



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

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

**Efecto de la aplicación de paclobutrazol y metil jasmonato en la  
bulbificación y diferenciación de bulbos de ajo  
(*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano'**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Presenta

**IBQ. Gisela Krupskaya Rodríguez Lerma**

Dirigida por

**Dr. Edmundo M. Mercado Silva**

Santiago de Querétaro, Qro., Noviembre de 2013



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

Efecto de la aplicación de paclobutrazol y metil jasmonato en la bulbificación y diferenciación de bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano'

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

IBQ. Gisela Krupskaya Rodríguez Lerma

**Dirigido por:**

Dr. Edmundo M. Mercado Silva

**SINODALES**

Dr. Edmundo M. Mercado Silva  
Presidente

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios  
Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Vocal

Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche  
Suplente

Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Suplente

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

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

## RESUMEN

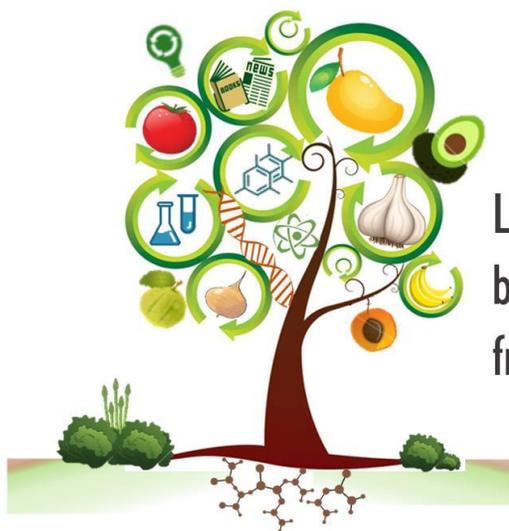
El cultivo de ajo 'Coreano' requiere acumular 550 horas de frío (<5°C) para inducir una correcta bulbificación y obtener una adecuada calidad de los bulbos. No obstante, otros factores como el fotoperiodo, el régimen de fertilización y las prácticas de cultivo, son también determinantes. Para superar la falta de horas de frío, e inducir el proceso de bulbificación, es posible aplicar reguladores de crecimiento con efecto antigiberélico, o con actividad microtubular disruptora que han demostrado favorecer la bulbificación. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la aplicación de paclobutrazol (PBZ), inhibidor de la biosíntesis de giberelinas, y metil jasmonato (MeJA), inductor de la tuberización y del crecimiento radial, sobre la bulbificación de ajo cv. 'Coreano'. Se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizado con tres repeticiones, considerando dos factores de estudio con tres niveles cada uno: tipo de regulador de crecimiento (PBZ 1000 ppm, MeJA 250 ppm y agua como control), y fecha de aplicación de los reguladores (marzo, abril y marzo+abril). Se efectuaron siete muestreos a lo largo del ciclo de cultivo, evaluándose las variables fenológicas, concentración de giberelinas en bulbos de ajo por HPLC-PDA a 205 nm y concentración de glucosa+fructosa (G+F), sacarosa y fructanos por métodos espectrofotométricos (DNS y PAHBAH) y enzimáticos (Kit enzimático K-Fruc, Megazyme). La aplicación de PBZ redujo 17.59 cm la altura de las plantas. Aunque no hubo diferencias estadísticas en el diámetro de bulbo, los tratamientos MeJA en marzo (Mm) y PBZ en marzo+abril (Pma) disminuyeron 3 cm el diámetro del cuello y aumentaron el índice de bulbificación (IB = 2.93 y 2.75, respectivamente). Los reguladores no mostraron efecto en el rendimiento total de la cosecha, registrándose una media de 10.4 a 13.2 ton/ha. Se determinaron dos fracciones con actividad de giberelina (F2 y F3) en los bulbos. En todos los tratamientos se encontró un contenido de F3 cuatro veces mayor que F2. Los reguladores no tuvieron efecto en el contenido de G+F y sacarosa pero sí sobre fructanos, el tratamiento Pma generó mayor contenido de fructanos. Mm disminuyó la concentración de F2 y F3 y aumentó el contenido de fructanos (43.24 g/100 g m.s) coincidiendo con el mayor IB (2.93). Sin embargo, Pma registró el mayor contenido de fructanos (50.80 g/100 g m.s). PBZ y MeJA parecen inducir la bulbificación aunque su acción se vio reducida debido a un inadecuado régimen de fertilización.

**Palabras clave:** reguladores de crecimiento, bulbificación, fertilización, giberelinas, fructanos.

## SUMMARY

'Coreano' garlic crop needs to accumulate 550 chilling hours ( $<5^{\circ}\text{C}$ ) in order to induce an accurate bulbification process and reach a proper quality in bulbs. However, factors such as photoperiod, fertilization regimen and cultural practices are also determinant. To get through lack of chilling hours and promote bulbification it is possible to apply growth regulators with a negative effect on gibberellins or microtuber breakage activity that have been proven to stimulate bulbification. The aim of this work was to determine the effect of paclobutrazol (PBZ) application, a gibberellin biosynthesis inhibitor and methyl jasmonate (MeJA), a tuber-inducing substance and radial expansion promoter, on bulbification in garlic cv. 'Coreano'. A completely randomized block design with three replications was used, considering two factors with three levels each one: growth regulator type (PBZ 1000 ppm, MeJA 250 ppm and water as control), and regulator application date (march, april and march+april). During cultivation seven samplings were made, to measure phenological variables, gibberellin content in garlic bulb using HPLC-PDA at 205 nm and glucose+fructose (G+F), sucrose and fructans content by spectrophotometric and enzymatic methods (PAHBAH, DNS and Megazyme Enzymatic Kit, K-Fruct). PBZ application diminished 17.59 cm the plants height. In spite of the fact that there were no statistical difference in bulb diameter, MeJA in march (Mm) and PBZ in march+april (Pma) treatments reduced 3 cm pseudo stem diameter and increased bulbing index (BI = 2.93 and 2.74, respectively). Growth regulators did not show an improvement in total yield (10.4 - 13.2 ton/ha as an average). Two fractions (F2 and F3) displaying gibberlin-like activity were determined in garlic bulbs. Treatments altogether showed an F3 content fourfold higher than F2. Growth regulators did not have effect on G+F and sucrose content but did on fructanos, PBZ applied in march+april raised fructans content. Mm reduced F2 and F3 concentration and increased fructans content (43.24 g/100 g dry weight) these results matched with the highest BI. However, Pma showed the highest fructan content (50.80 g/100 dry weight). PBZ and MeJA appear to induce bulbification although their action was abated due to an inadequate fertilization regimen.

**Key words:** growth regulators, bulbification, fertilization, gibberellin, fructans.



Lab. de fisiología y  
bioquímica poscosecha de  
frutas y hortalizas



“Above all, do not fear difficult moments. The best comes from them”

*(Rita Levi-Montalcini)*

## Dedicatoria

En una ocasión, una maestra de preparatoria dijo en clase:

–Para que valga la pena el esfuerzo de sus padres por darles educación y los años que ustedes invertirán en su educación, deberán escribir por lo menos un *libro*. No importa qué tan extenso sea o el tema a tratar, lo que importa es el empeño y tiempo que dediquen para hacerlo. ¿Saben de qué *libro* hablo? –La Tesis–.

Este *libro* que es un logro personal lo dedico a mi mamá. La mujer más fuerte que conozco, quién ha estado siempre a mi lado para aconsejarme, apoyarme, cuidarme, escucharme y cuando es necesario regañarme. Por tu grandeza, humildad, entereza, sinceridad, por tú entrega en todo lo que haces y por tu gran corazón, mami eres mi ejemplo a seguir. Con mejor madre Dios no me pudo haber mandado. ¡Te adoro!

De igual forma dedico este trabajo a mi compañero de clases, de equipo, de viajes, de vacaciones, de compras, de fiestas, de ejercicio... a mi compañero de vida: Luis Raymundo de quién recibo amor, apoyo, inspiración, motivación, quién me hace ser una mejor persona. Me hace inmensamente feliz el saber que tengo a mi lado a un excelente hombre con quién puedo compartir la vida. ¡Te amo!

## Agradecimientos

A Dios porque ha permitido que siempre me encuentre acompañada por amigos y familia con quienes me he hecho de valiosos momentos y recuerdos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Al Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos y al personal administrativo

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

Al Dr. Edmundo Mercado por haber aceptado ser mi asesor. Creo que no pude quedar en mejores manos, con su carácter y sentido del humor hizo llevaderas las dificultades que se presentaron.

A la Dra. Estela Vázquez, por su constante apoyo durante el desarrollo del proyecto y por qué siempre procura que estemos bien en todos los aspectos.

Al Dr. Eduardo Castaño, por su paciencia y disposición cuando me encontraba ante dilemas estadísticos durante el desarrollo del proyecto y por los valiosos consejos que a mis compañeros de generación y a mí nos brindó durante las clases.

Al Dr. Ramón Peniche y al Dr. Ramón Guevara por las observaciones que realizaron para enriquecer este trabajo.

A la Dra. Dulce Rivera, quien a pesar de no formar parte de mí comité me ayudó incontable número de veces.

Al Ing. Hostilio Torres y al Ing. Francisco Ferrel “Pancho” por haber ayudado con las actividades de campo, monitoreo del cultivo y por su ayuda durante de la cosecha. ¡Me convirtieron en una chica de campo!

A mi mamá por su apoyo incondicional y amor sin medida. Lo que soy es por ti, mami.

A mi hermanos Rafa y Martitha porque cuidan y acompañan a mi mamá cuando yo no puedo hacerlo. Cada uno con su singular personalidad me demuestra su amor y de igual forma yo a cada uno los quiero a más no poder.

A Ray por su amor, compañía y apoyo. Los que sólo venían a estudiar, donde se fueron a encontrar.

A la Na por su amor, por sus ocurrencias que siempre me quitan el estrés, pero sobre todo por el apoyo y sus consejos que siempre nos brindado por momentos difíciles.

A mi Tía Rossy, una de las mujeres más nobles que conozco. Tan linda tú siempre tía al pendiente de mí. Te quiero.

To Mark and Nina. Even though plans changed quite a bit you've been there for me, no matter what, to cheering me up, to talk to me when needed, to love me. Who cares if I'm not related to you? You are my American parents, period. You've done more than enough for me so I can only say thank you and I love you very very much, guys!

A mi Tío Eduardo, Raquel y a mis primas (Raquelito, Rocío, Roxana, Rossely y Rubí), porque a pesar de la distancia siempre nos hemos mantenidos unidos y por el apoyo que hemos recibimos en todo momento. Mi mamá y hermanos siempre estaremos agradecidos por todos los detalles que han tenido.

A mi Yaya porque sus consejos y recuerdo me acompañan siempre.

A mi Tía Patty porque nos dejó el regalo y la encomienda más grande que se puede recibir, el criar y cuidar a “la niña de la casa”. Gracias a ello mi mamá se ganó el título por tercera ocasión y mi hermano ahora puede presumir que es hermano mayor.

A la familia Reyes por haberme hecho sentir inmediatamente parte de ellos, por el apoyo y el amor que me demuestran en todo momento.

A mi amiga del alma, mi Camarada, quien a pesar de todas sus ocupaciones y loco horario de trabajo siempre se hacía un tiempo para que pudiéramos reunirnos y platicar largo y tendido. Amigas como tú Camarada hay pocas. ¡Te quiero mucho!

A mis amigos Sophie, Manny, Chris, Sandra, Karen y Blanquita por los gratos momentos que hemos compartido y porque a pesar que ya no nos vemos con tanta frecuencia siempre estamos apoyándonos.

A mis primeras roomies, Vicky y Ra porque me hicieron sentir como en casa. Las quiero niñas.

A Beto y Marely que además de ser grandes amigos, son como mis hermanos de generación. Don Beto y Doña Marely estaré siempre en deuda con ustedes no sólo por la ayuda laboral sino por el apoyo que me han brindado en cualquier cosa durante estos dos años. ¡Los quiero!

A Rossana, Ana y José Luis que son el alma del laboratorio. Este trío llegó a revolucionar el laboratorio con sus ocurrencias y frases. Conviví con ustedes lo suficiente para saber que poseen una gran calidad humana, y que saben ser amigos en todo y para todo. Por todo lo que hicieron por mí... chicos les estoy inmensamente agradecida.

A Tere porque siempre que necesité manos ahí estaba aunque no tuviera obligación. ¡Muchas gracias por todo Teresita, eres una gran persona, con una nobleza inmensa!

A David y Dalia por la ayuda que me brindaron.

A todos los chicos de servicio: Paz, Ana Luisa, Norma, Néstor, Lupita Catalasa, Ximena, Vianney, Edgar, Valeria, Claudia, Ernesto, Nohemí y Letty, por su gran disposición y por la ayuda brindada durante los experimentos. Sin ustedes chicos este momento hubiera demorado un poco más.

A todos mis amigos del posgrado: Gaby, Eunice, Dalia, Naye, Omar, Diego, Danny, Karen, Alejandro, Tere, Flor, Iraís, Rodrigo, Martita y Víctor con las reuniones que se organizaban indudablemente el estrés se olvidaba. Contribuyeron a que estos dos años sean inolvidables y una etapa de mi vida de la cual tendré excelentes recuerdos.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>ii</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>iv</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Taxonomía del ajo .....	3
2.2 Morfología de la planta de ajo .....	3
2.2.1 Estructura y composición del bulbo .....	4
2.2.1.1 Estructura del bulbillo .....	8
2.3 Importancia económica del cultivo de ajo .....	8
2.4 Requerimientos del cultivo de ajo .....	9
2.4.1 Termoperiodo .....	9
2.4.2 Fotoperiodo .....	11
2.4.3 Prácticas culturales de cultivo .....	12
2.4.3.1 Fertilización .....	13
2.5 Ciclo biológico del cultivo de ajo .....	14
2.5.1 Bulbificación .....	16
2.5.1.1 Factores físicos involucrados en el proceso de bulbificación	18
2.5.1.2 Defectos en la formación del bulbo .....	19
2.6 Factores bioquímicos que afectan la bulbificación .....	21
2.6.1 Giberelinas (GAs) .....	21
2.6.1.1 Biosíntesis de giberelinas .....	21
2.6.1.2 Las giberelinas y su relación con la bulbificación .....	22
2.6.1.3 Paclobutrazol: inhibidor de la biosíntesis de giberelinas .....	24
2.6.2 Jasmonatos .....	26
2.6.2.1 Biosíntesis de jasmonatos .....	27

2.6.2.2 Jasmonatos y su relación con la bulbificación .....	28
2.6.3 Carbohidratos .....	29
2.6.3.1 Fructanos .....	30
2.6.3.2 Biosíntesis de fructanos .....	31
2.6.3.3 Los fructanos y su relación la bulbificación .....	33
<b>III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
4.1 General .....	36
4.2 Específicos .....	36
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
5.1 Material biológico .....	37
5.2 Estrategia experimental .....	37
5.3 Programa de muestreo .....	40
5.4 Diseño experimental y análisis estadístico .....	40
5.5. Aplicación de los reguladores de crecimiento .....	42
5.5.1 Preparación de la solución de metil jasmonato (PBZ) .....	43
5.5.2 Preparación de la solución de paclobutrazol (MeJA) .....	43
5.6 Determinaciones durante el desarrollo .....	43
5.6.1 Porcentaje de emergencia de plantas .....	44
5.6.2 Variables fenológicas .....	44
5.7 Métodos utilizados .....	45
5.7.1 Análisis de giberelinas .....	45
5.7.1.1 Extracción .....	45
5.7.1.2 Separación y cuantificación de giberelinas .....	46
5.7.1.3 Bioensayo para la determinación de actividad giberélica de los compuestos separados por HPLC .....	47
5.7.2 Cuantificación de carbohidratos .....	48
5.7.2.1 Obtención de extracto de carbohidratos .....	48
5.7.2.2 Cuantificación de monosacáridos solubles en agua .....	49
5.7.2.3 Determinación de fructanos .....	49
5.7.2.3.1 Remoción de sacarosa .....	50
5.7.2.3.2 Hidrólisis y medición de fructanos .....	50
5.8 Determinación de rendimiento y calidad de la cosecha .....	51
5.8.1 Clasificación por calibre .....	51
5.8.2 Rendimiento total y por calibre por hectárea .....	51

5.8.3 Porcentaje de bulbos con defectos .....	52
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
6.1 Análisis climático de la zona de producción .....	53
6.2 Desarrollo del cultivo .....	56
6.2.1 Emergencia de plantas .....	56
6.3 Comportamiento fenológico previo a la aplicación de los reguladores de crecimiento .....	57
6.4 Efecto de las aplicaciones de los reguladores de crecimiento en el desarrollo de las plantas .....	60
6.5 Rendimiento y calidad de la cosecha de los bulbos .....	69
6.6 Análisis de giberelinas (GAs) .....	74
6.6.1 Comprobación de la actividad giberélica de las fracciones F2 y F3	75
6.6.2 Cambios en el contenido de GAs durante el desarrollo de la planta	76
6.7 Análisis teórico de los aportes de nitrógeno .....	83
6.8 Análisis de carbohidratos.....	85
6.8.1 Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el contenido de azúcares y fructanos .....	85
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>92</b>
<b>VIII. REFERENCIAS .....</b>	<b>94</b>
<b>IX. ANEXOS .....</b>	<b>103</b>
9.1 Curva estándar de giberelinas .....	103
9.2 Cuva estándar de maltosa .....	104
9.3 Curva estándar de glucosa .....	105
9.4 Preparación de 3,5-ácido dinitrosalicílico .....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Estructura de una planta de ajo .....	4
2.	Estructura de un bulbo de ajo desarrollado .....	5
3.	Estructura del bulbillo .....	8
4.	Requerimientos termoperiódicos del ajo durante su ciclo vegetativo (Burba, 2003) .....	10
5.	Pudrición blanca causada por <i>Sclerotium cepivorum</i> (a) y raíz rodada causada por <i>Fusarium oxisporum</i> (b) .....	13
6.	Ciclo de cultivo del ajo (Portela, 1996) .....	15
7.	Etapas fisiológicas de ajos de tipo blanco y violeta (Portela y Cavagnaro, 2005) .....	17
8.	Efecto de la temperatura en el cultivo de ajo (Ávila, 2007) .....	18
9.	Efecto de la intensidad luminosa en el cultivo de ajo (Ávila, 2007) .....	19
10.	Bulbo de ajo bien desarrollado y diferenciado (a), ajo no diferenciado o “acebollado” (b) y ajo rebrotado (c) .....	19
11.	Estructura de las giberelinas C <sub>19</sub> (GAs) (Thomas <i>et al.</i> , 2005) .....	22
12.	Ruta de biosíntesis de giberelinas (George, 2008) .....	23
13.	Estructura del paclobutrazol .....	25
14.	Estructuras químicas del ácido jasmónico (JA) y otros jasmonatos .....	26
15.	Síntesis de jasmonatos en respuesta a señales ambientales y de desarrollo (Creelman y Mullet, 1997a) .....	27
16.	Ruta de biosíntesis del JA y derivados más comunes (Soberón <i>et al.</i> , 2005) .....	28
17.	Estructura de la inulina (a) y de la neo-serie de inulina (b) (Ritsema y Smeekens, 2003) .....	30
18.	Metabolismo de carbohidratos en células de plantas (Vjin y Smeekens, 1999) .....	31
19.	Biosíntesis de fructanos en plantas (Vjin y Smeekens, 1999) .....	32
20.	Estructura sugerida para el fructano de ajo; n = 9 para un DP = 58 (Baungartner <i>et al.</i> , 2000) .....	31
21.	Ubicación del municipio de Cosío, Ags. ....	37
22.	Diagrama de flujo experimental. Donde 1: aplicación de reguladores en marzo; 2: aplicación de reguladores en abril; y 1 + 2: aplicación de reguladores en marzo y abril .....	39
23.	Esquema de parcela experimental y distribución de tratamientos .....	40
24.	Aplicación en suelo de MeJA (250 ppm) a plantas de ajo .....	42
25.	Dosificadores utilizados para la aplicación de los reguladores de crecimiento .....	43
26.	Esquema general de extracción de giberelinas libres (Rakhimbaev y Ol’shanskaya, 1976; modificado por Vázquez-Barrios 2005) .....	45

27.	Esquema de acción de las GAs en la germinación de granos .....	47
28.	Plantilla de calibración de bulbos de ajo .....	52
29.	Registro de temperaturas de la estación Makelisa (a) y CEPAB (b) .....	54
30.	Registro del fotoperiodo (h:m) y la radiación lumínica máxima ( $W/m^2$ ) diaria durante el desarrollo del cultivo .....	55
31.	Comparación de horas de frío acumuladas en el campo experimental .....	56
32.	Porcentaje de emergencia de plantas de ajo .....	57
33.	Comportamiento de variables fenológicas: número de hojas (a), ancho de hoja (b), altura (c), peso (d), diámetro cuello (e), diámetro bulbo (f) e índice de bulbificación (g) .....	59
34.	Muestras de ajo a los 61 DDS (1), 95 DDS (2), 123 DDS (3) y 147 DDS (4) en Tepezalá, Ags., (a) y Cosío, Ags. (b) .....	60
35.	Comparación de altura de plantas de ajo entre tratamientos control, MeJA y PBZ después de 210 días de desarrollo (izq.) y plantas en campo tratadas con PBZ (surco izq.) .....	62
36.	Cambios a través del tiempo de número de hojas (a) y altura (b) de plantas de ajo sometidas a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento y plantas control .....	63
37.	Cambios a través del tiempo del ancho de hoja (c) y diámetro de cuello (d) de plantas de ajo sometidas a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento y plantas control .....	64
38.	Cambios a través del tiempo del diámetro de bulbo (e) y peso (f) de plantas de ajo sometidas a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento y plantas control .....	65
39.	Cambios a través del tiempo del índice de bulbificación (IB) de plantas de ajo sometidas a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento y plantas control .....	66
40.	Plantas de ajo tratadas con MeJA en marzo y cosechadas a los 210 DDS ...	68
41.	Comparación de rendimiento total con la de bulbos acebollados y con defectos .....	71
42.	Distribución porcentual de calibres por tratamiento .....	73
43.	Cromatograma típico de extracto metanólico de GAs de bulbo de ajo cv. 'Coreano' .....	75
44.	Cambios en los contenidos de F2, F3 e índice de bulbificación (IB) en tratamientos control en marzo, abril y marzo+abril (Cm, Ca y Cma). s/t: sin tratamiento .....	80
45.	Cambios en los contenidos de F2, F3 e índice de bulbificación (IB) en plantas tratadas con MeJA en marzo, abril y marzo+abril (Mm, Ma y Mma). s/t: sin tratamiento .....	81
46.	Cambios en los contenidos de F2, F3 e índice de bulbificación (IB) en plantas tratadas con PBZ en marzo, abril y marzo+abril (Pm, Pa y Pma). s/t: sin tratamiento) .....	82
47.	Relación entre aplicación teórica de nitrógeno y contenido de fracciones con actividad de GAs .....	85

<b>48.</b>	Asociación entre concentración de azúcares e índice de bulbificación en tratamientos control .....	89
<b>49.</b>	Asociación entre concentración de azúcares e índice de bulbificación (IB) en tratamientos de MeJA en marzo, abril y marzo+abril (Mm, Ma y Mma)	90
<b>50.</b>	Asociación entre concentración de azúcares e índice de bulbificación (IB) en tratamientos de PBZ en marzo, abril y marzo+abril (Pm, Pa y Pma) .....	91
<b>51.</b>	Curva estándar de GA <sub>3</sub> .....	103
<b>52.</b>	Curva estándar de maltosa .....	104
<b>53.</b>	Curva estándar de glucosa .....	105

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Pág.</b>
1. Composición del ajo .....	6
2. Agroquímicos utilizados como plaguicida, bactericida y fungicida en dientes “semila” .....	38
3. Fechas de muestreo del ciclo de cultivo 2012-2013 .....	40
4. Diseño de tratamientos .....	41
5. Abreviaturas utilizadas para tratamientos .....	41
6. Gradiente de concentración para la separación de GAs por HPLC .....	46
7. Escala de calibres determinados de acuerdo al diámetro del bulbo de ajo .....	52
8. Localización de las estaciones climatológicas seleccionadas en Aguascalientes .....	53
9. Comparación de medias de variables morfológicas en dos parcelas experimentales durante los primeros 147 días de desarrollo .....	58
10. Valor p de variables fenológicas con respecto a los factores y su interacción .....	61
11. Comparación de medias entre tratamientos de diferentes reguladores y fechas de aplicación para las variables de crecimiento después de 210 días de desarrollo del cultivo .....	62
12. Variables de crecimiento de plantas de ajo ‘Coreano’ cultivadas en Cosío, Ags. ....	69
13. Rendimientos por hectárea de la producción total, de bulbos acebollados y bulbos con defectos (Tepezalá, Ags.) .....	70
14. Clasificación de bulbos desarrollados por calibres .....	72
15. Producción de maltosa por la acción de las fracciones F2 y F3 y de los controles en granos de cebada desembrionada . ....	76
16. Contenidos de las F2 y F3 en muestras de ajo cv. ‘Coreano’ durante las primeras etapas de desarrollo .....	76
17. Contenido de las fracciones de F2 y F3 con actividad de giberelinas en los bulbos de ajo después de la aplicación de los reguladores de crecimiento .....	77
18. Requerimiento total de N-P-K en cultivo de ajo cv. ‘Coreano’ y ‘Perla’	83
19. Unidades de nitrógeno aplicadas semanalmente a plantas de ajo ‘Perla’ y ‘Coreano’ .....	84
20. Contenido de glucosa+ fructosa, sacarosa y fructanos en bulbos de ajo cv. ‘Coreano’ cosechados y después del curado .....	86

## I. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie monocotiledónea de la familia *Alliaceae* y su origen se remonta a Asia Central. En la actualidad el ajo existe bajo cultivo y su reproducción es vegetativa, a través de sus bulbillos o dientes (Heredia, 2000). México ocupó el 21° lugar a nivel mundial con 58,065 ton, mientras que China ocupó el primer lugar con 19,234,134 ton (FAOSTAT, 2011). A pesar de ello, en el mercado internacional el ajo mexicano es muy apreciado por ser considerado un producto de alta calidad.

Las principales características que definen la calidad de esta hortaliza son el tamaño de los bulbos, su forma regular, firmeza, ausencia de defectos; siendo más cotizados aquellos bulbos de mayor calibre y libres de defectos. Es por ello que en los últimos años se han realizado diversos estudios con la finalidad de determinar y tratar de controlar los factores que permiten que el cultivo tenga un mayor porcentaje de calibres considerados de buena calidad, ya sea aplicando tratamientos a bajas temperaturas o utilizando reguladores del crecimiento (Vázquez-Barrios, 2005; Galaz-Pérez, 2008; Utrilla-Vázquez, 2008).

De manera general se sabe que la presencia de días fríos y fotoperiodos cortos durante las primeras etapas del desarrollo, seguidos de días con mayores temperaturas y mayores fotoperiodos son factores determinantes en la bulbificación (Ávila, 2007). López-Hernández (2010) determinó que se requiere de 550 h de frío para que la bulbificación sea inducida en ajo coreano.

Las variaciones climatológicas que se presentan cada año en las zonas de cultivo y el régimen de fertilización producen cambios en el crecimiento del bulbo y su rendimiento. A pesar de que se conocen técnicas de cultivo que favorecen el tamaño de los bulbos, como lo es el proveer de los requerimientos nutricionales adecuados; cuando los factores climatológicos no se satisfacen, se presentan altas incidencias de bulbos no diferenciados o “acebollados”. En la cosecha 2011-2012 los productores de la región de Cosío, Aguascalientes registraron pérdidas desde 30 a 50% en la producción total. Debidas a que las condiciones climatológicas fueron poco favorables para el cultivo, impidiendo que se

alcanzaran el número de horas de frío requeridas (>550 h a 5°C) para que la diferenciación de los bulbos ocurriera. Esto generó bulbos de ajo “acebollados”, es decir, bulbos de ajo no diferenciados que carecen de cualquier tipo de valor comercial en el mercado.

El proceso de formación del bulbo está determinado tanto por factores ambientales (temperatura y fotoperiodo), así como por la presencia de fitohormonas que regulan su desarrollo, tal es el caso de las giberelinas (GAs), el ácido abscísico (ABA) y el ácido jasmónico (JA). La presencia de estas fitohormonas puede verse afectada por la variación de la temperatura, o bien por un exceso de nitrógeno durante la fertilización, provocando un retraso en el desarrollo de la planta (Utrilla-Vázquez, 2008). Por ello es posible que mediante el uso de antagonistas de estas fitohormonas o la aplicación de ellas en determinado momento del ciclo de cultivo, se pudiera forzar la formación y diferenciación del bulbo. Los jasmonatos son fitohormonas lipídicas que actúan como señalizadores de las plantas en respuesta a situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo tales como la tuberización, la maduración de frutos, la senescencia, entre otros (Creelman y Mullet, 1997b). El paclobutrazol (PBZ) por su parte es un compuesto que inhibe la síntesis de giberelinas, cuyo rol principal es la estimulación de la elongación de las células. Cuando la producción de giberelinas se ve inhibida, la división celular ocurre; sin embargo las nuevas células no se elongan (George, 2008). Se ha demostrado además que la aplicación de PBZ incrementa la producción de ácido abscísico y de clorofila, ambos compuestos benéficos para el crecimiento de las plantas (Chaney, 2005).

Con base en lo anterior, el objetivo de éste trabajo fue determinar el efecto de la aplicación en suelo de paclobutrazol (PBZ) y metil jasmonato (MeJA) sobre la bulbificación y la calidad del ajo (*Allium sativum* L.) cv ‘Coreano’.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

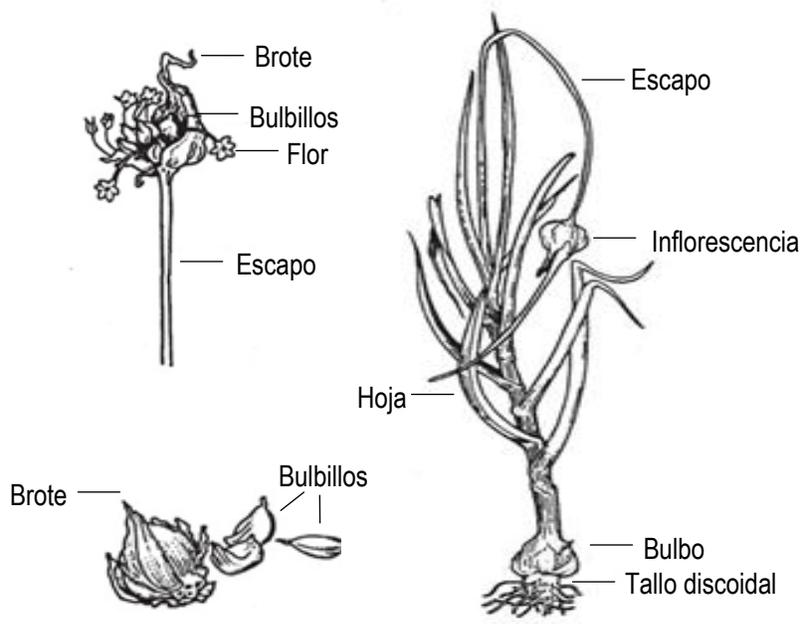
### 2.1 Taxonomía del ajo

*Allium* es un género de la familia *Alliaceae* que pertenece al orden de las Asparagales en la división de las monocotiledóneas (Brewster, 1994). Este género se distribuye en zonas templadas, cálido-templadas y boreales del hemisferio norte. En áreas tropicales está confinado a las áreas montañosas. En Eurasia, la región con mayor diversidad de especies, se encuentran desde el Este del Mediterráneo hasta la parte central de Asia y por el norte de Irán, Afganistán, Pakistán, Tajikistan, noreste de China, Mongolia y el sur de Siberia. Un centro de menor diversidad se localiza al oeste de Norte América (Brewster, 1994). Miembros de dicho género incluye diversos cultivos de gran importancia económica tales como ajo (*A. sativum*), cebolla (*A. cepa*), cebollines (*A. ascalonicum*), chalote (*A. oschaninii*), poro (*A. ampeloprasum*) entre otros (Odeny y Narina, 2011).

