vez es aleatoria, se requieren varios ciclos de siembras continuas con cultivos del género

Allium para que los esclerocios se dispersen de manera uniforme en todo el suelo. La actividad del patógeno se incrementa a medida que las raíces se desarrollan; cuando esto ocurre y además cuando hay un suministro adecuado de agua en el follaje, los síntomas foliares pueden no ser evidentes aunque el patógeno se encuentre activo (Entwistle, 1990). Después de que el patógeno crece sobre el cuello del tallo o el bulbo, se hacen evidentes los síntomas de amarillamiento prematuro y muerte de las hojas viejas, además de la detención del crecimiento, seguido por la muerte de las hojas; las plantas pueden morir en grupos de 2 a 40, muriendo primero las plantas del centro. Un signo temprano de la enfermedad es la aparición de abundante micelio en el cuello del tallo, extendiéndose alrededor de la base del bulbo; en los tejidos infectados se forman masas abundantes de esclerocios (APS, 1995). En la figura 14 se muestra el ciclo de vida de *S. cepivorum.*

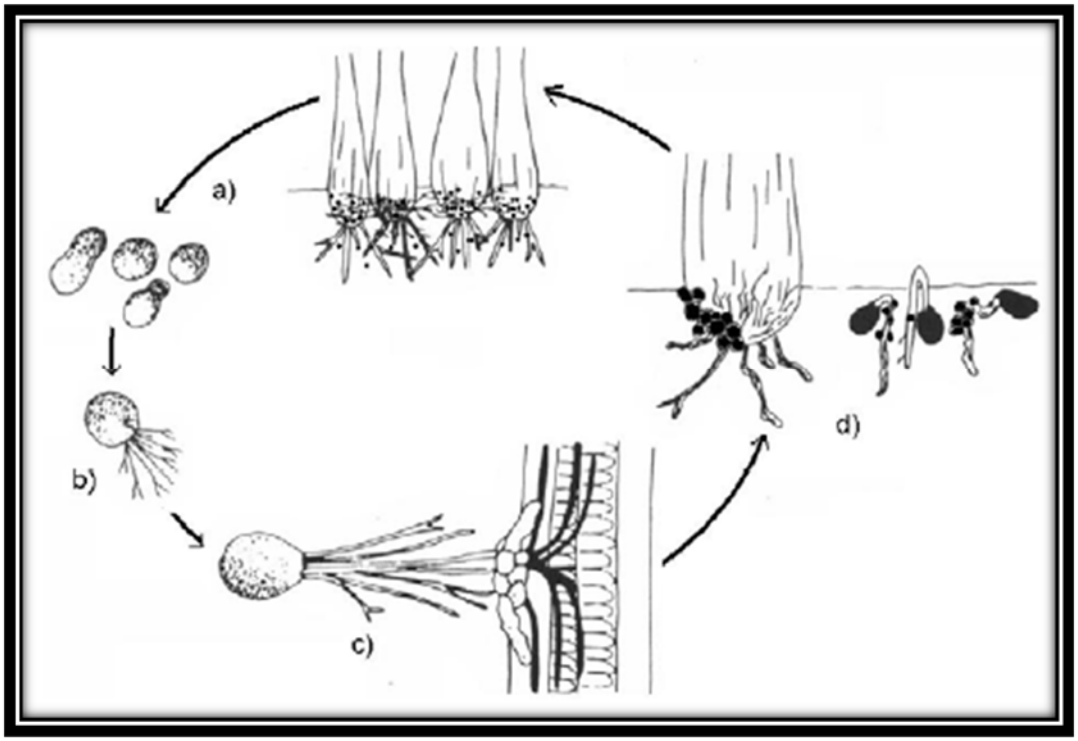


Figura 14. Representación esquemática del ciclo de desarrollo de *S. cepivorum*, en donde se muestran los procesos de diferenciación, germinación y formación de esclerocios. a) Los esclerocios son esparcidos durante la cosecha permaneciendo en el suelo por muchos años, b) y germinan en presencia de exudados radicales de especies *Allium*. c) El micelio invade las raíces en cualquier etapa del crecimiento. d) El micelio es esparcido a las plantas vecinas formando más esclerocios.

2.2.5. Manejo y control de la enfermedad.

S. cepivorum se caracteriza por su alta capacidad de reproducción, elevada densidad de inóculo en suelos infestados y gran longevidad de los esclerocios ya que pueden permanecer viables en el suelo hasta por 40 años en ausencia del tejido del hospedante (Coley-Smith *et al*., 1990; Entwistle, 1990; Velásquez-Valle *et al*., 2011) lo cual lo hace que sea de difícil manejo y sólo es necesario un esclerocio por kg de suelo para una incidencia de 50% de la enfermedad (Crowe *et al*., 1980).

En México hay una carencia de medidas de protección efectivas contra dicho patógeno, y esto representa un riesgo potencial en el incremento del daño en futuras plantaciones de especies del género *Allium.* Algunos de los métodos que se utilizan para el control de la pudrición blanca se han enfocado a destruir los esclerocios antes de la siembra, y otros como son los fungicidas a abatir su crecimiento cuando ha iniciado el ataque al cultivo (Pérez-Moreno *et al*., 1998). Los intentos del combate químico son ineficientes, quizás porque algunos de los fungicidas son de baja estabilidad en el suelo; además de que el hongo ha originado cepas de resistencia a algunos de los productos más comúnmente empleados, incluyendo la variabilidad de resultados con los fumigantes de suelo (Pérez-Moreno *et al*., 2004).

Algunas de las prácticas de manejo que se han aplicado para reducir la enfermedad incluyen el uso de fungicidas como el Tebuconazole, la aplicación al suelo de aceites sintéticos de *Allium*, la rotación de cultivos, la inundación del suelo, la aplicación de compostas, el acolchado, la incorporación de residuos de crucíferas, la aplicación de vermicomposta, la incorporación de antagonistas al suelo, la aplicación de micorrizas y la solarización (Ulacio *et al*., 2003).

De acuerdo con los antecedentes mencionados, este trabajo se enfocó a generar información sobre la relación entre el contenido de compuestos fenólicos y el posible grado de infestación de *Sclerotium cepivorum* en ajo tolerantes a la enfermedad (‘Perla’) y susceptibles como el ‘Coreano’ sometidos a condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas inductoras de la producción de fenoles.

En la región productora de ajo de Aguascalientes se sabe que el ajo cv Perla es tolerante a la pudrición blanca pero no se ha informado que factores e su composición (una posible mayor contenido de fenoles) podrían contribuir a generarle esa tolerancia. Por otro lado, se ha observado que la incidencia de esta enfermedad no se presentó en los ajos del cultivar 'Coreano' generados a partir de bulbos "semilla" almacenados a 5°C y que además este tratamiento induce una mayor síntesis de compuestos fenólicos los cuales podrían también inducir una tolerancia a la enfermedad en esta variedad. También es posible que el adelanto del ciclo de cultivo debido al efecto del almacenamiento refrigerado podría cambiar las relaciones huésped patógeno dificultando el ataque del hongo a las plantas del ajo 'Coreano'.

III. JUSTIFICACIÓN

La pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* es una de las enfermedades más importantes que ataca a las especies *Allium* causando graves daños a las zonas de producción de ajos morados del país. Por ello es necesario buscar alternativas que permitan un mejor control de la enfermedad.

Se ha demostrado en el laboratorio de Fisiología y Bioquímica poscosecha de frutas y hortalizas que el almacenamiento a bajas temperaturas (5°C) de bulbos "semilla" de ajo 'Coreano' induce la sobreexpresión de genes de la síntesis de compuestos fenólicos, por lo que es posible que este tratamiento pueda inducir tolerancia al patógeno resultando en una ventaja para la producción de ajo lo cual podría constituir una alternativa tecnológica para el control de esta enfermedad.

En la actualidad solo se conoce que los ajos Perla son tolerantes a esta enfermedad en tanto que los ajos morados son fuertemente atacados por este patógeno. El estudio comparativo de estos dos tipos de ajo en cuanto a su contenido y síntesis de fenoles y su tolerancia a la enfermedad podría dar nueva información que pudieran generar nuevas alternativas de control de la misma.

IV. HIPÓTESIS

En los dientes semilla almacenados a bajas temperaturas se induce la sobre expresión de genes de la síntesis de compuestos fenólicos y de antocianinas por lo que es posible que este tratamiento pueda inducir tolerancia o sensibilidad al patógeno (*Sclerotium cepivorum)*, lo cual podría constituir una fuente de información para el control de esta enfermedad.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar las posibles relaciones de susceptibilidad al ataque de *Sclerotium cepivorum* y su composición de fenoles en ajo Perla y Coreano obtenidos a partir de dientes “semilla” almacenados a bajas temperaturas y temperatura ambiente.

5.2. Objetivos específicos

- Cuantificar y estudiar el contenido y cambios en el perfil de los compuestos fenólicos de ambas variedades durante su desarrollo. Someter a pruebas de reto ambas variedades de plantas frente al patógeno para determinar su tolerancia/susceptibilidad.

- Estudiar las diferencias en el perfil de fenoles de ajos Coreano y Perla y analizar los posibles efectos que pudiera tener ese perfil en la susceptibilidad al ataque por *Sclerotium cepivorum.*

- Cuantificar y estudiar el contenido de giberelinas durante el desarrollo de ambos cultivos y correlacionar este perfil con el desarrollo del cultivo y analizar sus posibles implicaciones con el desarrollo de la pudrición blanca.

.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen, almacenamiento y manejo del cultivo.

Se utilizaron bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano' del ciclo de producción 2013-2014 que procedían de la cosecha 2012-2013 igualmente se utilizó la variedad "Perla" como comparación, ya que es una de las variedades que se ha reportado como más tolerante al ataque por *Sclerotium cepivorum*. Para la variedad 'Coreano' los dientes "semilla" se dividieron en dos grupos para la aplicación de tratamientos; TA (Bulbos almacenados a temperatura ambiente) y 5C (Bulbos almacenados a 5°C durante 5 semanas). Después de los periodos de almacenamiento de los bulbos de ajo cv. Coreano, y Perla¸ se les aplicó un tratamiento de des infestación para evitar el ataque de bacterias, nematodos y hongos durante las primeras etapas de desarrollo en campo para después ser sembrados en huertos de producción comercial del municipio de Cosío, Aguascalientes, México (para la variedad 'Coreano') y en Rincón de Romos, Aguascalientes, México para la variedad Perla. Todas las prácticas culturales aplicadas al cultivo comercial fueron las aplicadas a los tratamientos experimentales y estas estuvieron dentro de las recomendaciones dadas por el Consejo de Ajo de Aguascalientes AC.

6.2. Estrategia experimental.

Dado a que el objetivo del trabajo fue comparar los cambios en la composición de fenoles de dos variedades de ajo; una tolerante a la pudrición blanca ('Perla') y otra susceptible a la misma ('Coreano') pero sometida a condiciones de inducción o no inducción de síntesis de fenoles; los tratamientos previos a la siembra no fueron los mismos para ambas variedades. La variedad 'Perla' solo se almacenó a temperatura ambiente; mientras que la variedad 'Coreano' se sometió a dos condiciones de almacenamiento, temperatura ambiente y almacenamiento a 5°C por 5 semanas.

Después del periodo de almacenamiento y previo a la fecha se siembra, un lote de bulbos de ajo 'Coreano' y 'Perla' de la cosecha 2012-2013 fueron transportados al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro donde se seleccionaron bulbos sanos, firmes, íntegros, de tamaño uniforme y libres de daño mecánico; se procedió a realizar los dos tratamientos el almacenamiento a TA y 5C, después del tratamiento estos se desgranaron manualmente. Los dientes se seleccionaron por tamaño y se trataron con inmersión de soluciones de Bactrimicin®, Basudin®, Folicur® y Buffex® para el control de enfermedades, y nematodos que atacan a este cultivo en las primeras etapas de desarrollo de la planta. Los agroquímicos fueron aplicados de acuerdo a las especificaciones del fabricante y recomendaciones de los productores (Cuadro 6). Estos tratamientos se aplicaron un día antes de la siembra.

Cuadro 6. Agroquímicos utilizados como plaguicida, bactericida y fungicida en dientes "semilla"

Agroquímico	Tiempo de aplicación (min)	Dosis para 20L de agua
Basudín® + Folicur®	15	66mL + 10mL
Buffex®	50	9g
Bactrimicin®	15	120g

Una vez preparadas las soluciones, los dientes semilla se colocaron dentro de una malla y se sumergieron en las soluciones por los periodos de tiempo indicados. Posteriormente fueron escurridos para eliminar exceso de la solución.

La figura 15 muestra la estrategia seguida para el desarrollo de los experimentos. En el mes de octubre los dientes desinfectados se llevaron a un huerto comercial en el municipio de Cosío Aguascalientes, México; esto para la variedad Coreano, mientras que los ajos Perla se sembraron en Rincón de Romos, Aguascalientes, México, donde fueron sembrados manualmente en surcos de dos hileras de plantas con 7cm de distancia entre cada diente. La siembra se realizó en

tres surcos distintos, en cada surco se sembraron tres repeticiones de cada uno de los tratamientos.

6.3. Programa de muestreos.

Los dientes semilla (almacenados a temperatura ambiente y 5°C) se sembraron el 14 de Octubre del 2013. Durante el desarrollo del cultivo se realizaron 5 muestreos mensuales y uno posterior a la cosecha. El Cuadro 7 muestra las fechas de muestreo realzados durante el periodo de estudio. Cabe mencionar que debido a que el ajo 'Coreano' almacenado a 5°C se adelanta su ciclo de cultivo, se realizaron 3 muestreos, en tanto que aquellos almacenados a temperatura ambiente se realizaron 5 muestreos. La variedad Perla incluyó cuatro muestreos. También se incluyó un muestreo adicional después del periodo de curado para todos los tratamientos. Cada muestreo consistió en tomar 10 plantas (unidad experimental) de cada tratamiento y en cada una de las tres repeticiones; las plantas se colocaron en hielo y se trasladaron al laboratorio donde se realizaron la medición de parámetros de crecimiento del cultivo (número de hojas, altura de la planta, peso, diámetro del bulbo e índice de bulbificación). Después se separaron bulbos y raíces, y estos se congelaron en forma separada en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C para posteriormente ser liofilizados y conservados en un lugar seco hasta su análisis.

Cuadro 7. Fechas de muestreos del ciclo de cultivo 2013-2014

Condición	Muestreo	Fecha	Días después de siembra (DDS)
	Siembra	14-Oct-2013	0
Coreano 5, TA y P	1	16-Ene-2013	94
Coreano 5, TA y P	2	28-Feb-2013	122
Coreano 5, TA y P	3	27-Mar-2013	149
Coreano TA y P	4	30-Abr-2013	179
Coreano TA	5	14-May-2013	193
Coreano 5, TA y P	Curado		

5: Almacenados a 5 °C cinco semanas, TA: Temp. ambiente P: ajo 'Perla'

Una vez liofilizadas las muestras, se procedió a obtener los extractos metanólicos de cada una de ellas (bulbos o raíces) y en cada una de las 3 réplicas. El total de muestras por cada periodo de muestreo y tratamiento fue de seis (tres repeticiones X dos órganos) para dar un total de 18 muestras para los tres tratamientos estudiados. Estos extractos metanólicos fueron utilizados para los análisis de fenoles, antocianinas, giberelinas y para las pruebas de reto de inhibición del patógeno.

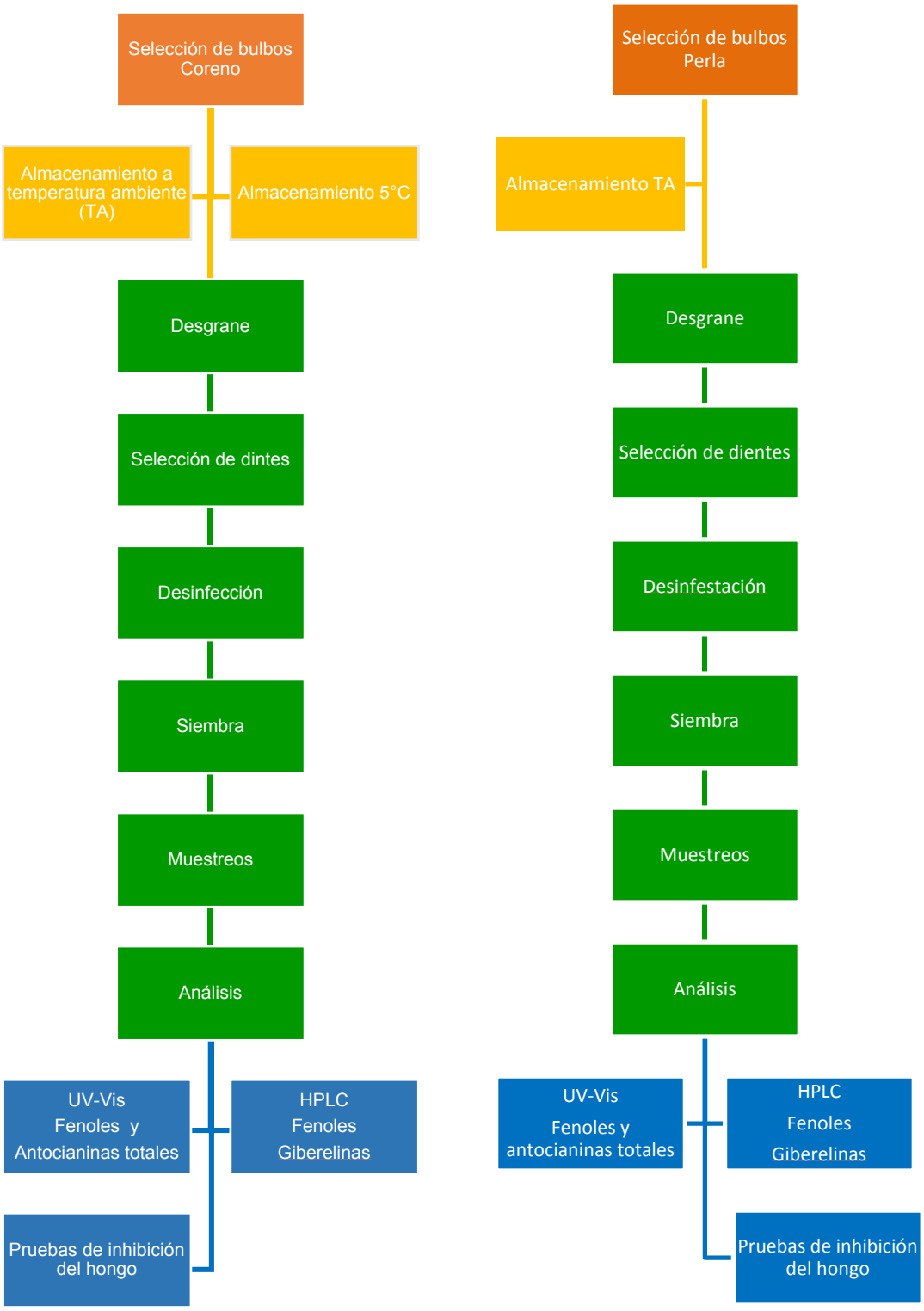


Figura 15. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

6.4. Análisis estadístico.

Los datos de cada una de los tratamientos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza general y por fecha de muestreo utilizando el paquete estadístico JMP; cuando se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos se procedió a hacer la comparación de medias utilizando las pruebas t de Student y Tuckey a una probabilidad $P \leq 0.05$

6.5. Extracción de fenoles, antocianinas y giberelinas.

Para la extracción de fenoles, antocianinas y giberelinas se siguió la metodología propuesta por Rakhimbaev y Ol´ shanskaya (1976) modificado por Vázquez- Barrios (2005) (Figura 16). Un gramo de tejido (bulbo o raíz liofilizados) se homogenizó con 40mL de metanol al 80%, después de reposar 24h a 4°C, el homogenizado se filtró a través de papel Whatman No.1. El filtrado se concentró al vacío en un rotavapor a 40°C hasta alcanzar un volumen de 5ml. El concentrado acuoso se ajustó a pH 3-3.5. Los fenoles, antocianinas y giberelinas se extrajeron por la técnica de partición de solventes con acetato de etilo 1:1 en tres ocasiones. Los extractos de acetato de etilo de juntaron y el exceso de agua se eliminó con Na_2SO_4 anhidro; el acetato de etilo se evaporó hasta sequedad en rotavapor a 40°C y el extracto seco se suspendió en 1ml de metanol 100%. El extracto metanólico se filtró en membrana de nylon de tamaño de poro de 0.2µm. El filtrado obtenido se consideró como el extracto de fenoles, antocianinas y giberelinas.