El género comprende tanto plantas perennes de vida corta y larga con la particularidad de que presentan órganos de almacenamiento (Fritsch y Friesen, 2002). Los órganos típicos de almacenamiento son rizomas, raíces y bulbos.

### 2.2 Morfología de la planta de ajo

Es una planta herbácea erecta de 30 a 60 cm de altura y de raíces adventicias superficiales. Posee bulbos compuestos por un tallo discoidal, hojas escamosas secas y delgadas, que constituyen la base de las hojas fotosintéticamente funcionales (hojas aéreas), y bulbillos o “dientes” formados de yemas axilares de las hojas funcionales más jóvenes (Figura 1). Las hojas aéreas son aplanadas, sólidas, con 2.5 cm o menos de ancho, plegadas en forma longitudinal. Estas varían en número, pero generalmente son menos de 10. Un extremo de la hoja es afilada y el otro se encuentra cubriendo la base del pseudo tallo (Purseglove, 1985; Bell y Bryan, 1991). Los bulbillos o dientes son producidos en la axila de la hoja, hacia el interior del bulbo en el cual la hoja diverge (Mann, 1952).



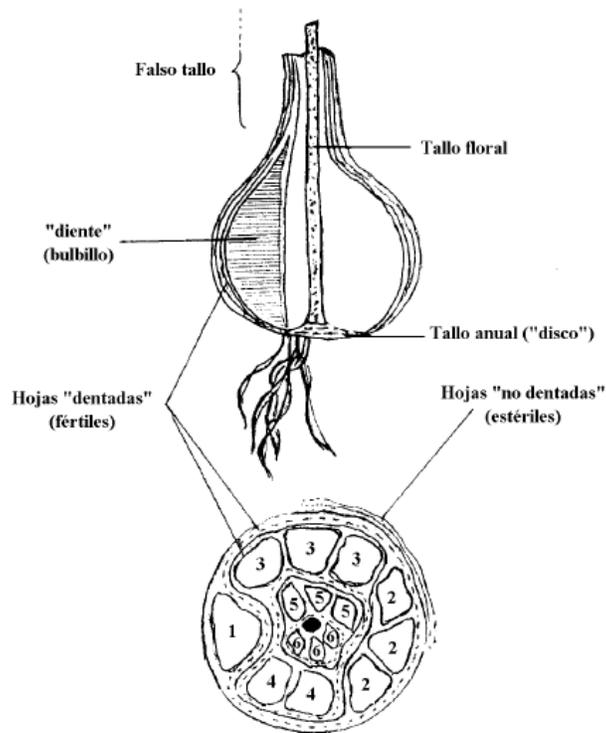
**Figura 1.** Estructura de una planta de ajo

### 2.2.1 Estructura y composición 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 (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 (pseodo tallo) compuesto por la porción superior de las vainas de las hojas con lámina. 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 (Figura 2). Apoyadas sobre el disco se encuentran las hojas estériles o no dentadas (aquellas que envuelven el bulbo y no poseen “dientes” en sus axilas), y hojas fértiles o dentadas (que poseen “dientes” en sus axilas). (Burba, 2003)



**Figura 2.** Estructura de un bulbo de ajo desarrollado

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 de ajo 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 la axila de cada túnica se desarrollan de dos a cinco yemas colaterales que formarán los bulbillos, cada uno con una sola túnica carnosa alrededor de la yema terminal (González y Arbo, 2006).

La composición química de los bulbillos de ajo depende de la variedad, condiciones de cultivo y del estado físico del ajo. De manera general el bulbo de ajo constituye una fuente rica de carbohidratos, proteínas y potasio. Contiene agua (62 a 68%), carbohidratos (26 a 30%), proteína (1.5 a 2.1%), aminoácidos (1.0 a 1.5%), compuestos organosulfurados (1.1 a 3.5%) y fibra (1.0 a 1.5%), en base húmeda (Koch y Lawson, 1996). Además contiene minerales como yodo, magnesio, fósforo, calcio y selenio; vitaminas como tiamina, vitamina B<sub>6</sub> y vitamina C (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición del ajo

<b>Componente</b>	<b>Por porción comestible (100 g)</b>	<b>Por diente (5 g)</b>
Aporte energético (Kcal)	116	4
Proteínas (g)	5.3	0.2
Lípidos totales (g)	0.4	0.0
AG saturados (g)	0.089	0.003
AG monoinsaturados (g)	0.011	0.000
AG poliinsaturados (g)	0.249	0.009
$\omega$ -3 (g)	0.020	0.001
$\omega$ -6 (g)	0.229	0.009
Colesterol (mg)	0.0	0.0
Carbohidratos (g)	23	0.9
Fibra (g)	1.1	0.0
Agua (g)	70.3	2.7
Calcio (mg)	14	0.5
Hierro (mg)	1.5	0.1
Yodo ( $\mu$ g)	94	3.6
Magnesio (mg)	25	1.0
Zinc (mg)	1.0	0.0
Sodio (mg)	19	0.7
Potasio (mg)	529	20.1
Fósforo (mg)	134	5.1
Selenio ( $\mu$ g)	2.0	0.1
Tiamina (mg)	0.16	0.01
Riboflavina (mg)	0.02	0.00
Equivalentes Niacina (mg)	1.3	0.0
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	0.38	0.01
Ácido fólico ( $\mu$ g)	5.0	0.2
Vitamina C (mg)	11.0	0.4
Vitamina A: Eq. Retinol ( $\mu$ g)	Trazas	Trazas
Vitamina E (mg)	0.01	0.0

(Fuente: USDA, 2007 y Moreiras *et al.*, 2007)

A nivel bioquímico, en el ajo hay glúcidos condensados del tipo fructanos y los glutamil dipéptidos con radicales de azufre. Entre estos últimos se encuentran el ácido glutámico y el sulfóxido de alicisteina o aliína. Este compuesto proporciona el aroma característico del ajo. La aliína es convertida a alicina, piruvato y amoniaco a través de la

enzima aliínasa. La aliícina (S-alil tiosulfonato) es el componente principal responsable del sabor del ajo fresco (Utrilla-Vázquez, 2008). Además tiene azúcares libres como fructosa, glucosa y arabinosa (García, 1998).

Todas las especies del género *Allium* poseen principios activos volátiles que les confieren un sabor y aroma muy particulares, razón por la cual son tan apreciados como condimentos. Las diferencias gustativas dependen de la cantidad de radicales metilo o alilo. El ajo posee una gran cantidad de radicales metil alilo. Por ello, no genera suficientes compuestos lacrimales a diferencia de la cebolla (García, 1998).

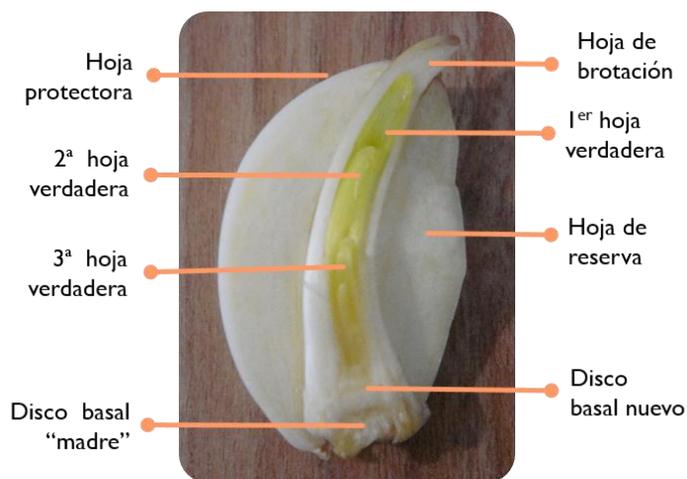
Al ajo se le han atribuido numerosas propiedades benéficas para la salud: efecto antiséptico, antiinflamatorio, bactericida, antiviral, antifúngico y antiparasitario intestinal. Estudios *in vitro* han indicado que el extracto de ajo, incluso a bajas concentraciones, es un potente inhibidor de *Helicobacter pylori*, bacteria implicada en el desarrollo de las úlceras gástricas y duodenales (Baungartner *et al.*, 2000). Por otra parte numerosos estudios epidemiológicos muestran una asociación inversa entre el consumo de hortalizas del género *Allium*, como el ajo y el riesgo de sufrir ciertos tipos de cáncer. La protección que ejercen los compuestos alil-sulfidos está, probablemente, relacionada con la capacidad de inhibir la formación y activación de inductores cancerígenos como las nitrosaminas, que son compuestos orgánicos que se originan al reaccionar una amina secundaria con nitritos en un medio muy ácido, por ejemplo el estómago. También favorecen la reparación del material genético celular dañado y mejorando las defensas del individuo. Así mismo parece retardar la proliferación tumoral (Chandrashekar, *et al.*, 2010).

El ajo ejerce un importante papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares, reduciendo los niveles de lípidos en la sangre, ayuda a reducir la fracción LDL-colesterol, a inhibe su oxidación y protege a las células endoteliales de estas lipoproteínas modificadas. Además disminuye la presión arterial y la agregación plaquetaria (Hosono, *et al.*, 2003)

### 2.2.1.1 Estructura del bulbillo

Los bulbillos o “dientes” se originan en la axila de las hojas fértiles o dentadas y están apoyados sobre el disco basal (Figura 3). Cada bulbillo está compuesto por una serie de hojas modificadas. Por su estructura, son órganos de propagación de ésta especie que se encuentran en estado de letargo cuando están recién cosechados pero que ante determinadas condiciones ambientales activan su crecimiento para generar una nueva planta (Utrilla-Vázquez, 2008).

La hoja de protección (hoja externa) consiste sólo de una vaina foliar lignificada y seca. Ésta es la responsable del color del bulbillo que caracteriza a los cultivares y que varía desde el blanco al púrpura. Hacia el interior hay otra hoja sin lámina (parte comestible), de gran espesor, denominada hoja de reserva o de almacenamiento que representa entre un 90 y 95% del peso total del diente y en la cual se acumulan los fructanos, que serán utilizados para la brotación de la nueva planta (Izquierdo y Quiones, 2001 y Burba 2003).



**Figura 3.** Estructura del bulbillo

### 2.3 Importancia económica del cultivo de ajo

El ajo es una planta ampliamente cultivada a nivel mundial con una producción de 23'769,746 ton (FAOSTAT 2011). La mayor parte del ajo se produce en Asia (85%) siendo China y la India los principales productores con 19'234,134 ton y 1'057,800 ton, respectivamente. Es interesante resaltar que la producción de China es 18.2 veces mayor que la de la India. La diferencia en la tasa de producción no solo con éste país sino con el

resto de los países productores está asociada principalmente a los recursos tecnológicos y los aspectos relacionados con el manejo del cultivo, más que a los antecedentes genéticos de los cultivares usados (Cavagnaro y Galmarini 2005).

Por su parte 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).

## **2.4 Requerimientos del cultivo de ajo**

La capacidad de un bulbillo para transformarse en una planta completa está fuertemente influenciada por el ambiente. La brotación, crecimiento, bulbificación, senescencia y letargo son etapas del ciclo de esta especie, cuyos requerimientos ambientales son marcadamente distintos (Burba, 2003).

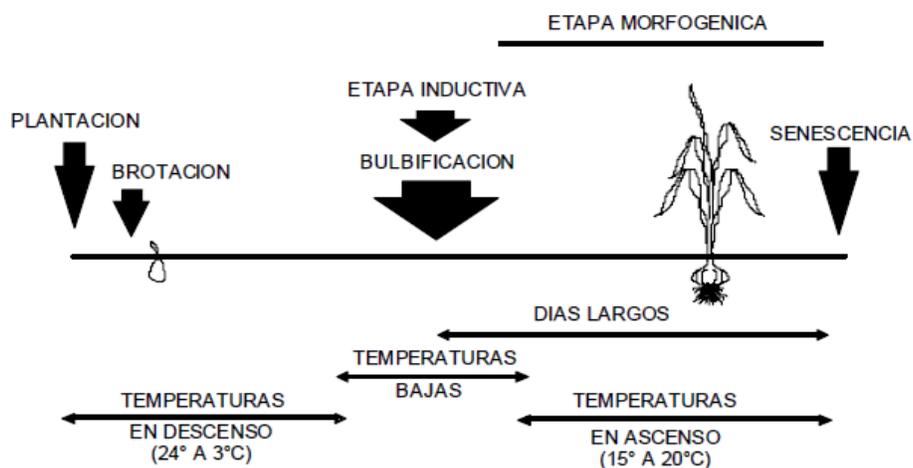
Un “diente” separado del bulbo “madre” recién cosechado es incapaz de brotar en condiciones ambientales normales para esa época debido al estado de letargo en que se encuentra. Este periodo de letargo es variable según los cultivares y las condiciones de almacenamiento de los bulbos (fundamentalmente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

### **2.4.1 Termoperiodo**

El ajo es una especie de cultivo otoño-invierno-primaveral resistente a heladas. Llega a soportar inviernos rigurosos con una media mínima de -4 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 bulbo hasta su cosecha (Giacconi y Escaff, 1993).

El termoperiodo 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 las temperaturas más importantes que el fotoperiodo (duración del día) (Figura 4). 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 4.** Requerimientos termoperiódicos del ajo durante de 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).

Rahim y Fordham (2001) en un estudio de bulbificación de ajo cv. ‘Bangladesh Local’, crecido en condiciones controladas de temperatura, encontraron que los rendimientos de plantas crecidas a 15/10°C (día/noche) fueron mayores que las plantas crecidas a temperaturas superiores a 20/15°C (día/noche). Además se observó que las primeras plantas mostraban un desarrollo más lento mientras que las últimas (20/15°C) presentaron un desarrollo acelerado.

#### **2.4.2 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 distintos fotoperiodos (8, 12 y 16 h) observando que el inicio de la bulbificación fue más rápido con fotoperiodo de 16 h, mientras que los rendimientos fueron más altos con 12 h. Además indicaron que con 16 h de fotoperiodo se redujo el tiempo requerido para la maduración del bulbo.

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

En un estudio de la bulbificación de ajo *in vitro* se encontró que dicho fenómeno se promovió con el uso de luz rojo-lejano (600-900 nm). Además se observó 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 se concluyó que tanto la fuente de luz como el fotoperiodo afectan fuertemente la morfogénesis *in vitro* de plántulas de ajo (Takagi y Qu, 1995).

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 son necesarios días cada vez más largos; es decir, con intensidades lumínicas también mayores (Ávila, 2007).

### **2.4.3 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* (Figura 5) 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 es llevado en 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 atacada por nematodos pierde altura y gana grosor debido a la hipertrofia de sus tejidos, que se tornan esponjosos y poco consistentes.



**Figura 5.** Pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum* (a) y raíz rosada causada por *Fusarium oxysporum* (b).

#### 2.4.3.1 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 brotamiento 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 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 Gavila 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 mismas 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) en el cual observaron que no hay diferencia en rendimiento por la fuente de nitrógeno pero sí por la dosis de aplicación, siendo 160 kg de N/ha la dosis recomendada para esta variedad de ajo.

## **2.5 Ciclo biológico del cultivo de ajo**

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 a estar dada por el efecto conjunto de los factores ambientales condicionantes actuales y anteriores.

El cultivo del ajo presenta dos etapas bien definidas; la primera denominada etapa vegetativa en la cual los procesos metabólicos y fisiológicos de la planta están orientados a formar el sistema radicular y las hojas; se caracteriza porque no hay desarrollo del bulbo ni del escapo floral. Esta etapa ocurre normalmente durante el otoño y gran parte del invierno (Figura 6). La formación y alargamiento de las raíces desde la base del diente es una de las primeras manifestaciones del crecimiento luego de la plantación. Conjuntamente se produce el crecimiento de la hoja de brotación y de los primordios de hojas contenidos en la yema ubicada en el interior de la hoja de reserva (Burba, 1992; Portela, 1996).



**Figura 6.** Ciclo de cultivo del ajo (Portela, 1996)

El crecimiento durante las primeras semanas está directamente relacionado con la disminución del peso seco del “diente madre”. Como se mencionó con anterioridad la etapa vegetativa se realiza en condiciones de días cortos y con temperaturas en descenso gradual.

Los requerimientos ambientales para que ocurra el crecimiento vegetativo son distintos a los de la bulbificación o bien a la formación de inflorescencia. Para que se induzca el desarrollo del bulbo y el escapo floral se requiere de bajas temperatura (etapa inductiva). Finalmente las temperaturas en ascenso y días más largos son capaces de favorecer el crecimiento del bulbo (etapa multiplicativa) y posterior senescencia.

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).

### **2.5.1 Bulbificación**

El proceso de formación de bulbos es de gran importancia para el cultivo, ya que los bulbos constituyen el elemento fundamental del producto. Por lo cual es indispensable comprender el mecanismo que controla el inicio de la bulbificación.

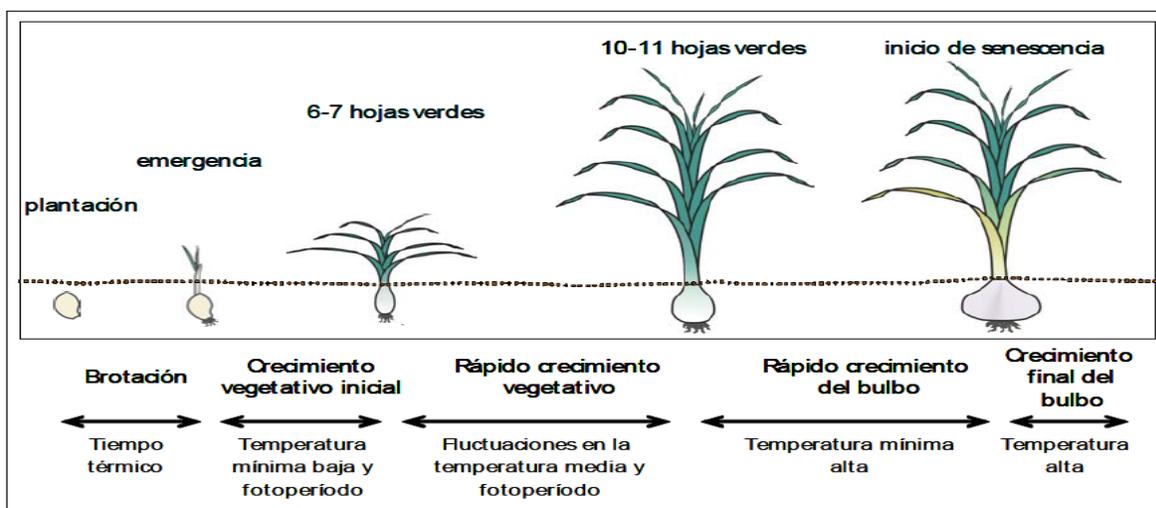
Se sabe que el llenado del bulbo de ajo se produce cuando la temperatura media diaria es mayor de 18 a 20°C y cuando el fotoperiodo supera un umbral que es diferente para cada cultivar o genotipo. Cultivares adaptados a regiones tropicales tienen un umbral de 11 a 12 horas de luz (Izquierdo *et al.*, 1997).

La formación del bulbo inicia por un estímulo termo-fotoperiódico que se caracteriza por dos etapas. La etapa inductiva en la que el frío y los días cortos (poca luz) son factores imprescindibles, y la etapa morfológica caracterizada por temperaturas en ascenso y días más largos. Las condiciones termo-fotoperiódicas son las responsables de modificar la velocidad del proceso de bulbificación (Portela, 1996; Ávila, 2007).

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 (Brewster, 1994).

En variedades productoras de escapo floral, la iniciación de la inflorescencia puede ocurrir antes de la diferenciación de las hojas de almacenamiento (dientes), para entonces romper el letargo apical y permitir la formación de yemas axilares que podrían entonces diferenciarse en hojas de almacenamiento y formar dientes. En los cultivares que no producen escapo floral, la ramificación axilar puede ocurrir antes de que las hojas de almacenamiento se diferencien. Esto se favorece con temperaturas frías y fotoperiodos cortos inmediatamente después de la siembra. Una vez que la ramificación axilar ocurre, los incrementos en temperatura y fotoperiodo promoverán la diferenciación de las hojas de almacenamiento y el desarrollo de un bulbo con múltiples dientes (Utrilla-Vázquez, 2008).

Portela y Cavagnaro (2005) elaboraron una gráfica-escala del desarrollo de plantas de ajo blanco y violeta (Figura 7) que integra las etapas más importantes del ciclo del cultivo (crecimiento de la parte aérea y del bulbo).



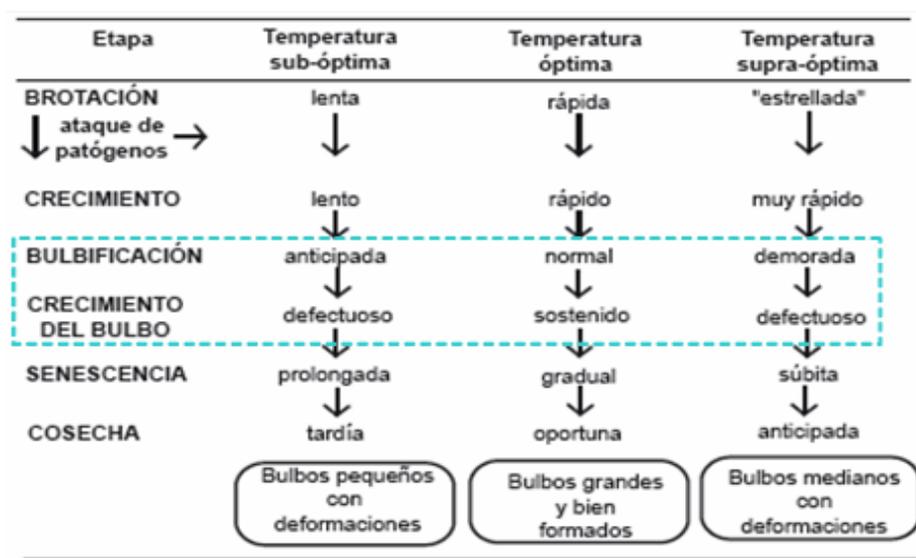
**Figura 7.** Etapas fisiológicas de ajos de tipo blanco y violeta. (Portela y Cavagnaro, 2005)

Cuando el bulbo “madura” (bulbo bien formado y llenado), las tres hojas de cubierta más externas se secan, adelgazan y protegen al bulbo, a estas hojas se les denomina túnicas 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).

### 2.5.1.1 Factores físicos involucrados en el proceso de 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 8). Una vez plantados, los dientes que están expuestos a temperaturas entre 5 y 10°C son óptimas para generar 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 8.** Efecto de la temperatura en el cultivo de ajo (Ávila, 2007)

Temperaturas entre 5 y 10°C no favorecen el desarrollo de bulbos, siendo mínima su calidad comercial (Ledesma *et al.*, 1997).

La luz natural ejerce un papel muy importante en la formación del bulbo bajo sus modalidades de fotoperiodo e intensidad luminosa (Figura 9). 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, 1990a).

Etapa	Luz insuficiente	Luz óptima
BROTACIÓN	lenta	rápida
CRECIMIENTO	excesivo follaje	normal
BULBIFICACIÓN	sin inducción	normal
CRECIMIENTO DEL BULBO	no se produce	sostenido
SENESCENCIA	prolongada	gradual
COSECHA	tardía	oportuna

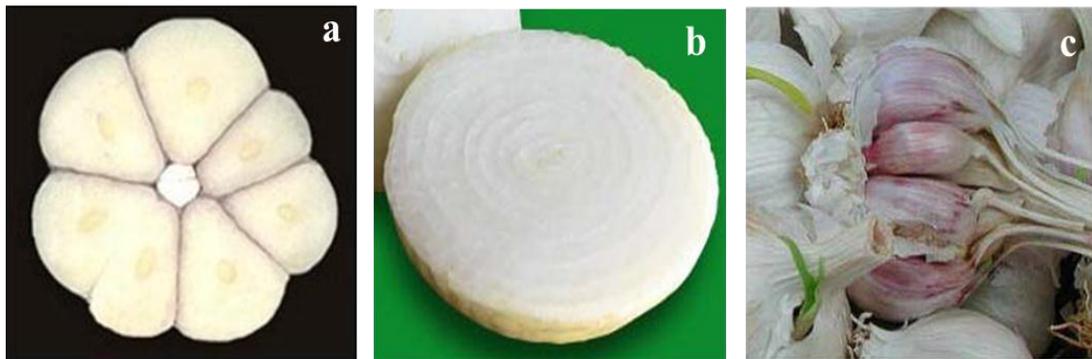
Sin bulbos

Bulbos grandes y bien formados

**Figura 9.** Efecto de la intensidad luminosa en el cultivo de ajo (Ávila, 2007)

### 2.5.1.2 Defectos en la formación del bulbo

Los bulbos de ajos maduros al ser cortados transversalmente, deben tener una apariencia circular con los dientes bien formados y diferenciados, los cuales deben estar cubiertos por varias capas externas, estos ajos se consideran uniformes y bien diferenciados (Figura 10a).



**Figura 10.** Bulbo de ajo bien desarrollado y diferenciado (a), ajo no diferenciado o “acebollado” (b) y ajo rebrotado (c).

Uno de los principales defectos que se presenta durante el desarrollo del bulbo es el “acebollado” (Figura 10b). Dichos ajos tienen apariencia similar a la cebolla, debido a que presentan una mínima o rudimentaria formación de dientes al presionarlos no muestran resistencia, posee una base globosa y vainas concéntricas grandes y gruesas (Portela, 1997).

Se ha observado que una bulbificación demasiado rápida ocasiona este fenómeno de formación de un solo diente en el ápice foliar sin la generación de yemas laterales previo al desarrollo de los dientes y sin desarrollo de inflorescencia. Se considera que la incidencia de fotoperiodos largos y temperaturas altas inmediatamente después de la plantación, promueven una rápida diferenciación de las hojas de almacenamiento, así que los dientes pueden formar ramificaciones axilares anticipadamente, resultando en bulbos de un solo diente (Brewster, 1994). Aunque no se han realizados estudios que logren describir los cambios bioquímicos que propician este fenómeno, por trabajos previos realizados por Galáz-Pérez (2008), Utrilla-Vázquez (2008), Vázquez-Mandujano (2009) y López-Hernández (2010) se sospecha que se debe a una baja acumulación de horas frío lo que ocasiona una disminución en la concentración de fructanos (carbohidratos de reserva del ajo) así como de su grado de polimerización.

Otro defecto que los bulbos de ajo pueden presentar es el “rebrote” (Figura 10c) que es la formación de tallos laterales en la planta como consecuencia del crecimiento secundario; se le considera como una enfermedad de tipo fisiogenética. Se presenta durante el cultivo una vez que se ha completado la inducción del mismo para bulbificar, y se traduce en la cosecha como bulbillos abiertos (con gran espacio entre bulbillos), poco firmes e irregulares (Portela, 1998).

Se considera que las bajas temperaturas (5 a 10°C) y los días cortos, están fuertemente asociados al desarrollo del ajo y serían los factores que determinan la incidencia de la proporción de plantas afectadas por “rebrote”, en tanto que una alta disponibilidad de nitrógeno y agua son responsables de la severidad con que se presenta la anomalía (Utrilla-Vázquez, 2008).

El crecimiento secundario (rebrote) se asocia a una alta actividad de giberelinas (Lee y Moon, 1982). Una característica de esta fitohormona es que pueden conjugarse con compuestos nitrogenados. De manera que a mayores concentraciones de nitrógeno (en fertilización) en la planta se incrementa la posibilidad de almacenamiento de giberelinas, pudiendo promover una expresión más fuerte de rebrote.

## **2.6 Factores bioquímicos que afectan la bulbificación**

### **2.6.1 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 giberelinas 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<sub>20</sub>), las cuales poseen el esqueleto diterpenoide completo y las giberelinas C<sub>19</sub>, en las cuales el C<sub>20</sub> ha sido reemplazado por un anillo  $\gamma$ -lactona. Éstas últimas son las que presentan mayor actividad biológica siendo GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>9</sub> las más importantes (George, 2008).

#### **2.6.1.1 Biosíntesis de giberelinas**

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).



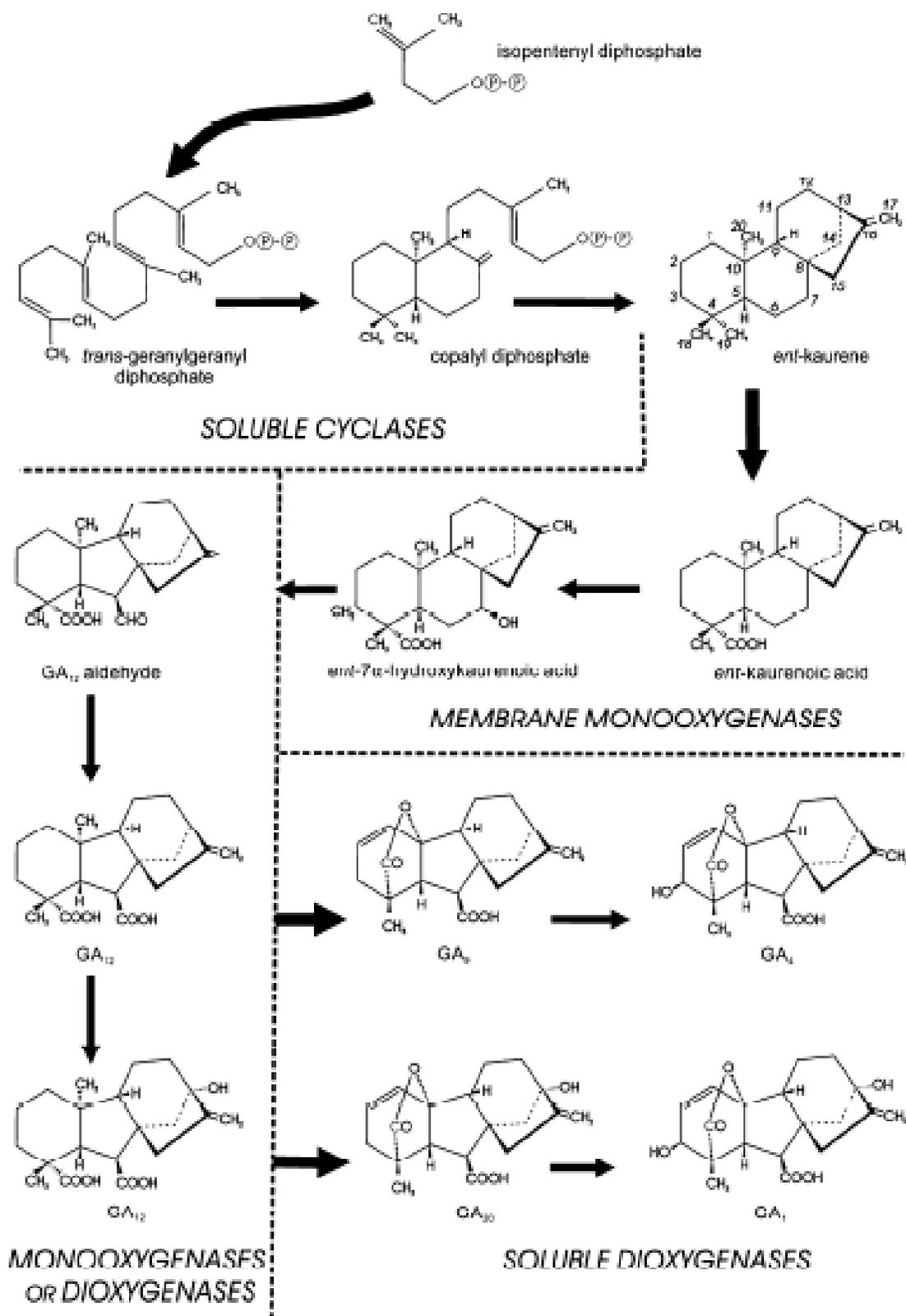


Figura 12. Ruta de biosíntesis de giberelinas (George, 2008)

Por otra parte, Mita y Shibaoka (1984) reportaron en cebolla, que las GAs estabilizan los microtúbulos y actúan en forma contraria al estímulo de las condiciones de día largo, las cuales reducen el número de microtúbulos y alteran su orientación transversal, esto sugiere un papel antibulbificante de la fitohormona.

La bulbificación se considera un proceso morfogénico, al igual que el proceso de tuberización que presenta una disminución en el nivel de GAs para la formación de tubérculos como la papa (Koda y Okasawa, 1983).

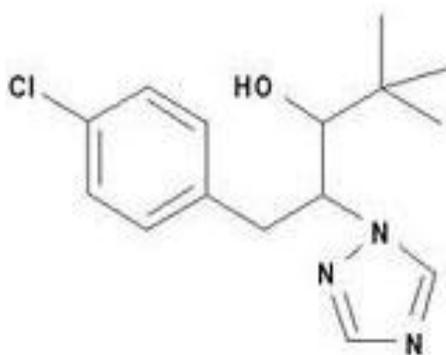
Los niveles de giberelinas endógenas se han cuantificados en un sistema de tuberización de papa *in vitro* en relación a los diversos estados de la elongación del estolón y formación del tubérculo (Xu *et al.*, 1998). En este trabajo se describió que el contenido de GA<sub>1</sub> en los estolones fue alto cuando éstos se encontraban en el proceso de elongación y disminuyó cuando comenzaron a hincharse después de la transferencia a condiciones inductoras.

Kim *et al.*, (2003) en una investigación para desarrollar un método para la regeneración de brotes múltiples y formación *in vitro* de bulbillos de ajo a partir de callos, encontraron que la adición de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) al medio suprimió significativamente la formación de los dientes. Por tanto, los autores sugieren que, dado que el ácido giberélico es conocido como regulador de crecimiento y promotor de la elongación del órgano de la planta, es lógico que tenga la capacidad de suprimir la formación de bulbo en ajo, de tal forma que se vea alterado el balance de las sustancias de crecimiento necesarias para la bulbificación a partir de los brotes.

### **2.6.1.3 Paclobutrazol: inhibidor de la biosíntesis de giberelinas**

El paclobutrazol (PBZ) [(2RS, 3RS)-1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1,2,4-triazol-1il) penta-3-ol] miembro del grupo triazol (Figura 13), es un inhibidor de amplio espectro de la biosíntesis de GAs (Davis y Curry, 1991). Los triazoles tienen tanto efecto fungicida como efecto regulador en el crecimiento de la planta (Webb y Fletcher, 1996), inhibe o retrasa la germinación de las semillas, reducen el tamaño de la planta y la compacta, aumenta la síntesis de clorofila (Yadav *et al.*, 2005). Además incrementa la tolerancia a estreses

bióticos y abióticos, incluidos patógenos fúngicos, sequía, contaminantes presentes en aire y estrés ante bajas y altas temperaturas (Fletcher *et al.*, 2000).



**Figura 13.** Estructura del paclobutrazol

Diversos métodos como la aplicación foliar del PBZ, aplicación en suelo, método de inyección y por incorporación a solución nutritiva han resultado efectivos (Still y Pill, 2004). Sin embargo, la aplicación en suelo ha mostrado tener efectos más duraderos en el retraso del crecimiento (Yadav *et al.*, 2005). Se ha observado que el PBZ es trasladado acropetalmente, es decir, tomado por la raíces, transportado por el xilema a través del tallo y se acumula en las hojas.

La aplicación en árboles frutales como mango y aguacate aumenta la cantidad de yemas florales e induce una proporción mayor de ramilletes florales en la parte inferior del árbol, incrementando la cantidad de frutos cuajados. Reduce el largo de los entrenudos y la producción de brotes laterales, disminuyendo requerimientos de poda. Adelanta la madurez de la fruta de 4-5 días y concentra el periodo de cosecha, mejorando el color y la calidad de la fruta (Yadav *et al.*, 2005).

Además se ha reportado que el PBZ confiere protección a las plantas que sufren de algún tipo de estrés mediante una reducción del daño oxidativo vía elevación de antioxidantes o reduciendo la actividad de enzimas oxidativas (Lin *et al.*, 2006).

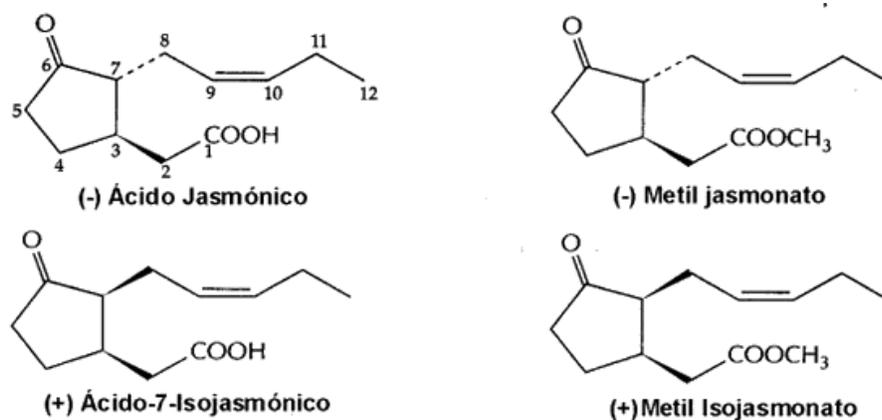
Resende y Souza (2002) evaluaron el efecto de la aplicación de PBZ a cuatro diferentes concentraciones (0, 500, 1000 y 1500 ppm) en cultivo de ajo cv. 'Quitéria'. Los resultados mostraron que la concentración de 744 ppm incrementó el peso medio de los

bulbos, las concentraciones de 725 y 778 ppm aumentaron la producción total del cultivo; dichos datos son similares a los reportados por Rahim y Fordham (1990b) y Rahim *et al.* (1994) quienes encontraron incrementos en la producción total de los bulbos con la aplicación de PBZ. Adicionalmente, Resende y Souza (2002) encontraron que una concentración de 1163 ppm de PBZ reduce el porcentaje de bulbos rebrotados, una anomalía común en el proceso de bulbificación.

### 2.6.2 Jasmonatos

Se ha demostrado que el ácido jasmónico (JA) o el metil jasmonato (MeJA) pueden promover la senescencia de las plantas (Creelman y Mullet, 1997a). Otro de los papeles importantes de estos compuestos, es su intervención en los procesos morfogénicos de la planta, tal como la bulbificación (Koda, 1997).

Los compuestos más representativos de este grupo son el ácido jasmónico, su esteroisómero el ácido 7-isojasmónico y sus ésteres metílicos llamados metil jasmonatos (Figura 14).

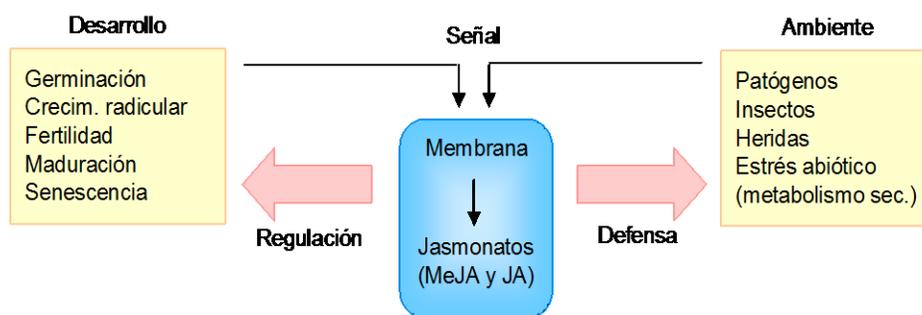


**Figura 14.** Estructuras químicas del ácido jasmónico (JA) y otros jasmonatos

El contenido endógeno de jasmonatos (JAs) varía entre las diferentes especies de plantas dependiendo del tejido y tipo de células, estado de desarrollo de la planta y en respuesta a diferentes estímulos del medio ambiente (Creelman y Mullet, 1997a). Las concentraciones de JA o MeJA generalmente están en el rango  $10^{-12}$  por gramo de peso fresco en tejido de hojas y pueden aumentar rápidamente bajo estímulos externos. Algunos

órganos exhiben concentraciones 10 veces por encima del nivel encontrado en hojas, sugiriendo que estos niveles elevados presentan funciones diferentes en la regulación de determinados procesos de desarrollo (Wasternack y Hause, 2002).

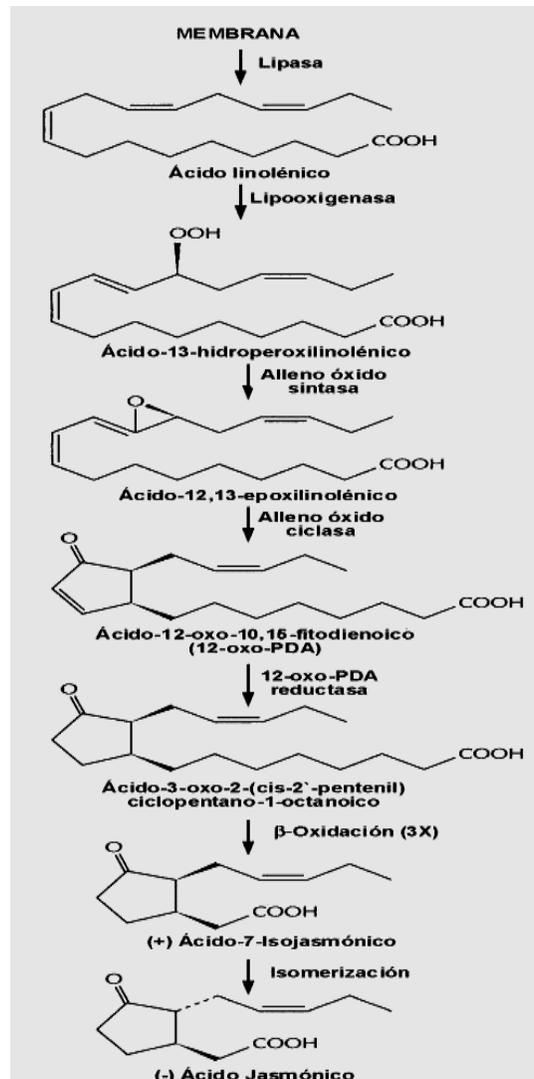
El MeJA fue identificado por primera vez en 1962 como principal constituyente del aceite etérico del jazmín (Demole *et al.*, 1962). Sin embargo, fue hasta la década de los ochentas que comenzaron a describirse los numerosos efectos fisiológicos de los JAs y la vía de síntesis de dichos compuestos (Vick y Zimmerman, 1983). Recientemente los JAs fueron propuestos como moléculas señalizadoras que participan en respuestas de plantas a una gran variedad de factores bióticos y abióticos, así como en diversos procesos de desarrollo (Creelman y Mullet, 1997a). De acuerdo con estos autores, diferentes señales podrían inducir la síntesis de JA a partir del ácido linolénico presente en las membranas celulares, especialmente en las membranas del cloroplasto y regular de este modo diversos procesos fisiológicos (Figura 15).



**Figura 15.** Síntesis de jasmonatos en respuesta a señales ambientales y de desarrollo (Creelman y Mullet, 1997a)

### 2.6.2.1 Biosíntesis de jasmonatos

La ruta de biosíntesis de JAs inicia con el ácido linolénico (Figura 16), este ácido graso es convertido a ácido 13-hidroperoxilinolénico mediante la acción de la lipoxigenasa. A su vez, el ácido 13-hidroperoxilinolénico es sustrato de la óxido aleno sintasa y óxido aleno ciclasa, que promueven la formación del ácido 12-oxo-fitodienoico (12-oxo-PDA). Después de una reducción y tres pasos de  $\beta$ -oxidación, se forma el (-)-7-iso-JA. El JA puede ser metabolizado para formar MeJA y numerosos conjugados y catabolitos que pueden tener actividad biológica (Creelman y Mullet, 1997a).



**Figura 16.** Ruta de biosíntesis del JA y derivados más comunes (Soberón *et al.*, 2005)

### 2.6.2.2 Jasmonatos y su relación con la bulbificación

Debido a que el JA y el MeJA tienen actividad microtúbulo-disruptora en cultivos de células de tabaco y papa (Abe *et al.*, 1990), se piensa que los JAs son reguladores de crecimiento que favorece la bulbificación. Ravnkar *et al.*, (1994) reportaron que la brotación y formación de bulbo de ajo *in vitro* fue estimulado mediante JA exógeno.

Jaume y Corral (1997) estudiaron el efecto de la adición de JA exógeno en el desarrollo de bulbos *in vitro*, demostrando que este compuesto tuvo una actividad promotora del desarrollo del bulbo cuando se puso en el medio a una concentración de 1

mg/L y 3% de sacarosa; después de 60 días de cultivo, el porcentaje de bulbos formados alcanzó 100%; mientras que en las plantas sin tratar, el porcentaje fue de 83.3% y eran bulbos muy pequeños. Bioensayos realizados por estos mismos autores, lograron evidenciar la existencia de un mayor nivel de JA libre en bulbos, respecto al encontrado en hojas. Con lo anterior, se sustenta la idea de que el ácido jasmónico (JA) es sintetizado en el follaje y transportado a través del floema hasta el suelo induciendo así la formación del bulbo.

Kim *et al.* (2003) en su trabajo de desarrollo de un método para regeneración de brotes múltiples y formación de dientes *in vitro* a partir de callos de ajo, reportaron que la tasa de formación de bulbillos se elevó de 36.8% a 77.6% cuando la concentración de JA adicionado al medio se aumentó de 0.5 a 2 mg/L, mientras que el GA<sub>3</sub> suprimió significativamente la formación de bulbillos.

Por otra parte, Utrilla-Vázquez (2008) realizó la aplicación de MeJA por aspersión foliar en un cultivo de ajo, utilizando dos concentraciones (250 y 1000 ppm) y dos periodos de aplicación (30 y 60 días antes de la diferenciación del bulbo). Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron comparables con los estudios realizados *in vitro* donde la aplicación exógena de MeJA o JA tiene un efecto positivo en la bulbificación.

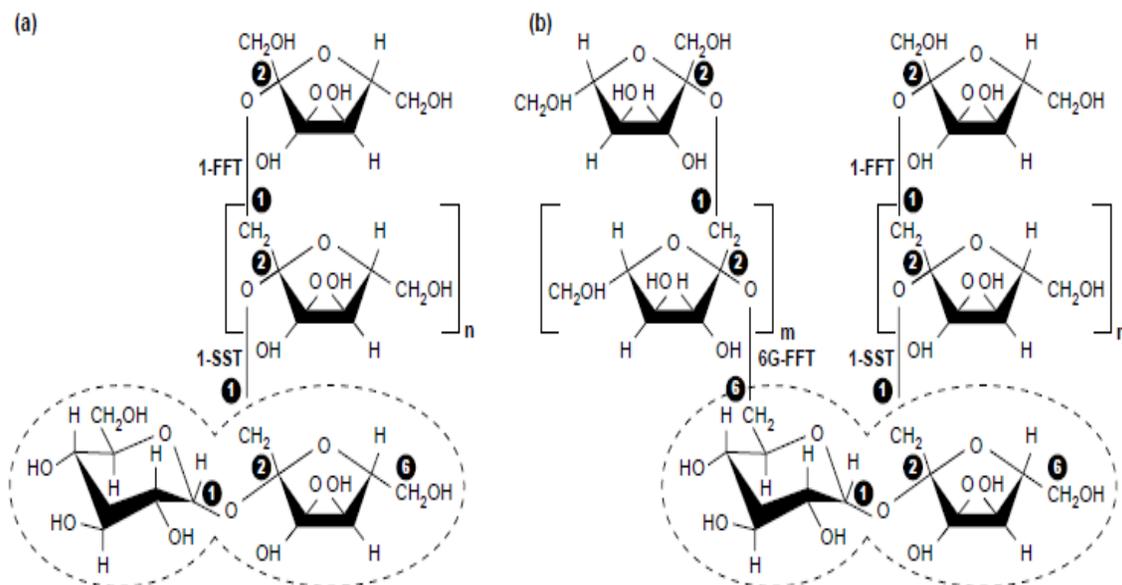
Es importante mencionar que a la fecha no se ha reportado la presencia de ácido jasmónico o jasmonatos durante la formación *in vivo* de los bulbos de ajo y en el caso de estar presentes, no se conoce cuáles son sus cambios durante el desarrollo y cómo afectan estos cambios al proceso de bulbificación ni cuáles son las interacciones con otras hormonas, como las GAs.

### **2.6.3 Carbohidratos**

Los carbohidratos de ajo están conformados por una mezcla de monosacáridos solubles en agua (glucosa y fructosa), el disacárido sacarosa, trisacáridos como 1-kestosa y neokestosa, y fructanos de distintos grados de polimerización. Darbyshire y Henry (1981), señalaron que la cebolla, poro y ajo no contienen almidón, por lo que los fructanos tienen una función de reserva así como de regulación en la fisiología de la planta.

### 2.6.3.1 Fructanos

Estos compuestos son polímeros de fructosa que derivan de la sacarosa, son no reductores e insolubles en agua. Se acumulan en plantas que soportan bajas temperaturas como carbohidrato de almacenamiento a corto plazo ya que permiten la osmorregulación, facilitan la adaptación de la fotosíntesis a bajas temperaturas, protegen a la planta del estrés por frío (Losso y Nakai, 1997).



**Figura 17.** Estructura de la inulina (a) y de la neo-serie de inulina (b). (Ritsema y Smeekens, 2003)

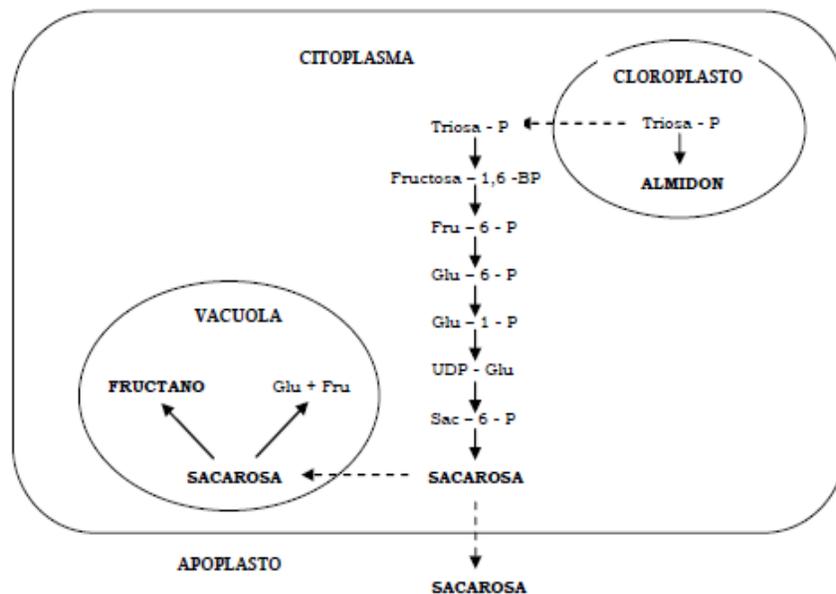
Los fructanos se encuentran ampliamente distribuidos como carbohidratos de reserva en tejidos vegetales de diversas familias de plantas, bacterias y hongos (Hosono *et al.*, 2003). De acuerdo al tipo de enlace que presente, los fructanos se clasifican en tres familia, denominadas, inulina [enlace  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1)-D-fructofuranosil], levanos [enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6) -D-fructofuranosil] y gramínea [enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) y  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6)-D-fructofuranosil]. (Roberfroid, 2005) (Figura 17).

En las plantas, los fructanos tienen otras funciones además del almacenamiento de carbono fotosintético, pues están implicados en la protección de la planta contra el déficit de agua debido a la sequía o a las bajas temperaturas (Hendry y Wallace, 1993; Pilon *et al.*, 1995). En la familia *Alliaceae* existen fructanos que pertenece al grupo de la inulina

llamado neo-series y se almacenan en el bulbo. En las neo-series de inulina, dos cadenas de fructosa ligadas por enlaces  $\beta(2\rightarrow1)$  se encuentran a una unidad de sacarosa (Ritsema y Smeekens, 2003; Baungartner *et al.*, 2000).

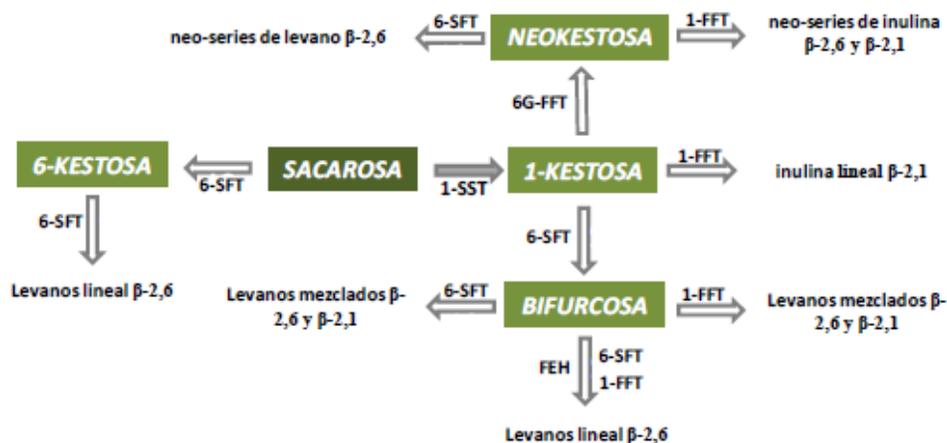
### 2.6.3.2 Biosíntesis de fructanos

La sacarosa es el sustrato para que la biosíntesis de fructanos se lleve a cabo; tanto la sacarosa como la fructosa son almacenadas en la vacuola. Aunque la sacarosa es sintetizada en el citoplasma, los fructanos son producidos en la vacuola por la acción de dos o más enzimas con especificidades distintas (fructosiltransferasas). Una alta actividad fotosintética está relacionada con niveles elevados de la exportación de carbono del cloroplasto al citoplasma, lo que resulta en un incremento de intermediarios para la síntesis de sacarosa. La sacarosa sintetizada puede ser distribuida a la vacuola (almacenamiento) o al apoplasto (exportación). En la vacuola, la sacarosa puede ser convertida a fructano por la acción de fructosiltransferasas o bien ser hidrolizada en glucosa y fructosa por invertasas (Vjin y Smeekens, 1999). (Figura 18).



**Figura 18.** Metabolismo de carbohidratos en células de plantas ( Vjin y Smeekens, 1999)

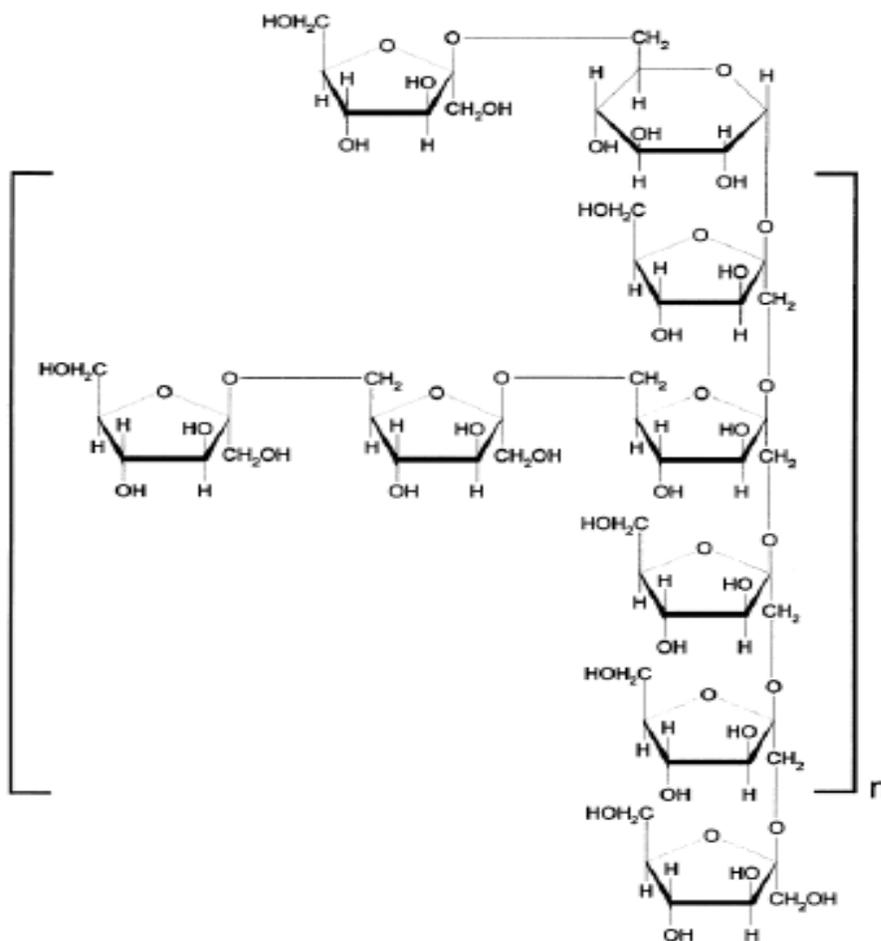
La síntesis de fructanos inicia con la enzima sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa (1-SST) que toma dos moléculas de sacarosa uniendo el residuo fructosil de una de ellas para unirlo al otro residuo fructosil de la otra molécula generándose una molécula de glucosa y un oligofructósido o trisacárido (1-kestosa) (Figura 19); el cual puede ser polimerizado por la participación de la enzima fructano-fructano-1-fructosiltransferasa (1-FFT) que transfiere, de modo reversible, un fructosil de un fructano con un grado de polimerización mayor o igual a la molécula de 1-kestosa generando así inulina cuya estructura lineal de diferente grado de polimerización (Vjin y Smeekens, 1999). En las especies de la familia *Alliaceae*, a la que pertenece el ajo, en adición a la inulina, se pueden sintetizar fructanos del tipo neo-serie de inulina, formados por la polimerización de la neo-kestosa que es catalizada por la enzima 6-glucosa-fructano-fructosil-transferasa (6G-FFT) que uno el residuo fructosil de una molécula de 1-kestosa al C<sub>6</sub> del residuo de glucosa de una molécula de sacarosa. La extensión de la molécula de neo-kestosa se lleva a cabo por la participación de la enzima 1-FFT que generará diferentes neo-series de inulina con diferentes grados de polimerización. En general se ha mencionad que los grados de polimerización de estos fructanos es dependiente del tipo de planta y por lo tanto de las características de la enzima 1-FFT particular, por lo que en ajo se reportan grados de polimerización de más de 50 mientras que en cebolla se señalan grados de polimerización de 6 a 12 ( Vjin y Smeekens, 1999).



**Figura 19.** Biosíntesis de fructanos en plantas (Vjin y Smeekens, 1999)

### 2.6.3.3 Los fructanos y su relación en la bulbificación

La mezcla de carbohidratos presente en el ajo está conformada por monosacáridos (glucosa y fructosa), disacáridos (sacarosa), trisacáridos (1-kestosa y neo-kestosa) y fructanos de diferentes grados de plimerización (Baungartner *et al.*, 2000). Se ha dicho que la neo-kestosa es la unidad principal de la molécula de fructano y que estos en el ajo tienen un alto peso molecular y un grado de polimerización (DP) de 58 (Figura 20).



**Figura 20.** Estructura sugerida para el fructano de ajo;  $n = 9$  para un DP = 58 (Baungartner *et al.*, 2000)

Algunos trabajos han reportado que en el inicio de la bulbificación, existe acumulación de carbohidratos en la base de las hojas (Butt, 1968; Lercari, 1982). También se han observado incrementos en la concentración de fructanos en plantas de cebolla

expuestas a condiciones inductivas de bulbificación, incluso antes de que los bulbos comiencen a hincharse notoriamente (Brewster, 1994).

Le Guen-Le Saos, *et al.*, (2002) en su estudio de formación de bulbos de chalote *in vitro*, encontraron que la aplicación de ancymidol (retardador de crecimiento) en el medio de cultivo indujo una disminución de 66% en el contenido de sacarosa en las bases de las hojas, e incrementó las cantidades de glucosa, fructosa y fructanos en 188, 274 y 131% respectivamente. Este trabajo destacó la importancia que tiene el evaluar el efecto de inhibidores en la síntesis de fructanos. Aunque no se conoce qué efecto podría tener este tipo de compuestos en la actividad enzimática de la sacarosa-sacarosa fructosiltransferasa.

### III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia económica que tiene el cultivo de ajo en México y a las pérdidas registradas (30-50% de la producción total) por los productores del municipio Cosío, Aguascalientes en la cosecha 2011-2012, provocadas por las condiciones climáticas poco favorables de ese ciclo que impidieron un correcto proceso de bulbificación permitiendo el desarrollo bulbos “acebollados” o “rebrotados”. Es por ello que el presente trabajo mediante el uso de inhibidores de síntesis de giberelinas (PBZ); y de compuestos inductores de la tuberización y del crecimiento radial (MeJA) pretende dar solución a la falta de horas de frío requeridas (550 h a  $<5^{\circ}\text{C}$ ) para que el proceso de bulbificación ocurra adecuadamente

Hasta el momento existe muy poca información desde un punto de vista bioquímico sobre el proceso de bulbificación en ajo. Son pocos los trabajos que evalúan el efecto de la temperatura durante el desarrollo del cultivo en la biosíntesis de reguladores de crecimiento involucrados en el proceso de bulbificación *in vivo* y la adición exógena de compuestos promotores o inhibidores de crecimiento. Por ello en éste estudio, se pretende evaluar la aplicación en suelo de diferentes concentraciones de estos compuestos en dos distintos periodos del ciclo del desarrollo del cultivo. Buscando con ello obtener bulbos de ajo de buena calidad y libres de defectos.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 General

Evaluar el efecto de la aplicación al suelo de diferentes dosis de metil jasmonato y paclobutrazol en el proceso de la bulbificación y diferenciación de los bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv ‘Coreano’.

### 4.2 Específicos

1. Evaluar el efecto de la aplicación de paclobutrazol (PBZ) en el desarrollo de bulbos de ajo.
2. Evaluar el efecto de la aplicación de metil jasmonato (MeJA) en el desarrollo de bulbos de ajo.
3. Determinar el efecto del PBZ y MeJA en el rendimiento total y calidad de los bulbos de ajo.
4. Cuantificar los cambios de giberelinas (GAs) durante el desarrollo de los bulbos de ajo debido a la aplicación de los reguladores de crecimiento.
5. Determinar el efecto del PBZ y MeJA en el contenido de azúcares (glucosa+fructosa, sacarosa y fructanos) en bulbos durante su desarrollo.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

Se utilizaron bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. ‘Coreano’, del ciclo de producción 2011-2012 procedente del rancho “El Refugio” localizado en el municipio Cosío, Aguascalientes (Figura 21). Donde se presenta un clima de seco a templado con una temperatura media anual de 16.1°C.