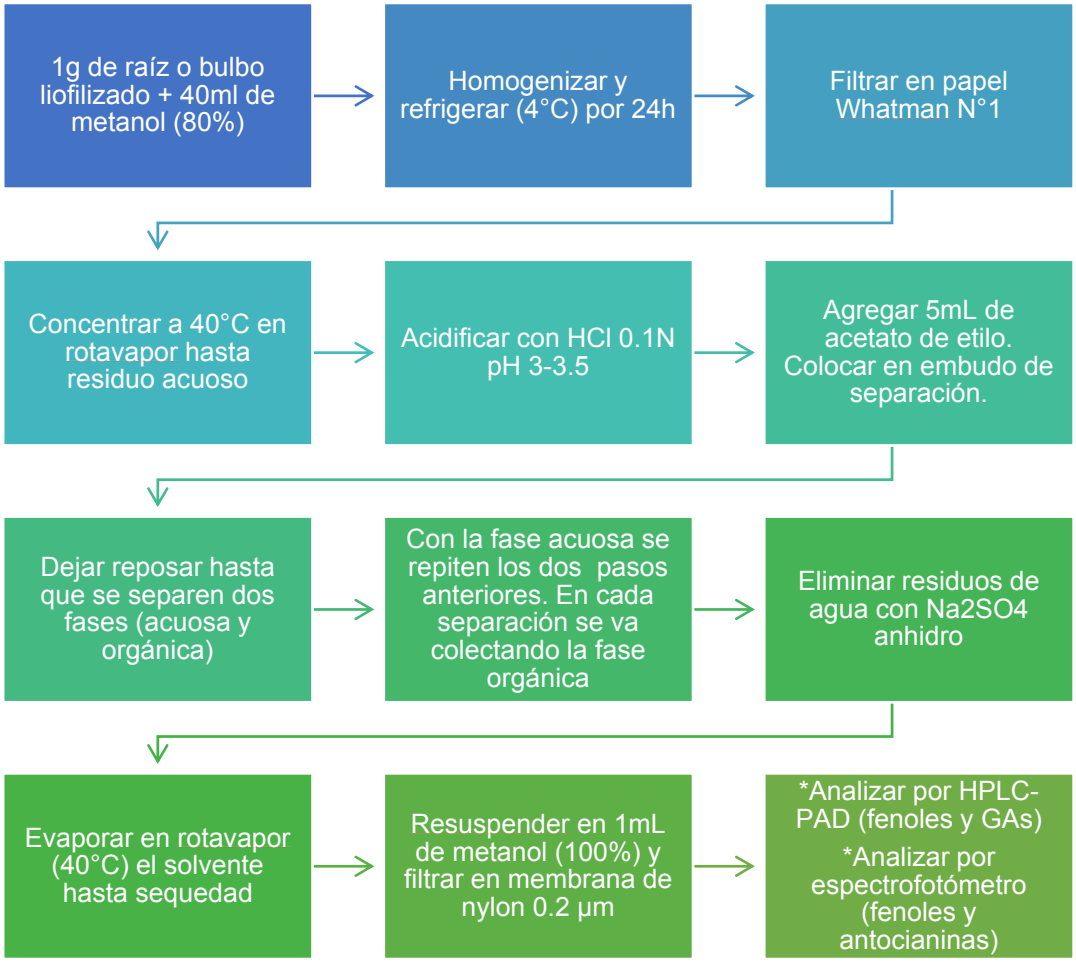


Figura 16. Esquema general de extracción de fenoles, antocianinas y giberelinas (Rakhimbaev y Ol´shanskaya, 1976; modificado por Vázquez, 2005.

6.5.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales.

Se llevó a cabo por la metodología de Folin-Ciocalteu (Rivera-Pastrana, 2013), con modificaciones, se tomaron 3mL de agua destilada más 50µl del extracto obtenido, se agregaron 250µl del reactivo Folin –Ciocalteu 1N, se agitó la mezcla (Daigger Vortex Genie 2) y se dejó reposar 5 minutos, transcurrido el tiempo se añadieron 750µl de Cloruro de sodio al 20%, y finalmente se agregaron 950µl de agua destilada se dejó reposar una hora y media en oscuridad y se leyó en espectrofotómetro Lambda 40 UV-Vis (Perkin-Elmer Instruments) a 760 nm. La cuantificación de los fenoles se realizó mediante una curva estándar de soluciones

de concentraciones conocidas de ácido gálico desde 0-125mg/L y el registro de sus absorbancias. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra liofilizada (mg EAG/g).

6.5.2. Cuantificación de antocianinas totales

Se determinaron por el método de pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001). Una alícuota de 50µl del extracto metanólico se diluyó en 2.5mL de buffer de cloruro de potasio 0.025M pH 1. Otra alícuota de 50µl del mismo extracto se diluyó en 2.5mL de buffer de acetatos 0.025M pH 4.5. Las muestras diluídas fueron equilibradas en la oscuridad por 15 minutos y posteriormente se leyó su absorbancia a 510 nm (absorbancia máxima) y a 700 nm (lectura del grado de degradación del compuesto y lectura de corrección debido a sustancias interferentes) utilizando un espectrofotómetro Lambda 40 UV-Vis (Perkin-Elmer Instruments). Se utilizó agua destilada como blanco. La concentración de antocianinas se calculó usando la siguiente ecuación y los resultados se expresaron como mg equivalentes de cianidín 3 glucósido por gramo de muestra liofilizada (mg C3G/g):

$$\frac{\Delta Abs * PM * FD}{\varepsilon * L * g} = mg\ C3G/g$$

Donde:

$\Delta Abs = (A_{510} - A_{700})_{pH\ 1} - (A_{510} - A_{700})_{pH\ 4.5}$

PM=Peso molecular de cianidín-3glucósido (445.2 g mol^{-1})

FD= Factor de dilución

ε = Coeficiente de extinción 29, 600 (L cm^{-1} mol^{-1}) de la cianidin 3 glucosido

L= Ancho de la celda (1 cm)

g= gramos de muestra en el extracto (0.03g L^{-1})

6.5.3. Separación y cuantificación de fenoles por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos, HPLC-PDA, que registró la absorbancia de la muestra a 280 y 320nm. Se utilizó un equipo HPLC Waters® Alliance® 2695 y un detector de arreglo de diodos Waters™ 2998 equipado con una columna Symetry C_{18} de 3.5µm tamaño de partícula y de 4.6 x 100 mm de diámetro y largo respectivamente. Para la separación se utilizó dos fase móviles; fase A (agua grado HPLC-1% ácido fórmico) y fase B (acetonitrilo 100%) corridas en gradiente de concentración como se establece en el Cuadro 8. El tiempo de corrida para cada una de las muestras fue de 55min a un flujo de la fase móvil 0.5mLmin^{-1}, el volumen de inyección fue de 20µL del extracto metanólico de fenoles y antocianinas.

Cuadro 8. Gradiente de concentración para separación de compuestos fenólicos.

Minuto	Flujo (ml/min)	%de A	% de B
0	0.5	98	2
50	0.5	0	100
55	0.5	98	2

6.5.4. Separación y cuantificación de giberelinas por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos, HPLC-PDA, que registró la absorbancia de la muestra en 205nm. Se utilizó un equipo HPLC Waters® Alliance® 2695 y un detector de arreglo de diodos Waters™ 2998 equipado con una columna Symetry C_{18} de 3.5µm tamaño de partícula y de 4.6 x 100 mm de diámetro y largo respectivamente. Siguiendo el procedimiento recomendado por Vázquez-Barrios (2005) para la separación de las dos fracciones F2 y F3 se utilizó un doble gradiente de concentración de fase móvil A (agua con 5% de acetonitrilo y 0.01% de ácido fosfórico) y fase B (acetonitrilo con 5% de agua y 0.01% de ácido fosfórico) (Cuadro 9), la fase móvil corrió a 1mLmin^{-1} en un tiempo de corrida de 35 minutos. El volumen

de muestra (extracto metanólico) inyectado al equipo HPLC-PDA fue 10µl. Los tiempos de retención y espectros de absorción se compararon con el espectro de un estándar comercial de giberelinas GA_3 (Sigma Chemical). Mediante la comparación de áreas bajo la curva y los espectros de los picos de las muestras con el estándar comercial (ácido giberélico, GA_3) se realizó la cuantificación del compuesto de interés. Se preparó una solución de GA_3 a una concentración de 1mg/mL a partir de la cual se realizaron diluciones. Cada dilución fue inyectada por duplicado y se corrió con el mismo método de análisis en el sistema HPLC-PDA (λ=205nm).

Cuadro 9. Gradiente de concentración para la separación de GAs por HPLC.

Minuto	Flujo (ml/min)	%de A	% de B
0	1	90	10
15	1	30	70
20	1	30	70
21	1	1	99
28	1	1	99
30	1	90	10
35	1	90	10

6.6. Aislamiento de hongo *Sclerotium cepivorum* de tierra infestada

El aislamiento del hongo *Sclerotium cepivorum* fue realizado a partir de tierra infestada del sitio de producción y siguiendo las indicaciones señaladas por Papavizas 1972 con modificaciones (Figura 17).

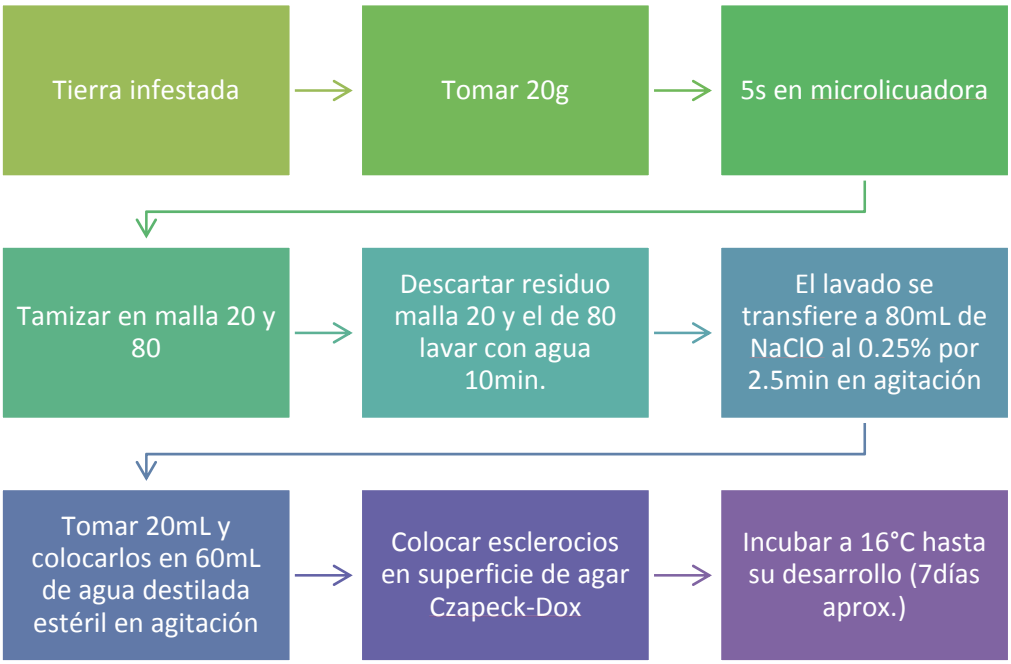


Figura 17. Aislamiento de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* de tierra infestada.

Para las pruebas de reto de crecimiento del patógeno se pesaron 0.5g de raíz liofilizada de cada condición (Coreano 5°C, Coreano TA y Perla TA) y por separado se tomaron 0.5mL del extracto de cada condición y se llevaron a sequedad para después resuspender en agua destilada estéril. Una vez que se obtuvieron los extractos de la raíz liofilizada estos se disolvieron en medio Czapeck-Dox esterilizado que después se colocó en cajas Petri, una vez gelificado el medio y el extracto se procedió a la siembra del hongo. Cinco días después se tomó el diámetro del micelio del hongo. Para la realización de los extractos se siguió la misma metodología descrita para la extracción de fenoles, antocianinas y giberelinas añadiendo un paso de eliminación del metanol en un rotavapor hasta sequedad, el extracto libre de metanol se resuspendió con un volumen similar de agua destilada estéril. Como control se inoculó el hongo en medio Czapeck únicamente y el medio Czapeck sin inóculo.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Crecimiento y desarrollo del cultivo.

El Cuadro 10 resume los datos de número de hojas, altura de la planta, diámetro del bulbo, peso de la planta e índice de bulbificación de las plantas de ajo 'Coreano' desarrolladas en Cosío Aguascalientes México. El número de hojas en las plantas generadas a partir de los bulbos almacenados a 5 °C fue estadísticamente menor (5 a 7 hojas) respecto de las plantas generadas de bulbos almacenados a temperatura ambiente (7 a 8 hojas).

Durante los primeros 122 DDS de desarrollo, las plantas generadas de bulbos almacenados a 5 °C mostraron mayor altura (77.5 cm), mayor peso (106.8 g), mayor diámetro del bulbo (44.8 mm) y mayor índice de bulbificación (2.7) respecto de las plantas generadas de bulbos "semilla" almacenados a TA (63 cm, 88.6 g, 31.9 mm y 1.8 de talla, peso, diámetro del bulbo e índice de bulbificación respectivamente). No obstante al final de sus respectivos ciclos de cultivo el comportamiento se invirtió; las plantas generadas de bulbos almacenados a TA mostraron mayor diámetro del bulbo y mayor peso que las plantas generadas de bulbos almacenados a 5 °C.

Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado por López-Hernández (2010) y por Zavala-Gutiérrez (2011) quienes también señalaron que las cosechas se adelantaron para las plantas generadas de bulbos almacenadas a 5°C y que los rendimientos de producción fueron menores que los registrados en las plantas generadas de bulbos almacenados a temperatura ambiente.

Cuadro 10. Parámetros de crecimiento de la planta y bulbo de ajo cv. Coreano durante el ciclo de cultivo a partir de bulbos semilla previamente almacenados a 5°C y TA.

Tratamiento	DDS	Número de hojas	Altura de la planta (cm)	Diámetro del bulbo (mm)	Peso (g)	IB
	94	7.21[b]	63.65[c]	31.14[e]	56.65[d]	2.76[c]
	122	5.34[c]	77.54[a]	44.88[c]	106.84[bc]	2.77[c]
	149	5.11[c]	80.3[a]	44.59[b]	129.58[b]	4.34[a]
5	193	-	-	-	-	-
	94	7.07[b]	49.68[d]	22.67[e]	43.86[d]	1.54[d]
	122	8.68[a]	63[c]	31.86[d]	88.58[c]	1.77[d]
	149	-	-	-	-	-
TA	193	7.45[b]	79.5[b]	64.42[a]	168.41[a]	3.72[b]

Letras diferentes por DDS representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).
DDS: Días después de siembra TA: Temperatura ambiente IB: Índice de bulbificación

7.2. Aislamiento de *Sclerotium cepivorum* de tierra infestada.

El aislamiento se llevó a cabo según la metodología propuesta por Papavizas 1972 con modificaciones y descrita en la sección de metodología. El hongo aislado del suelo del sitio de cultivo fue similar morfológica y microscópicamente al hongo donado por el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Celaya (ITC). La Figura 18 muestran las características visuales de las dos cepas de hongos aislados de suelo infestado como el donado por el ITC.

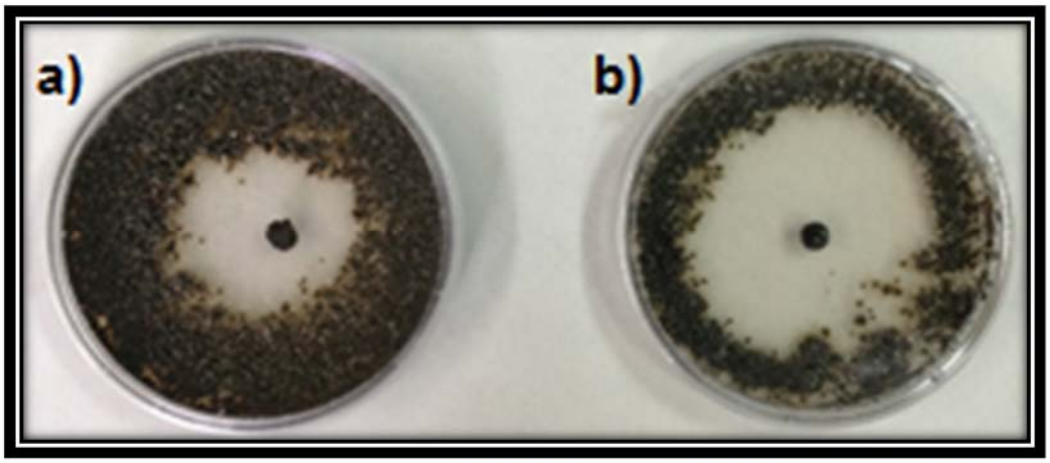


Figura 18. a) Hongo aislado de suelo infestado en Cosío Ags. y b) Hongo donado por ITC.

7.2.1. Pruebas de reto del crecimiento del *Sclerotium cepivorum* en agar adicionado con extractos fenólicos de raíz de ajo.

Este estudio tuvo la finalidad de investigar, *in vitro*, si la raíz liofilizada de las plantas de ajo, de las diferentes condiciones experimentales estudiadas, tenían algún efecto inhibitorio en el crecimiento del patógeno. El experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con medio solido utilizando el hongo aislado del suelo infestado y raíz liofilizada molida, ya que se supone que por medio de este órgano se induce el crecimiento del patógeno y se inicia la infección (Coventry *et al*., 2002, Pérez-Moreno *et al*., 2004, Tamire-Zewde *et al*., 2007, Velásquez *et al.,* 2011, Acosta-García *et al.,* 2012).

Los experimentos se realizaron por triplicado utilizando un control positivo que fue: medio Czapeck-Dox inoculado con el hongo *Sclerotium cepivorum* sin la adición de la raíz liofilizada. La raíz liofilizada y molida se agregaba a cada Caja de Petri con el medio Czapeck-Dox ya estéril y atemperado, una vez disperso el polvo de la raíz en las cajas Petri con el medio de cultivo se preparaban se dejaban reposar y se ponía un implante de la colonia del hongo en el centro de cada una de las cajas Petri. Una vez implantado el patógeno, las cajas se incubaron durante 5 días a 16°C. Después del periodo de incubación, se midieron los diámetros de la colonia micelial del patógeno.

El Cuadro 11 muestra los diámetros de crecimiento del micelio del patógeno en medio agar Czapek-Dox adicionado con raíces liofilizadas de cada uno de las tres condiciones de estudio (raíces de ajo coreano TA, raíces de ajo ‘Coreano’ 5°C y raíces de ajo ‘Perla’) y para cada periodo de muestreo de las plantas. El mayor desarrollo micelial se observó en las cajas que fueron adicionadas con raíces liofilizadas de plantas de ajo ‘Coreano’ generadas a partir de bulbos “semilla” almacenados a temperatura ambiente (37 a 40 mm); un menor desarrollo fue observado en las cajas con raíces liofilizadas de las plantas generadas de bulbos

“semilla” almacenados a 5 °C durante cinco semanas (28 a 32 mm). El menor crecimiento fue observado en las cajas con raíz liofilizada de las plantas de ajo ‘Perla’ (18 a 19 mm).

Estos datos confirmaron que la variedad ‘Perla’ tiene mayor capacidad para controlar el desarrollo del patógeno y confirmó su tolerancia a la enfermedad aunque no inhibió el crecimiento del hongo por completo. También estos datos muestran que el almacenamiento de los bulbos “semilla” a 5 °C por cinco semanas indujo un menor crecimiento micelial en comparación con el crecimiento mostrado por las raíces de plantas generadas de bulbos almacenados a TA. Lo cual parece indicar una inducción de tolerancia al patógeno por efecto del almacenamiento a 5 °C.

En estos experimentos la cantidad de inóculo fue aproximadamente constante; por ello no se observaron diferencias significativas en el crecimiento micelial respecto de las edad de las muestras donde se tomaron las raíces (Cuadro 11) por lo que se puede decir que el efecto de la raíz tuvo un efecto similar sobre el crecimiento del hongo en las diferentes fechas de toma de muestras.

Como se ha indicado, estos datos se generaron a partir de experimentos con niveles de inóculo del patógeno relativamente constantes y por ello no fue posible identificar el efecto que Ponce-Herrera *et al* (2008) observaron en estudios en campo con cultivos de cebolla en los cuales indicaron que bajo tres diferentes densidades de inóculo (baja, media y alta), el porcentaje de infestación de la enfermedad fue directamente proporcional al nivel de inoculo del patógeno.

Cuadro 11. Crecimiento diametral micelial (mm) *in vitro* de *Sclerotium cepivorum* en raíz liofilizada durante el desarrollo del cultivo.

Crecimiento micelial (mm)	DDS		
Tratamiento	**94**	**122**	**149**
5	32.27 ± 0.49[b]	30.66 ± 0.32[b]	28.28 ± 035[b]
TA	40.37 ± 0.66[a]	38.06 ± 0.37[a]	37.16 ± 0.41[a]
P	18.8 ± 0.64[c]	20.38 ± 0.46[c]	18.24 ± 0.36[c]

Letras diferentes por DDS representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).
DDS: Días después de siembra 5: Almacenados a 5°C TA: Temperatura ambiente P: Ajo Perla

La Figura 19 muestra visualmente el crecimiento del patógeno en las cajas de Petri para las tres condiciones analizadas y diferentes días de toma de muestras y en comparación con el cultivo control. En los tres muestreos se observó un menor diámetro micelial del hongo para las raíces de ajo Perla (P) seguido de las raíces de ajo coreano almacenado a 5 °C (5) y un mayor diámetro en las raíces de ajo Coreano almacenado a TA. Esto confirma la mayor tolerancia del ajo Perla y la inducción de tolerancia del almacenamiento a 5 °C en el ajo Coreano.

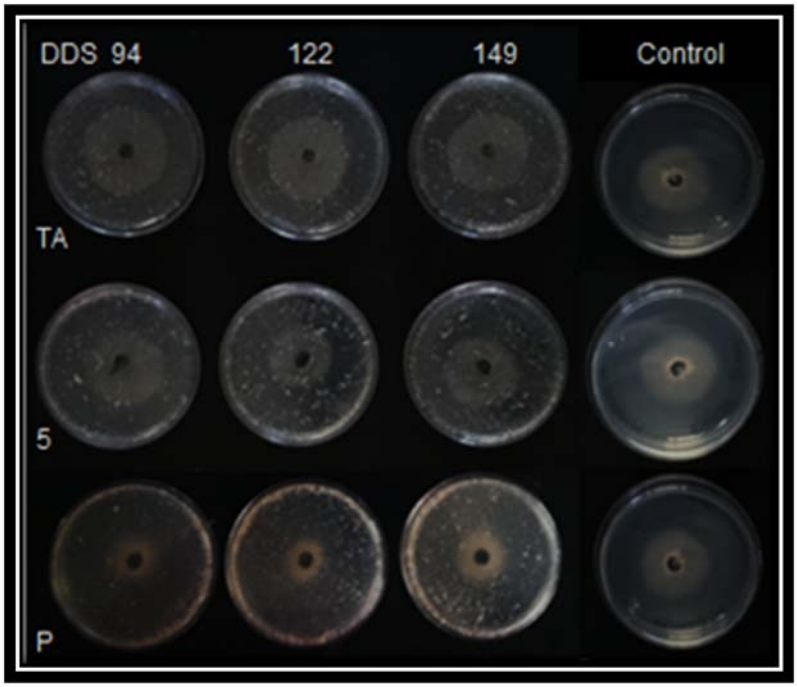


Figura 19. Hongo inoculado en placas con agar Czapek-Dox adicionado con raíz liofilizada durante el desarrollo del cultivo. DDS: Días después de siembra. TA: Raíz de ajo almacenado a temperatura ambiente, 5: Raíz de ajo almacenado a 5°C, P: Raíz de ajo Perla. El control fue medio Czapek-Dox y el inóculo.

Es importante mencionar que en los experimentos de campo donde se sembraron los ajos que fueron almacenados a 5°C, no se presentó la enfermedad de pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum* (Figura 20); en cambio en los ajos almacenados a TA, se observaron manchones de plantas enfermas que fueron atacadas por este hondo dejando plantas muertas enfermas. En el campo esta enfermedad se presentó en las últimas etapas fenológicas de la planta, lo que coincide con lo mencionado por Ponce-Herrera *et al.* (2008), quienes mencionan que independientemente de la densidad de inóculo la incidencia del patógeno es mayor en las últimas etapas de desarrollo de la planta.

Figura 20. Campo donde se sembraron los ajos almacenados a 5°C libre de pudrición blanca.

7.3. Cambios en el Contenido de fenoles en bulbos y raíces durante el desarrollo.

Los cambios en el contenido de fenoles totales así como su caracterización semi cualitativa se llevó a cabo por métodos espectrofométricos y por análisis de los perfiles cromatográficos de los cromatogramas obtenidos por HPLC. Se analizaron extractos metanólicos de bulbo y raíz de las plantas de ajo sujetas a las condiciones

de estudio indicadas. Ambos extractos tanto de bulbo como de raíz fueron utilizados para el análisis espectrofotométrico y cromatográfico.

7.3.1. Cambios en el Contenido de Fenoles totales en raíz y bulbo de plantas de ajo durante su desarrollo.

El análisis de varianza del contenido de fenoles totales de cada uno de los órganos estudiados, en las tres fechas de muestreo y para cada uno de los factores en estudio indicó los valores de probabilidad que se registran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Valores de probabilidad de significancia estadística del contenido de fenoles totales en bulbos y raíces de plantas de ajo en diferentes condiciones de estudio.

Factor de variación	Bulbo	Raíz
Tratamiento	<.0001	<.0001
Muestreo	<.0001	<.0001
Tratamiento*muestreo	<.0001	<.0001

Todos los factores de estudio fueron altamente significativos para ambos órganos estudiados. Los bulbos de ajo Coreano procedentes del almacenamiento a 5 °C mostraron los niveles más altos de fenoles totales (0.22 mg EAG/g m.s.) mientras que los bulbos de ajo Coreano procedentes del almacenamiento a TA fueron iguales estadísticamente a los bulbos de ajo Perla (0.13 y 0.15 mg EAG/g m.s. respectivamente). Así mismo los Bulbos de las muestras analizadas en el primer muestreo registraron los valores más altos (0.27 mg EAG/g m.s.) seguidos por las muestras del segundo muestreo (0.13 mg EAG/g m.s.) y finalmente por los bulbos del tercer muestreo (0.10 mg EAG/g m.s.). Respecto a las interacciones tratamiento*muestreo; los bulbos procedentes del primer muestreo (94 DDS) de las plantas procedentes de ajo Coreano generadas del almacenamiento a 5 °C mostraron los valores más altos (0.39 mg EAG/g m.s.) y estos fueron estadísticamente diferentes del contenido de fenoles totales del tercer muestreo tanto de bulbos de ajo Coreano generados de plantas de TA y de los bulbos de ajo Perla

(0.07 y 0.11 mg EAG/g m.s. respectivamente). Indicándose con esto que el almacenamiento de los bulbos “semilla” de ajo Coreano indujo una mayor acumulación de fenoles en el bulbo respecto del acumulado por los bulbos de las plantas TA. Esa acumulación de fenoles fue mayor que el registrado por el ajo Perla pero que esta acumulación disminuye conforme transcurre el ciclo de cultivo.

Para el caso de las raíces, el tratamiento mostró también efectos altamente significativos; las raíces de las plantas de ajo Perla mostraron los contenidos más altos de fenoles (0.76 mg EAG/g m.s.) seguido de las raíces de ajo Coreano procedentes de plantas almacenadas a 5 °C (0.46 mg EAG/g m.s.) y finalmente las raíces de las plantas generadas del almacenamiento a TA mostraron los valores más bajos (0.38 mg EAG/g m.s.). Esto señaló que las raíces en cualquiera de los sistemas analizados tienen contenidos más altos de fenoles respecto de los contenidos en los bulbos. En cuanto al efecto del factor tiempo de muestreo, en el muestreo 1 (94 DDS) se registraron los valores más bajos (0.44 mg EAG/g m.s.) y los valores mayores se encontraron a los 122 y 149 DDS (0.57 y 0.59 mg EAG/g m.s.) los cuales fueron iguales entre sí. Esto muestra que el comportamiento de acumulación de fenoles en raíces es inverso al mostrado por los bulbos. En cuanto a las interacciones tratamiento muestreo, las raíces del ajo Perla en las tres fechas de muestreo fueron las que registraron los valores más altos de fenoles (0.60, 0.97 y 0.72 para los muestreos 1, 2 y 3 respectivamente) mientras que las raíces de las plantas generadas del almacenamiento a TA en los muestreos 1 y 2 fueron las que mostraron los valores más bajos (0.31 y 0.37 mg EAG/g m.s.) siendo estadísticamente iguales entre sí. Las raíces de las plantas generadas del almacenamiento a 5 °C mostraron valores intermedios a estos (0.40, 0.45 y 0.53 mg EAG/g m.s. para los muestreos 1, 2 y 3 respectivamente). Estos resultados parecen explicar el crecimiento micelial *in vitro* del patógeno discutido en la sección anterior.

Los mayores contenidos de fenoles en bulbos de ajo Coreano procedentes del almacenamiento a 5 °C también ha sido informado por Zavala-Gutiérrez, (2011) y por Dufoo-Hurtado *et al.,* (2013) quienes también indicaron que la mayor síntesis

de estos compuestos se debió a una sobreexpresión del gen de la Fenil alanin amonio liasa (PAL) durante el periodo de almacenamiento de los dientes semilla. Esta acumulación de fenoles en la raíz podría presentar una ventaja para las plantas generadas del almacenamiento a 5 °C para superar el ataque de microorganismos en el campo y en particular resistir el ataque de la pudrición blanca.

El alto contenido de fenoles totales en raíz del ajo cv Perla durante el desarrollo del cultivo también da soporte para explicar por qué esta variedad posee una mayor tolerancia al ataque del hongo *Sclerotium cepivorum* y en consecuencia a una menor incidencia de pudrición blanca en campo.

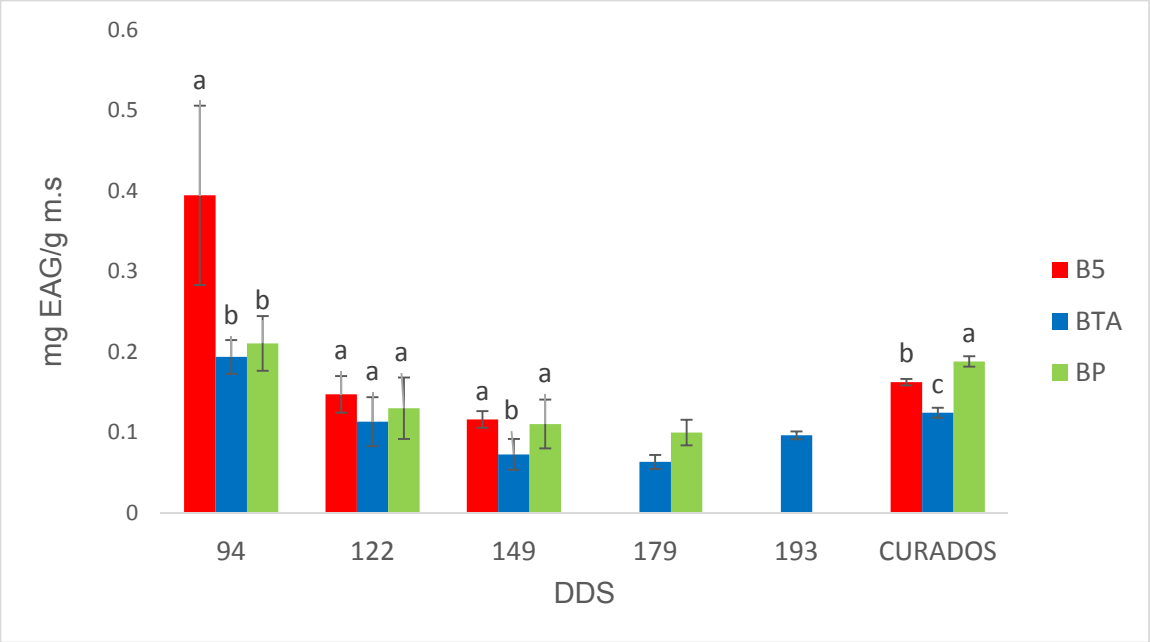
Dufoo *et al.,* (2013) informaron también un mayor contenido de fenoles en las catáfilas (túnicas) separadas de los bulbos en la condición de 5°C (1.87-3.24 mg EAG/g) seguido de las catafilas de TA (0.61-2.61 mg EAG/g); esto muestra que también hay una distribución diferencial de estos compuestos en diferentes zonas de la planta. Cabe mencionar que la muestra que se utilizó en este estudio incluía tanto el bulbo y la túnica de cada condición y raíz liofilizada. Otros autores, (Bilijana-Bozin *et al*., 2008) han informado un mayor contenido de fenoles en bulbos (0.98 mg EAG/g) probablemente debido a un mayor tiempo de extracción utilizado (76 h).

El Cuadro 13 y la Figura 21 muestran los cambios en el contenido individual de fenoles y la comparación de medias en bulbos de las diferentes condiciones de estudio y diferentes periodos de muestreo. Los contenidos tendieron a disminuir a medida que avanzó el desarrollo y que los bulbos de plantas generadas del almacenamiento a 5 °C mostraron los mayores valores en todos los periodos de muestreo.

Cuadro 13. Contenido de fenoles en bulbo de ajo en diferentes DDS según el tratamiento.

Tratamiento	DDS					
Bulbos	**94**	**122**	**149**	**179**	**193**	**CURADOS**
B5	0.394 ± 0.11[a]	0.147 ± 0.22[a]	0.11 ± 0.01[a]			0.162 ± 0.003[b]
BTA	0.193 ± 0.02[b]	0.113 ± 0.03[a]	0.0720 ± 0.01[b]	0.063 ± 0.008	0.096 ± 0.004	0.124 ± 0.006[c]
BP	0.210 ± 0.03[b]	0.130 ± 0.03[a]	0.110 ± 0.03[a]	0.099 ± 0.01		0.188 ± 0.006[a]

Letras diferentes por DDS representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). DDS: Días después de siembra B5: Almacenados a 5°C BTA: Temperatura ambiente BP: Ajo Perla



Letras diferentes indican diferencias significativas en los dos tratamientos por prueba Tukey ($p \leq 0.05$). B5: Bulbos 5°C, BTA: Bulbos a temperatura ambiente y BP: Bulbos Perla. DDS: Días después de siembra.