**Figura 21.** Ubicación del municipio Cosío, Ags.

### 5.2 Estrategia experimental

Previo a la fecha de siembra, un lote de bulbos fue transportado 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; estos se desgranaron manualmente. Los dientes se seleccionaron por tamaño y se trataron por inmersión en soluciones de Bactrimicin<sup>®</sup>, Basudin<sup>®</sup>, Folicur<sup>®</sup> y Buffex<sup>®</sup> para el control de enfermedades y nemátodos que atacan a este cultivo en las primeras etapas del desarrollo de la planta. Los agroquímicos fueron aplicados de acuerdo a las especificaciones del fabricante y a las recomendaciones de los productores (Tabla 2). Este tratamiento se aplicó un día antes de la siembra.

**Tabla 2.** Agroquímicos utilizados como plaguicida, bactericida y fungicida en dientes “semilla”

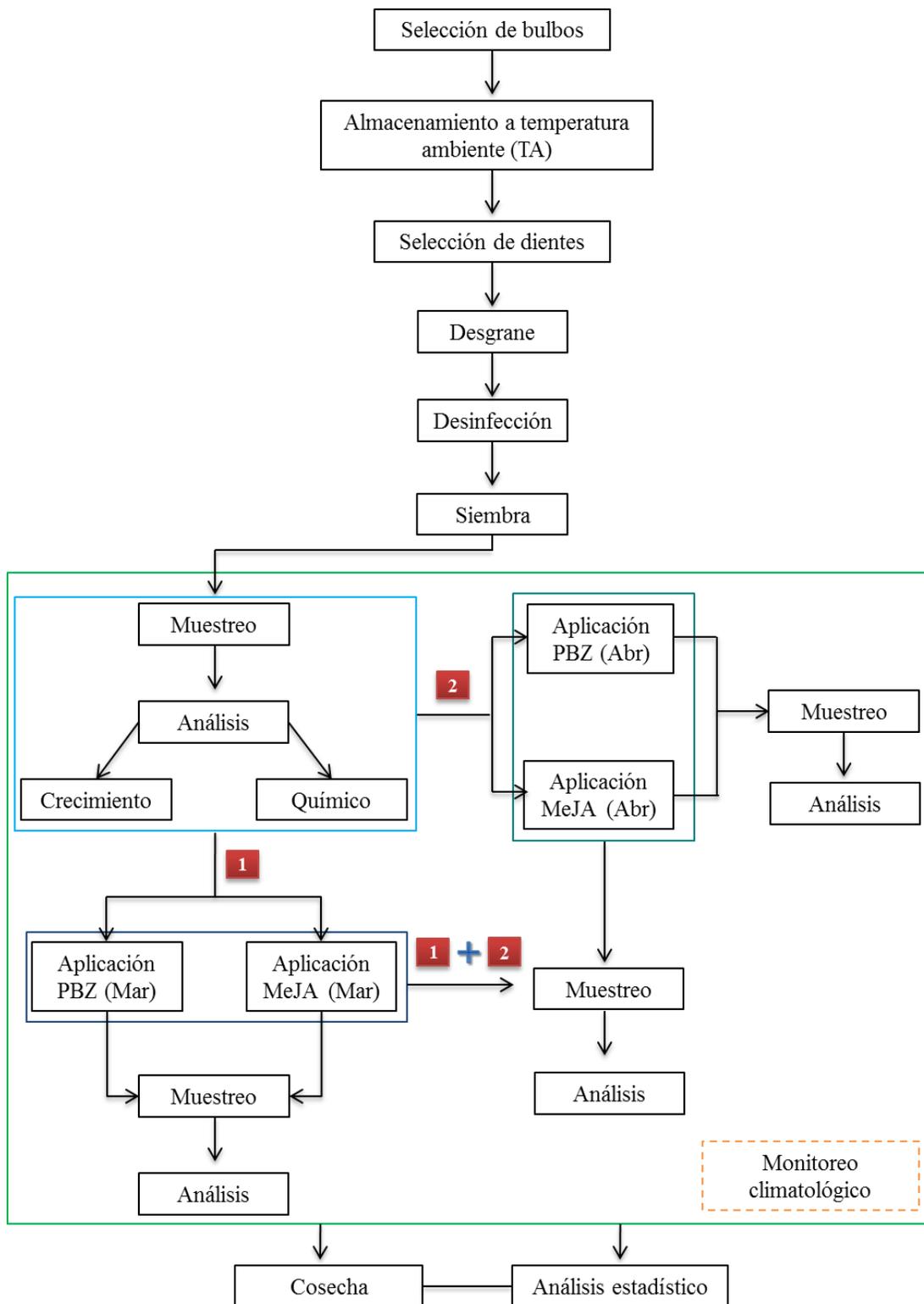
<b>Agroquímico</b>	<b>Tiempo de aplicación (min)</b>	<b>Dosis para 20 L de agua</b>
Basudin <sup>®</sup> + Folicur <sup>®</sup>	15	66 mL + 10 mL
Buffex <sup>®</sup>	50	9 g
Bactrimicin <sup>®</sup>	15	120 g

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 el exceso de la solución.

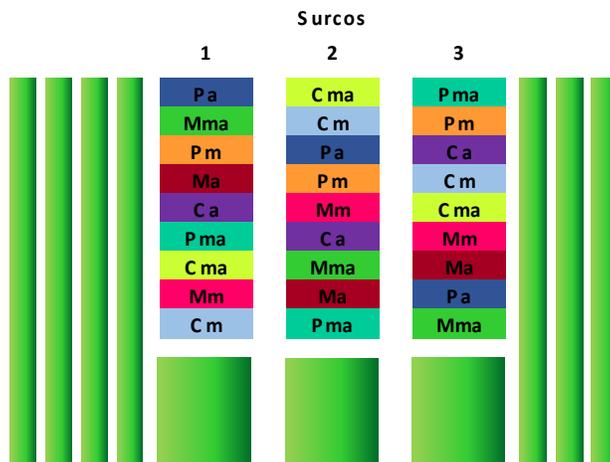
La Figura 22 muestra la estrategia seguida para el desarrollo de los experimentos. En el mes de octubre los dientes desinfectados se llevaron a un huerto comercial “El Pozo” ubicado en el municipio de Tepazalá, Ags., donde fueron sembrados manualmente en surcos de dos hileras de plantas con 7 cm de distancia entre cada diente. La siembra se realizó en tres surcos distintos, en cada surco se sembró una repetición de cada uno de los tratamientos (Figura 23).

La elección de la parcela experimental se basó en que ésta localidad registra una temperatura media mayor en aproximadamente 2 a 3°C de los municipios de Cosío que presenta una temperatura media entre 15 a 18°C; lo cual supone que la acumulación de horas frío necesarias para el desarrollo de la variedad ‘Coreano’ en esa localidad no se cumplirían y por ello favorecería las condiciones del experimento. Es decir, se podría observar el efecto que tienen los reguladores de crecimiento aplicados en la inducción de la bulbificación y diferenciación de los dientes.

Los procedimientos de manejo y fertilización del cultivo la realizaron los productores donde se llevó a cabo el experimento.



**Figura 22.** Diagrama de flujo experimental. Donde 1: aplicación de reguladores en marzo; 2: aplicación de reguladores en abril; y 1 y 2: aplicación de reguladores en marzo y abril.



**Figura 23.** Esquema de parcela experimental y distribución de tratamientos

### 5.3 Programa de muestreo

Los dientes “semilla” (almacenados a temperatura ambiente) se sembraron el 11 de octubre de 2012 en el huerto comercial “El Pozo” ubicado en el municipio de Tepezalá, Ags. Durante el desarrollo del cultivo se realizaron 6 muestreos mensuales y uno posterior a la cosecha (Tabla 3).

**Tabla 3.** Fechas de muestreo del ciclo de cultivo 2012-2013

Muestreo	Fecha	DDS
Siembra	11-oct-12	0
1	11-dic-12	61
2	14-ene-13	95
3	11-feb-13	123
4	07-mar-13	147
5	04-abr-13	175
6	09-may-13	210
Cosecha	22-may-13	223
7	20-jun-13	252

### 5.4 Diseño experimental y análisis estadístico

Se seleccionó un diseño en bloques completamente aleatorizado utilizando dos factores de estudio cada uno con tres niveles; cada bloque estuvo conformado por nueve tratamientos. Se realizaron tres repeticiones (Tabla 4) (Figura 23).

**Tabla 4.** Diseño de tratamientos

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>
Regulador de crecimiento	PBZ (1000 ppm)
	MeJA (250 ppm)
	Control (Agua)
Número de aplicación	Marzo
	Abril
	Marzo + Abril

El experimento constó de 27 unidades experimentales, los cuales fueron distribuidas en tres surcos (bloques). Cada bloque contaba con nueve tratamientos colocados en orden aleatorio. Se sembraron 125 dientes por tratamiento, de los cuales 28 eran dientes grandes (> 5 g), 78 medianos (5 g) y 19 pequeños (< 5 g).

La Tabla 5 muestra las abreviaturas con las que fueron connotados los cada uno de los 9 tratamientos.

**Tabla 5.** Abreviaturas utilizadas para tratamientos

<b>Regulador</b>	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Abreviatura</b>
Control (agua)	marzo	Cm
	abril	Ca
	marzo+abril	Cma
MeJA	marzo	Mm
	abril	Ma
	marzo+abril	Mma
PBZ	marzo	Pm
	abril	Pa
	marzo+abril	Pma

Se realizó un análisis de varianza de las variables de respuesta consideradas: crecimiento, contenido de GAs, azúcares y fructanos así como de los rendimientos y calidad de la cosecha en diferentes periodos a través del tiempo. En caso de diferencia entre

los tratamientos considerados se realizó como una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con una probabilidad  $\alpha = 0.05$ , utilizando el programa estadístico JMP® 8.

### 5.5 Aplicación de reguladores de crecimiento

Tanto el paclobutrazol (PBZ) como el metil jasmonato (MeJA) se aplicaron al suelo en dos fechas distintas durante el ciclo de cultivo. La primera fecha de aplicación fue el 7 de marzo antes del inicio de la bulbificación, y la segunda el 4 de abril cuando las plantas estaban iniciando su proceso de bulbificación. Para cada aplicación se identificó en campo los surcos y repeticiones que llevaría cada tratamiento; en cada planta se abrió el suelo hasta descubrir el bulbo y ahí se aplicaron 20 mL de las soluciones de cada regulador o de agua (grupos control) (Figura 24). Las aplicaciones se realizaron 20 h después del riego para evitar una dilución de los compuestos en el suelo. Además estas aplicaciones se realizaron durante las primeras horas de la mañana para facilitar que los compuestos fueran absorbidos por la planta al incrementar su actividad fotosintética diaria. Las concentraciones de ambas soluciones fueron 1000 ppm y 250 ppm para PBZ y MeJA, respectivamente. Como se mostró en la estrategia experimental (Figura 22); unos tratamientos recibieron sólo una aplicación (marzo o abril) y otros recibieron dos aplicaciones (marzo y abril).



**Figura 24.** Aplicación en suelo de MeJA (250 ppm) a plantas de ajo

### 5.5.1 Preparación de la solución de paclobutrazol (PBZ)

Para cada fecha de aplicación, se prepararon en laboratorio 16 L de solución de PBZ a 1000 ppm, para ello se utilizaron 69 mL de paclobutrazol en suspensión acuosa (Cultar<sup>®</sup> 25 SC, Syngenta) los cuales se disolvieron en 16 L de agua destilada a pH de 6. Las soluciones fueron llevadas a campo el día de su aplicación. Los volúmenes de solución fueron aplicados mediante dosificadores (Figura 25).



**Figura 25.** Dosificadores utilizados para la aplicación de los reguladores de crecimiento

### 5.5.2 Preparación de la solución de metil jasmonato (MeJA)

Se prepararon 16 L de MeJA a 250 ppm. 4.5 mL de metil jasmonato al 95% (Sigma-Aldrich) se colocaron en el volumen de agua a la cual se le ajusto el pH a 6; para lograr la total dispersión del MeJA en el agua se adicionó TWEEN<sup>®</sup> 80 al 2% (v/v) (Sigma-Aldrich) (Yao y Tain, 2005) y la mezcla se homogenizó mediante un Ultra Turrax<sup>®</sup> (T25 basic, IKA). Las aplicaciones se realizaron como se describió para el caso de PBZ.

## 5.6 Determinaciones durante el desarrollo

Mensualmente se efectuaron muestreos de 5 plantas diferentes de cada tratamiento a las cuales se les realizaron las siguientes determinaciones: parámetros de crecimiento (porcentaje de emergencia, altura de la planta, número de hojas, ancho de hoja, diámetro del cuello y del bulbo, índice de bulbificación), peso fresco, contenido de giberelinas (GAs) y azúcares (azúcares reductores, sacarosa y fructanos). De cada una de las 5 plantas muestreadas se tomaba una muestra representativa de bulbo, se congelaban con nitrógeno líquido y se almacenaban a -70°C hasta su análisis. El contenido de giberelinas (GAs) y

azúcares (glucosa+fructosa, sacarosa y fructanos); se realizó en muestras de previamente liofilizados.

Al final del ciclo de cultivo, las plantas fueron arrancadas y llevadas a las instalaciones de Proajo para ser curadas a la sombra durante dos semanas; posteriormente el follaje fue removido y los bulbos obtenidos fueron clasificados de acuerdo a su tamaño y defectos siguiendo los criterios de la Asociación de Productores de Ajo de Aguascalientes.

De forma simultánea y durante todo el ciclo de cultivo se llevó un registro diario de las temperaturas (máxima, mínima y media), del fotoperiodo y la radiación lumínica máxima ( $W/m^2$ ) de las estaciones climatológicas más cercanas al sitio experimental y que pertenecen a la Red Nacional de Estaciones Estatales Agroclimáticas del INIFAP (Estación Makelisa y CEPAB) cuyas bases de datos están disponibles en el página <http://clima.inifap.gob.mx/redinifap/>. Con esta base de datos de esas estaciones se calculó la suma de horas diarias cuyas temperaturas registradas estuvieran por debajo de  $5^{\circ}C$  con las cuales se calculó las horas de frío acumuladas por el cultivo. Adicionalmente, en la parcela experimental se colocó un registrador de temperatura y humedad relativa (LASCAR electronics, Mod. EL-USB-2) con el cual se hicieron los mismos cálculos indicados.

### **5.6.1 Porcentaje de emergencia de plantas**

A los 18 y 36 días después de la siembra se contaron el número de plantas emergidas y éstas se relacionaron con el número de dientes sembrados expresándose la emergencia como porcentaje.

### **5.6.2 Variables fenológicas**

Una vez emergidas por completo las plantas, se realizaron muestreos mensuales durante el ciclo de cultivo. En cada muestreo se tomaron cinco plantas al azar de cada repetición y de cada tratamiento para determinarles peso fresco, altura de la planta, ancho de la base de las hojas, número de hojas por planta, diámetro del bulbo y del cuello e índice de bulbificación, el cual se calculó mediante la siguiente ecuación (Mann, 1952).

$$IB = \frac{\text{Diámetro bulbo}}{\text{Diámetro cuello}}$$

Cuando el IB es mayor a 2, se consideró que el proceso de bulbificación había iniciado (Clark y Heath, 1962).

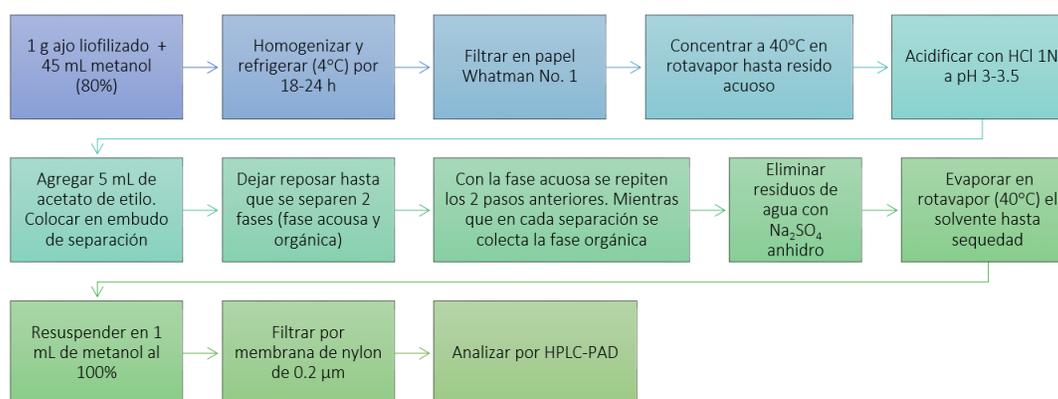
Con la finalidad de observar el proceso de diferenciación de dientes, los bulbos de cada planta fueron cortados de forma transversal para contar el número de dientes por bulbos y detectar posibles anomalías en el tejido interno de los bulbos.

## 5.7 Métodos utilizados

### 5.7.1 Análisis de giberelinas

#### 5.7.1.1 Extracción

La extracción de giberelinas se realizó utilizando el método reportado por Rakhimbaev y Ol'shanskaya (1976) modificado por Vázquez-Barrios (2005) (Figura 26). Un gramo de bulbo liofilizado, se homogenizó en 45 mL de alcohol metílico al 80%. El homogenizado se dejó reposar durante 18-24 h a 4°C; se filtró en papel Whatman No. 1. El filtrado se sometió a evaporación a 40°C en un rotavapor hasta eliminar la fracción metanólica. El extracto se acidificó con HCl 1N a pH 3-3.5.



**Figura 26.** Esquema general de extracción de giberelinas libres (Rakhimbaev y Ol'shanskaya, 1976; modificado por Vázquez-Barrios 2005)

Las giberelinas se extrajeron por la técnica de partición de solventes; al extracto concentrado se añadieron en tres ocasiones 5 mL de acetato de etilo usando un embudo de separación. De cada adición de acetato de etilo, se recolectó la fase orgánica y el exceso de

agua presente en ellas se elimina con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La fase orgánica de acetato de etilo se evaporó hasta sequedad en un rotavapor (BÜCHI R-205, B-490) a 40°C y el extracto seco se resuspendió en 1 mL de metanol al 100%. El extracto metanólico se filtró en membrana de nylon de 0.2 µm. El filtrado que contenía las giberelinas libres se almacenó en refrigeración hasta su análisis.

### 5.7.1.2 Separación y cuantificación de giberelinas

La separación y cuantificación se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos, HPLC-PDA, que registró la absorbancia de la muestra a 205 nm. Se utilizó un equipo HPLC Waters® Alliance® 2695 y un detector de arreglo de diodos Waters™ 2998 equipado con una columna Symetry C<sub>18</sub> de 3.5 µm de tamaño de partícula y de 4.6x100 mm de diámetro y largo, respectivamente.

De acuerdo con Vázquez-Barrios (2005) se utilizó un doble gradiente de concentración de acetonitrilo con una fase móvil A (agua con 5% de acetonitrilo y 0.01% de ácido fosfórico) y una fase B (acetonitrilo con 5% de agua y 0.01% de ácido fosfórico) (Tabla 6) la fase móvil corrió a un flujo de 1 mL/min en un tiempo de corrida de 35 min. El volumen de muestra (extracto metanólico) inyectado al equipo HPLC-PDA fue de 10 µL. Los tiempos de retención y espectros de absorción se compararon con el espectro de un estándar comercial de giberelinas GA<sub>3</sub> (Sigma Chemical).

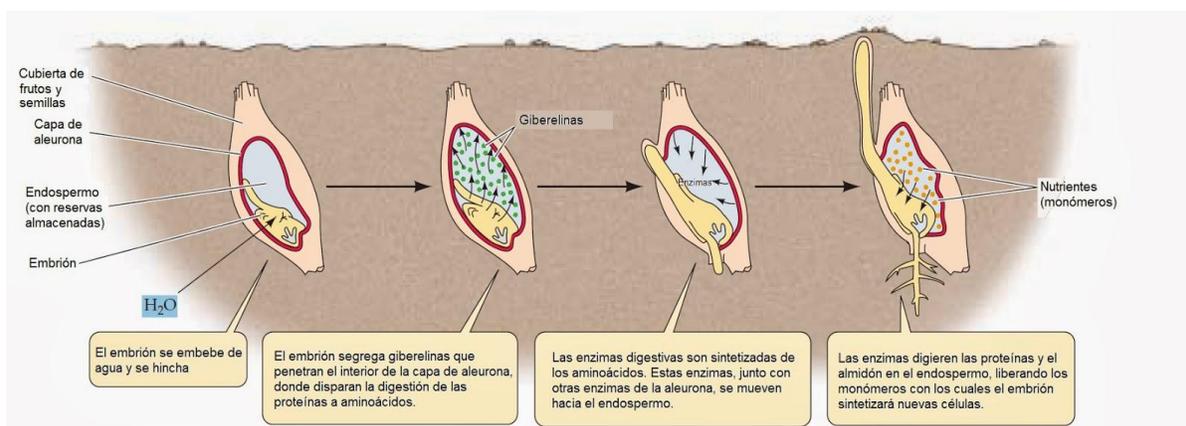
**Tabla 6.** Gradiente de concentración para la separación de GAs por HPLC

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	1	90	10
15	1	30	70
20	1	30	70
21	1	0	100
28	1	0	100
30	1	90	10
35	1	90	10

Mediante la comparación de áreas bajo la curva y los espectros de los picos de las muestras con el estándar comercial (ácido giberélico, GA<sub>3</sub>) se realizó la cuantificación del compuesto de interés (Anexo 9.1).

### 5.7.1.3 Bioensayo para la determinación de actividad giberélica de los compuestos separados por HPLC

Para demostrar la actividad giberélica de los compuestos separados por HPLC se aplicó un método basado en la capacidad que tienen las giberelinas de inducir la síntesis de enzimas hidrolíticas del almidón en granos de trigo en estado germinativo (Nicholls y Paleg, 1963) (Figura 27). Para que la germinación de un grano ocurra se requiere de la producción de enzimas hidrolíticas para debilitar la capa protectora del grano, movilizar los nutrientes de del endospermo, estimular el crecimiento del embrión y activar al meristemo del embrión para que produzca nuevas raíces y brotes. En todos los procesos anteriores las GAs se encuentran implicadas (Thomas *et al.* 2005)



**Figura 27.** Esquema de acción de las GAs en la germinación de granos

De varias muestras se colectaron las dos fracciones ( $t = 22.7$  min y  $23.6$  min) de interés a la salida del detector PDA (Waters® 2998). Se evaporó el solvente en corriente de N<sub>2</sub>, los compuestos adheridos a las paredes del vial se resuspendieron en 500  $\mu$ L de metanol al 100%. Este nuevo extracto fue inyectado en el sistema HPLC-PDA para conocer la concentración de las fracciones. Una vez conocida la concentración de giberelinas en la solución de metanol se evaporó y se resuspendió en 500  $\mu$ L de agua destilada

En tubos Falcon™ se colocaron 20 granos de cebada ( $\approx 0.54$  g) previamente descascarillada y desembrionada a los que se les agregó los 500  $\mu$ L del extracto acuoso de las fracciones detectadas y se dejó incubar a 35°C durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo, se adicionó 10 mL de agua destilada, se homogenizo la mezcla con un Ultra Turrax (IKA T25 BASIC), durante 20 s. El homogenizado se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C por 10 min. Del sobrenadante se tomaron 3 alícuotas para realizar ensayo de azúcares reductores por DNS; método que se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitro-salicílico (ANS) y durante este proceso, el grupo aldehído del azúcar es oxidado al respectivo ácido carboxílico (Saquib y Whitney, 2011).

En dicho bioensayo se incluyeron dos controles uno negativo (H<sub>2</sub>O destilada) y otro positivo (GA<sub>3</sub>, 1 mg/mL). La concentración de azúcares reductores presentes en las fracciones y en los controles se calculó mediante una curva de calibración de maltosa (Anexo 9.2).

### **5.7.2 Cuantificación de carbohidratos en bulbos**

Se utilizaron dos métodos espectrofotométricos para cuantificar los azúcares presentes en las muestras. El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con el cual se conoció el contenido de azúcares reductores libres en el extracto, y el método de la hidrazida del ácido *p*-hidroxibenzoico que se empleó junto con un kit enzimático (K-FRUC 03/12, Megazyme) para calcular la concentración de sacarosa y fructanos.

#### **5.7.2.1 Obtención de extracto de carbohidratos**

Las muestras de tejido de ajo liofilizado fueron molidas utilizando un molino de café y especias (KRUPS GX4100).

A 50 mg de muestra molida se le agregaron 20 mL de agua destilada (pH 6) a 80°C, se mantuvo en agitación y a temperatura constante (80°C) durante 15 minutos. Transcurrido dicho tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente para posteriormente aforar a 25 mL la solución se filtró en papel filtro Whatman No. 1. Esta solución fue considerada como el extracto para la cuantificación de azúcares.

### **5.7.2.2 Cuantificación de monosacáridos solubles en agua**

Mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) se cuantificó el contenido de glucosa y fructosa libres en el extracto (Miller, 1959). En un tubo de ensaye se colocan 0.5 mL de extracto y 0.5 mL de reactivo DNS (Anexo 9.4), se agita en vórtex y se lleva a baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Se dejó enfriar y posteriormente se le agregaron 5 mL de agua destilada. Se agitó nuevamente en vórtex y se deja reposar durante 15 minutos. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro UV/VIS (Lambda 40, Perkin Elmer Instruments) a una longitud de onda de 540 nm (Bello-Gil *et al.*, 2006).

La concentración de monosacáridos solubles en agua presentes en las muestras de ajo se determinó mediante una curva de calibración de glucosa (Anexo 9.3).

### **5.7.2.3 Determinación de fructanos**

Se utilizó un método enzimático y espectrofotométrico de la AOAC usando el Kit de Megazyme fructans K-Fruc assay (AOAC método 999.03 y ACC método 32.32.1). El cual se basa en el siguiente principio general: los fructanos presentes en la muestra de estudio son hidrolizados a D-glucosa y D-fructosa mediante fructanasas. Los azúcares reductores generados de dicha hidrólisis son cuantificados por el método de la hidrazida del ácido *p*-hidroxibenzoico (PAHBAH) que da como producto un compuesto colorido que se mide espectrofotométricamente a 410 nm. Dado que en la muestra pueden existir otros azúcares que sobrestimen el contenido de fructanos; es necesario eliminarlos antes de dicha determinación. Mediante una sacarasa específica la sacarosa se hidroliza a D-fructosa y D-glucosa; simultáneamente, el almidón y los maltosacáridos (si están presentes en la muestra son hidrolizados de igual forma por la acción combinada de la  $\beta$ -amilasa, pululanasa y maltasa. Los azúcares reductores generados son reducidos a alcohol azúcares por un tratamiento con borohidruro de sodio alcalino los cuales no reaccionan con el PAHBAH. La solución se neutraliza y el exceso de  $\text{NaBH}_4$  es removido por tratamientos con ácido acético. Una vez hecho este procedimiento, es posible llevar a cabo la hidrólisis y cuantificación de fructanos.

### 5.7.2.3.1 Remoción de sacarosa

Se colocó 0.2 mL de extracto en tubos de ensaye, se añadió 0.2 mL de una mezcla de Sacarasa/ $\beta$ -amilasa y se incubó a 40°C por 30 minutos. A continuación se adicionó 0.2 mL de solución alcalina de borohidruro de sodio, se agitó en vórtex e incubó a 40°C por 30 minutos. Al término de la incubación se le añadió 0.5 mL de ácido acético 2 M y agitó en vórtex. Para fines prácticos a esta solución se le denota como solución S.

### 5.7.2.3.2 Hidrólisis y medición de fructanos

Se tomaron 2 alícuotas de 0.2 mL de la solución S, a una se le adicionó 0.1 mL de fructanasa, para hidrolizar los fructanos contenidos en las muestras de ajo, mientras que al segundo tubo se le agregó 0.1 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M, que se usó como blanco. Todos los tubos se incubaron a 40°C durante 1h. Posteriormente se les añadió 5 mL de la solución PAHBAH y se incubaron en baño de agua a ebullición por 6 minutos, tiempo necesario para que el reactivo PAHBAH reaccione con los azúcares reductores presentes en las muestras evidenciándose por el desarrollo de color amarillo. Después de remover los tubos del baño de agua se colocaron en un baño de agua fría (18-20°C) por 5 minutos.

La cuantificación de D-glucosa y D-fructosa (azúcares reductores) se realizó mediante la lectura de la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Lambda 40, Perkin Elmer Instruments). La concentración de fructanos (p/p) presentes en las muestras se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

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

Donde:

$\Delta_A$  = (absorbancia muestra) – (absorbancia blanco)

$F$  = (54.5  $\mu$ g D-fructosa/ absorbancia del estándar de D-fructosa para 54.5  $\mu$ g D-fructosa)  
[Factor para convertir valores de absorbancia de  $\mu$ g de D-fructosa (McCleary y Murphy, 2000).

$5$  = Factor para convertir 0.2 mL analizados a 1 mL

**V** = volumen (mL) de extracto usado

**W** = Peso (mg) de muestra extraída

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

**1/1000** = Factor de conversión de  $\mu\text{g}$  a  $\text{mg}$

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

## **5.8 Determinación de rendimiento y calidad de la cosecha**

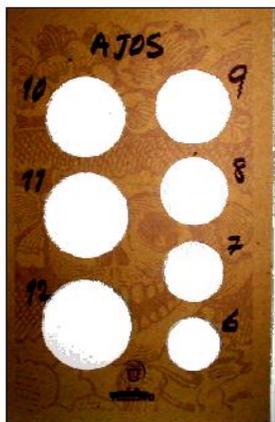
Al final del ciclo de cultivo y previo a la cosecha, se delimitaron 3 m lineales de cada tratamiento; los cuales se separaron el día de la cosecha y se almacenaron durante dos semanas en un lugar protegido por el sol y con buena ventilación a fin de que el follaje de las plantas se seque, esta práctica es conocida como curado, y tiene por finalidad reducir la susceptibilidad a pudriciones durante el almacenamiento. Una vez finalizado el proceso de curado, a cada bulbo se le cortó el follaje y los bulbos resultantes se clasificaron por calibre y por defectos siguiendo los criterios de la Asociación de Productores de Ajo de Aguascalientes.

### **5.8.1 Clasificación por calibre**

El tamaño o calibre de los bulbos se determinó usando el patrón de calibres utilizado por la Asociación de Productores y Exportadores de Ajo (Figura 28). Esta clasificación consiste en separar los bulbos de acuerdo al diámetro mayor de los bulbos que corresponden a los diferentes calibres comerciales establecidos (Tabla 7).

### **5.8.2 Rendimiento total y por calibre por hectárea**

Los bulbos de cada calibre fueron contados y pesados, con estos datos se realizó el cálculo para expresar el rendimiento en kilogramo por hectárea. Para el cálculo por hectárea se consideran las plantas o bulbos obtenidos en los tres metros lineales de evaluación y se extrapoló a una hectárea. Para ello se tomó en cuenta que la separación entre plantas fue de 7 cm, que los surcos estuvieron sembrados a dos hileras de plantas y que cada surco estaba separado por una distancia de 85 cm.