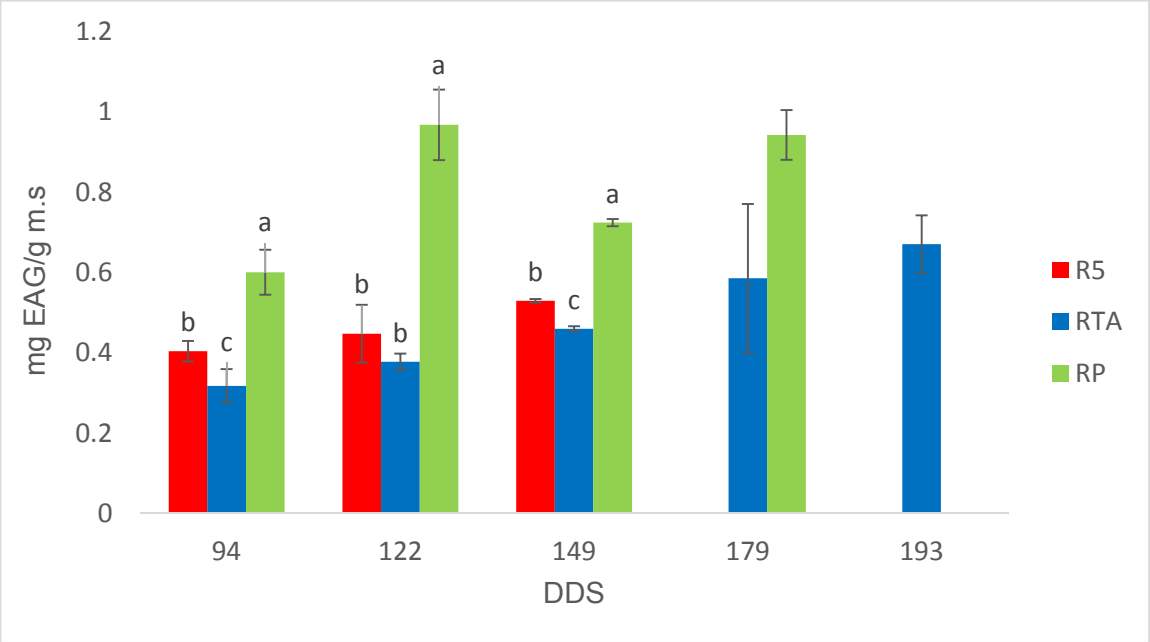
Figura 21. Contenido de fenoles totales en bulbo durante el desarrollo del cultivo.

El Cuadro 14 y la Figura 22 muestran los cambios en el contenido individual de fenoles y la comparación de medias en raíces de las diferentes condiciones de estudio y diferentes periodos de muestreo. Los contenidos tendieron a aumentar a medida que avanzó el desarrollo y las raíces de plantas de ajo Perla mostraron los mayores valores en todos los periodos de muestreo, mientras que las raíces de plantas del almacenamiento TA mostraron los valores más bajos.

Cuadro 14. Contenido de fenoles en raíz en los diferentes DDS según el tratamiento.

Tratamiento	**DDS**				
Raíz (mg EAG/g m.s)	**94**	**122**	**149**	**179**	**193**
R5	0.404 ± 0.02[b]	0.447 ± 0.07[b]	0.529 ± 0.004[b]		
RTA	0.317 ± 0.04[c]	0.377 ± 0.02[b]	0.460 ± 0.006[c]	0.585 ± 0.18	0.670 ± 0.07
RP	0.600 ± 0.05[a]	0.968 ± 0.08[a]	0.724 ± 0.008[a]	0.942 ± 0.06	

Letras diferentes por DDS representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). DDS: Días después de siembra R5: Almacenados a 5°C RTA: Temperatura ambiente RP: Ajo Perla



Letras diferentes por DDS representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). DDS: Días después de siembra R5: Almacenados a 5°C RTA: Temperatura ambiente RP: Ajo Perla

Figura 22. Contenido de fenoles totales en raíz durante el desarrollo del cultivo.

El ajo Perla muestra una mayor tendencia para incrementar los contenidos de fenoles sin haber sido sometido a procesos de refrigeración de sus dientes "semilla". Por su parte el ajo Coreano mostró esta misma tendencia, no obstante, los valores registrados no superaron los contenidos mostrados por las raíces del ajo Perla aunque las raíces de ajos generados del almacenamiento a 5 °C estuvieron por arriba de aquellos generados por el almacenamiento a TA.

7.3.2. Perfíl cromatográfico de Fenoles por HPLC.

A partir de cada uno de los cromatogramas generados por el equipo HPLC Waters® Alliance® 2695 y el detector de arreglo de diodos Waters™ 2998, se registraron las áreas de cada uno de los picos utilizando las absorbancias de la muestra a 280 y 320nm.

Los datos de área de todos los picos, de sus tres replicas, de todas las condiciones de estudio y para todos los periodos de muestreo se analizaron bajo dos criterios; comparar las sumatorias de área total de todos los picos detectados entre cada una de las condiciones de estudio y comparar los perfiles cromatograficos de cada una de las condiciones de estudio.

El primer criterio de comparación sirve para analizar si el área total de picos explica los contenidos de fenoles totales en cada una de las condiciones de estudio y el segundo criterio servirá para detectar si existen picos diferentes (fenoles) en cada uno de las condiciones de estudio.

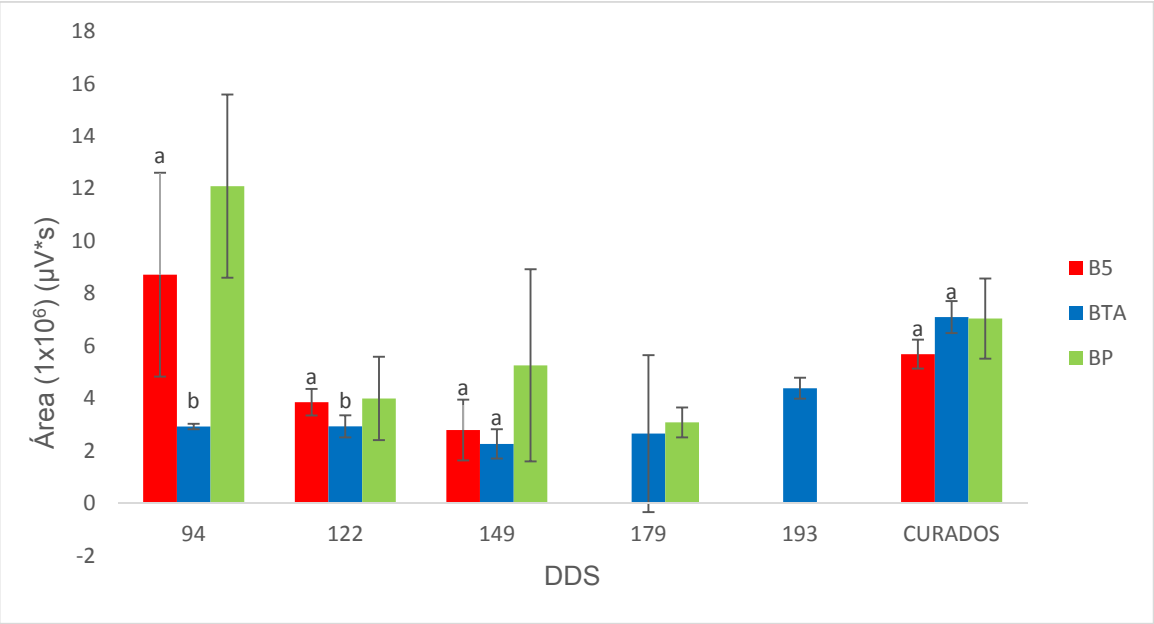
Las áreas detectadas por el equipo se registraron a dos longitudes de onda (280nm y 320nm) tanto en bulbo como en raíz. Las Figuras 23 y 24 muestran los cambios de área total de los picos para los bulbos y raíz registrados a 280 nm durante el desarrollo de las plantas y las Figuras 25 y 26 muestran esos mismos cambios en ambos órganos para las áreas detectadas a 320 nm.

El área total de los fenoles en los bulbos y raíces en ambas longitudes de onda, siguió un comportamiento muy parecido al registrado por el contenido de fenoles totales descrito en la sección anterior. Los bulbos mostraron mayor área en el primer muestreo (94 DDS) que disminuyó a medida que transcurrió el desarrollo del cultivo (Figuras 23 y 25), de igual forma también los bulbos de plantas de ajo Coreano generadas del almacenamiento a 5 °C mostraron una mayor área que la registrada por los bulbos de las plantas generadas del almacenamiento a TA. Estos

datos confirmaron los resultados de fenoles totales obtenidos por el método espectro foto métrico.

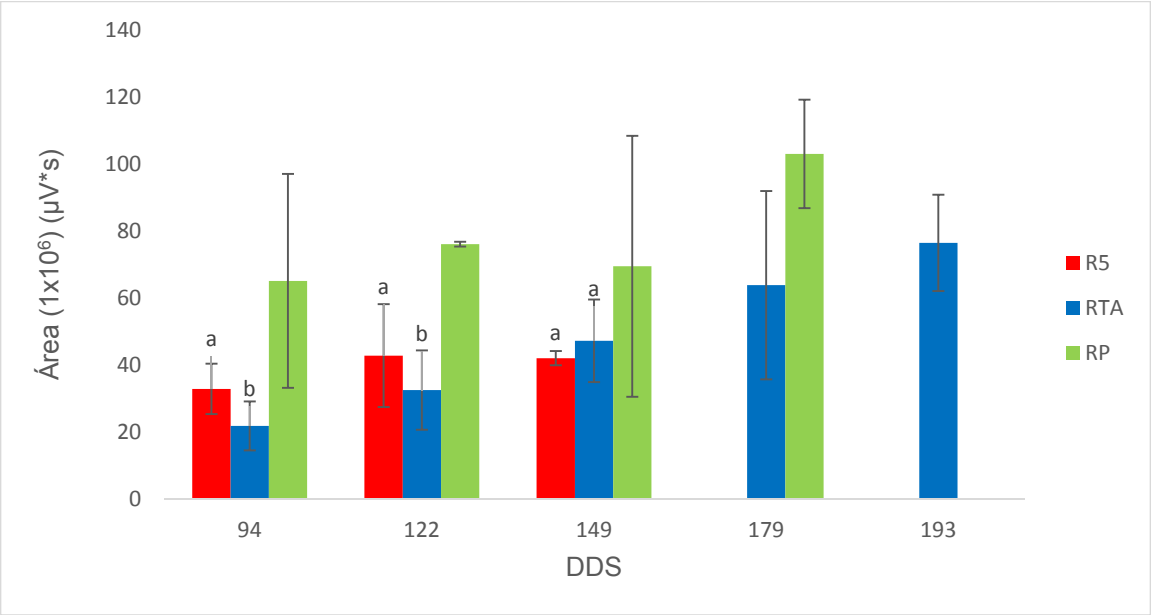
De manera similar, el área total de los fenoles de las raíces en ambas longitudes de onda, también siguió un comportamiento muy parecido al registrado por su contenido total de fenoles descrito en la sección anterior (Figuras 24 y 26). Las áreas totales de los fenoles tendieron a incrementarse a medida que transcurrió el desarrollo de las plantas, siendo mayor el área para las muestras de ajo Perla. Durante los primeros dos muestreos (94 y 122 DDS), las raíces de las plantas generadas del almacenamiento a 5 °C mostraron valores de área mayor que las áreas registradas por las raíces de las plantas TA.

Estos resultados indican que el pre-acondicionamiento por 5 semanas a 5°C de los bulbos semilla del ajo Coreano, antes de la siembra, incrementa el proceso de síntesis de fenoles en las primeras etapas de desarrollo del cultivo y en ambos tipos de órganos lo cual podría explicar la mayor tolerancia de estas plantas al ataque de organismos patógenos como el *Sclerotium cepivorum*. También las mayores áreas registradas para los órganos del ajo Perla confirman su mayor tolerancia de esta variedad hacia esa enfermedad.



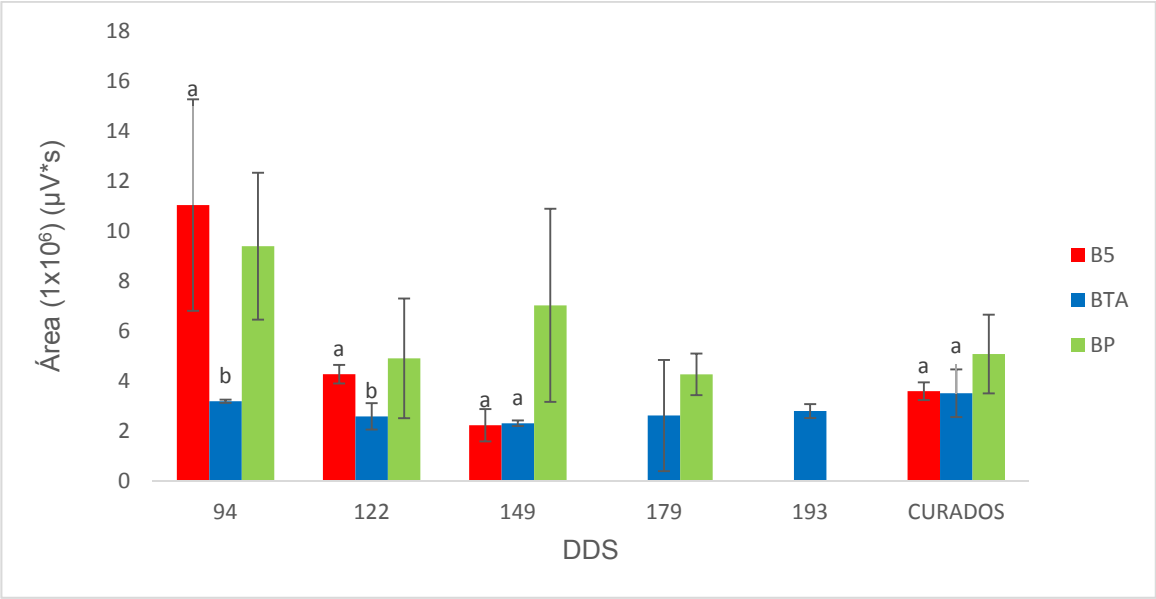
Letras diferentes indican diferencias significativas en los dos tratamientos por prueba t de Student ($p \leq 0.05$). 5:5°C, TA: temperatura ambiente y P: Perla. DDS: Días después de siembra.

Figura 23. Área total de picos de fenoles a 280nm en bulbos de ajo Coreano de plantas generadas del almacenamiento a 5 °C (B5) o TA (BTA) y bulbos de ajo Perla (BP).



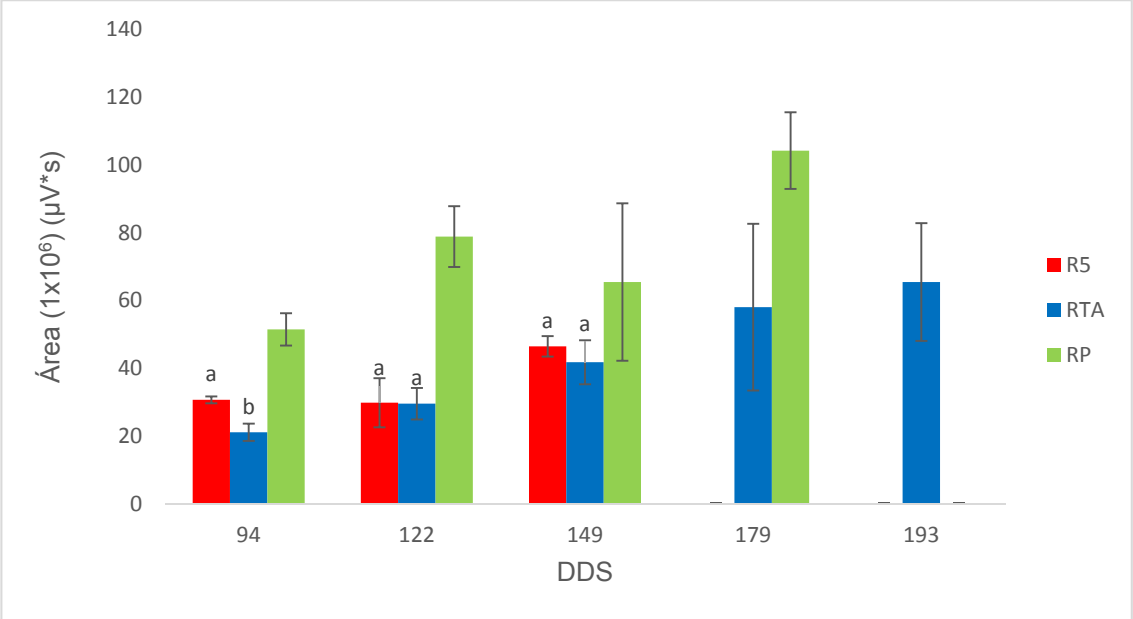
Letras diferentes indican diferencias significativas en los dos tratamientos por prueba t de Student ($p \leq 0.05$). 5: 5°C, TA: temperatura ambiente y P: Perla. DDS: Días después de siembra.

Figura 24. Área total de picos de fenoles a 280nm en raíces de ajo Coreano de plantas generadas del almacenamiento a 5 °C (B5) o TA (BTA) y raíces de ajo Perla (BP).



Letras diferentes indican diferencias significativas en los dos tratamientos por prueba t de Student ($p \leq 0.05$). 5: 5°C, TA: temperatura ambiente y P: Perla. DDS: Días después de siembra.