**Figura 28.** Plantilla de calibración de bulbos de ajo

**Tabla 7.** Escala de calibres determinados de acuerdo al diámetro del bulbo de ajo

Calibre	Diámetro del bulbo (cm)
< 6	4
6	4.5
7	5
8	5.5
9	6
10	6.5
11	7
12	7.5
>12	>7.5

### 5.8.3 Porcentaje de bulbos con defectos

Por las características visuales de los ajos cosechados se identificaron los bulbos “acebollados” (ausencia de dientes), rebrotados, mal llenados (falta de madurez), bulbos irregulares, y los que presentaban daños mecánicos. Con el peso de estos ajos y el peso total de los tratamientos se obtuvo el porcentaje de los bulbos defectuosos.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis climático de la zona de producción

El municipio de Cosío se encuentra localizado al norte del Estado de Aguascalientes y cuenta con las condiciones climáticas adecuadas para el cultivo de ajo jaspeado. Sin embargo, en este trabajo se planteó situar el experimento en una zona donde las temperaturas mínimas fueran superiores a las de Cosío con el objetivo de inducir la bulbificación y diferenciación a través de la aplicación de los reguladores de crecimiento, es decir, los reguladores aplicados deberán minimizar el efecto negativo en la bulbificación por la falta de horas de frío requeridas por esta variedad.

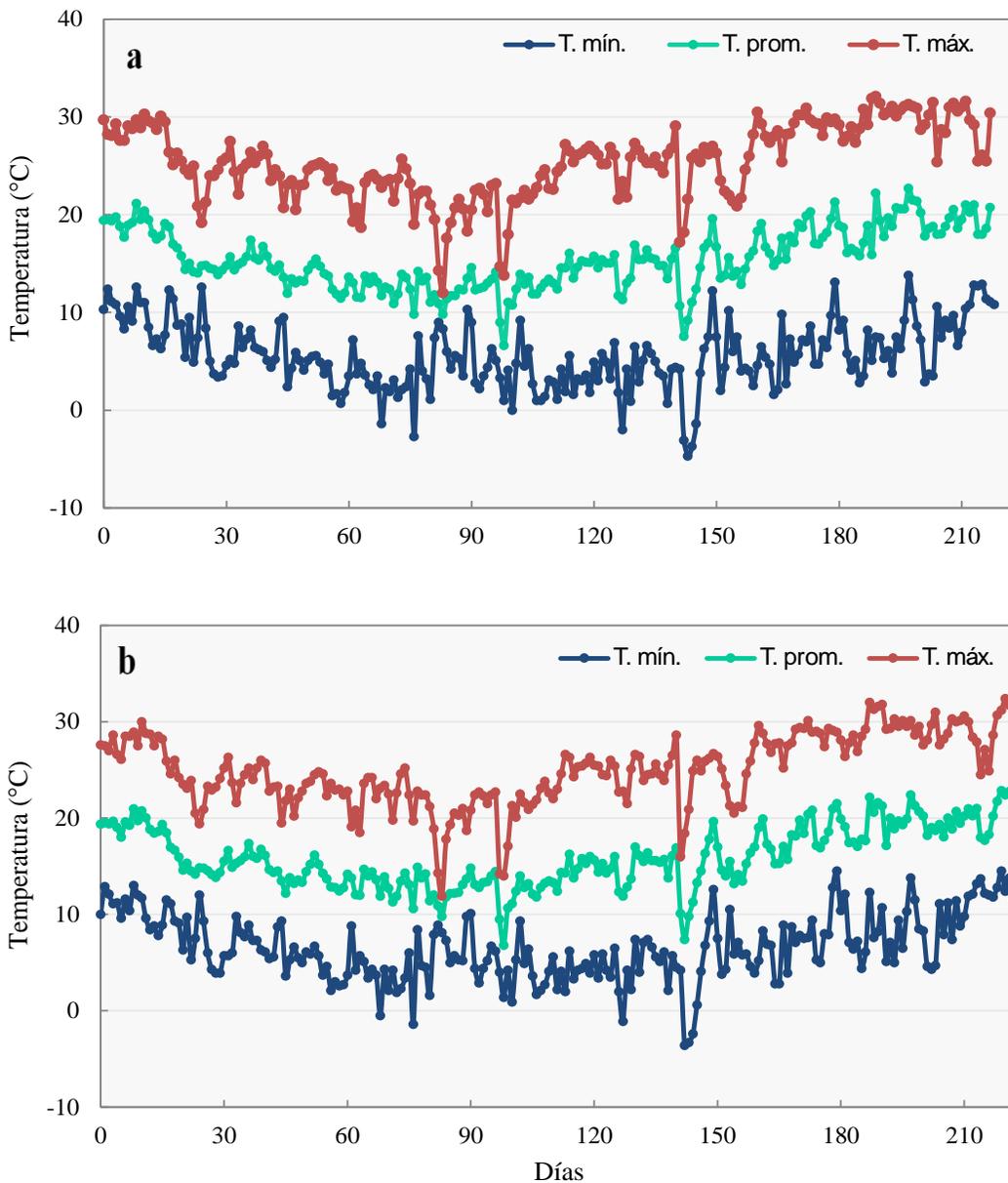
Con los datos proporcionados por la Red Nacional de Estaciones Climatológicas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, en sus estaciones Makelisa y CEPAB con coordenadas geográficas indicadas en la Tabla 8, se registraron los datos diarios de temperatura máxima, mínima y promedio los cuales se muestran en la Figura 29.

**Tabla 8.** Localización de las estaciones climatológicas seleccionadas en Aguascalientes

<b>Estación</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Municipio</b>
Makelisa	22° 13' 13"	102° 16' 29"	Tepezalá
CEPAB	22° 09' 54"	102° 42' 07"	Pabellón de Arteaga

Fuente: <http://clima.inifap.gob.mx/redclima>

Durante el tiempo de experimento (223 días) el intervalo de variación de la temperatura máxima en la estación Makelisa fue de 12 a 33.2°C mientras que la temperatura media oscilo entre 6.6 y 22.5°C y la mínima entre -4.7 y 13.8°C. Para la estación CEPAB la temperatura máxima se mantuvo entre 11.9 y 32.8°C, la media entre 6.8 y 22.4°C y la mínima entre -3.6 y 14.5°C. De acuerdo con estos promedios, ambas estaciones parecen mostrar una alta similitud.

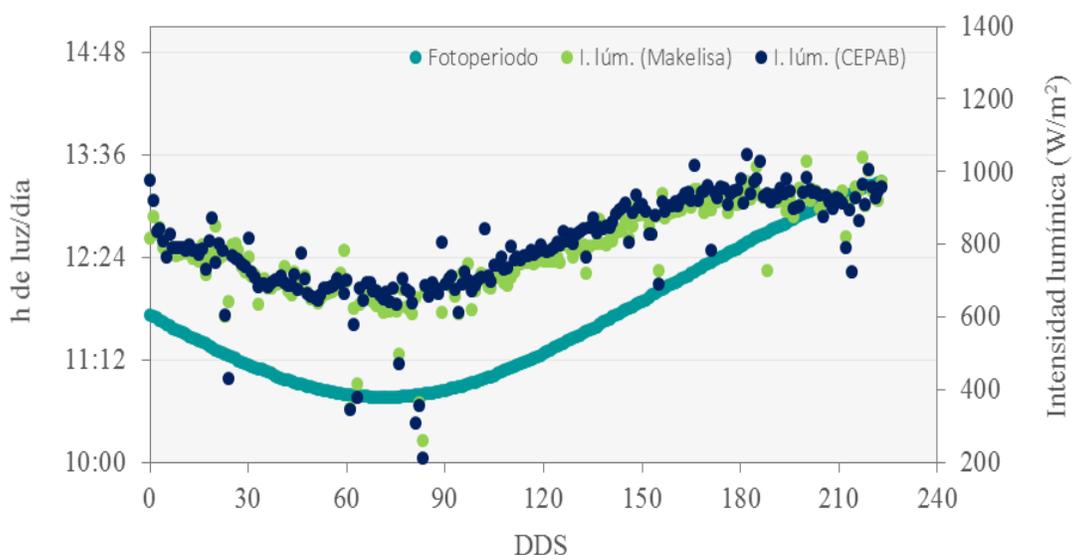


**Figura 29.** Registro de temperaturas máximas, mínimas y promedio diarias de la estación Makelisa (a) y CEPAB (b)

Después de la siembra, las temperaturas máximas promedio disminuyeron desde 33 °C hasta 12°C dentro de los primeros 85 días de desarrollo del cultivo para posteriormente volver a incrementarse hasta registrar valores de 32°C al final del ciclo de cultivo. La misma tendencia mostró la temperatura media al disminuir de 20 a 8°C en los primeros 85 días y al incrementarse de 8 a 22°C hasta el final del ciclo. También las

temperaturas mínimas decrecieron desde 12 a  $-3^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se incrementaron hasta  $12^{\circ}\text{C}$  hacia el final del ciclo de cultivo (Figura 29).

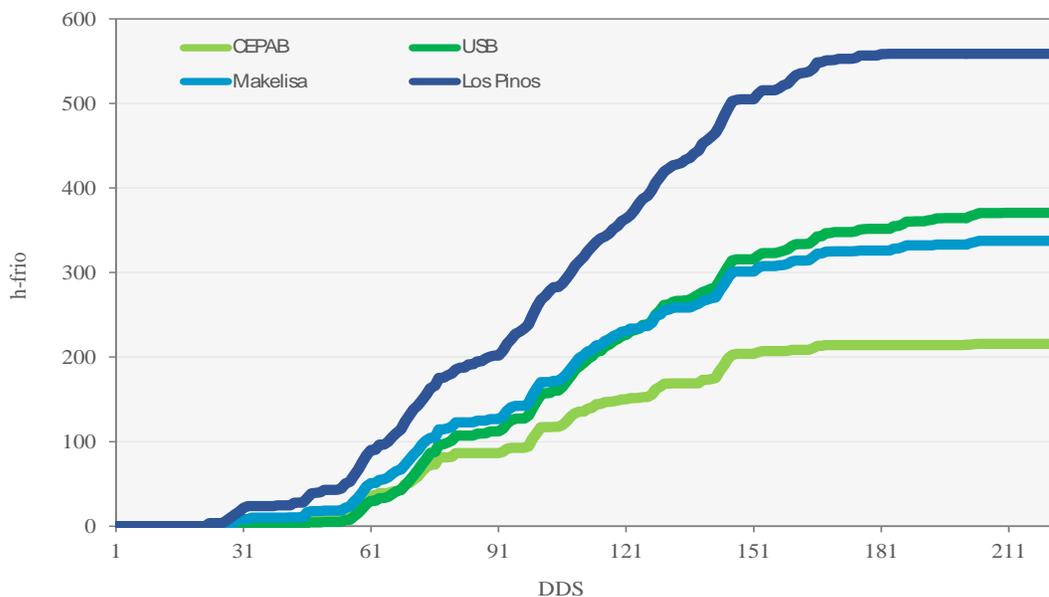
En cuanto a la amplitud del fotoperiodo (Figura 30), éste también mostró una disminución desde 11:35 h en el día de la siembra hasta 10:48 h a los 62 días después de la siembra. A partir de este valor mínimo el fotoperiodo se incrementó hasta alcanzar valores máximos de 13:29 h el día de la cosecha (223 días después de la siembra). Una tendencia similar se observó para la radiación, la cual disminuyó de  $900\text{ W/m}^2$  hasta  $285\text{ W/m}^2$  en los primeros 85 días, para posteriormente incrementarse a partir de esos valores hasta  $980.5\text{ W/m}^2$  al final del ciclo de cultivo.



**Figura 30.** Registro del fotoperiodo (h:m) y la radiación lumínica máxima ( $\text{W/m}^2$ ) diaria durante el desarrollo del cultivo

Respecto de la acumulación de horas de frío, definidas como la suma de horas en las que la temperatura ambiente se encontraba por debajo de  $5^{\circ}\text{C}$ ; la Figura 31 muestra dicha acumulación en ambas estaciones climatológicas para todo el ciclo de cultivo. A estos datos se añaden aquellos registrados mediante el termógrafo digital ubicado en la parcela experimental.

En la estación Makelisa se registraron 337.5 h, mientras que en la estación CEPAB se registró la menor acumulación de horas de frío (215.5 h) y en la parcela experimental se registró la mayor acumulación de horas de frío (370.6 h) (Figura 31).



**Figura 31.** Comparación de horas de frío acumuladas en el campo experimental

Por trabajos previos realizados en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas se ha establecido que el ajo cv. ‘Coreano’ requiere más de 550 horas para inducir la bulbificación y diferenciación de los dientes (López-Hernández, 2010). Los datos de temperaturas y acumulación de frío en la parcela experimental muestran que no se alcanzaron los requerimientos de frío necesarios para esta variedad y por ello los efectos observados de diferenciación y bulbificación podrían ser atribuibles a las aplicaciones de los reguladores ensayados.

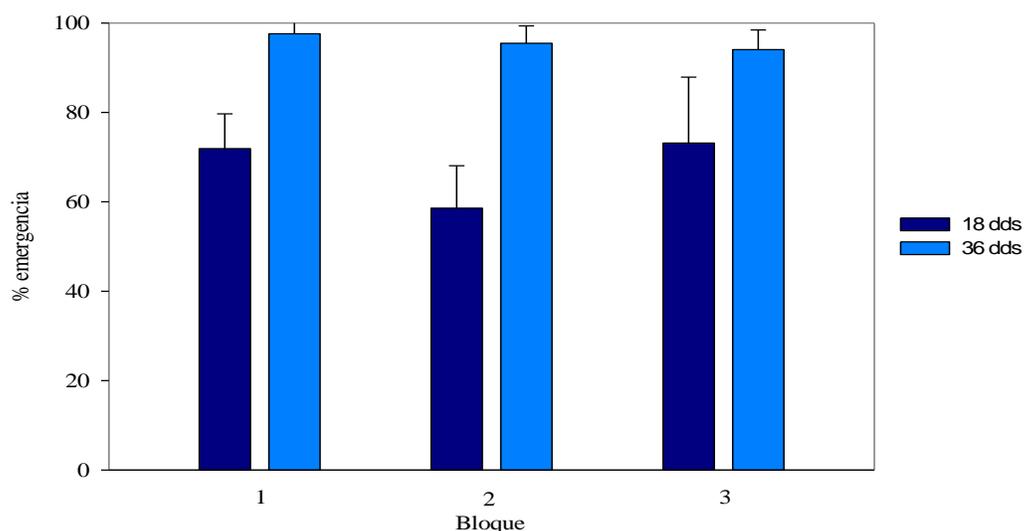
De manera comparativa la Figura 31 muestra las horas de frío acumuladas en la estación climatológica más próxima a Cosío (Los Pinos), municipio donde se tenía otra parcela experimental con diferentes fines de estudio. En este sitio si se alcanzaron los requerimientos de frío con lo que se logra un adecuado proceso de bulbificación y diferenciación de los bulbos de ajo (568.5 h).

## 6.2 Desarrollo del cultivo

### 6.2.1 Emergencia de plantas

La Figura 32 muestra el porcentaje de plantas que emergieron después de 18 y 36 días de la siembra; registrándose valores de 58 a 74% para 18 días y de 94 a 97% para los 36 días.

Utrilla-Vázquez (2008) trabajando con esta misma variedad en la temporada 2007-2008 y cultivada en la localidad de Macondo, Rincón de Romos (municipio con condiciones climáticas similares a Tepezalá), registró una emergencia de 85% a los 18 días después de la siembra, porcentaje ligeramente mayor respecto a lo obtenido en este trabajo. Es posible que las diferentes parcelas tuvieran manejos agronómicos diferentes del cultivo que propiciaron estas diferencias. No obstante, después de 36 días la emergencia de plantas fue casi completa.



**Figura 32.** Porcentaje de emergencia de plantas de ajo

### 6.3 Comportamiento fenológico previo a la aplicación de los reguladores de crecimiento

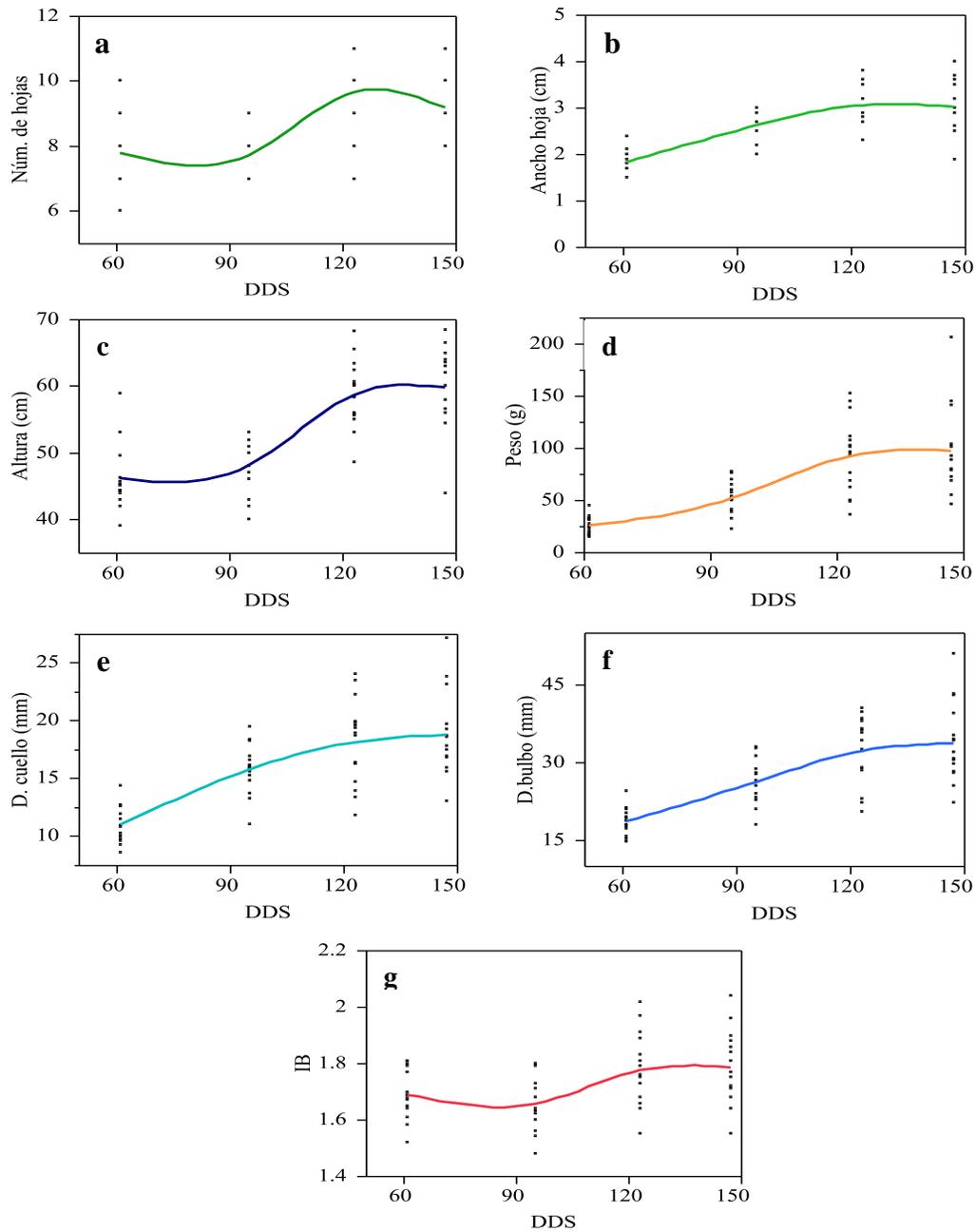
Debido a que las aplicaciones de los tratamientos se realizaron en los meses de marzo y abril, hubo un periodo de 147 días en el que todos los tratamientos eran iguales (libres de aplicación de reguladores) y por tanto se esperaría que el crecimiento de las plantas fuera similar en los tres surcos experimentales. La Tabla 9 muestra la comparación de medias de las variables de crecimiento en los diferentes surcos de siembra y durante los primeros 147 días del cultivo. En esta misma tabla se añaden los datos de crecimiento de plantas de ajo crecidas en el municipio de Cosío con el objeto de comparar los datos de crecimiento de la parcela experimental con los datos de una región con condiciones climáticas adecuadas para el cultivo de esta variedad.

**Tabla 9.** Comparación de medias de variables morfológicas en dos parcelas experimentales y distintas fechas DDS

DDS	Mpio	Rep.	Núm. hojas	Altura (cm)	Ancho hoja (cm)	D. cuello (cm)	D. bulbo (cm)	Peso (g)	IB
61	Tepezalá	1	7.40a	44.06b	1.66a	10.00b	16.74b	19.25b	1.67a
		2	8.20a	51.00a	2.04a	12.15a	20.43a	34.49a	1.68a
		3	7.80a	43.56b	1.82a	10.97ab	18.72ab	24.65ab	1.71a
	Cosío	TA	5.40b	30.72c	1.20b	6.14c	10.35c	7.25c	1.69a
95	Tepezalá	1	8.00a	48.00ab	2.68a	15.88ab	26.23a	50.93ab	1.65a
		2	8.00a	51.20a	2.86a	17.34a	29.28a	64.15a	1.69a
		3	7.2ab	45.40b	2.34a	14.30b	23.51a	41.86b	1.64a
	Cosío	TA	6.4b	35.4c	1.48b	9.75c	16.14b	15.88c	1.66a
123	Tepezalá	1	8.8b	58.56a	3.00a	16.07ab	28.25ab	70.75ab	1.76a
		2	9.6ab	56.52ab	3.06a	17.64a	31.23a	87.71a	1.77a
		3	10.6a	61.28a	2.94a	20.87a	37.42a	119.86a	1.80a
	Cosío	TA	8.00b	48.22b	1.88b	11.76b	20.60b	36.57b	1.76a
147	Tepezalá	1	9.80a	60.90a	3.14a	18.65a	34.08a	99.74a	1.82a
		2	9.00a	61.50a	3.16a	20.14a	35.66a	114.27a	1.77a
		3	8.80a	57.10a	2.80a	17.72a	31.76a	78.80a	1.78a
	Cosío	TA	8.20a	62.46a	2.68a	14.97a	28.80a	71.34a	1.92a

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

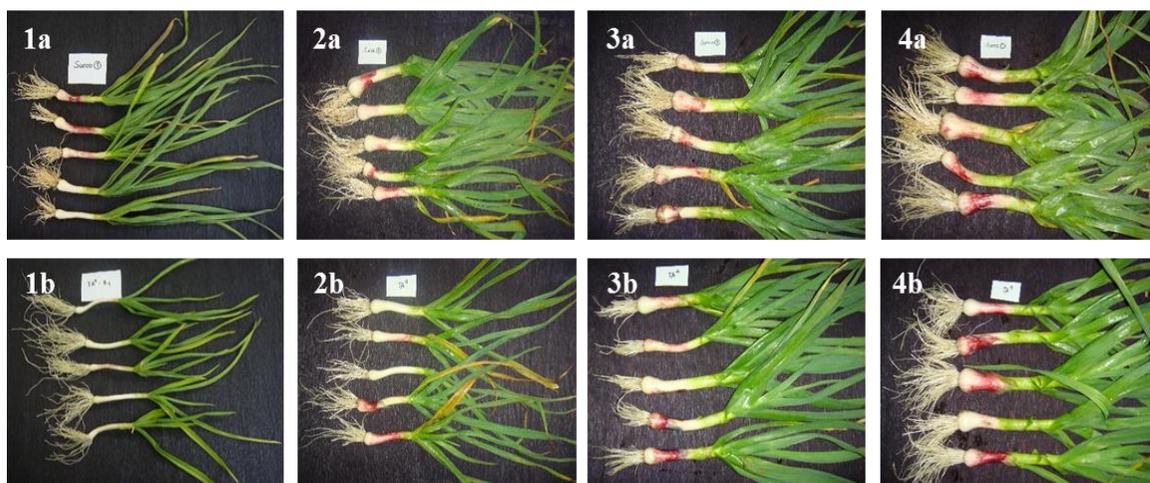
De forma general se observa que después de 123 días de crecimiento de las plantas en la parcela experimental de Tepezalá, Ags, el crecimiento de las plantas en los tres surcos fue similar y por tanto se dedujo que era posible estimar un efecto de las aplicaciones de los reguladores de crecimiento después de los 147 días. No obstante, al comparar, dentro del mismo periodo de tiempo, el crecimiento de esta variedad en el municipio de Cosío se observan diferencias importantes entre ambos sitios. Las variables de crecimiento medidas a las plantas sembradas en Cosío a los 61, 95 y 123 DDS fueron estadísticamente menores respecto de las plantas ubicadas en la parcela experimental de Tepezalá mientras que a los 147 DDS ya no se observaron diferencias en estas mismas variables. La mayor acumulación de horas de frío en la región de Cosío respecto de las acumuladas en Tepezalá, así como un manejo diferente de cultivo pudieron ser la causa de las diferencias observadas en este periodo.



**Figura 33.** Comportamiento de variables morfológicas: número de hojas (a), ancho de hoja (b), altura (c), peso (d), diámetro cuello (e), diámetro bulbo (f) e índice de bulbificación (g)

La Figura 33 muestra mediante un ajuste suavizado ( $\lambda=0.01$ ) el comportamiento de las variables de crecimiento. De manera general se observa una tendencia a incrementar en cada una de las variables analizadas. No obstante, se aprecia que hubo una amplia dispersión de las mediciones siendo más notoria esa dispersión a medida que el cultivo se desarrolló.

La Figura 34 muestra las diferencias de crecimiento entre ambas zonas de cultivo; hasta los 123 DDS, se aprecia que las muestras procedentes de Tepezalá tuvieron una mayor altura, mayor número de hojas y más anchas, y mayores diámetros del cuello y bulbo; así mismo, se aprecia que las plantas de Tepezalá (Figura 32, 1a-4a) mostraron el conjunto de hojas más compacto respecto del mostrado por las plantas de Cosío (Figura 32, 1b-4b). A los 147 DDS las diferencias se hacen menos evidentes aunque el comportamiento de crecimiento de las hojas en la parcela de Tepezalá continua siendo compacto.



**Figura 34.** Muestras de ajo a los 61 DDS (1), 95 DDS (2), 123 DDS (3) y 147 DDS (4) en Tepezalá, Ags., (a) y Cosío, Ags. (b)

De acuerdo con Clark y Heath (1962) la bulbificación inicia cuando el índice de bulbificación es mayor a 2, la Figura 33 en conjunto con la Figura 34 muestran que las plantas en el muestreo realizado a los 147 días después de la siembra aún no ha iniciado dicha proceso ya que la media de las muestras se encuentra en  $1.73 \pm 0.13$ .

#### **6.4 Efecto de las aplicaciones de los reguladores de crecimiento en el desarrollo de las plantas**

La Tabla 10 presenta los valores p del análisis de varianza que muestra la significancia de las aplicaciones de PBZ y MeJA sobre el número de hojas, altura de la planta, ancho de la hoja, diámetro del cuello y del bulbo, peso fresco e índice de bulbificación a los 210 DDS.

**Tabla 10.** Valor p de variables fenológicas con respecto a los factores y su interacción

Factor	Variables						
	Núm. hojas	Altura	Ancho hoja	Diám. cuello	Diám. bulbo	Peso	IB
Trat. (T)	0.6278	<0.0001	0.0393	0.0014	0.2155	0.0943	<0.0001
Surco (S)	0.5605	0.0855	0.0004	0.0039	0.4997	0.0322	0.1352
T*S	0.1833	0.0038	0.9881	0.7039	0.8518	0.5922	0.398

IB: Índice de bulbificación

Los tratamientos tuvieron un efecto significativo en las variables altura de la planta, índice de bulbificación, y diámetro del cuello, y no tuvieron efecto en el número de hojas, diámetro del bulbo y peso de la planta. El factor surco (bloque) tuvo un efecto significativo en la variable ancho de la hoja y diámetro del cuello y no tuvo efecto significativo en las demás variables. Por su parte la interacción tratamiento\*surco sólo fue significativa en la variable altura de planta.

El efecto significativo de los bloques en algunas de las variables analizadas no es esperado en una distribución aleatoria de los tratamientos; puesto que indica que hubo algunos otros factores no controlados en el experimento que afectaron de manera independiente a esos bloques (surcos); dichos factores también pudieron afectar las variables medidas.

La Tabla 11 muestra la comparación de medias para cada uno de los tratamientos en el muestreo 6 (210 días después de la siembra). La aplicación de PBZ tuvo notable efecto en la altura (Figura 35 y 36a), siendo la aplicación doble (marzo+abril) la que generó una disminución de aproximadamente 22% (17.59 cm) en la altura de las plantas respecto a los otros tratamientos. Así mismo, la doble aplicación de PBZ y la aplicación de MeJA en marzo generaron plantas de menor diámetro de cuello, 22.88 y 22.78 cm, respectivamente. A pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas, el tratamiento de con MeJA en marzo mostró un mayor diámetro de bulbo (63.88 cm); por ello en esa fecha de aplicación, al tener menor diámetro de cuello y mayor diámetro de bulbo el índice de bulbificación fue mayor respecto de los demás tratamientos.