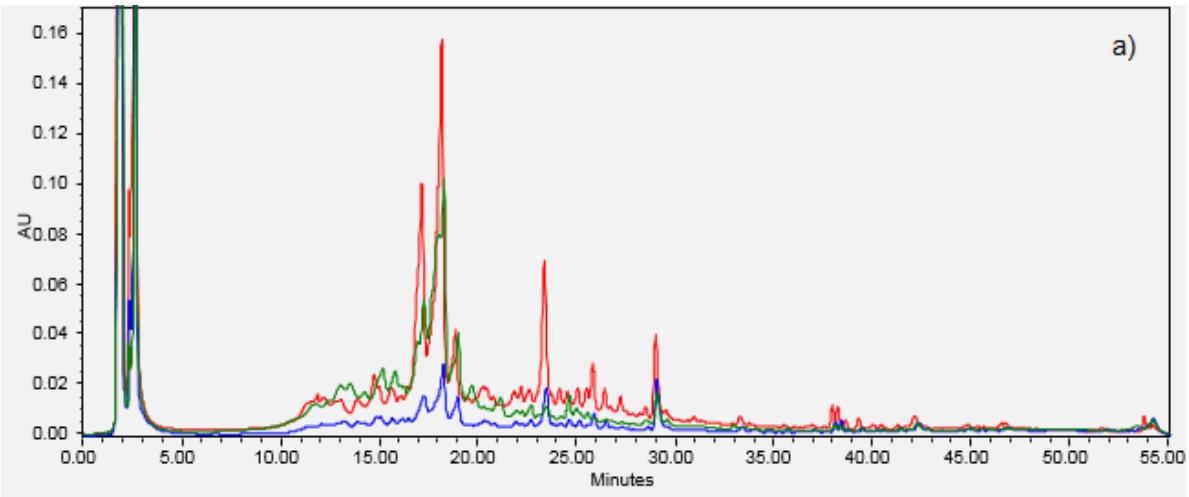
Figura 25. Área total de picos de fenoles a 320 nm en bulbos de ajo Coreano de plantas generadas del almacenamiento a 5 °C (B5) o TA (BTA) y bulbos de ajo Perla (BP)



Letras diferentes indican diferencias significativas en los dos tratamientos por prueba t de Student ($p \leq 0.05$). 5: 5°C, TA: temperatura ambiente y P: Perla. DDS: Días después de siembra.

Figura 26. Área total de picos de fenoles a 320nm en raíces de ajo Coreano de plantas generadas del almacenamiento a 5 °C (B5) o TA (BTA) y raíces de ajo Perla (BP)

En cuanto a los perfiles cromatográficos registrados, las Figuras 27 y 29 muestran los cromatogramas obtenidos para los bulbos a 280 y 320 nm; mientras que las Figuras 28 y 30 muestran los perfiles para las raíces a esas mismas longitudes de onda. De forma general estos perfiles confirman lo anotado en los análisis de las áreas totales descrito anteriormente. No obstante, la observación más detallada de cada uno de los órganos a las diferentes longitudes de onda permite señalar que hubo cambios cualitativos y cuantitativos en los perfiles de cada uno de los órganos y en cada una de las condiciones estudiadas, es decir algunos picos incrementan o disminuyen sus áreas conforme transcurre el desarrollo y en otros casos aparecen o desaparecen picos en las distintas condiciones de estudio o durante el desarrollo. También la longitud de onda escogida para la detección de estos picos permitió incrementar o disminuir la resolución de los picos pero también algunas veces descubre nuevos picos que no se observan en alguna de las longitudes de onda.



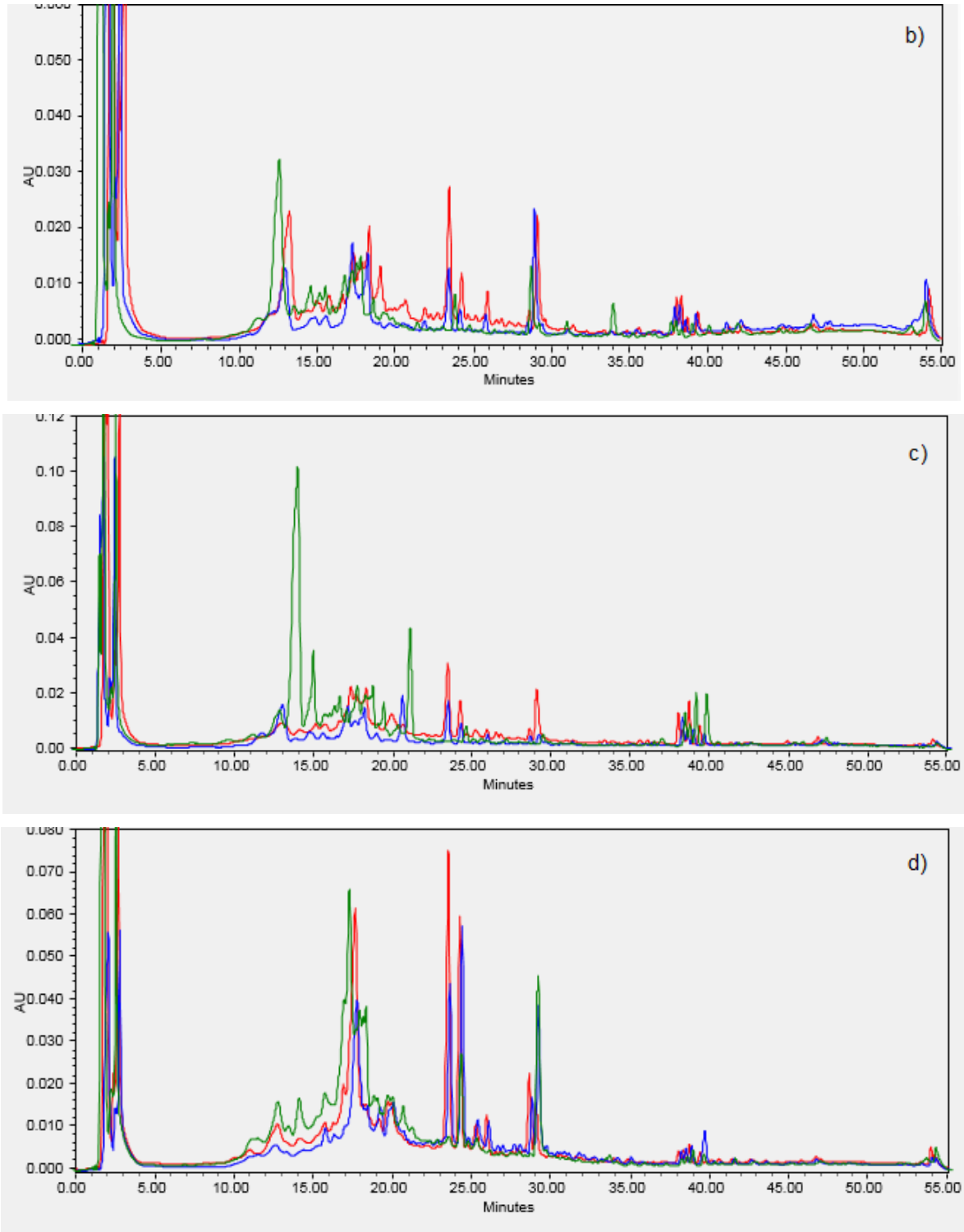


Figura 27. Perfiles de los Cromatogramas de fenóles de bulbos de ajo durante el desarrollo a 280nm. Línea roja: Coreano 5 °C, línea azul: Coreano TA, línea verde: Perla P. a) 94 DDS, b) 122 DDS, c) 149 DDS, d) Curados.

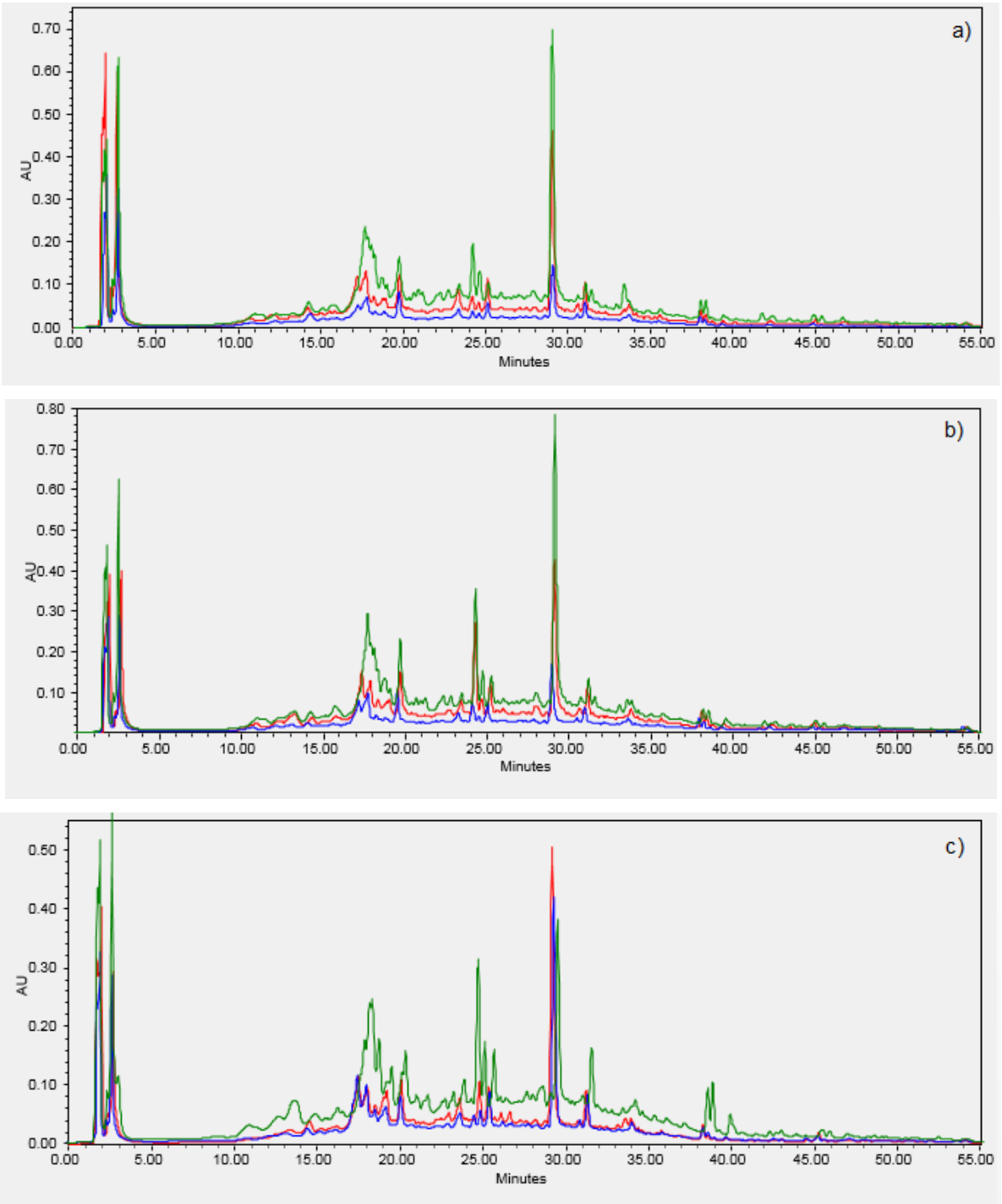
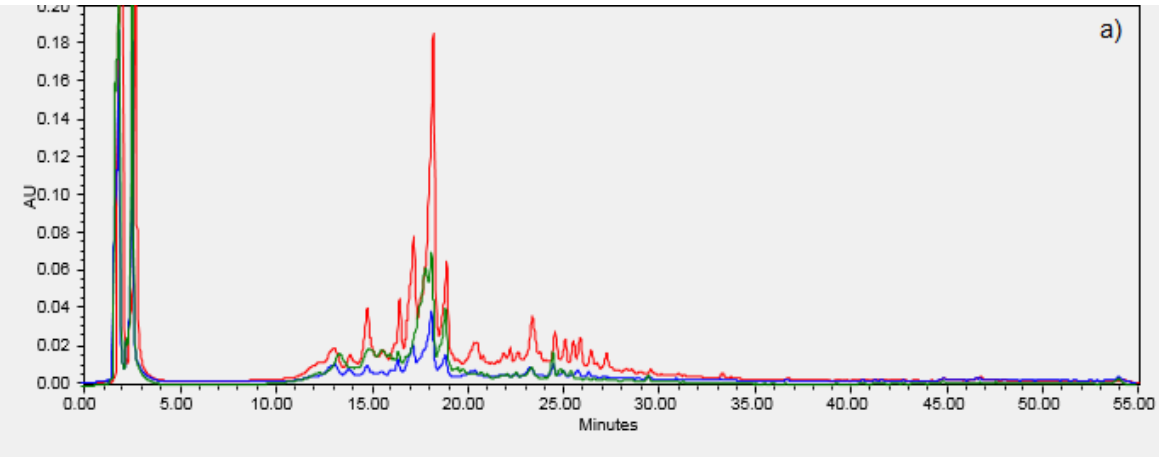
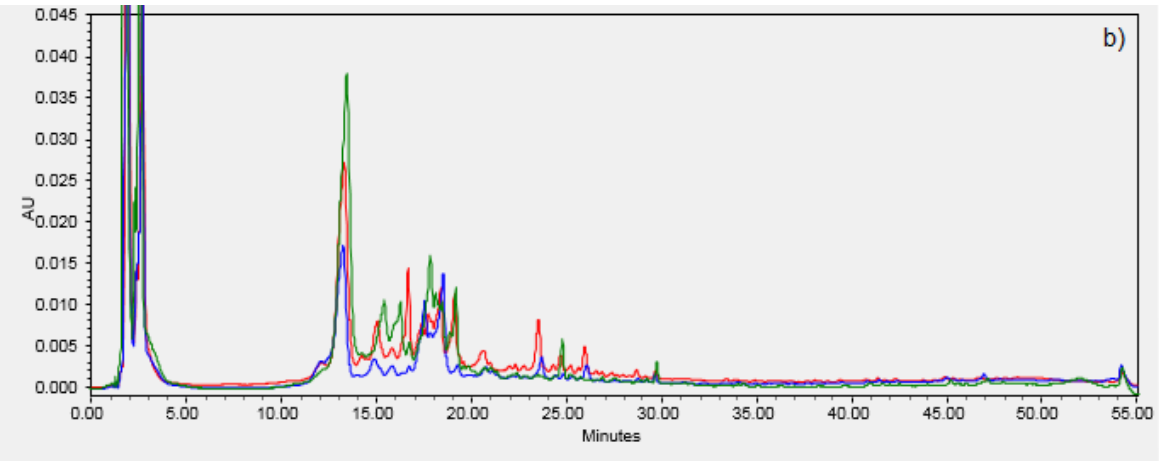
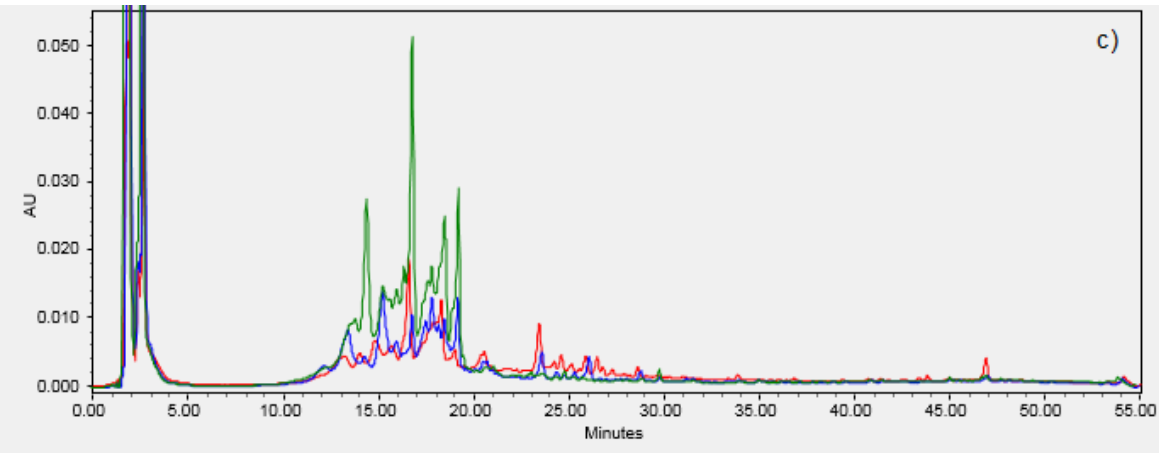


Figura 28. Perfiles de los Cromatogramas de fenoles de raíces de ajo durante el desarrollo a 280nm. Línea roja: Coreano 5 °C, línea azul: Coreano TA, línea verde: Perla P. a) 94 DDS, b) 122 DDS, c) 149 DDS, d) Curados.