**Tabla 11.** Comparación de medias entre tratamientos de diferentes reguladores y fechas de aplicación para las variables de crecimiento después de 210 días de desarrollo del cultivo

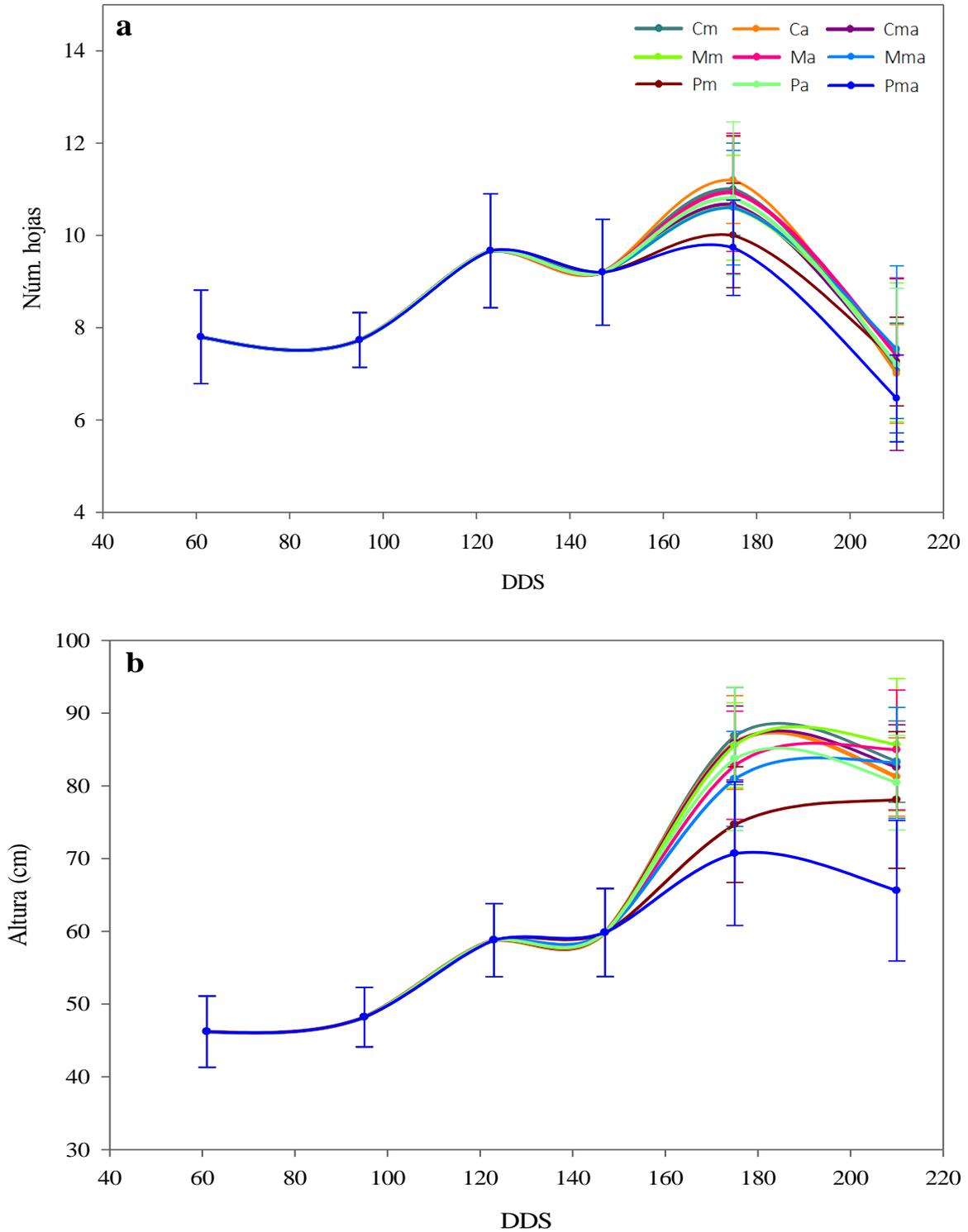
Aplicación	Trat.	Núm. hojas	Altura (cm)	Ancho hoja (cm)	D. cuello (cm)	D. bulbo (cm)	Peso (g)	IB
Marzo	MeJA	7.47a	85.65a	3.67ab	22.78c	63.88a	230.98a	2.93a
	PBZ	7.27a	78.07a	3.96a	28.38a	61.80a	230.98a	2.19cd
	Control	7.07a	83.33a	3.65ab	24.76abc	61.95a	221.58a	2.52abcd
Abril	MeJA	7.4a	84.93a	3.67ab	25.93abc	61.39a	245.80a	2.43abc
	PBZ	7.2a	80.43a	3.66ab	27.9ab	56.51a	221.17a	2.07d
	Control	7.0a	81.27a	3.25b	23.09bc	62.46a	210.56a	2.79ab
Marzo + Abril	MeJA	7.53a	83.16a	3.6ab	23.88abc	56.77a	202.66a	2.44abcd
	PBZ	6.47a	65.57b	3.56ab	22.88c	60.86a	181.01a	2.75abc
	Control	7.2a	82.53a	3.46ab	25.85abc	57.45a	215.60a	2.28bcd

Letras diferentes por columna representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ )  
 IB: Índice de bulbificación.

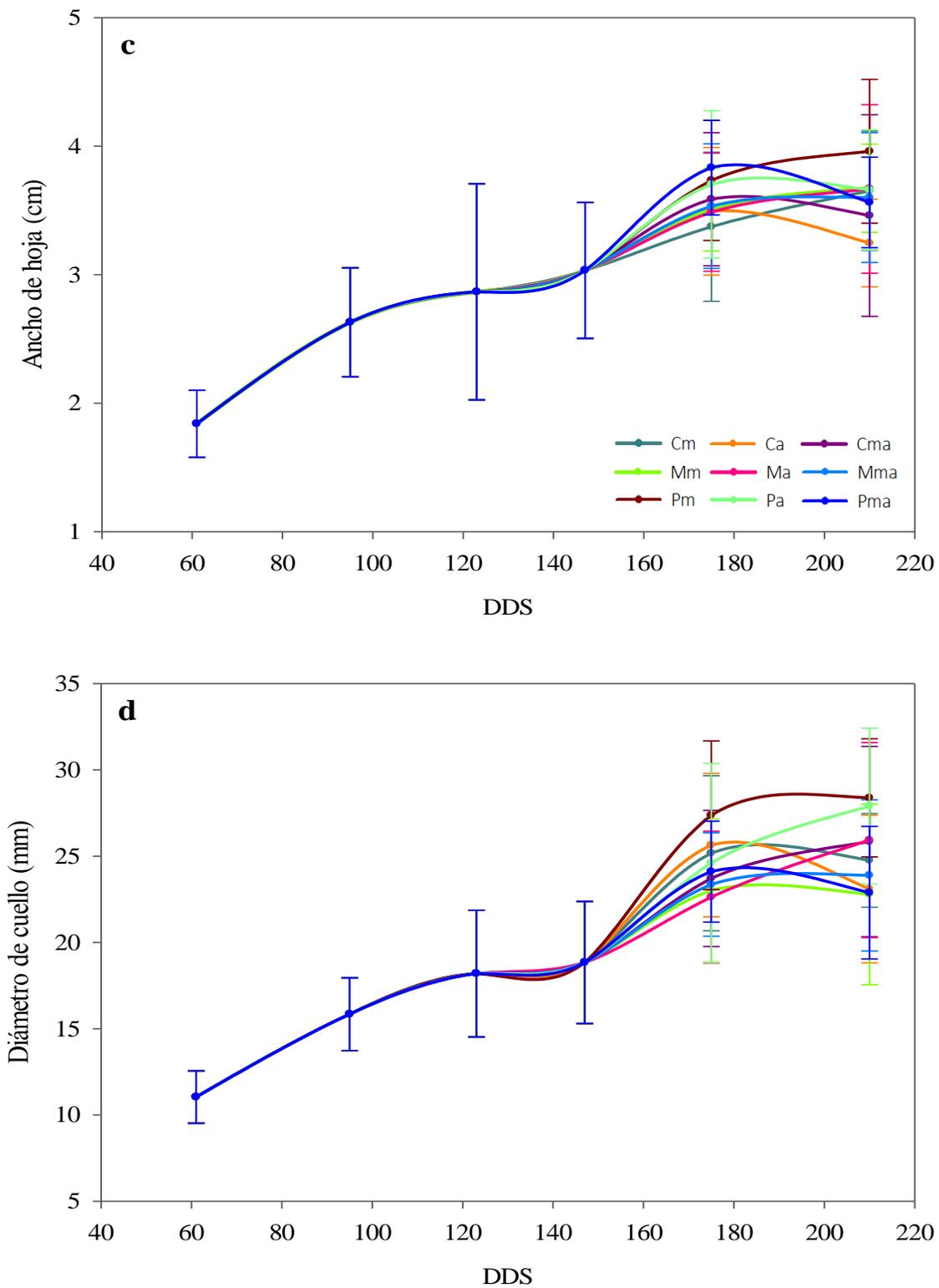


**Figura 35.** Comparación de altura de plantas de ajo entre tratamientos control, MeJA y PBZ después de 210 días de desarrollo (izq.) y plantas en campo tratadas con PBZ (surco izq.)

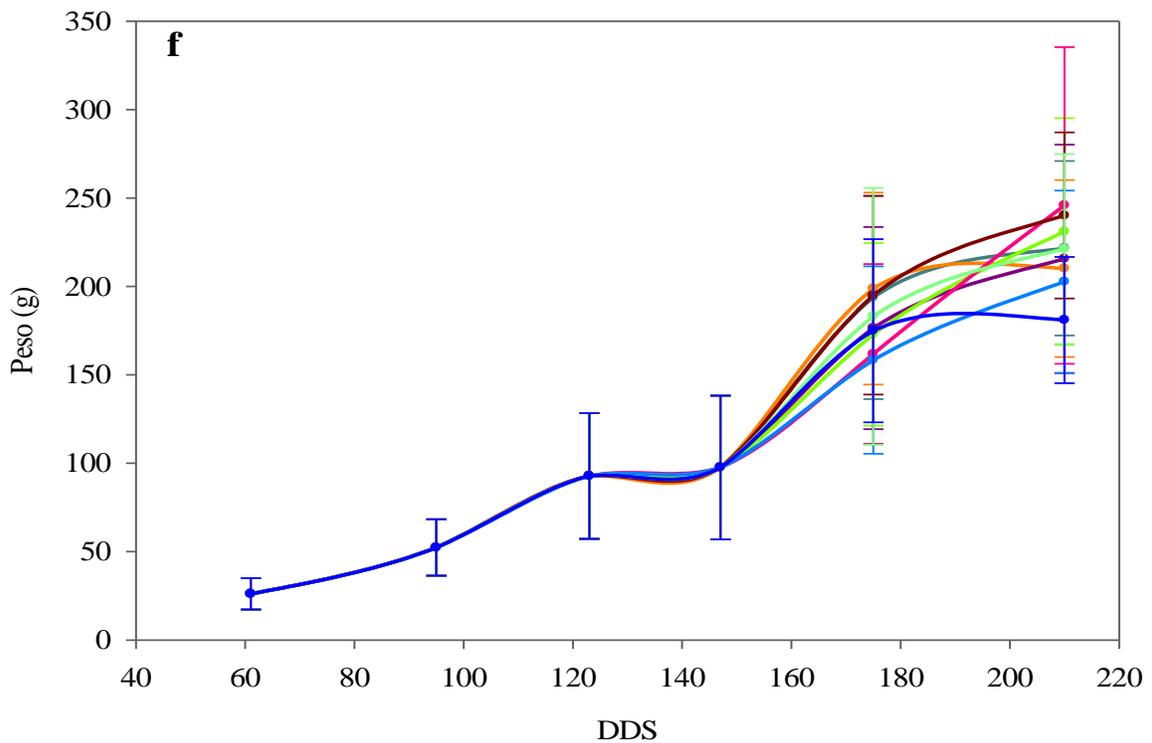
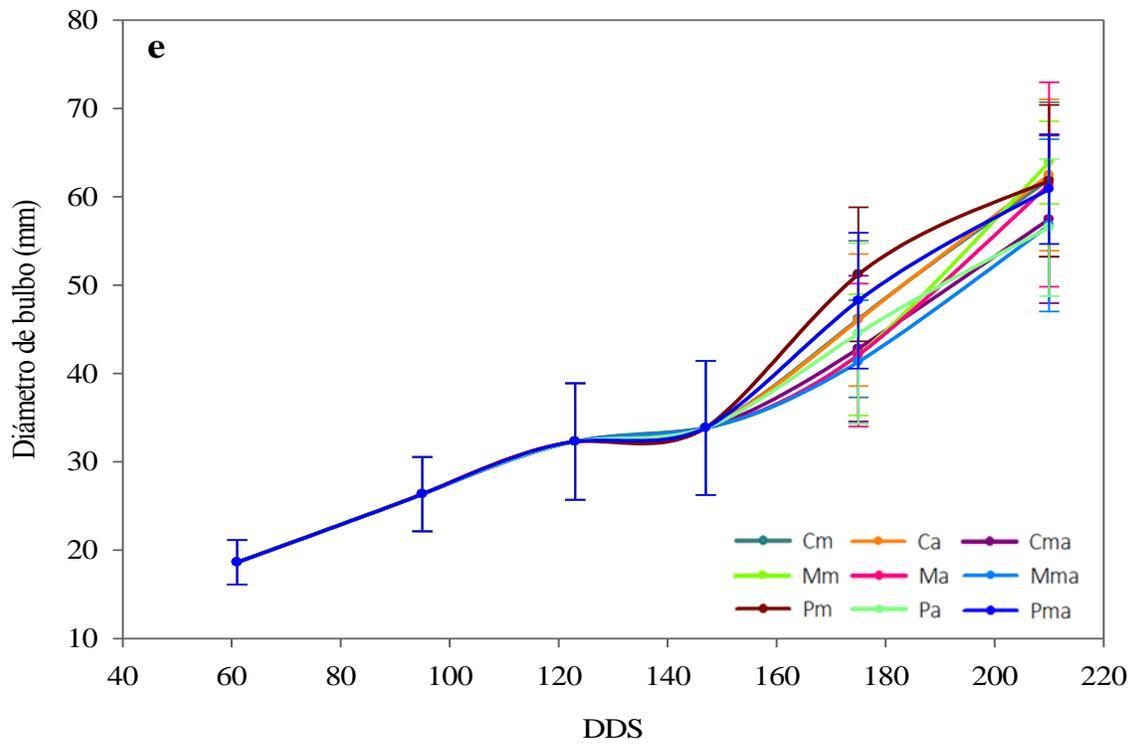
Las Figuras 36, 37, 38 y 39 muestran gráficamente el comportamiento de las diferentes variables de crecimiento de los distintos tratamientos aplicados. Así mismo la Figura 35 muestra fotografías de las plantas a los 210 DDS.



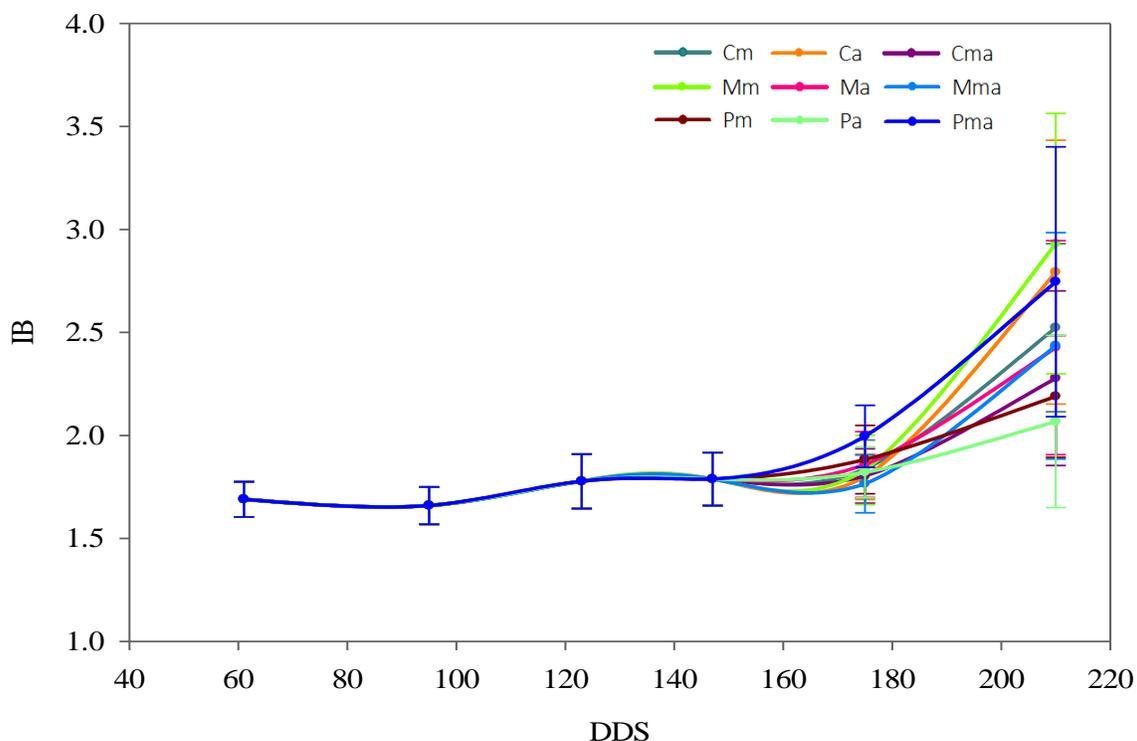
**Figura 36.** Cambios a través del tiempo del número de hojas (a) y altura (b) de plantas de ajo sometidas a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento y plantas control.



**Figura 37.** Cambios a través del tiempo del ancho de hoja (c) y diámetro de cuello (d) de plantas de ajo sometidas a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento y plantas control.



**Figura 38.** Cambios a través del tiempo del diámetro de bulbo (e) y peso (f) de plantas de ajo sometidas a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento y plantas control.



**Figura 39.** Cambios a través del tiempo del índice de bulbificación (IB) de plantas de ajo sometidas a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento y plantas control.

El PBZ es un regulador de crecimiento cuya función es inhibir la biosíntesis de giberelinas (Thomas *et al.*, 2005, George, 2008), lo que provoca una reducción en la elongación celular y en el crecimiento de la planta, por ello el menor crecimiento de la planta en los tratamientos con este compuesto se encuentra dentro de los resultados esperados. El PBZ se usa comúnmente para reducir el tamaño de plantas herbáceas. De igual forma ha demostrado su actividad cuando es aplicado en palmeras y ajo (Ali y Bernick, 2010 y Resende y Souza, 2002).

Rahim y Fordham (1994) en un experimento con ajos cv. ‘Bangladesh Local’ aplicaron PBZ (5 ppm) en solución acuosa a dientes “semilla” por inmersión durante 24 h. El tratamiento resultó efectivo al acelerar el desarrollo de la planta y el rendimiento se vio incrementada. Los autores concluyeron que dicho regulador podría acortar el ciclo de cultivo de ajo y favorecer la maduración de bulbo. Cabe resaltar que el número de hojas que tuvieron los ajos sometidos al tratamiento fue en promedio de cinco, mientras que en la presente investigación se obtuvieron ajos con 7 a 8 hojas, lo cual evidencia un posible

problema con el régimen de fertilización que como consecuencia inhibió el efecto del PBZ y sus efectos no pudieron ser claramente observados como en el trabajo anterior.

Los resultados obtenidos en éste trabajo contrastan con los obtenidos por Galaz-Pérez (2008) quién aplicó PBZ (1000 ppm) por inmersión de los dientes “semilla” que habían sido almacenados a temperatura ambiente y a 5°C utilizando dos fechas diferentes de siembra. En ningún tratamiento se observaron efectos sobre las variables morfológicas de estudio del ajo. No obstante, parece probable que el diferente método de aplicación utilizado en ambos trabajos sea la explicación a estas diferencias.

Por su parte, López-Hernández (2010) forma realizó una aplicación de PBZ (1000 ppm) por inmersión de los dientes “semilla” viéndose afectado solamente el diámetro de cuello en el día 157 después de la siembra el cual mostró un incremento de 3 cm con respecto al tratamiento control.

Los resultados obtenidos en los tratamientos de MeJA en este trabajo (Figura 38) coinciden con los reportados anteriormente por Ravnkar *et al.* (1994), Koda (1997) y Kim *et al.*, (2003) quienes vieron que la aplicación exógena de MeJA/JA indujo la formación del bulbo (órgano de reserva) en ajo en ensayos *in vitro*.

Utrilla-Vázquez (2008) también evaluó la aplicación de MeJA (por aspersión foliar) en la calidad de bulbos de ajo cv. ‘Retinto’, probó tres diferentes concentraciones (0, 250 y 1000 ppm) aplicados foliarmente a 30 y 60 días antes de la diferenciación del bulbo. No obstante, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Esta autora explicó que posiblemente el modo de aplicación del compuesto además de un exceso de fertilización nitrogenada pudieron ser las causas por las cuales no encontraron diferencias entre los tratamientos, y supone que un exceso de nitrógeno pudo haber alterado la respuesta del cultivo a los tratamientos aplicados.

La Figura 40 muestra el aspecto visual de las plantas tratadas con MeJA en marzo y cosechadas a los 210 DDS. Se puede observar una buena formación de bulbos (IB = 2.93). No obstante, el desarrollo de las hojas se ve muy compacto y en una planta se observa un diámetro de cuello mayor.



**Figura 40.** Plantas de ajo tratadas con MeJA en marzo y cosechadas a los 210 DDS

A efecto de comparar el crecimiento de las plantas de ajo cultivadas en Cosío, Ags. con las cultivadas en Tepezalá, se registran los datos de crecimiento a los 175 y 210 DDS (Tabla 12). Los datos de las medias observadas de las variables consideradas a los 175 DDS son muy parecidos a los valores registrados a los 210 DDS en Tepezalá; lo que muestra que en ésta localidad el crecimiento fue más pronunciado respecto a Cosío. A los 210 DDS los valores de altura de la planta y diámetro del cuello son mayores en Tepezalá (Tabla 11) que los mostrados por las plantas cultivadas en Cosío donde se registraron alturas más bajas y diámetros de cuello menores. Lo anterior, asociado con un diámetro de bulbo similar en ambas regiones, genera un índice de bulbificación mayor en la parcela de Cosío indicando una mejor bulbificación de las plantas en esa región ( $IB = 3.7$ ). Por otro lado, los datos de mayor diámetro del cuello de las plantas de Tepezalá parecen mostrar que el crecimiento continuaba y no se había iniciado el proceso de senescencia de las plantas que las llevará con una calidad adecuada a la cosecha.

**Tabla 12.** Variables de crecimiento en función de los DDS de plantas de ajo ‘Coreano’ cultivadas en Cosío, Ags.

DDS	Núm. hojas	Altura (cm)	Ancho hoja (cm)	D. cuello (cm)	D. bulbo (cm)	Peso (g)	IB
175	10.91a	78.04a	3.42a	22.48a	43.51b	152.39a	1.92b
210	7.58b	71.37b	3.09b	17.70b	64.44a	168.48a	3.74a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas en ambas fechas de muestreo por prueba t de Student ( $\alpha=0.05$ ). DDS: días después de la siembra IB: índice de bulbificación

### 6.5 Rendimiento y calidad de la cosecha de los bulbos

En las operaciones comerciales de ajo son muy importantes los factores de calidad de los bulbos que incluyen el calibre, peso, firmeza, ausencia de defectos (bulbos acebollados, rebrotados, con daños mecánicos y bulbos incompletos) y el rendimiento por hectárea. Todos estos parámetros permiten evaluar desde un punto de vista económico/productivo el efecto sobre la productividad de nuevas tecnologías aplicadas al cultivo y su rentabilidad.

El cálculo de los rendimientos se basó en las siguientes consideraciones; en cada surco de plantas estas se encontraban a doble hilera y la separación entre surcos era de 0.85 m por lo que una hectárea contaba con 117.6 surcos de 100 m de largo, cada planta fue sembrada a una distancia de 7 cm una de otra. Para cada tratamiento y repetición se estableció un tramo de 3 m de largo del surco de los que no se tomó ninguna planta durante los muestreos del ciclo de cultivo. Al final del ciclo, el total de plantas de esa sección del surco fue llevado a la sombra hasta el término del proceso de curado (dos semanas). Después de este tiempo a todos los bulbos se les separó las hojas secas y se procedió a contar y pesar el total de bulbos y posteriormente estos fueron clasificados por tamaño y por defectos de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología. Una vez clasificados por calibre o por defectos, los bulbos fueron contados y pesados nuevamente. Los datos así obtenidos se extrapolaron desde 3 metros a una hectárea.

Los tamaños de los bulbos se establecen por calibres siendo los bulbos más pequeños los calibres menores que 6 (<4.0 cm de diámetro) y los más grandes los calibres mayores que 12 (>8.0 cm de diámetro).

En la Tabla 13 se resumen las medias y su comparación estadística del rendimiento total, de los cuales se identificaron los bulbos acebollados y bulbos con defectos. De manera general se observó un rendimiento total bajo (8.30 a 13.16 ton/ha) y una alta producción de bulbos acebollados y con defectos; los cuales representaron una proporción de alrededor del 40 a 60% de la producción. Este porcentaje es muy alto para una producción comercial. La gran incidencia de bulbos acebollados y con defectos y el no registrar diferencias significativas entre los tratamientos parece sugerir que tanto el clima como otros factores del cultivo no permitieron detectar efectos favorables en los rendimientos entre los tratamientos.

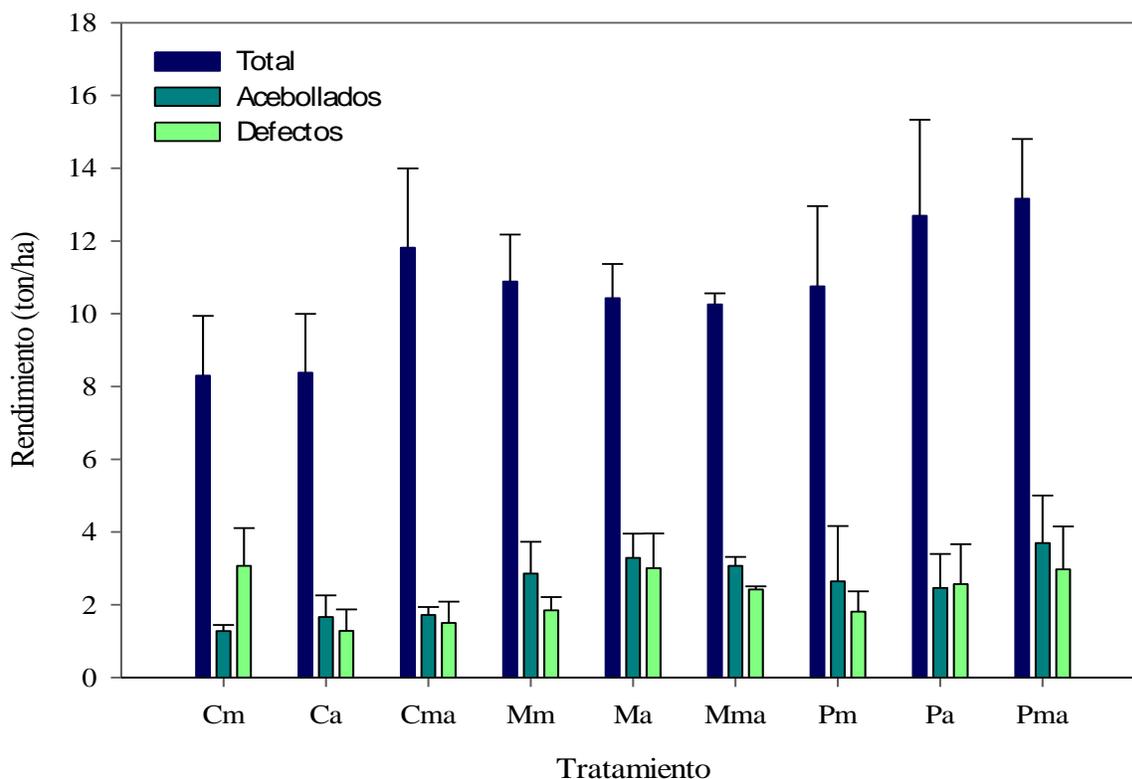
**Tabla 13.** Rendimientos por hectárea de la producción total, de bulbos acebollados y bulbos con defectos (Tepezalá, Ags.)

Tratamiento	Rendimiento (ton/ha)		
	Total	Acebollados	Defectos
Cm	8.30a	1.28a	3.07a
Ca	8.38a	1.66a	1.28a
Cma	11.82a	1.72a	1.50a
Mm	10.89a	2.86a	1.84a
Ma	10.43a	3.29a	3.01a
Mma	10.25a	3.07a	2.42a
Pm	10.75a	2.64a	1.81a
Pa	12.69a	2.46a	2.57a
Pma	13.16a	3.69a	2.98a

Letras diferentes por columna representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ )  
 C: Control M: MeJA P: PBZ m: marzo a: abril

De manera conjunta en la Tabla 13 y la Figura 41 se observa un fenómeno opuesto al esperado con la aplicación de los reguladores. Con el soporte científico reportado previamente por diversos investigadores se esperaba que estos reguladores indujeran una bulbificación adecuada, una disminución en la producción de bulbos acebollados y un incremento en la producción total. Los tratamientos control en las aplicaciones de marzo y abril (Cm y Ca, respectivamente) muestran las producciones totales más bajas (8.30 y 8.38 ton/ha, respectivamente), mientras que Ca y Cma (Control de abril y marzo+abril) presentan producciones más bajas en bulbos acebollados (1.66 y 1.72 ton/ha, respectivamente) y bulbos con defectos (1.28 y 1.50 ton/ha, respectivamente). Las

aplicaciones de PBZ en abril y en marzo-abril (Pa y Pma) mostraron valores mayores de producción total (12.69 y 13.16 ton/ha, respectivamente); aunque también la aplicación doble de los reguladores tendió a manifestar una mayor incidencia de bulbos acebollados (2.45 a 3.69 ton/ha).



**Figura 41.** Comparación de rendimiento total con la de bulbos acebollados y con defectos

Del volumen total obtenido (bulbos con calidad comercial, bulbos acebollados y con defectos) se eliminaron los bulbos acebollados y con defectos y el resto de la producción fue clasificada por calibres usando el patrón de calibres utilizado por la Asociación de Productores y Exportadores de Ajo. La Tabla 14 resume los valores promedio de los distintos calibres de bulbos encontrados en la cosecha de todos los tratamientos.

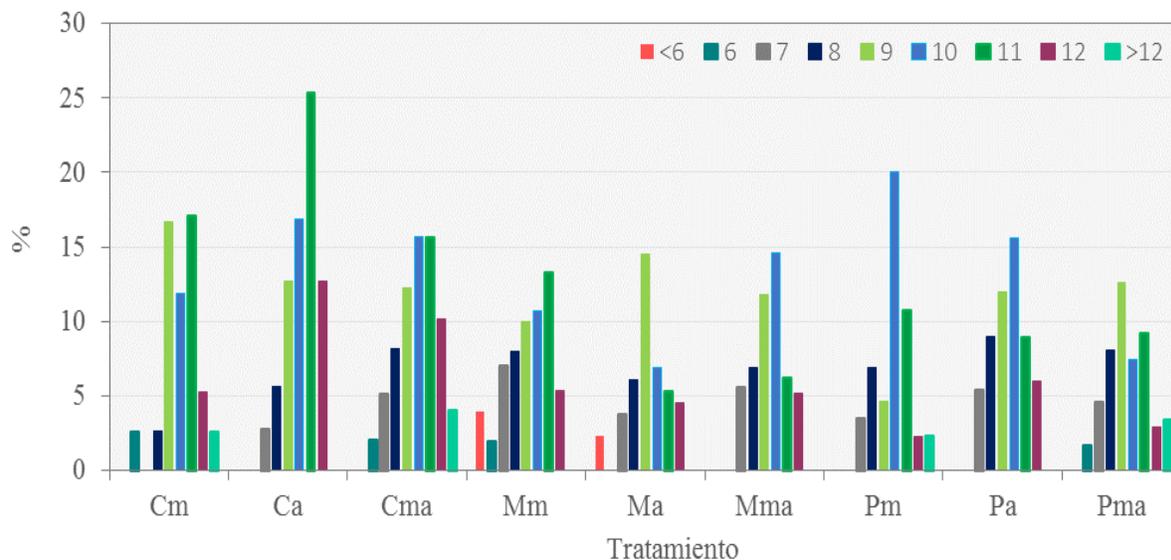
**Tabla 14.** Clasificación de bulbos desarrollados por calibres

Trat.	Rendimiento por calibres (ton/ha)								
	<6	6	7	8	9	10	11	12	>12
Cm	-	0.04a	-	0.06a	1.43a	0.75a	1.26a	0.27ab	0.14a
Ca	-	-	0.08a	0.18a	0.92a	1.44a	1.36a	1.48ab	-
Cma	-	0.03a	0.20a	0.68a	1.29a	2.00a	2.33a	1.80a	0.26a
Mm	0.04a	0.03a	0.27a	0.66a	1.07a	1.31a	1.88a	0.93ab	-
Ma	0.04a	-	0.25a	0.44a	1.24a	0.78a	0.70a	0.69ab	-
Mma	-	-	0.37a	0.55a	1.17a	1.18a	0.95a	0.56ab	-
Pm	-	-	0.14a	0.13a	2.02a	2.27a	1.37a	0.23b	0.13a
Pa	-	-	0.35a	0.80a	1.42a	2.24a	1.51a	1.34ab	-
Pma	-	0.05a	0.36a	0.81a	1.67a	1.14a	1.60a	0.59ab	0.26a

Letras diferentes por columna representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ )  
 C: Control M: MeJA P: PBZ m: marzo a: abril

Aunque debido a la dispersión de datos, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, parece haber una tendencia en los tratamientos con PBZ (Pm, Pa y Pma) que muestra mayor proporción de bulbos con calibres 8, 9, 10 y 11 los cuales son más comerciales.

La Figura 42 muestra los porcentajes de calibres obtenidos en cada tratamiento. Los calibres dominantes fueron 9, 10 y 11. En el tratamiento control del mes de abril (Ca) se obtuvo el mayor porcentaje de bulbos de calibre 9 (25.35%). Los tratamientos control (Cm, Ca y Cma) muestran una distribución similar, porcentajes mayores de calibres 9, 10, 11 y 12, en este último calibre Cm fue la excepción cuyo porcentaje fue relativamente bajo (5.26%). Por su parte, los tratamientos de MeJA muestran un comportamiento ligeramente variado; siendo la aplicación de MeJA en marzo y abril (Mm y Ma) los únicos tratamientos que presentaron bulbos de calibres menores que 6; los calibres mayoritarios en los tratamientos de MeJA fueron 9 y 10. Los tres tratamientos de PBZ, al igual que los de MeJA, presentan un comportamiento variado; observándose que los bulbos de calibre 10 tuvieron un mayor porcentaje (16 a 20%). Los tratamientos con PBZ en los meses de marzo y marzo+abril presentaron 2.31 y 3.45 % respectivamente, de bulbos de calibre mayores a 12.



**Figura 42.** Distribución porcentual de calibres por tratamiento

Los rendimientos obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados por Resende y Souza (2002) quienes encontraron que aplicaciones de 775 a 778 ppm en ajo cv. ‘Quitéria’ obtuvieron un rendimiento 6.5 ton/ha y cuando aplicaron 1000 ppm el rendimiento fue de 5 ton/ha. Los rendimientos comerciales promedio observados en Tepezalá se ubican en 12 ton/ha SIAP (2011), los resultados de los grupos control se ubicaron por debajo de estos valores (8.30 a 11.82 ton/ha) lo cual parece indicar un manejo inadecuado del lote experimental. La alta incidencia de bulbos con defectos (rebrotos), así como mayores diámetros de cuellos (descritos en la sección de crecimiento) parece indicar que hubo un excedente de nitrógeno durante la fertilización en la parcela experimental. Utrilla-Vázquez, (2008) y López-Hernández, (2010) reportaron rendimientos de 15 a 20 ton/ha para la variedad ‘Coreano’ con producciones de defectos mucho menores lo cual nuevamente señala que hubo un factor adicional al clima que indujo los bajos rendimientos alcanzados.

Es importante señalar que el lote experimental quedó ubicada en medio de plantaciones de ajo ‘Perla’ cuyo requerimiento de nitrógeno es mayor que la variedad ‘Coerano’. Ambos lotes fueron irrigados con el mismo sistema de bombeo; aunque se instalaron válvulas manuales en las cintillas de riego por goteo para controlar el flujo de agua y fertilizante a la parcela experimental; no obstante, es posible que hubiese habido

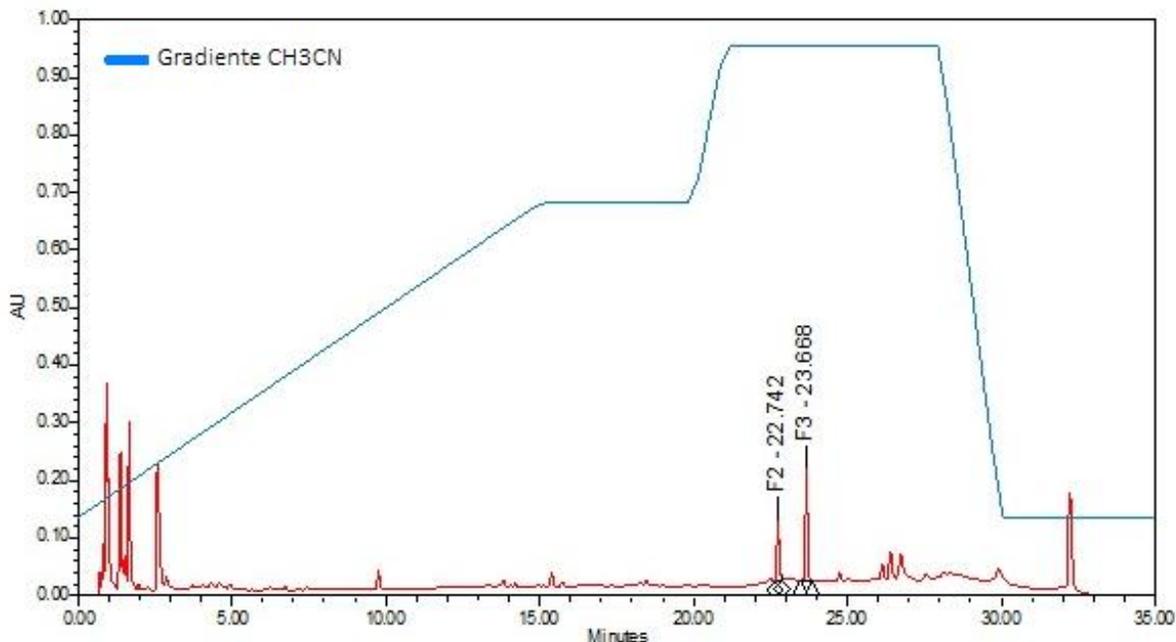
algún efecto de sobre fertilización a través del suelo aledaño cultivado con la variedad ‘Perla’ y por ello se indujeran los resultados obtenidos.

En apoyo a estas observaciones, Kakar *et al.* (2002) en un estudio para evaluar el efecto de las dosis de nitrógeno en el crecimiento y cultivo de ajo, reportaron que excesos de nitrógeno (240 kg/ha) disminuye los rendimientos del cultivo e incrementan los defectos, aunque en las primeras etapas de desarrollo, los bulbos presentan tamaños mayores y las plantas son más altas, y que con el transcurso del ciclo de cultivo los bulbos se vieron deformados y se favoreció la incidencia de rebrotes. Estas observaciones parecen explicar los resultados encontrados.

## **6.6 Análisis de giberelinas (GAs)**

La Figura 43 muestra un cromatograma típico de un extracto de giberelinas de una muestra de ajo Vázquez-Barrios (2005). El cual muestra coincidencia con los reportados por López-Echeverría (2004), Meza-Hernández (2005), y Utrilla-Vázquez (2008), en extractos metanólicos de brotes de ajo cv. ‘Taiwan’, ‘Chino’ y ‘Perla’. Mediante comparaciones de los espectros de absorción de los picos de las muestras contra el espectro del estándar de GA<sub>3</sub> se observó que solamente dos picos máximos (fracciones) mostraron un espectro similar al del estándar, denominados F2 y F3 cuyos tiempos de elución fueron 22.7 min y 23.6, respectivamente. En éste trabajo con ajo cv ‘Coreano’ se obtuvo un cromatograma similar lo que indica que dichas fracciones están presentes en los bulbos.

A diferencia de los autores anteriores, quienes no detectaron GA<sub>3</sub> o algún otro tipo de GAs biológicamente activas, Argüello *et al.* (2001) en un estudio explican el comportamiento de GA<sub>3</sub> encontrado en bulbillos obtenidos por cultivo *in vitro* de meristemas de ajo; y Guo *et al.*, (2012) explicaron el cambio de concentración de GA<sub>3</sub> encontrado en la hojas de ajo cv. ‘Zhengyuezaos’, cultivar que puede producir inflorescencia.



**Figura 43.** Cromatograma típico de extracto metanólico de GAs de bulbo de ajo cv. ‘Coreano’

### 6.6.1 Comprobación de la actividad giberélica de las fracciones F2 y F3

Se realizó un bioensayo con granos de cebada desembrionados para determinar si las fracciones F2 y F3 tenían actividad de giberelinas. Este bioensayo se basa en que las GAs liberadas por el embrión del grano de cebada cuando se induce la germinación, viajan a la aleurona e induce la síntesis de  $\alpha$ -amilasas. Estas enzimas llegan al endospermo e hidrolizan al almidón generando moléculas de maltosa. Este mismo efecto se genera si los granos son desembrionados y se ponen en contacto con un extracto que presumiblemente tenga giberelinas. Muestras por triplicado de las fracciones F2 y F3, separadas previamente por el equipo HPLC, fueron comparados contra un control positivo de  $GA_3$  (1 mg/mL) y uno negativo ( $H_2O$ ). Los resultados de la maltosa liberada se muestran en la Tabla 15. Los datos señalan claramente que las fracciones separadas de los extractos de ajo son compuestos similares a las giberelinas aunque su estructura no sea igual a los estándares. El nivel mínimo del producto de la hidrólisis de almidón (maltosa) detectado fue del control negativo (0.53 mg maltosa/g de cebada). Utrilla-Vázquez (2008) señaló que la fracción F2 parece estar más relacionada con los cambios en el desarrollo de la planta similar a la actividad medida en este ensayo pareciera tener el mismo efecto.

**Tabla 15.** Producción de maltosa por la acción de las fracciones F2 y F3 y de los controles en granos de cebada desembrionada

Muestra	mg maltosa/g cebada
F2	5.30b
F3	5.90a
Control positivo (GA <sub>3</sub> )	6.04a
Control negativo (H <sub>2</sub> O)	0.53c

Letras diferentes por columna representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

Los granos de cereal germinan tan solo con entrar en contacto con agua ya que liberan fitohormonas que son capaces de digerir la proteína y el almidón almacenado en el endospermo (Thomas *et al.*, 2005), esto explica por qué en el control negativo (agua) se encontró baja concentración de. Sin embargo, la concentración obtenida fue por lo menos 10 veces menor con respecto a las fracciones de interés F2 y F3.

Se desconoce la naturaleza de dichos compuestos con actividad de giberelina, ya que no existen reportes al respecto. De las 136 diferentes GAs identificadas a la fecha, sólo unas cuantas son biológicamente activas (Thomas *et al.*, 2005), por lo cual es importante realizar más estudios para dilucidar su estructura, actividad e importancia en el desarrollo del ajo.

### 6.6.2 Cambios en el contenido de GAs durante el desarrollo de la planta

La Tabla 16 muestra los cambios en los contenidos de las fracciones F2 y F3 durante los primeros 147 días de desarrollo, cuando aún no se habían aplicado los reguladores de crecimiento.

**Tabla 16.** Contenido de F2 y F3 en muestras de ajo cv. ‘Coreano’ durante las primeras etapas de desarrollo

Fracciones (mg eq. GA <sub>3</sub> /100 g m. s)	DDS			
	61	95	123	147
F2	6.21b	9.18a	2.47c	4.19bc
F3	11.63b	17.29a	9.84b	8.12b

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa por prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ )

Los datos anteriores muestran un incremento de las dos fracciones en el muestreo de 95 DDS y un posterior decremento hasta el día 147. Este comportamiento coincide de

forma general con lo reportado por Utrilla-Vázquez (2008); no obstante, esta autora describe tal decremento a partir de los 175 días de desarrollo mientras que en este estudio se observa después de los 95 días. En la Tabla 17 se concentran los datos de los contenidos de las dos fracciones de giberelinas después de haberse aplicado los reguladores de crecimiento.

**Tabla 17.** Contenido de las fracciones de F2 y F3 con actividad de giberelinas en los bulbos de ajo después de la aplicación de los reguladores de crecimiento

Fracciones (mg eq. GA <sub>3</sub> /100 g m.s)	Trat.	DDS		
		175	210	252
F2	Cm	1.87a	4.60bcd	6.56a
	Ca	1.00ab	5.53ab	7.61a
	Cma	2.03a	5.37abc	8.93a
	Mm	1.07ab	2.83d	6.60a
	Ma	1.75a	4.71abcd	5.23a
	Mma	1.65a	3.38cd	5.03a
	Pm	1.09ab	6.70a	5.67a
	Pa	1.69a	5.77ab	5.24a
	Pma	0.32b	4.70abcd	5.84a
F3	Cm	4.94a	18.34bcd	22.50ab
	Ca	3.42abc	23.43ab	23.11ab
	Cma	4.37ab	22.22abc	30.44a
	Mm	2.71bcd	9.87e	20.22ab
	Ma	4.18ab	16.56cd	17.32ab
	Mma	3.70abc	12.05de	17.28ab
	Pm	1.89cd	25.44a	18.90ab
	Pa	3.50abc	20.10abc	17.29ab
	Pma	0.89d	19.66abc	15.10b

Letras diferentes por columna representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ )  
 C: Control P: PBZ M: MeJA m: marzo a: abril

En todos los tratamientos la concentración de F3 fue mayor que F2. También se observa que el tratamiento de PBZ aplicado en marzo y en marzo+abril propiciaron un menor contenido de giberelinas en el día 252 después del curado. Los demás tratamientos indujeron un mayor contenido de ambas fracciones incluso en los tratamientos control. El PBZ es un inhibidor de la biosíntesis de giberelinas, por ello es lógico esperar una disminución en los contenidos de estas fracciones con actividad de giberelinas. Sin embargo, se observó una reactivación del crecimiento (por efecto del incremento de las

GAs) que generó una mayor proporción de bulbos con rebrotes. La explicación propuesta anteriormente respecto a que la diferencia de clima podría ser la causante de este cambio en la fisiología de la planta parece no ser suficiente. Sugiriendo que la cercanía del cultivo de ajos ‘Perla’ que tiene un mayor requerimiento de unidades de nitrógeno, afectó el experimento al transferirse el fertilizante a través del suelo hasta las raíces de la variedad ‘Coreano’ induciendo la rebrotación de plantas, un mayor crecimiento de los cuellos de las plantas y por tanto índices de bulbificación menores.

El efecto de mayores aplicaciones de nitrógeno sobre un mayor contenido de giberelinas parece soportarse por los trabajos de Jang *et al.* (2008) quienes evaluaron los cambios en el contenido de GAs y JA en tres diferentes cultivares de arroz como respuesta a la aplicación de dosis elevadas de N en la fertilización. Los autores observaron un incremento en el contenido de GAs endógenas analizadas respecto del grupo control; en el en el cual midieron una concentración de GA<sub>12</sub> de 1.5 ng/g materia seca y este contenido se incrementó 3.6 veces con una aplicación de 36.8 kg/ha de N y hasta 6.1 veces con aplicaciones de 73.6 kg N/ha. En GA<sub>1</sub> la concentración reportada en el tratamiento control fue de 0.8 ng/g materia seca, y se incrementó 2.4 y 4.4 veces para las dos distintas aplicaciones de N. Las otras GAs analizadas (GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub> y GA<sub>53</sub>) mostraron incrementos similares. Con respecto al contenido de JA endógeno el experimento mostró que elevados niveles de N tiene un efecto negativo ya que la concentración se vio disminuida.

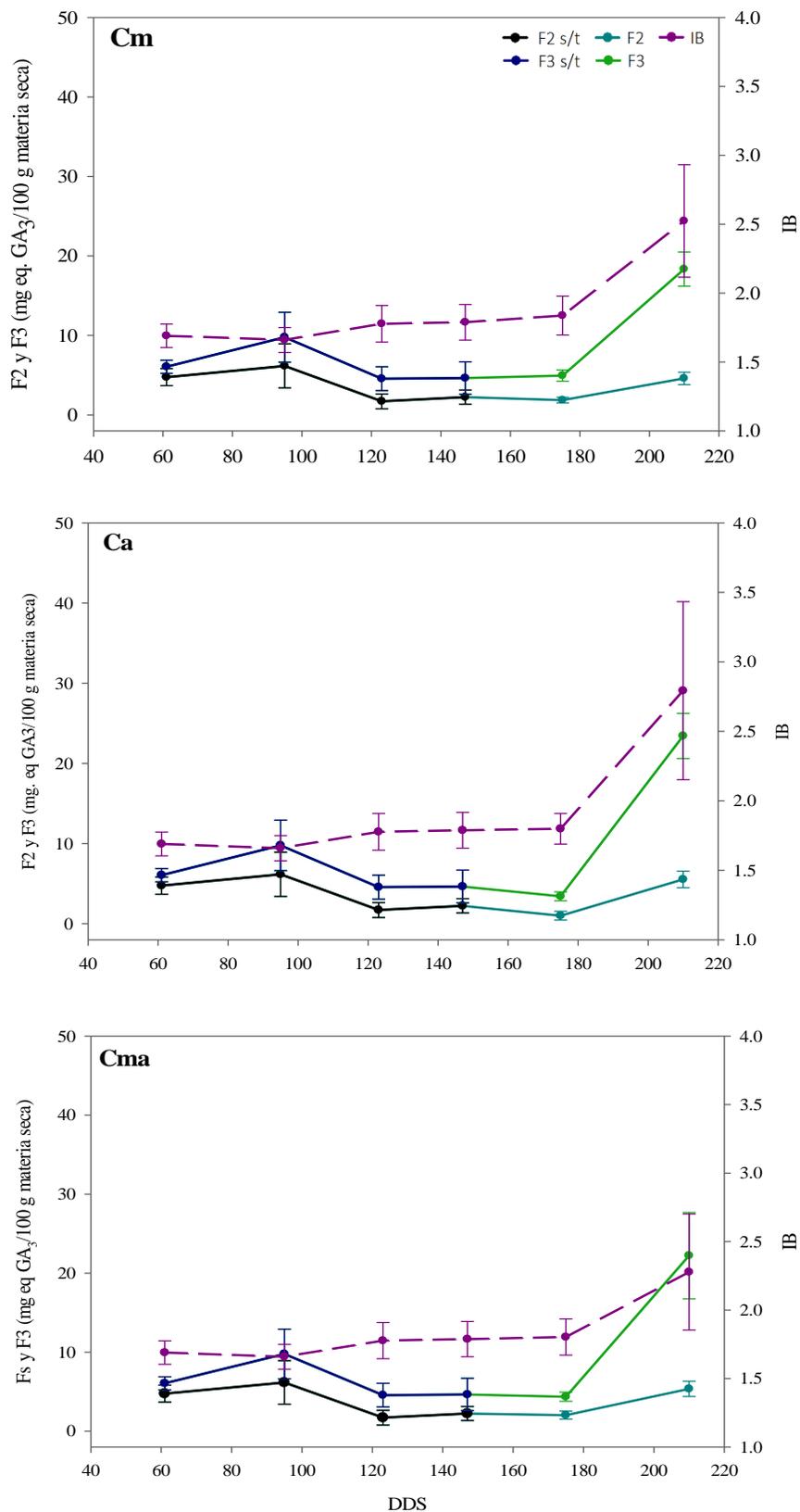
Le Guen-Le Saos *et al.* (2002) explican en un modelo *in vitro* de chalote que cuando un inhibidor de la biosíntesis de GAs es aplicado en combinación con GA<sub>3</sub> el efecto del compuesto anti-giberélico se ve inhibido por acción de las GAs aplicadas de manera exógena. Aunado a esto los resultados reportados por Jang *et al.* (2008) evidencian que un dosis mayor a la requerida de N incrementa la concentración de GAs; por tanto a través de ambos trabajos se puede sugerir que el exceso de nitrógeno incrementó el contenido de GAs en los ajos y dicho aumento de GAs inhibió el efecto del PBZ así como del MeJA.

Al observar los datos del día 147 y compararlos con los del día 175, se aprecia que la disminución en el contenido de ambas fracciones se continua hasta ese día; no obstante, después los contenidos de estas fracciones vuelven a incrementarse hasta el día de la

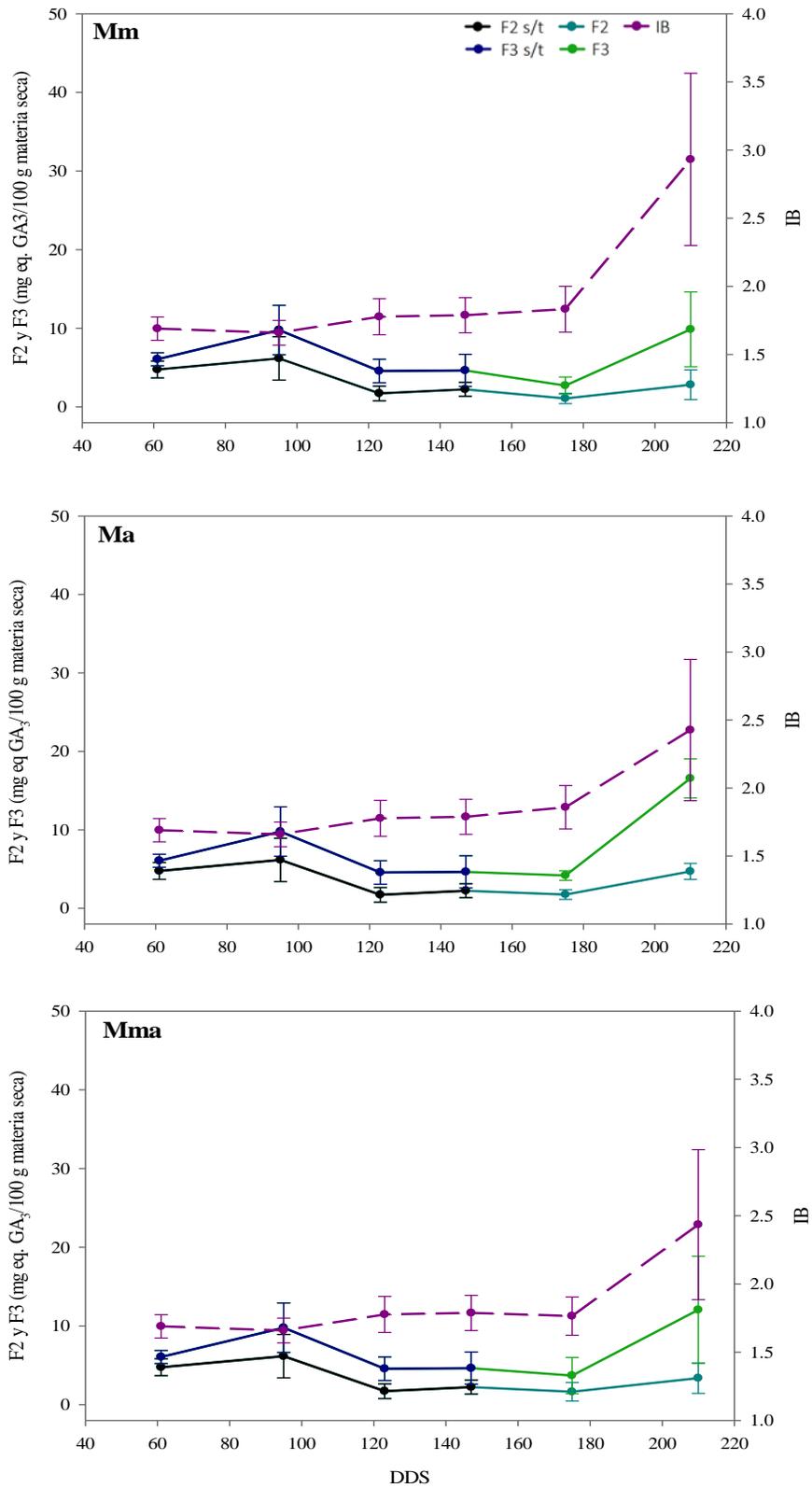
cosecha en la que alcanzan valores máximos. Este aspecto llama la atención puesto que de acuerdo a la biología del desarrollo de esta planta, la actividad de crecimiento debe ser mínimo al momento de la cosecha y según Utrilla-Vázquez (2008) el contenido de giberelinas es mínimo cuando se inició el proceso de bulbificación. Para correlacionar ambos procesos, las Figuras 44, 45 y 46 muestran los cambios de estas fracciones en conjunto con los cambios del índice de bulbificación.

En las figuras siguientes se observa que en los tratamientos control (Cm, Ca y Cma) el índice de bulbificación no incrementó de forma súbita mientras que el contenidos de las fracciones F2 y F3 se incrementa de manera pronunciada; por su parte en el tratamiento de PBZ en marzo+abril (Pma) se puede observar un mejor desarrollo de las plantas determinado por el índice de bulbificación asociado con menores contenidos de las fracciones F2 y F3. Aunque también se observó un incremento de estas al final del ciclo de cultivo.

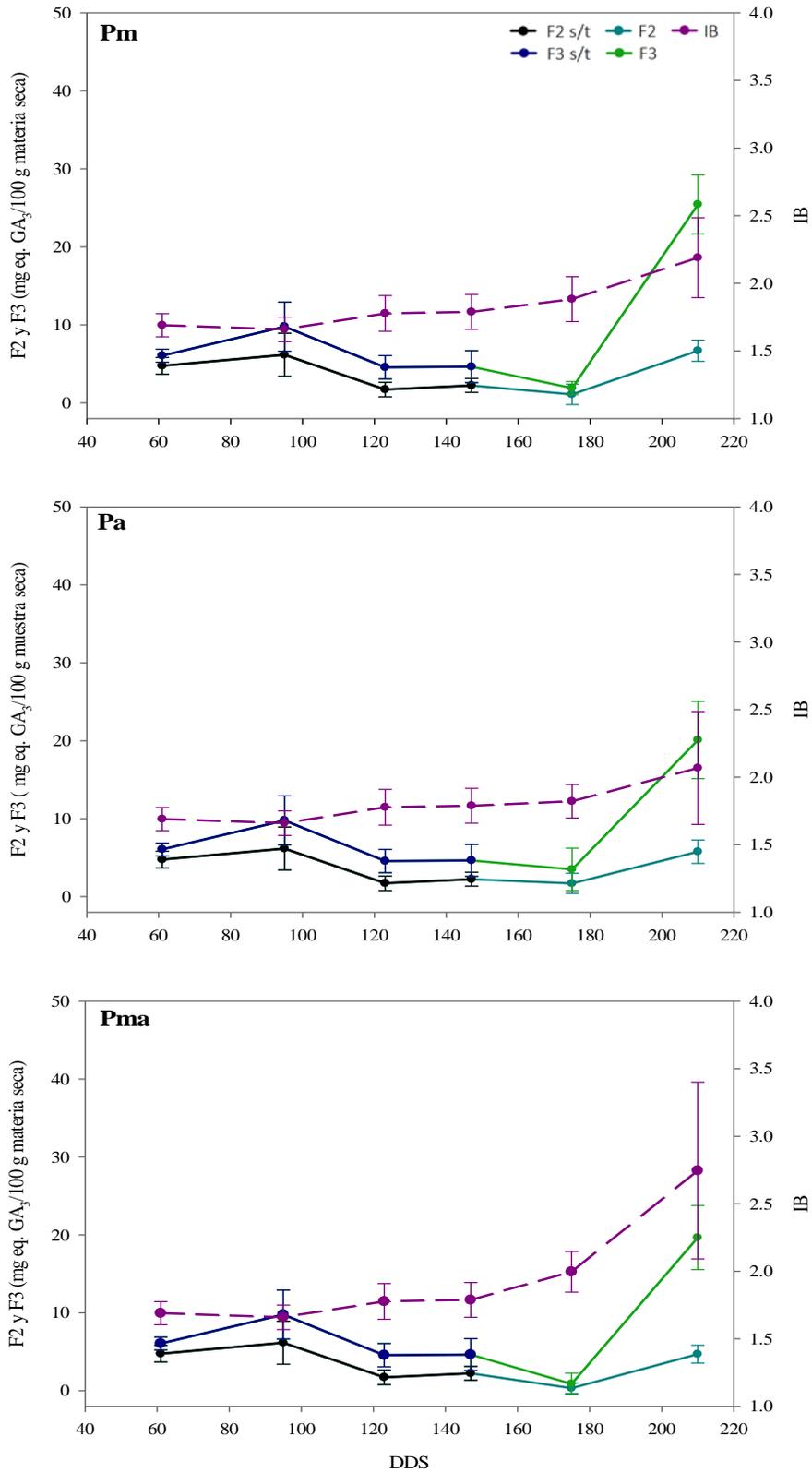
Utrilla-Vázquez (2008) explicó que el desarrollo del bulbo de ajo marca el inicio del proceso de letargo de la planta de ajo, viéndose detenido el crecimiento vegetativo debido a la disminución de la síntesis de giberelinas. Al parecer los aportes laterales de nutrientes alteró el proceso normal de desarrollo que desembocó en una producción con alta proporción de bulbos con defectos y acebollados.



**Figura 44.** Cambios en los contenidos de F2, F3 e índice de bulbificación (IB) en plantas de tratamientos control en marzo, abril y marzo+abril (Cm, Ca y Cma). s/t: sin tratamiento



**Figura 45.** Cambios en los contenidos de F2, F3 e índice de bulbificación (IB) en plantas tratadas con MeJA en marzo, abril y marzo+abril (Mm, Ma y Mma). s/t: sin tratamiento



**Figura 46.** Cambios en los contenidos de F2, F3 e índice de bulbificación (IB) en plantas tratadas con PBZ en marzo, abril y marzo+abril (Pm, Pa y Pma). s/t: sin tratamiento.

## 6.7 Análisis teórico de los aportes de nitrógeno

Con el objeto de dar soporte a la argumentación que los aportes de nitrógeno dados a las plantas de ajo ‘Perla’ probablemente afectaron el desarrollo de los bulbos de ajo ‘Coreano’. Las Tablas 18 y 19 muestran los requerimientos totales y las unidades de nitrógeno aplicadas semanalmente a cada uno de los cultivos de ajo cv. ‘Coreano’ y ‘Perla’ de acuerdo con las recomendaciones dadas por el Consejo de Ajo de Aguascalientes. Dada la cercanía del lote experimental a los surcos con ajos ‘Perla’ se calcularon las unidades de nitrógeno las cuales se grafican en la Figura 47.