a)
AU
Minutes


b)
AU
Minutes


c)
AU
Minutes

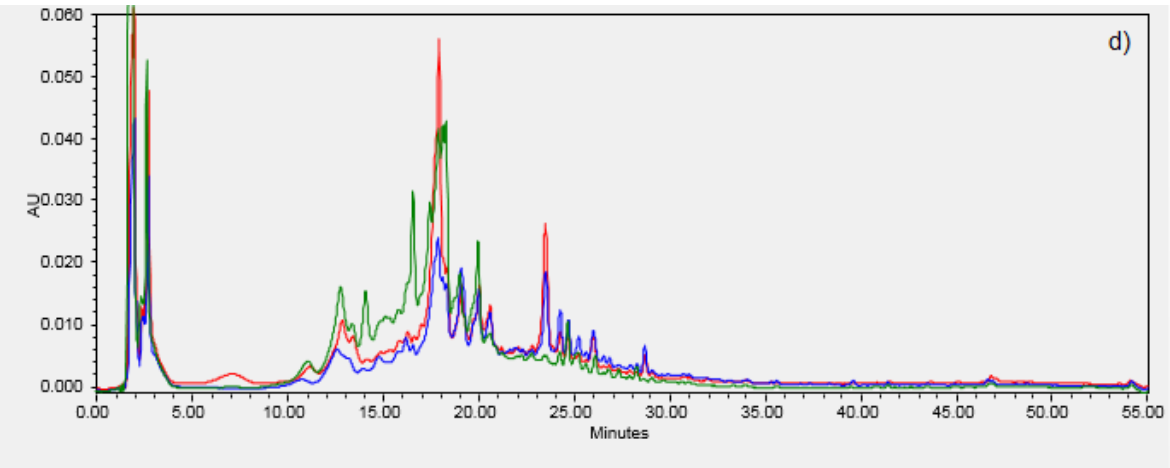
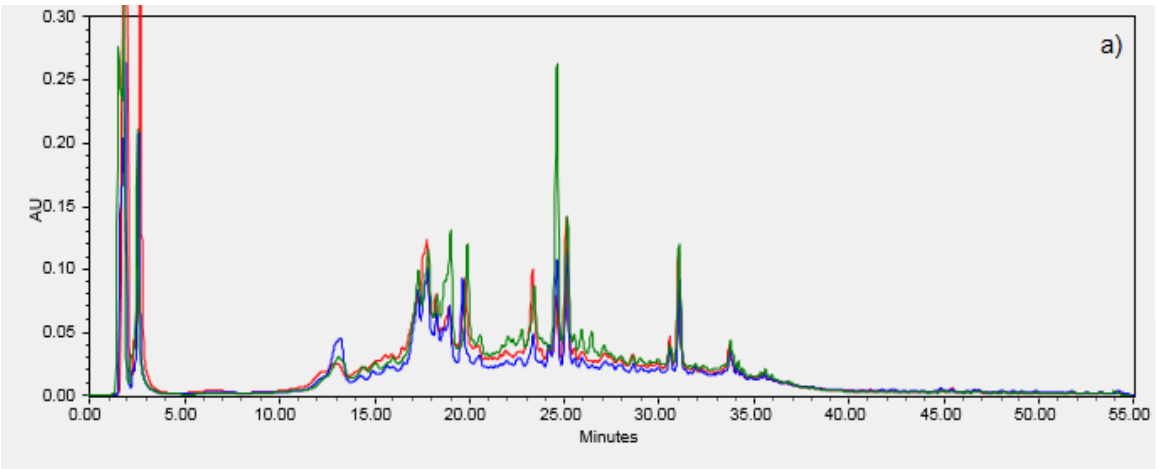
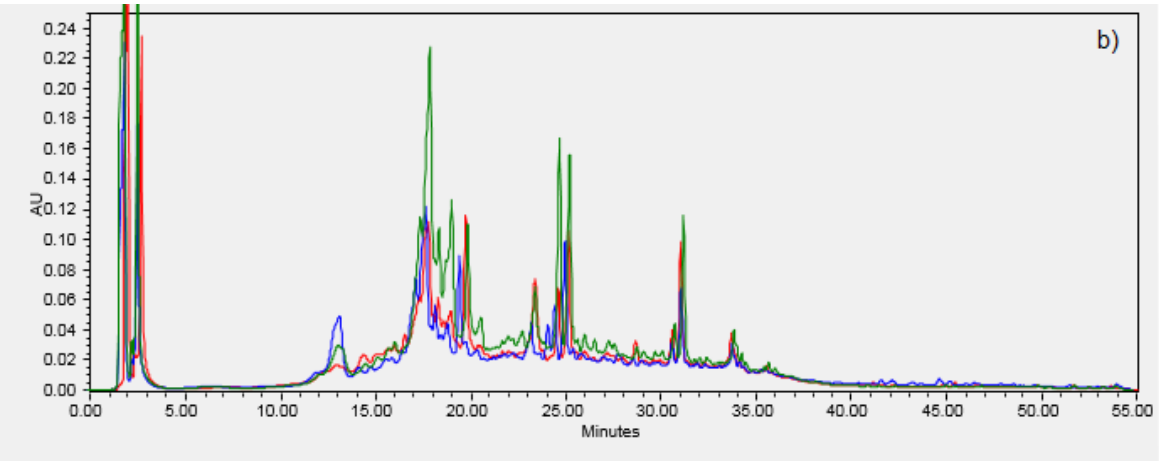


Figura 29. Perfiles de los Cromatogramas de fenoles de bulbos de ajo durante el desarrollo a 320 nm. Línea roja: Coreano 5 °C, línea azul: Coreano TA, línea verde: Perla P. a) 94 DDS, b) 122 DDS, c) 149 DDS, d) Curados.





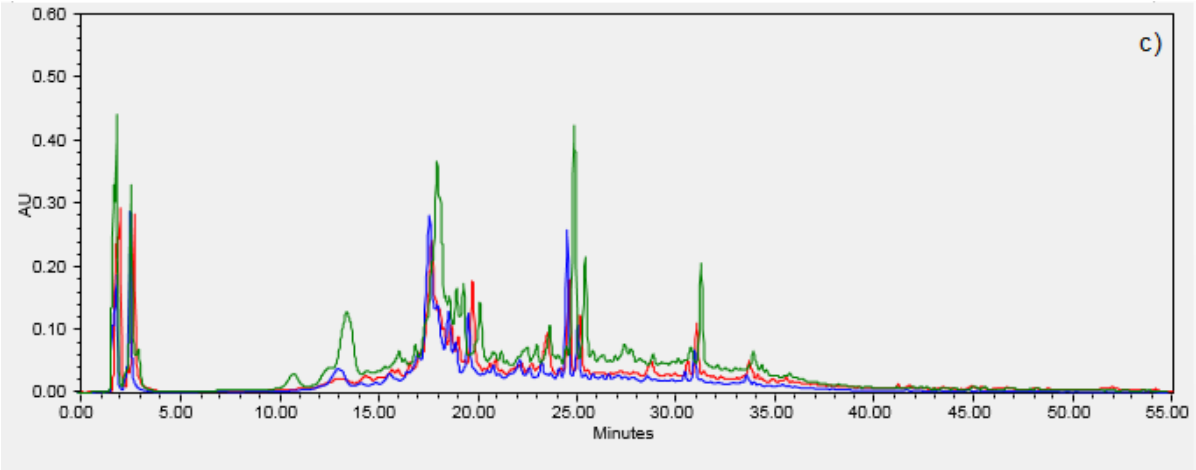


Figura 30. Perfiles de los Cromatogramas de fenoles de raíces de ajo durante el desarrollo a 320nm. Línea roja: Coreano 5 °C, línea azul: Coreano TA, línea verde: Perla P. a) 94 DDS, b) 122 DDS, c) 149 DDS.

Debido a que no fue posible identificar los picos con los estándares disponibles, se procedió a realizar un escrutinio en todos los cromatogramas obtenidos para identificar si había diferencias en cuanto a la presencia o no de algunos picos durante el desarrollo y así determinar si esa presencia o ausencia era atribuible a las diferentes condiciones de estudio. El escrutinio se realizó en el conjunto de picos que mostraron las áreas mayores, (1 hasta 10 X 10^6 para bulbos, y de 5 hasta 70 X 10^6 para raíces). El escrutinio se realizó con 17 picos en bulbo y 15 picos en la raíz.

Los cuadros 15 y 16 muestran los tiempos de retención de los picos de bulbo y raíz respectivamente donde se anota con asterisco aquellos que desaparecen durante las diferentes fechas de análisis mientras que los que no tienen esa anotación indica la presencia de los mismos. Los bulbos de ajo ‘Perla’ (BP) presentaron el menor número de picos que desaparecieron (5) a los que les siguió los bulbos de plantas generadas de “dientes semilla” almacenados a 5 °C (B5) donde no se observaron 7 picos, mientras que los bulbos de “dientes semilla” almacenados a TA (BTA) no mostraron 9 picos (Cuadro 15). Dado que el ajo ‘Perla es tolerante a la pudrición blanca, y que los bulbos B5 adquirieron cierta tolerancia; un criterio de

utilidad de esta tabla sería que los fenoles que no se encuentran en los Bulbos BTA en las primeras etapas de desarrollo podrían ser compuestos candidatos a explicar la tolerancia a la enfermedad. En este sentido, los picos con tiempos de retención de 17.88 y 20.67 min podrían ser candidatos para explicar la tolerancia a esta enfermedad. No obstante, hace falta trabajo para comprobar ésta hipótesis.

Cuadro 15. Resumen de picos de fenoles que aparecen o no durante el desarrollo de bulbos de plantas de ajo generadas de "dientes semilla" almacenados a 5 °C y TA.

TRAT.	B5				BTA				BP			
TR/DDS	94	122	149	C	94	122	149	C	94	122	149	C
13.276			*	*							*	*
14.061												
15.008				*						*		
17.203								*				
17.883	*				*							
18.342												
19.021				*		*						
19.507		*		*		*			*	*		
20.67					*		*					
23.49										*		
24.267												
25.882						*						
28.676												
29.108												
38.027								*				
38.71												
39.377								*				

TR: tiempo de retención TRAT.:tratamiento DDS:Días después de siembra C:Curado
B5: Bulbo almacenado a 5°C BTA:Bulbo almacenado a TA BP:Bulbo Perla
*Picos que desaparecen en los diferentes DDS.

Para el caso de las raíces, los picos 19.7, 23.3 y 24.2 podrían tener interés para explicar la susceptibilidad de las plantas RTA (Cuadro 16). No obstante, también la concentración de todos y cada uno de los compuestos puede ser parte de la explicación a la susceptibilidad o tolerancia al patógeno.

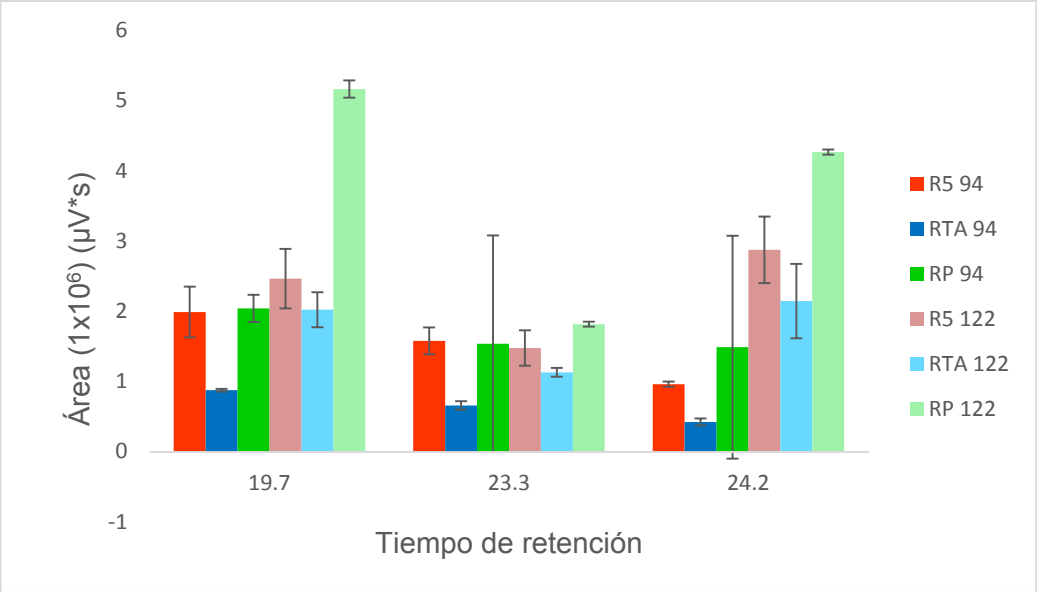
Cuadro 16. Resumen de picos de fenoles que aparecen o no durante el desarrollo de raíces de plantas de ajo generadas de “dientes semilla” almacenados a 5 °C y TA.

TRAT.	R5			RTA			RP		
TR	94	122	149	94	122	149	94	122	149
17.643			*			*			
18.156		*	*	*	*	*			
18.315	*								
18.716									
19.735						*			
20.31									
23.379						*			*
24.209						*			
24.626									
25.175									
25.616									
29.021									
29.436		*	*		*				
31.462									
32.052		*						*	*

TR: tiempo de retención TRAT.:tratamiento DDS:Días después de siembra C:Curado
B5: Bulbo almacenado a 5°C BTA:Bulbo almacenado a TA BP:Bulbo Perla
*Picos que desaparecen en los diferentes DDS.

A efecto de explorar si los picos de fenoles con tiempos de retención de 19.7, 23.3 y 24.2 minutos en raíces de las diferentes muestras señalaban una diferencia de abundancia en los diferentes condiciones de estudio; se analizó por separado dicha abundancia (área bajo la curva) a los 94 y 122 días después de la siembra. La Figura 31 indica que las raíces de plantas generadas de “dientes semilla” almacenada a 5 °C (R5) tuvieron una mayor área de esos tres fenoles en comparación con las raíces de las plantas generadas de “dientes semilla” almacenados a temperatura ambiente (RTA) y sus valores fueron comparables con la abundancia mostrada por las raíces de ajo ‘Perla’ (RP). Esto parece apoyar de manera presuntiva que estos tres fenoles podrían ser responsables de la mayor tolerancia a las enfermedades por parte del ajo ‘Perla’ y la tolerancia inducida por el almacenamiento a 5 °C en el ajó ‘Coreano’.

No obstante, lo anterior debe ser comprobado con más experimentación e identificación de los compuestos fenólicos señalados.



R5: Raíz de dientes almacenados a 5°C
RTA: Raíz de dientes almacenados a TA (Temperatura ambiente)
RP: Raíz de dientes Perla.
94, 122: DDS (Días después de siembra)
Figura 31. Tiempos de retención que no aparecen en TA a los 149 DDS.

7.4. Cambios en el contenido de antocianinas en los bulbos de ajo.

Con el acondicionamiento a 5°C durante 5 semanas antes de la siembra aumentó el color morado de los bulbos (Figura 32) durante el crecimiento de las plantas y en los bulbos cosechados, lo que indica que el proceso de acumulación de antocianinas se vio afectado por el acondicionamiento en frío. Este cambio de color se considera un rasgo positivo en la calidad, ya que el color morado es muy apreciado en el mercado nacional.

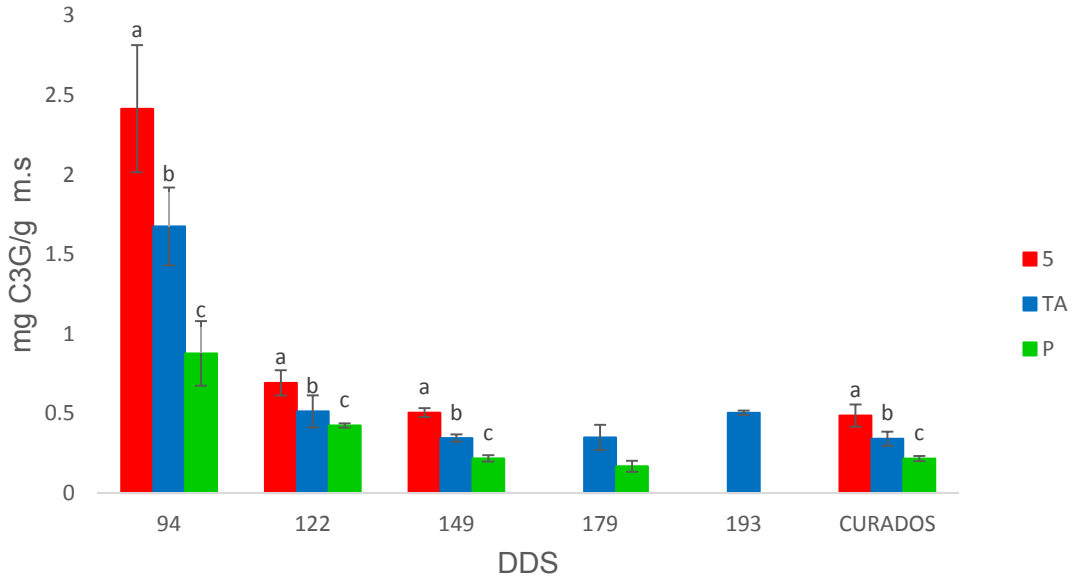
Figura 32. Bulbos de ajo Coreano generados del almacenamiento a 5 °C (a) o almacenados a TA (b) y bulbos de ajo Perla (c).

El Cuadro 17 muestra el contenido de antocianinas y su comparación de medias entre las diferentes condiciones de estudio mientras que la Figura 33 muestra los cambios de este componente durante el desarrollo en las condiciones de este estudio. Conforme transcurrió el desarrollo de la planta el contenido de antocianinas disminuyó para las tres condiciones del estudio, siendo mayor el contenido en los bulbos de las plantas de ajo Coreano generadas del almacenamiento a 5°C a los que le siguieron los bulbos de las plantas de esa misma variedad generadas del almacenamiento a TA y finalmente por los bulbos del ajo Perla. Estos datos confirman por qué el ajo Coreano tiene su color morado característico asociado a su contenido de antocianinas mientras que el ajo Perla, al ser una variedad blanca, muestra menor contenido de antocianinas.

Cuadro 17. Comparación de medias del contenido de antocianinas totales en bulbos con túnicas de ajo Coreano y Perla durante su desarrollo del cultivo.

Tratamiento mg C3G/g m.s	DDS					
	94	122	149	179	193	CURADOS
B5	2.41 ± 0.39[a]	0.69 ± 0.07[a]	0.50 ± 0.02[a]			0.48 ± 0.06[a]
BTA	1.67 ± 0.24[b]	0.51 ± 0.10[b]	0.34 ± 0.02[b]	0.34 ± 0.07	0.50 ± 0.01	0.34 ± 0.04[b]
BP	0.87 ± 0.20[c]	0.42 ± 0.01[c]	0.21 ± 0.01[c]	0.16 ± 0.03		0.21 ± 0.01[c]

Letras diferentes representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). B5: Bulbos de ajo Coreano a 5°C, BTA: bulbos de ajo Coreano a TA y BP: Bulbos de ajo Perla. DDS: Días después de siembra.



Letras diferentes representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). 5: 5°C, TA: temperatura ambiente y P: Perla. DDS: Días después de siembra.

Figura 33. Cambios en el contenido de antocianinas totales durante el desarrollo de bulbos de ajo Coreano y Perla Bajo las tres condiciones de estudio.

Los contenidos de antocianinas para los bulbos de ajo Coreano registrados en este estudio coinciden con lo reportado por Dufoo *et al.,* (2013) quienes reportaron mayores contenidos de antocianinas en túnicas de ajo Coreano (0.380-1.136 mg C3G/g) generados de bulbos “semilla” almacenaos a 5°C en comparación de las túnicas de bulbos de la misma variedad generados de bulbos “semilla” almacenados a TA (0.103-0892 mg C3G/g).

Los menores contenidos de antocianinas observados en la variedad Perla confirman su característica de variedad blanca; no obstante también muestra que aunque con menor contenido de estos compuestos, tiene la capacidad de síntesis de los mismos y puede posiblemente potenciarla si las condiciones ambientales se cambian como lo demostró Galaz-Pérez (2009) en ajo California late (variedad blanca) quien indujo la pigmentación morada cuando el crecimiento de la planta estuvo sometida a condiciones de frio (0 y 5 °C) durante 30 días de desarrollo.

No obstante, el menor contenido de antocianinas y la mayor tolerancia del ajo Perla a la pudrición blanca; parecen indicar que no existe una relación directa de la presencia de estos compuestos con la tolerancia a esta enfermedad.

7.5. Cambios en el contenido de Giberelinas (GAs) durante el desarrollo.

El mayor contenido de compuestos fenólicos en las plantas de ajo Coreano generadas de bulbos “semilla” almacenadas a 5 °C, especialmente en las primeras etapas de desarrollo, planteo la necesidad de correlacionar estos datos con el desarrollo de la planta y de manera particular con los cambios en su contenido de giberelinas.

La figura 34 muestra un cromatograma típico de un extracto de giberelinas de una muestra de ajo el cual muestra plena coincidencia con los cromatogramas reportados por López-Echeverría (2004), Meza-Hernández (2005), Utrilla-Vázquez (2008), y Rodríguez-Lerma (2013), en muestras de brotes de ajo de diferentes variedades (Taiwan, Chino, Perla y Coreano). Mediante comparaciones de los espectros de absorción de los picos de las muestras contra el espectro del estándar de GA_3 se observó que solamente dos picos o fracciones mostraron un espectro similar al mostrado por el estándar GA_3, los cuales fueron denominados fracciones F2 y F3 con tiempos de elución de 22.7 y 23.7 minutos respectivamente. Vázquez-Barrios (2005), López-Echeverría (2004) y Rodríguez-Lerma (2013), utilizando un bioensayo con semillas de trigo, confirmaron que dichas fracciones tenían actividad giberélica. Este trabajo confirma esos resultados y también señala que la variedad Perla muestra cromatogramas similares lo que confirma que dichas fracciones están presentes en estos bulbos.

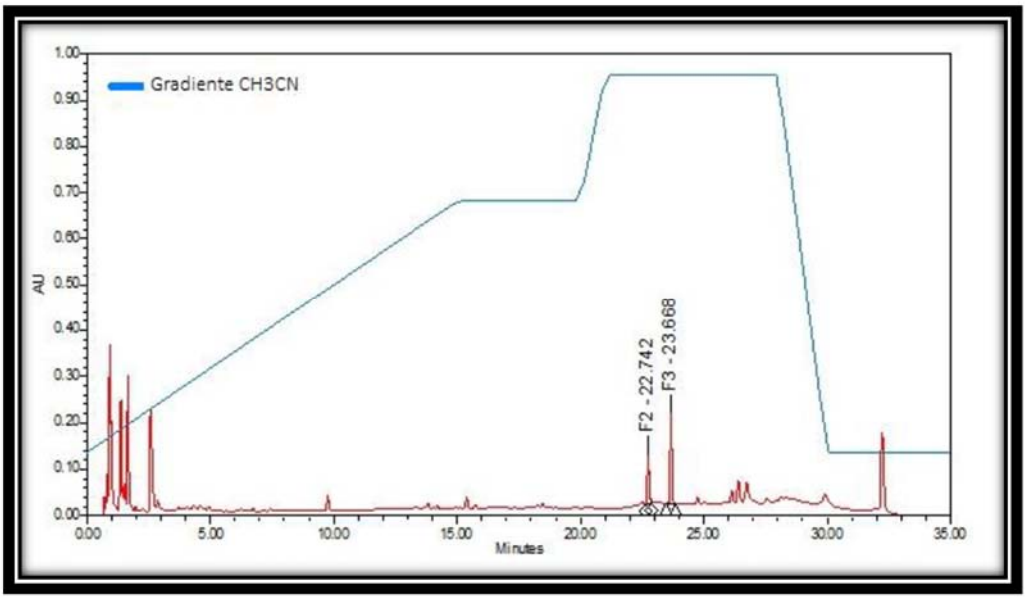


Figura 34. Cromatograma típico de extracto metanólico de GAs de bulbos de ajo Cv. Coreano.

Aunque se ha demostrado la actividad de giberelinas de esas fracciones no se ha demostrado que estas sean giberelinas GA3 lo cual contrasta con otros autores como Argüello *et al*., (2001) quienes describen el comportamiento de GA_3 encontrado en bulbillos obtenidos por cultivo *in vitro* de meristemos de ajo; y de Guo *et al*., (2012) quienes también muestran los cambios de concentración de GA_3 en las hojas de ajo cv Zhengyuezao.

7.5.1. Cambios en el contenido de GAs durante el desarrollo de la planta.

El cuadro 18 muestra la comparación de medias del contenido de las fracciones F2 y F3 durante el desarrollo del cultivo de ajo en diferentes condiciones de estudio.

Cuadro 18. Contenido de fracciones F2 y F3 durante el desarrollo del cultivo.

Fracciones (mg eq. GA3/100g m.s.)	DDS					
	94	122	149	179	193	CURADOS
F2 (5°C)	10.576 ± 1.73[a]	9.556 ± 0.46[a]	3.056 ± 0.11[a]	-	-	1.531 ± 0.05[a]
F3 (5°C)	27.318 ± 3.28[a]	21.552 ± 2.46[a]	10.730 ± 0.44[a]	-	-	4.376 ± 0.24[a]
F2 (TA)	14.111 ± 2.53[a]	9.927 ± 0.31[a]	2.188 ± 0.48[b]	0.390 ± 0.39	0.675 ± 0.11	1.284 ±0.33[a]
F3 (TA)	25.423 ± 0.05[a]	19.029 ± 0.91[a]	7.563 ± 0.85[b]	1.408 ± 1.07	2.037 ± 0.12	3.234 ± 0.75[a]
F2 (P)	20.755 ± 1.53	14.761 ± 2.56	5.354 ± 1.33	0.077 ± 0.07	-	2.082 ± 0.02
F3 (P)	30.313 ± 1.33	25.133 ± 3.35	25.284 ± 3.10	0.869 ± 0.12	-	6.461 ± 0.63

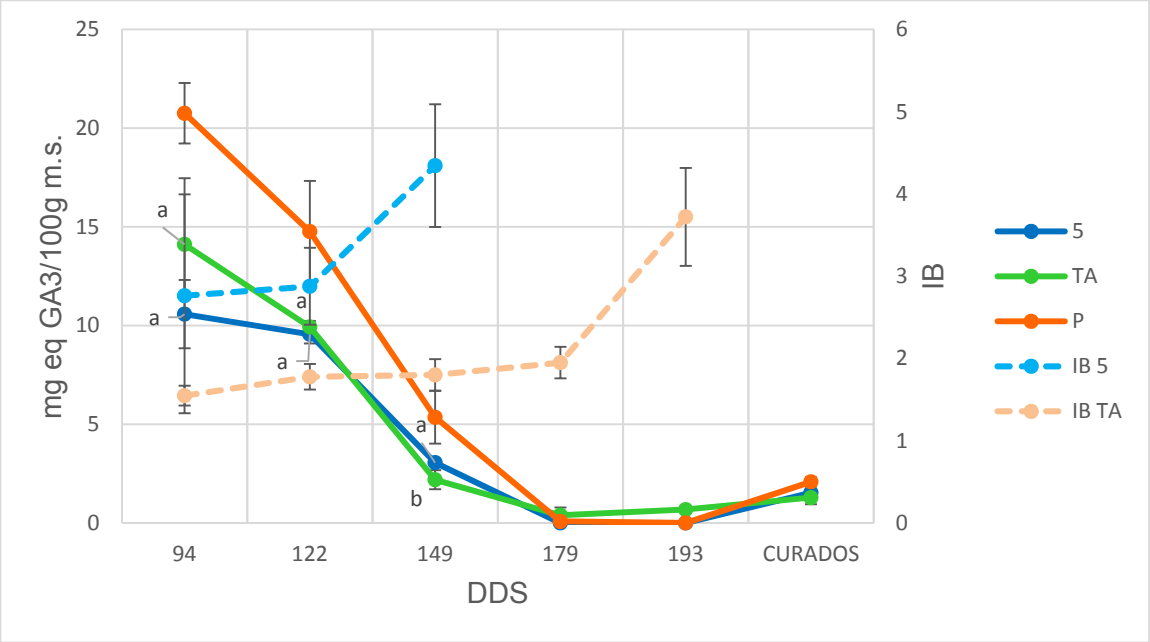
Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas en los dos tratamientos por prueba t de Student ($p \leq 0.05$). DDS: días después de la siembra.

Durante todo el desarrollo, el contenido de la fracción F3 fue mayor que la fracción F2 y ambas fracciones muestran un decremento durante el ciclo de cultivo Este comportamiento coincide de forma general con lo reportado con Utrilla-Vázquez (2008); no obstante, esta autora describe tal decremento a partir de los 175 días de desarrollo en plantas generadas del almacenamiento a TA, mientras que en este estudio inició desde los 94 días. La fracción F2 fue mayor de los 94-122 DDS en TA y a los 149 DDS mayor en 5°C. También se observa claramente que la fracción F3 fue mayor en las muestras de plantas generadas bajo almacenamiento a 5°C respecto del contenido de las plantas almacenadas a TA. Esto pudiera sugerir que esta fracción pudiera tener una mayor participación en el rápido desarrollo de las plantas de ajo generadas del almacenado a 5°C por 5 semanas.

Debido a que las giberelinas están relacionadas con el desarrollo de plantas y que los tratamientos aplicados pueden tener un efecto en el desarrollo de las mismas y los bulbos, se realizó una correlación gráfica entre el contenido de las fracciones con actividad de giberelinas y el índice de bulbificación durante el ciclo del cultivo. Las figuras 35 y 36 muestran los cambios de las dos fracciones F2 y F3 respectivamente en los bulbos cv Coreano y Perla con los índices de bulbificación de las plantas de ajo Coreano bajo las dos condiciones de almacenamiento de sus bulbos “semilla”. Como ya se anotó previamente, el contenido de la fracción F3 fue

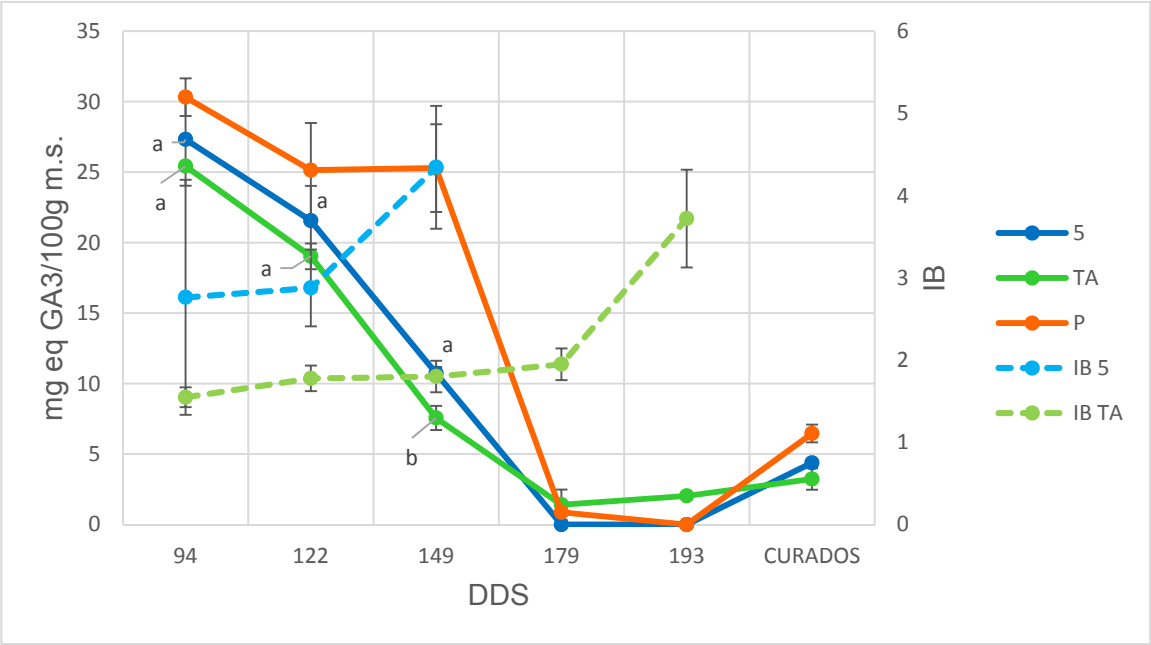
mayor que F2 y las dos fracciones tendieron a disminuir durante el ciclo de desarrollo del cultivo.

Un aspecto importante muestran estas gráficas es que cuando inicia la diferenciación del bulbo, el contenido de giberelinas disminuye, lo cual es lógico si se considera que el desarrollo del bulbo es parte del proceso de inicio de letargo de la planta y por tanto el crecimiento vegetativo se ve frenado. Meza-Hernández (2005) mencionó que la F3 puede estar directamente relacionada con el crecimiento de la planta, aunque no se puede descartar una interrelación con la otra fracción debido a que las dos fracciones muestran un comportamiento que pudiera explicar el crecimiento.



Letras diferentes indican diferencias significativas en los dos tratamientos por prueba t de Student ($p \leq 0.05$).

Figura 35. Contenido de F2 e índice de bulbificación (IB) en bulbos durante el desarrollo. 5: bulbos almacenados a 5°C, TA: Bulbos almacenados a temperatura ambiente y P: bulbos cv Perla. IB solo para cv Coreano.



Letras diferentes indican diferencias significativas en los dos tratamientos por prueba t de Student ($p \leq 0.05$).

Figura 36. Contenido de F3 e índice de bulbificación (IB) en bulbos durante el desarrollo. 5: bulbos almacenados a 5°C, TA: Bulbos almacenados a temperatura ambiente y P: bulbos cv Perla. IB solo para cv Coreano.

VIII. CONCLUSIONES

Los bulbos de plantas almacenados a 5°C mostraron un ciclo de desarrollo más corto (149 DDS) que las plantas de bulbos almacenados a TA (193 DDS). No obstante al final del ciclo de cultivo, las plantas 5C tuvieron menor número de hojas, menor peso y menor diámetro del bulbo.

Las pruebas de inhibición del crecimiento del hongo con raíz liofilizada *in vitro* mostraron una mayor inhibición del crecimiento del patógeno por las raíces de ajo cv Perla, al que le siguió las raíces de ajo Coreano generadas de bulbos “semilla” almacenados a 5°C. Las raíces de bulbos almacenados a TA, mostraron la menor inhibición del crecimiento lo que indicó que la refrigeración previa del ajo Coreano puede ser una alternativa para disminuir del ataque del hongo *Sclerotium cepivorum* en el campo.

El contenido de fenoles totales fue mayor en la variedad Perla lo cual parece estar asociado a su mayor tolerancia a la pudrición blanca. El proceso de acumulación de compuestos fenólicos fue diferente en bulbos y raíces; en bulbos decreció durante el desarrollo mientras que en raíces incrementó dentro el mismo ciclo. Esto puede tener implicaciones en el proceso de infección de la pudrición blanca.

El almacenamiento de los bulbos “semilla” a 5 °C en ajo Coreano indujo una mayor síntesis de compuestos fenólicos lo cual parece inducir una mayor tolerancia a la pudrición blanca. Estos datos parecieron confirmarse con las pruebas de reto de crecimiento del patógeno *in vitro*.

La inducción de la síntesis de compuestos fenólicos por medio del almacenamiento en refrigeración puede ser una alternativa para reducir el ataque o la incidencia de pudrición blanca en campo.

La mayor síntesis, en raíces, de fenoles con tiempos de retención de 19.7, 23.3 y 24.2 min pueden tener importancia como parte del proceso de inducción de tolerancia a la pudrición blanca.

Los contenidos de antocianinas no estuvieron correlacionados con la tolerancia a la pudrición blanca.

En todas las fechas de muestreo, la fracción F3 con actividad de giberelinas, fue más alta en las muestras de plantas generadas de “dientes semilla” almacenados a 5°C en comparación con las muestras de plantas generadas del almacenamiento a TA. Lo cual sugiere que esta fracción pudiera explicar el rápido desarrollo de las plantas de ajo generadas de bulbos “semilla” almacenados a 5 °C, pudiendo ser este un factor por el cual se adelanta el desarrollo y la cosecha.

X. BIBLIOGRAFÍA

Achard, P.; H. Cheng.; L. De Grauwe.; J. Decat.; y H. Schoutteten. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311:91–94.

Acosta-García, G.; Pantoja-Hernández, M.; Muñóz-Sánchez, C.; Pérez-Pérez, C.; Guevara-González, R.; Torres-Pacheco, I.; Delgadillo-Sánchez, F.;González-Chavira, M.; Guevara-Olvera, L. (2012). Transformación del hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berk. Empleando fusión de protoplastos. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3 (7): 1333-1345.

Agríos, G. N. (2006). Fitopatología. Limusa Noriega, Eds. 2ª Ed. México. 838 p.

(APS) American Phytopathological Society. (1995). Compendium of Onion and Garlic Diseases. H. F.. Schawartz, and S. K. Mohan (eds.). St. Paul, Minnesota, USA. 54 p.

Argüello, J. A.; S. B. Nuñez.; y A. Ledesma. (1997). Bulbing physiology in garlic (*Allium sativum* L) cv Rosado Paraguayo. III. Nutrient in garlic plants: Its relation to growth dynamic and bulb morphogenesis. Acta Hort. 433: 417-425.

Argüello, J. A.; Falcon, L. R.; Seisdedos, L.; Milrad, S.; Bottini, R. (2001). Morphological change in garlic (*Allium sativum* L.) microbulblets during dormancy and sprouting as related to peroxidase activity and gibberellin A_3 content. Biocell. 25:1-9.

Ávalos García, A.; y Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. *2* (3): 119-145.

Ávila, G. T. (2007). Factores de manejo del cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) que determinan la calidad del producto de cosecha. Avances en Horticultura. 5:1-13.

Beato, V. M.; Orgaz, F.; Mancilla, F.; y Montaño, A. (2011). Changes in Phenolic Compounds in Garlic (*Allium sativum* L.) Owing to the Cultivar and Location of Growth. Plant Foods Hum Nutr. 66 (3): 218-223.

Benkeblia, N. (2007). Phenolic Compounds of *Allium* Species. BioSciences , 1 (3): 135-140.

Biljana-Bozin.; Minica-Dukic N.; Samojlik I.; Goran A.; and Igic R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L.., Alliaceae). Food Chemistry. 111: 925-929.

Brewster, J.; F. M. Mondal.; y G.E. Morris. (1986). Bulb development in onion (*Allium cepa* L.). IV. Influence on yield of radiation interception, its efficiency of conversion, the duration of growth and dry matter partitioning. Ann. Bot. 58:221-223.

Brewster, J. (1994). Onions and other vegetables Alliums. CAB International. USA.

Brewster, J. (2001). Las cebollas y otros *Alliums*. Ed Acribia. España. pp 199-200.

Brewster, J. L. (2002). Las cebollas y otros *Alliums*. Traducción de Ana María Mayoral Canalejas y Otilia López Buesa. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 253 p.

Burba, J. L. (1992). Producción, propagación y utilización del ajo (*Allium sativum* L.). En: Producción, postcosecha, procesamiento y comercialización de ajo, cebolla y tomate. FAO/OEA. Santiago de Chile. p. 63-126.

Burba, J. L. (2003). Producción de ajo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Proyecto Ajo/INTA Argentina. 69: 5-36.

Coley-Smith, J. R.; D. Parfitt.; and I. M. Taylor. (1987). Studies of dormancy in sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Plant Pathology. 36 (4): 594-599.

Coley-Smith, J. R.; C. M. Mitchel.; and E. C. Sansford. (1990). Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. Plant Pathology. 39 (1): 58-69.

Coventry. E.; Noble. R.; Mead. A.; Whipps. J.M. (2002). Control of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) whit composted onion waste. (2002). Soil Biology and Biochemistry. 34:1037-1045.

Crowe, F. J.; H. S. Hall.; A. S. Greathead.; and K. G. Baghott. (1980). Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidense of white rot of onion and garlic. Phytopathology. 70 (1): 64-69.

Cruz-Borruel, M.; Hernández-Fundora, Y.; y Rivas-Figueredo, E. (2006). Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos y plagas. Temas de ciencia y tecnología. 10 (29), 45-54.

Delgadillo S, F.; E. Zavaleta-Mejía.; S. K. Osada,.; V. A. Arévalo.; V. A. González Hernández.; A. D. Nieto.; and P. I. Torres. (2002). Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* Berk. and it´s control with Tebuconazole in garlic (*Allium sativum* L.) Revista Fitotecnia Mexicana. 25: 349-354.

Del Pozo, A.; M. I. González.; y C. Barraza. (1997). Phenological development of 13 clones of garlic (*Allium sativum* L): influence of temperature, photoperiod and cold storage. Acta Hort. 433: 389-393.

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

Diez, M. de las Heras.; I. Jaime.; J. Rovira.; M. Collado.; y A. Fombellida. (2010). Antioxidant capacity and pungency of `Horcal` onion under refrigerated storage. Acta Hort. 858: 875-879.

Dufoo-Hurtado D.; Zavala-Gutiérrez K.; Cong-Mei C.; Cisneros-Zevallos L.; Guevara-González R.; Torres-Pacheco I.; Vázquez-Barrios M.; Rivera-Pastrana C.; and Mercado-Silva E. (2013). Low-Temperature conditioning of seed cloves enhances the expression of phenolic metabolism related genes and anthocyanin content in Coreano garlic (*Allium sativum*) during plant development. Journal of Agricultural and food chemistry. 61: 10439-10446.

Durán, R. M.; León, R.; y Ruíz Gutiérrez, V. (1993). Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. Grasas y Aceites. 44 (6), 365-369.

Entwistle, A. R. (1990). Root Diseases. In: Rabinowitch, H. D., and J. M. Brewster (Eds). Onions and allied Crops. Vol. II. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. U.S. 117-121.

Espinosa Cácares, F. W.; Ríos Ríos, E. M.; y Elías Peñafiel, C. C. (2010). Determination of total phenols, fructans, pungency in six cultivars of garlic (*Allium sativum* L.) from Peru. Rev Soc Quím Perú. 76 (1), 101-109.

FAOSTAT (2011). Consulta realizada el 20 de julio de 2012. http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE_BY_DOMAIN

Fenwick GR and Hanley AB. (1990). Chemical composition. In: Brewster JL, Rabinowitch HD (eds.) Onion and Allied Crops, vol. 3, Biochemistry, Food Science and MinorCrops.CRC, Boca Raton. 73-92.

Ferri N.; Yokoyama K.; Sadilek M.; Paoletti R.; Apitz-Castro R.; Gelb M. H.; y Corsini A. (2003). Ajoene, a garlic compound, inhibits protein prenylation and arterial smooth muscle cell proliferation. Journal of Pharmacology. 138 (5): 811-818.

Flaño-Ipinza I. A. (2012). El Mercado del ajo. Oficina de estudios y políticas agrarias ODEPA.

Galaz Perez E. (2009). Efecto de factores ambientales precosecha en el desarrollo de la planta, bulbificación y acumulación de fructanos en ajo. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro México.

García, C. R. (1998). El ajo: cultivo y aprovechamiento. 2ª. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. p. 205.

García, J.; y Sánchez, F. (2000). Efectos cardiovasculares del ajo (Allium sativum). Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50 (3): 219-229.

Giaconi, M.; and Escaff, M. (1993). Cultivo de hortalizas, Editorial Universitaria. Santiago, Chile. p. 332.

Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UVvisible spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc. F1.2.1-F1.2.13.

George. E. F. (2008). In: Plant propagataion by tissue culture. 3rd. Edition. pp. 227-232.

Gohel, V.; A. Singh.; M. Vimal.; P. Ashwini; and H. S. Chhatpar. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. African Journal of Biotechnology. 5 (2): 54-72.

González, A. M.; and Arbo, M. M. (2006). Morfología de plantas vasculares. Reporte informativo. Universidad Nacional del Noreste. Corrientes, Argentina. p. 220.

Guevara-Figueroa T.; López-Hernández L.; Lopez M.G.; Dufoo Hurtado M.D.; Vázquez-Barrios M.E.; Guevara-Olvera I.; Guevara González R.G.; Rivera-Pastrana D.M.; Torres –Robles H.; Mercado-Silva E.M. Conditioning garlic "seed" cloves at low temperature modifies plant growth, sugar, fructan content, and sucrose sucrose fructosyl transferase (*1-SST*) expression. Datos no publicados.

Hedden, P.; and Kamiya, Y. (1997). Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Molec. Biol. 48: 431-460.

Horbowicz, M.; y T. Kotlinska. (2004). Level of flavonols in wild and cultivated *Allium* species. Acta Hort. 517: 375-380.

Huchette, O.; R. Kahane; J. Auger.; I. Arnault y C. Bellamy. (2005). Influence of environmental and genetic factors on the alliin content of garlic bulbs. Acta Hort. 688: 93-99.

Jakson, S.; P. James.; E. Carrera.; S. Pratt y B. Thomas. (2000). Regulation of transcript level of a potato gibberellin 20-oxidase gene by light and phytochrome B. Plant Physiol. 124: 423-430.

Jiménez, M. A.; Arcia, A.; Ulacio, D.; & Hernández, A. (2012). Evaluation of Trichoderma spp. and Acibenzolar-S-Methyl (Bion®) as resistance inducers in

garlic (*Allium sativum* L.) agains white rot *Sclerotium cepivorum* Berk. under field conditions. *Journal of the Selva Andina Research Society.* Bolivia. 1 (1): 14-25.

Jiménez, M. A.; Perdomo, W.; & Ulacio, D. (2011). Estrategias de manejo integrado de *Sclerotium cepivorum* Berk., y la pudrición blanca del ajo en Carache, estado Trujillo, Venezuela. Bioagro , 23 (2): 1316-3361.

Kamenetsky, R.; & Rabinowich, H. D. (2006). The Genus *Allium*: A Developmental and Horticultural Analisis. Horticultural Reviews. 32: 329-337.

Kavanagh, K. (2005). Fungi: biology and applications. Ed. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK. 267 p.

Kim, M. Y.; Y. Kim.; y S. K. Chung. (2003). Identification and *in vitro* biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot:

inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. J. of the Sci. Food and Agric. 85 (49: 633-640.

Lagunes, E. F. (2009). Transformación genética de ajo (*Allium sativum* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens.* Tesis de Maestría en Recursos Genéticos y Productividad en el Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícola. Montecillo Texcoco, Estado de México. 95 p.

Lawson L. D. (1993). Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: role in reducing blood lipids. In: Human medicinal agents from plants. American Chemical Society, Chapter 21. 306-330 p.

Ledesma, A., Racca, R. W., and Reale, M. I. (1983). Efecto de las condiciones de almacenaje y épocas de plantación sobre el crecimiento en ajo (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo. Phyton , 43: 207-213.

Ledesma, A.; Nuñez, S. B.; Arguello, J. A. (1997). Almacenamiento de semillas de ajo a bajas temperaturas, uso de reguladores y fertilizantes para la producción de ajos tempranos. Una propuesta. En: 50 temas sobre producción de ajo. Mendoza, Argentina. 3: 39-46.

López E. G. 2004. Evaluación de los parámetros de calidad de ajo almacenado y efecto de la temperatura de almacenamiento en la ruptura del letargo. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química, Querétaro, México., 128 p.

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

Lozoya-Saldaña, H., Rivera-Hinojosa, R., y Colinas-León, M. T. (2007). Phenols, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase: their relationship to the genetic resistance against late blight (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) in potato (*Solanum tuberosum* L.) Clones. Agrociencia. 41 (4): 479-489.

Lipinski, V.; Gaviola de Heras, S. (1997). Manejo de la fertilización y el abonado de cultivos de ajo de Mendoza. En: 50 temas sobre producción de Ajo. Argentina. 3: 120-130.

Macias-Valdez, L. M.; Valadez-Marín C. C. López-Frías, L. C. (2007). Guía para cultivar ajo en Aguascalientes. Folleto para productores (21).

Metcalf, D.A., and C. R. Wilson. (1999). Histology of *Sclerotium cepivorum* infection of onion root and the spatial relation-ships of pectinases in the infection process. Plant Pathology. 48 (4): 445-452.

Metcalf, D.A., and C. R. Wilson. (2001). The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Pathology. 50 (2): 249-257.

Meza-Hernández, S. (2005). Estudio de homogenización de la brotación de ajo destinado para siembra y fisiología de ajo mínimamente procesado. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química, Querétaro, México.

Miean, K. y S. Mohamed. (2001). Flavonoids (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants. J. Agric. Food Chem. 49 (6): 3106-3112.

Nuñez, S. B., A. Ledesma, E. Milanesi, M. Dubois, M. Cerana y J. Argüello. (1997). Bulbing physiology in garlic (*Allium sativum* L) cv Rosado Paraguayo.I. Morphophyiological characterization of the inductive and morphological state of bulbing. Acta Hort. 433: 395-403.

Pérez-Moreno, L., J. G. González-Salinas y, J. R. Sánchez-Pale. (1995). Ensayo regional de adaptación y rendimiento de materiales de ajo *Allium sativum* L. tolerantes a la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. generados por irradiación. Revista Mexicana de Fitopatología. 13: 18-25.

Pérez-Moreno, L., J. R. Sánchez-Pale, and A. R. Entwistle. (1998). Control de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) del ajo (*Allium sativum* L.) con esterilizantes en la zona del Bajío, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 16:72-78.

Pérez-Moreno, L., Rodríguez-Aguilera, A, y **Ricardo Sánchez-Pale, J. (2004).** Efecto de *Coniothyrium minitans* Campbell en Esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. Revista Mexicana de Fitopatología. 22 (003): 429-434.

Ponce-Herrera V., R. García-Espinoza, Ma. del P. Rodríguez-Guzmán y E. Zavaleta-Mejía. (2008). análisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* l.) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. Agrociencia 42: 71-83.

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

Portela, J. A y Cavagnaro, J. B. (2005). Escala ecofisiológica par ajos blancos y violetas: Una herramienta fundamental para la toma de decisiones en el cultivo. Estación Experimental Agropecuaria. La Consulta. INTA. Informe Anual de Progresos. p. 42-46

Purseglove J., W. (1985). Tropical crops: Monocotyledons I. New York: Longman. 607 p.

Rabinowitch, H. D., and J. M. Brewster. (1990). Onions and Allied Crops. Botany, Physiology and Genetics. Vol. I. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. U.S. A. 273 p.

Rabinowith, H. D., and L. Currah. (2002). Allium Crop Science: Recent Advances. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U. K. 515 p.

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

Rademacher, W. (2000). Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and othere metabolic pathways. Ann. Rev. Plant Physiol and Plant Molec. Biol. 51:501-531.

Rahim, M. A. and Fordham, R. (1990). Effect of shade and environmental conditions on the initiation and development of garlic cloves (*Allium sativum* L.). Sci. Hort. 45: 21-30.

Rahim, M. A., and Fordham, R. (2001). Environmental manipulation for controling bulbing in garlic. Acta Hortic*.* 55 (5): 181-188.

Rakhimbaev, R. y R. V. Ol'shanskaya. 1981. Preliminary identification of natural gibberellins of garlic. Seriya Biogicheskaya 2: 17-22.

Reveles Hernández, M., Velásquez Valle, R., y Bravo Lozano, Á. G. (2009). Tecnología para cultivar ajo en Zacatecas, Libro técnico No. 11. Campo experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP.272 p.

Rivera-Pastrana D., Gardea, A, A., Elhadi M, Y., Martínez-Tellez M., y González-Aguilar G. (2013). Effect of UV-C irradiation and low temperature storage on bioactive compounds, antioxidant enzymes and radical scavenging activity of papaya fruit. Journal of Food Scientists and Technologists.

Rodríguez-Lerma. G. (2013). Efecto de la aplicación de paclobutrazol y metil jasmonato en la bulbificación y diferenciación de bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. Coreano. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Rojas, V., Ulacio, D., Jiménez, M. A., Perdomo, W., y Pardo, A. (2010). Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium cepivorum* Berk. y la pudrición blanca en ajo. Bioagro. *22* (3): 185-192.

Shah, J.J y I. Kothari. (1997). Histogenesis of the garlic clove. Phytomorphology 23: 162 – 170.

Sánchez P., J. R. (2002). Phathogenicity of four mexican isolates of *Sclerotium cepivorum* Berk. in three cultivars of garlic (*Allium sativum* L.). Agrociencia. 36 (1): 103-113.

Sarita, V. (1995). Cultivo de ajo. Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc. Boletín técnico No. 5 (2ª Ed.). República Dominicana.

SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2011). Recuperado el 03 de Mayo de 2013, de http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351

Slimestad, R., T. Fossen y I. Vágen. (2008). Onions: a source of unique dietary flavonoids. J. Agric. Food Chem. 55 (25): 1067-1080.

Tamire-Zewde., Chemeda-Fininsa., Parshotum K., Sakhuja., Seid-Ahmed. (2007). Association of white rot (*Sclerotium cepivorum*) of garlic with environmental factors and cultural practices in the North Shewa highlands of Ethiopia. Crop protection. 26: 1566-1573.

Takagi, H. & Qu, Y. (1995). Effects of light quality, photoperiod and cold treatment *in vitro* bulbing of garlic shoot tip. Acta Hort.393: 181-188.

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

Terán Quiroga, O. (1976). El cultivo del ajo. Cotagaita, San Juan del Oro, Bolivia. Centro de información para el desarrollo (CID). FIDA. 80p.

Thomas, S. G.; Rieu, I.; Steber, C. M. (2005). Gibberellin metabolism and signaling. Vitamins & Hormones. 172: 289-338.

Ulacio-Osorio, D., E. Zavaleta-Mejía, y R. García-Espinosa. (2003). Materia orgánica y microorganismos antagonistas como estrategias de manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su impacto en el progreso de la pudrición blanca en ajo (*Allium sativum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 21 (3): 346-354.

Ulacio, D., Zavaleta, E., Martínez, A., & Pedroza, A. (2006). Strategies for management of *Sclerotium cepivorum* Berk. in garlic. Journal of Plant Pathology , 88 (3): 253-261.

Utrilla-Vázquez, M. (2008). Efecto del almacenamiento de la "semilla" y del metil jasmonato en el desarrollo y calidad de bulbos de ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Vázquez-Barrios. M. E. (2005). Efecto de diferentes ambientes de conservación sobre la ruptura del letargo de ajo (*Allium sativum* L.) cv. Taiwan y Chino. Tesis Doctoral en Ciencia de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. p. 132.

Velásquez Valle, R., Reveles Hernández, M., & Medina Aguilar, M. M. (2011). Ecología del hongo causante de la pudrición blanca del ajo y la cebolla y

saneamiento de parcelas infestadas. Folleto técnico No.32. SAGARPA, Instituto Nacional de Investigaciones forestales, Agrícolas y Pecuarias .

Warade, S. D. and Shinde, K. G. (1998). Other Alliums. In: Handbook of Vegetable Science and Technology: Production, Composition, Storage and Processing. Marcel Dekker, Inc. N.Y. p. 415-431.

Xu, X.; van Lammeren, A. M.; Vermeer, E.; Vreugdenhil, D. (1998). The role of gibberellin, abscisic acid and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. En: Regulation of gibberellin biosynthesis by light. Current Opinion in Plant Biology. 2: 398-403.

Yamaguchi, S., J. McCallum, M. Shaw, M. Pither, S. Onodera, N, Shiomi, N. Yamauchi y M. Shigyo. (2008). Biochemical and genetic analysis of carbohydrate accumulation in onion (*Allium cepa* L.). Plant & Cell Physiology 49 (5): 730-739.

Zavala-Gutiérrez, K. G. (2011). Estudio de los cambios del perfil transcriptómico en brotes de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano' procedentes de "semillas" almacenadas a diferentes temperaturas. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 92 p.

Zewdea, T., Fininsaa, C., & Sa, P. K. (2007). Association of white rot (*Sclerotium cepivorum*) of garlic with environmental factors and cultural practices in the North Shewa highlands of Ethiopia. Crop protection. 26(10): 1566–1573.

X. ABREVIATURAS

5: Ajo cultivar Coreano almacenado a 5°C

TA: Ajo cultivar Coreano almacenado a temperatura ambiente

P: Ajo cultivar Perla almacenado a temperatura ambiente

B5: Bulbo cultivar Coreano almacenado a 5°C

BTA: Bulbo cultivar Coreano almacenado a temperatura ambiente

BP: Bulbo cultivar Perla almacenado a temperatura ambiente

R5: Raíz cultivar Coreano almacenada a 5°C

RTA: Raíz cultivar Coreano almacenada a temperatura ambiente

RP: Raíz cultivar Perla almacenada a temperatura ambiente

DDS: Días después de siembra

GAs: Giberelinas

C3G: Cianidin 3 glucósido

m.s: material seca

EAG: Equivalentes de Ácido gálico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

IB: índice de bulbificación

F2: Fracción 2 con actividad de giberelina

F3: Fracción 3 con actividad de giberelina