**Tabla 18.** Requerimiento total de N-P-K en cultivo de ajo cv. ‘Coreano’ y ‘Perla’

<b>Variedad</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>K</b>
Coreano	220	180	240
Perla	330	180	320

Datos presentados en Unidades de nitrógeno, fósforo y potasio

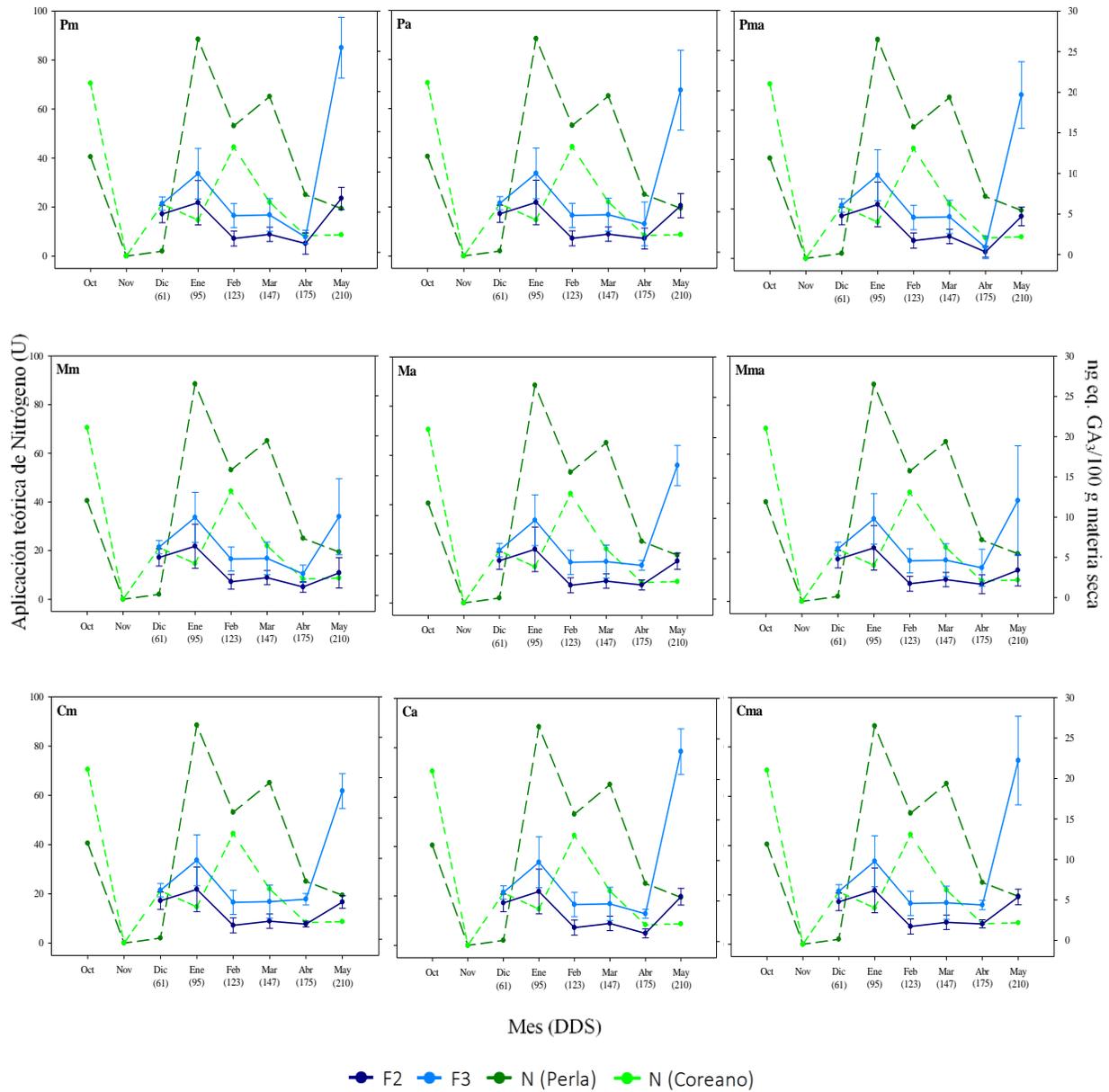
La Figura 47 muestra claramente que los aportes de nitrógeno a los ajos ‘Perla’ fueron notablemente mayores que los necesarios para el el ajo ‘Coreano; en todos los casos al final del ciclo de cultivo las niveles de unidades de nitrógeno dados al cultivar ‘Perla’ parecieron inducir una mayor síntesis de giberelinas lo cual alteró el desarrollo de los diferentes tratamientos.

Analizando los resultado fenológicos, rendimientos obtenidos y el comportamiento de las fracciones con actividad de GAs se estima que el régimen de fertilización aplicado a la parcela experimental fue 300-170-190 unidades de N-P-K; aplicándose un 30% del total como fertilización de fondo (al momento de la siembra) y el 70% restante se aplicó hasta la tercera semana del mes de abril por el sistema de riego por cintilla, coincidiendo esto último con el incremento en el contenido de F2 y F3, lo cual explicaría el drástico incremento que se observa para el día 210 después de la siembra.

**Tabla 19.** Unidades de nitrógeno aplicadas semanalmente a plantas de ajo ‘Perla’ y ‘Coreano’

Mes	Semana	Unidades de Nitrógeno	
		Perla	Coreano
Sept	2	0	70.5
	3	0	0
	4	40.5	0
Oct	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
Nov	1	0	3.6
	2	0	8.8
	3	0	8.8
	4	2	0
Dic	1	0	1.8
	2	2	6.15
	3	0	4.95
	4	86.5	1.8
Ene	1	4.95	28
	2	0	0
	3	37.55	7.94
	4	10.6	8.5
Feb	1	19.4	8.99
	2	14.5	1.6
	3	19.75	4.59
	4	11.46	6.79
Mar	1	5.99	3.71
	2	6.15	2.31
	3	6.9	0.91
	4	6	1.4
Abr	1	11.15	0.91
	2	8.25	1.4
	3	0	2.31
	4	0	4.07

Fuente: Consejo de Ajo de Aguascalientes, A.C



**Figura 47.** Relación entre aplicación teórica de nitrógeno y contenido de fracciones con actividad de GAS

## 6.8. Análisis de carbohidratos

### 6.8.1 Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el contenido de azúcares y fructanos

La Tabla 20 muestra el contenido de glucosa+fructosa, sacarosa y fructanos en la cosecha de las plantas (210 DDS) y en los bulbos ya curados (252 DDS)

**Tabla 20.** Contenido de glucosa+ fructosa, sacarosa y fructanos en bulbos de ajo cv. ‘Coreano’ cosechados y después del curado

Trat.	210 DDS			252 DDS		
	Gluc+Fruc	Sacarosa	Fructanos	Gluc+Fruc	Sacarosa	Fructanos
Cm	1.71b	0.21b	40.96a	8.67x10 <sup>-19</sup> a	0.51ab	47.79ab
Ca	1.89b	0.82a	38.63ab	-	0.29b	35.09bc
Cma	3.91ab	0.53ab	33.48ab	0.02a	0.31b	33.93c
Mm	3.32ab	0.37b	43.24a	-	0.35b	41.78abc
Ma	4.62ab	0.30b	37.76ab	0.02a	0.28b	41.49abc
Mma	3.10ab	0.18b	36.90ab	-	0.28b	36.88bc
Pm	4.49ab	0.25b	35.23ab	-	0.67a	44.31abc
Pa	5.57a	0.33b	28.30b	-	0.51ab	44.01abc
Pma	1.87b	0.49ab	36.13ab	1.73x10 <sup>-18</sup> a	0.61a	50.80a

Datos reportados como g/100 g de materia seca. Letras diferentes por columna representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). C: Control M: MeJA P: PBZ m: marzo a: abril.

El análisis estadístico muestra que la aplicación de los reguladores de crecimiento afectó las concentraciones de glucosa+fructosa, sacarosa y fructanos. A los 210 días la aplicación de PBZ en marzo y particularmente en abril (Pm y Pa) reflejó un incremento superior al doble en el contenido de azúcares libres (4.49 y 5.57 g glucosa+fructosa/100 g materia seca de bulbo de ajo) con respecto a los respectivos controles (1.71 y 1.89 g glucosa+fructosa/100 g materia seca de bulbo de ajo). Ambos reguladores disminuyeron el contenido de sacarosa, y fue solo la aplicación de MeJA en marzo (Mm) la que incrementó el contenido de fructanos en los bulbos de ajo. El tratamiento Mm generó el mayor índice de bulbificación (IB=2.93) dichos datos coinciden con el contenido de fructanos obtenidos por la aplicación de MeJA (43.24 g fructanos/100 g materia seca de bulbo de ajo).

Le Guen-Le Saos *et al.* (2002) reportaron que la aplicación de ancymidol (inhibidor de la biosíntesis de GAs) a chalotes (*A. cepa* L. Aggregatum group) en un modelo *in vitro*; no mostró efecto en el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos en la hoja aérea. Sin embargo si hubo diferencias en la base de las hojas, los tratamientos con ancymidol disminuyeron en un 66% el contenido de sacarosa e incrementaron la glucosa, fructosa y fructanos en un 188, 274 y 131%, respectivamente.

Después de curados los bulbos (día 252), la concentración de glucosa y fructosa en los bulbos de ajo fue practicante cero, lo cual tiene sentido ya que para éste día los ajos ya habían sido cosechados y sometidos al proceso de curado por tanto el ajo se encontraba en la etapa de letargo donde los azúcares son condensados en la hoja de almacenamiento para ser utilizados por la nueva planta una vez que la etapa de letargo es superada. La concentración de sacarosa se mantuvo relativamente constante con respecto al día 210. Por último, el contenido de fructanos incremento ligeramente por efecto del curado variando entre 33.93 g/100 g materia seca para el tratamiento Cma y 50.80 g/100 g de materia seca en el tratamiento Pma. El contenido de fructanos en los bulbos de ajo antes de la siembra fue de 46.53 g/100 g de materia seca de bulbo de ajo y estadísticamente fue diferente al contenido de fructanos alcanzado por los bulbos al final del ciclo de cultivo.

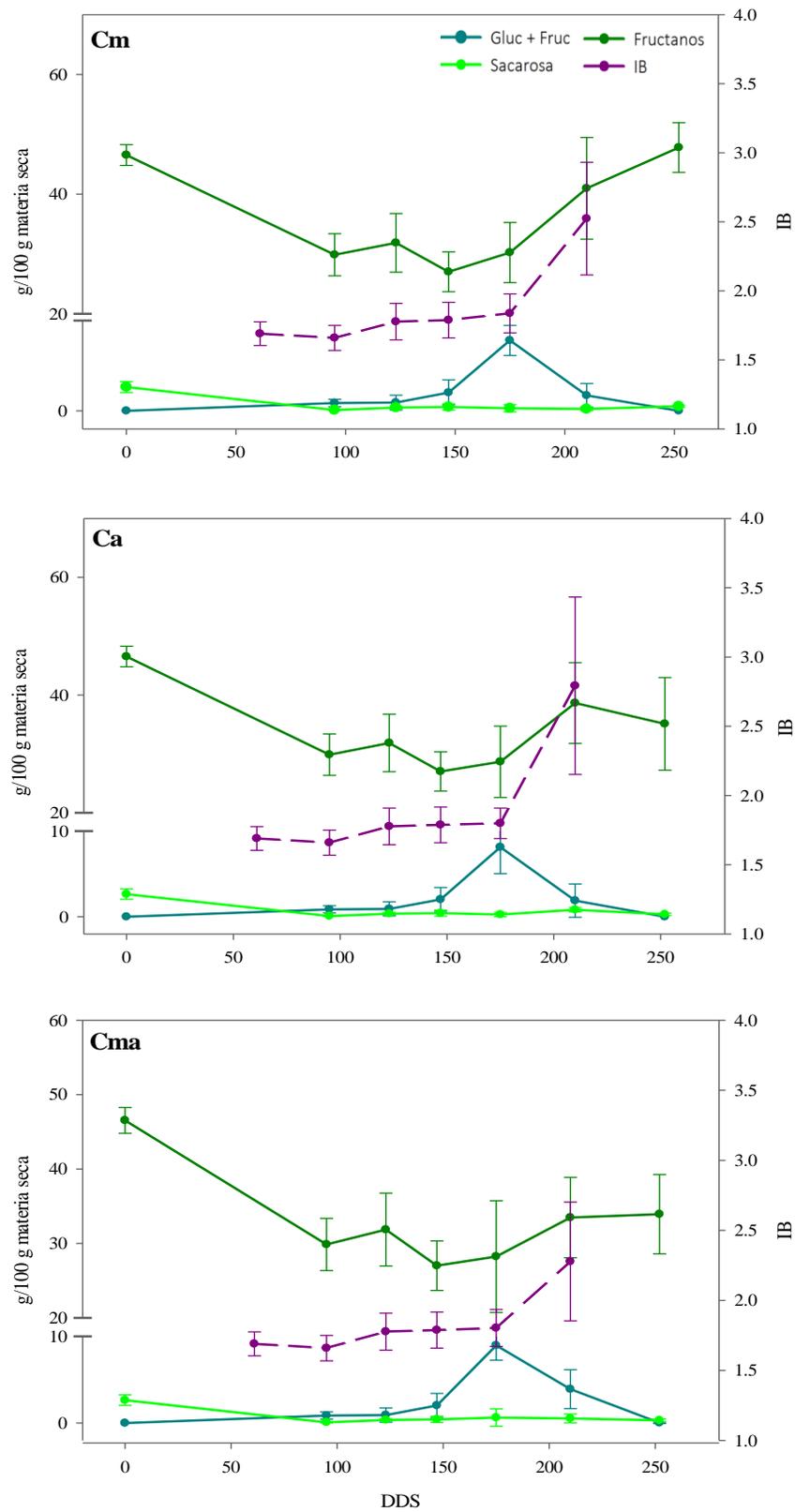
Las Figuras 48, 49 y 50 muestran los cambios registrados durante el ciclo de cultivo en los azúcares libres (glucosa + fructosa), sacarosa y fructanos, de igual manera muestra una correlación entre el incremento de fructanos con índice de bulbificación. De manera general se observa que en los primeros días después de siembra el contenido de fructanos disminuye, registrando la menor concentración (27.01 g/100 g materia seca) en el día 147; conforme la planta se aproximó a la etapa de letargo la concentración de fructanos aumentó. El tratamiento de PBZ en marzo+abril (Pma) fue el que alcanzó un mayor contenido de fructanos.

El efecto de la aplicación de inhibidores de la síntesis de giberelinas en la síntesis de fructanos también fue observado por Morvan *et al.* (1997) quienes aplicaron 1 mg/mL durante 48 h de uniconazol (inhibidor de la biosíntesis de giberelinas) después de la defoliación de plantas de ballica inglesa (*Lolium perenne* L.), observando una disminución de 67% en la actividad de la enzima fructan exohidrolasa (FEH) lo cual propició un mayor contenido de fructanos. Estos datos muestran que las GAs juegan un papel importante en la regulación de la actividad de la FEH y esto se ve reflejado en un aumento en el contenido de fructanos.

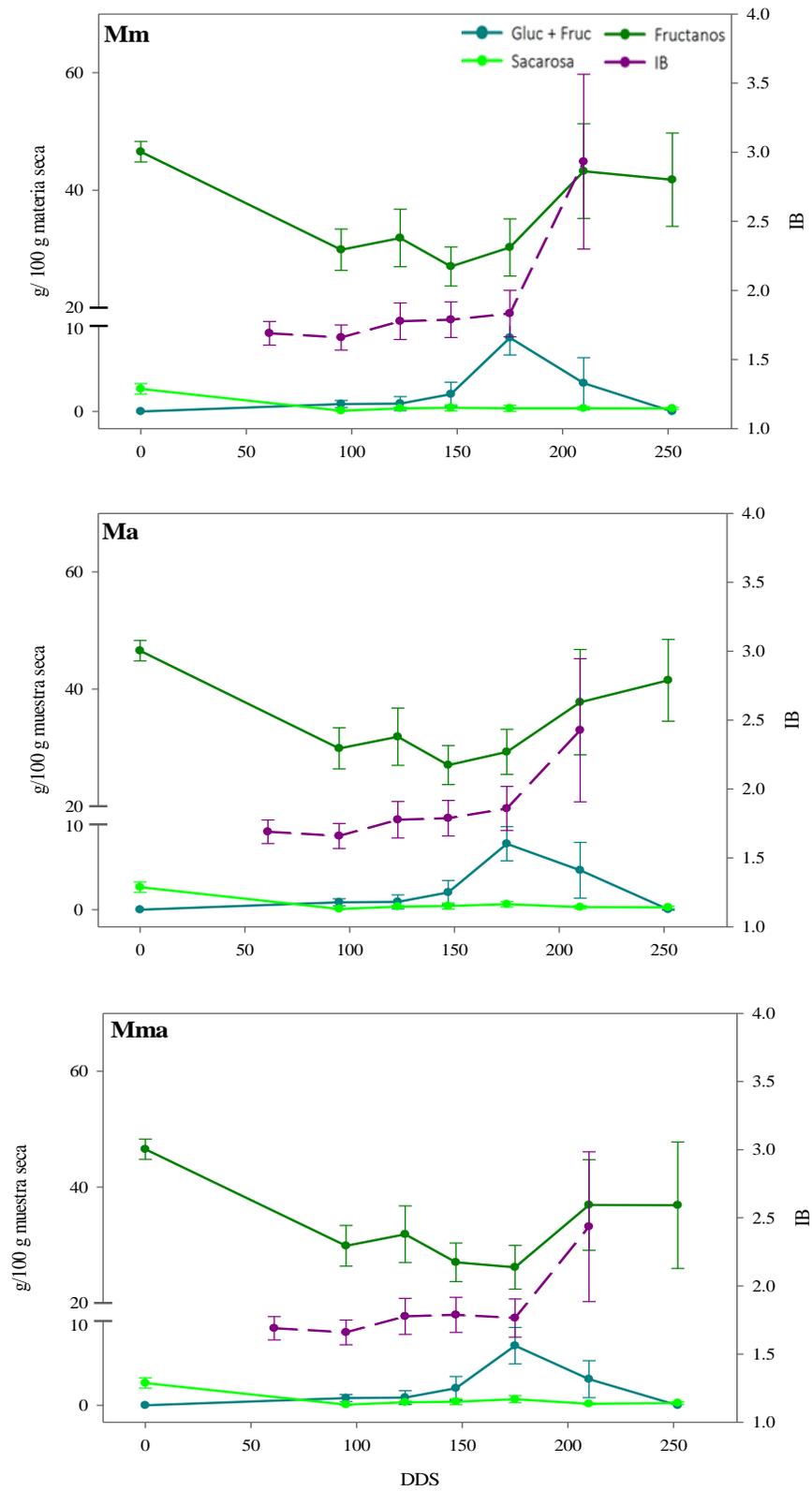
De manera comparativa en un estudio Chandrashekar *et al.* (2010) reportaron un mayor contenido de fructanos en ajo (65% en peso seco) con respecto al encontrado en el presente trabajo. La planta de ajo debe ser sometida a un estrés por frío para favorecer el

almacenamiento de fructanos en el bulbo; al no haberse acumulado las 550 h de frío y al haber sido afectada, hasta cierto punto, la acción de los reguladores de crecimiento por el exceso de fertilizante no se logró almacenar una mayor cantidad de fructanos en el bulbo.

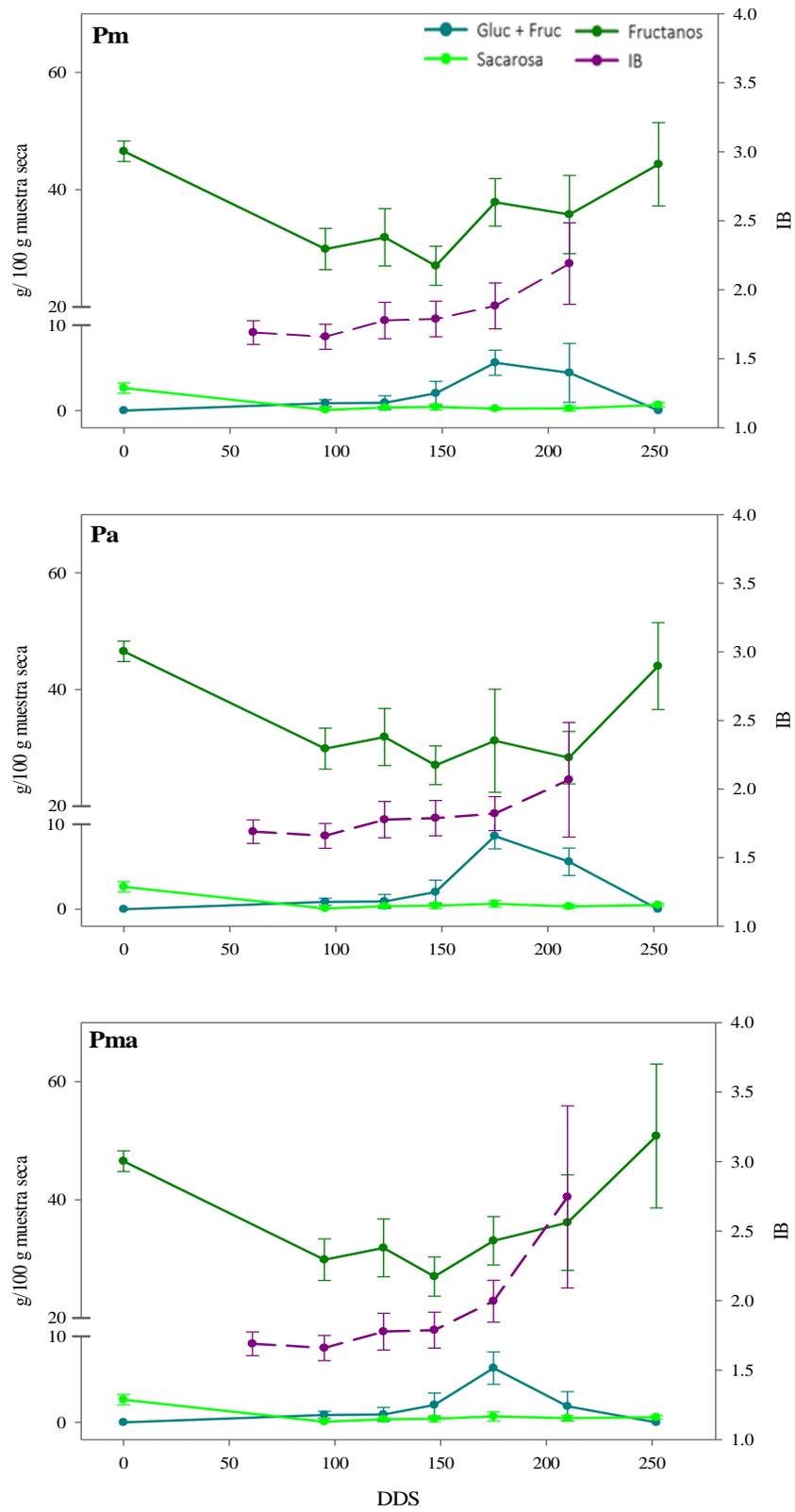
Por otro lado, en el día 175 después de la siembra se observa la máxima concentración de glucosa+fructosa (5.61 a 8.94 g/100 g materia seca) (Figuras 48, 49 y 50). Dicho incremento tan drástico coincidió con el máximo ancho de hoja y mayor número de hojas (Figura 36a y 37c). Mayor número de hojas y ancho de las mismas significa mayor área para llevar a cabo la fotosíntesis dando como resultado a una mayor concentración de azúcares libres los cuales serán movilizados al bulbo durante la etapa morfológica; sin embargo esto podría estar indicando una acumulación de azúcares libres en el bulbo y con ello alterar también el desarrollo. Nuevamente, esto da evidencia del exceso de fertilizante utilizado durante el ciclo de cultivo, cantidades mayores a las requeridas de nitrógeno favorecen el desarrollo vegetativo de las plantas en general (Le Guen – Le Saos, *et al.*, 2002).



**Figura 48.** Asociación entre concentración de azúcares e índice de bulbificación (IB) en tratamientos Control en marzo, abril y marzo+abril (Cm, Ca y Cma)



**Figura 49.** Asociación entre concentración de azúcares e índice de bulbificación (IB) en tratamientos de MeJA en marzo, abril y marzo+abril (Mm, Ma y Mma)



**Figura 50.** Asociación entre concentración de azúcares e índice de bulbificación (IB) en tratamientos de PBZ en marzo, abril y marzo+abril (Pm, Pa y Pma)

## VII. CONCLUSIONES

La aplicación en suelo de PBZ y MeJA propiciaron diferencias estadísticas en las variables morfológicas: altura, diámetro de cuello e índice de bulbificación. El tratamiento Pma (PBZ en marzo+abril) redujo en un 22% (equivalente a 17.59 cm) la altura de las plantas. Así mismo, este tratamiento y Mm (MeJA en marzo) indujeron el menor diámetro de cuello, 22.88 y 22.78 mm, respectivamente.

La aplicación de estos reguladores incrementó los rendimientos totales de un 10% a un 42%, con respecto a los tratamientos control, aunque también mostraron mayores cantidades de bulbos con defectos, lo cual pareció estar ligado a un exceso de nitrógeno en la fertilización debido posiblemente al traslado de este nutriente desde los campos de ajo 'Perla' aledaños a la parcela experimental

El tratamiento Mm mostró el mayor índice de bulbificación (IB =2.93), lo que sugiere una promoción de la bulbificación, mientras que el PBZ redujo el diámetro del cuello favoreciendo un mayor índice de bulbificación y mejor calidad de la cosecha.

La aplicación de PBZ en marzo y abril inhibió la síntesis de giberelinas, lo cual disminuyó el crecimiento de la planta y propició una mejor bulbificación. No obstante el efecto del PBZ se vio disminuido por un posible exceso de nitrógeno de los tratamientos.

Un régimen inadecuado de fertilización afecta de manera negativa la calidad de los bulbos de ajo y minimiza la eficacia del PBZ y MeJA. La aplicación de los reguladores no mostró diferencia estadística significativa en el rendimiento total el cual osciló entre 10.4 y 13.2 ton/ha. Así mismo, los reguladores no redujeron la incidencia de bulbos acebollados y otros defectos.

La aplicación de PBZ en marzo y abril (Pma) propició una mayor acumulación de fructanos en los bulbos cosechados.

Se detectaron dos fracciones con actividad de giberelina, F2 y F3, cuyos tiempos de elución fueron 22.7 y 23.6 min. La fracción F3 se encontró en mayores concentraciones respecto a la fracción F2 durante todo el cultivo.

La fracción F3 tiene la misma capacidad de síntesis de  $\alpha$ -amilasa que  $GA_3$ , con respecto a la maltosa producida (5.90 y 6.04 g maltosa). Se desconoce la naturaleza de dichas fracciones por lo cual es pertinente realizar más estudios para dilucidar su actividad en los bulbos de ajo.

La aplicación de los reguladores mostró diferencias significativas entre la concentración de F2 y F3 en el día 210, siendo el tratamiento Mm el único que redujo la concentración de dichas fracción. Sin embargo, tanto el efecto de PBZ como de MeJA se vio inhibido, en parte, debido a un exceso de nitrógeno en la fertilización lo cual promovió la síntesis de GAs.

La bulbificación está directamente relacionada con el almacenamiento de fructanos en el bulbo, ya que conforme el índice de bulbificación va incrementando la concentración de fructanos también, llegando a una concentración similar (33.93 a 50.80 g/100 g materia seca) a la que tenían los dientes antes de la siembra (46.53 g/100 g de materia seca).

## VIII. REFERENCIAS

- Abe, M.; Shibaoka, H.; Takahashi, N. (1990).** Cell cycle-dependent disruption of microtubules by methyl jasmonate in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*. 136: 1-8.
- Ali, A. D. and Bernick, S. C. (2010).** Effect of paclobutrazol on royal palm (*Roystonea regia*) trunk and height growth. *Arboriculture and Urban Forestry*. 36(5): 221-223.
- Argüello, J. A.; Falcon, L. R.; Seisedos, L.; Milrad, S.; Bottini, R. (2001).** Morphological changes in garlic (*Allium sativum* L.) microbulblets during dormancy and sprouting as related to peroxidase activity and gibberellin A<sub>3</sub> content. *Biocell*. 25: 1-9
- 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
- Baungartner, S.; Dax, T. G.; Prazkik, W.; Falk, H. (2000).** Characterization of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.) *Carbohydrate Research*. 328: 177-183.
- Bell, A. D.; Bryan, A. (1991).** Plant form: An illustrated guide to flowering plant morphology. En: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción. Ed. Heredia. G. E, SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. p. 24
- Bello-Gil, D.; Carrera-Bocourt, E.; Díaz-Maqueira, Y. (2006).** Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. ICIDA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 9(2): 25-50.
- Brewster, J. L. (2008).** Onions and other vegetable alliums. CABI. Horticulture Research International. Wellesbourne, UK. p. 25-117.
- Bidwell, R. G. S. (1974).** Plant Physiology. New York, McMillan Publishing Co. p. 643.
- 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.

- Butt, A. M. (1968).** Vegetable growth, morphogenesis and carbohydrate content of the onion plants as a function of light and temperature under field and controlled conditions. En: Bulbing in onions: photoperiod and temperature requirements and prediction of bulb size and maturity. *Ann. of Botany*. 78: 423-430.
- Cavagnaro, P. F.; Galmarini, C. R. (2005).** Chapter 12: Garlic. En: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Ed. C. Kole. 5: 349-364.
- Chandrashekar, P.M; Harish Prashanth, K. V.; Venkatesh, Y. P. (2010).** Isolation, structural elucidation and immunomodulatory activity of fructanos from aged garlic extract. *Phytochemistry*. 72:255-264
- Chaney, W. R. (2005).** A paclobutrazol treatment can leave a tree more stress tolerant. Golfdom. Solutions, ideas and origins. Advanstar Publications. USA.
- Cheong, J.; Choi, Y. D. (2003).** Methyl jasmonato as a vital substance in plants. *TRENDS in Genetics*. 19(7): 409-413.
- Clark, J. E. and Heath, O. V. S. (1962).** Studies in the physiology of the onion plant. V. An investigation into the growth substance content of bulbing onions. *J. Exp. Bot.*. 13: 227-249.
- Creelman, R. A. and Mullet, J. E. (1997a).** Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 48: 355-381.
- Creelman, R. A. and Mullet, J. E. (1997b).** Oligosaccharins, brassinolides, jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development and gene expression. *Plant Cell*. 9: 1211-1223.
- Darbyshire, B. and Henry, R. J. (1981).** Differences in fructan conten and synthesis in some *Allium* species. *New Phytol.* 87:249-256.
- Davies, P. J. (1995).** Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. p. 833.
- Davis, T. D. and Curry, E. A. (1991).** Chemical regulation of vegetative growth. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 151-188.
- Demole, E.; Leder, E.; Mercier, D. (1962).** Isolement et détermination de la structura du jasmonate de methyle, constituant odorant caractéristique de l'éssence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta*. 45:675-685.
- Espinosa-Martos, I.; Rico, E.; Rupérez, P. (2006).** Note. Low Molecular Weight Carbohydrates in Foods Usually Consumed in Spain. *Food Sci. Tech. Int.* 12(2): 171-175.

- FAOSAT (2011).** Consulta realizada el 20 de julio de 2012. [http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE\\_BY\\_DOMAIN](http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE_BY_DOMAIN)
- Fletcher, R. A.; Gilley, A.; Sankhla, N.; Davis, T. D. (2000).** Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Hortic. Rev.* 24: 55-137
- Fritsch, R. M.; Friesen, N. (2002).** Evolution, domestication and taxonomy. En *Allium crop science: recent advances*. p. 5-10.
- Galaz-Pérez, E. A. (2008).** 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. Querétaro, México.
- García, C. R. (1998).** El ajo: cultivo y aprovechamiento. 2ª. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. p. 205.
- George, E. F. (2008).** In: Plant propagation by tissue culture. 3rd. Edition. pp. 227-232.
- Giaconi, M. and Escaff, M. (1993).** Cultivo de hortalizas, Editorial Universitaria. Santiago, Chile. p. 332.
- González, A. M. and Arbo, M. M. (2006).** Morfología de plantas vasculares. Reporte informativo. Universidad Nacional del Noreste. Corrientes, Argentina. p. 220.
- Guo, J. Y.; Jiang, F. L.; Tian, J.; Wu, Z. (2012).** The dynamic changes of main endogenous hormone content in leaves during flower bud differentiation of bolting garlic cultivars. *Acta Hort.* 938: 415-422.
- Hedden, P. and Kamiya, Y. (1997).** Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Molec. Biol.* 48: 431-460.
- Hendry, G. A. F.; Wallace, R. K. (1993).** The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. En: Vjin, I. y Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate. *Plant Physiol.* 120. 351-359.
- Heredía, G. E. (2000).** El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción. En: Libro Técnico SAGAR, INIFAP. Celaya, Gto. 3: 12-28.
- Hosono, A.; Ozawa, A.; Kato, R.; Ohnishi, Y.; Nakanishi, Y.; Kimura, T.; Nakamura, R. (2003).** Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 758-764.
- Izquierdo, J.; Paltrinieri, G.; Arias, C. (1997).** Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización del ajo, cebolla y tomate. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile, p. 413.

- Izquierdo, O. H. y Quiones, O. Y. (2001).** Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de tecnología biotecnológica. Temas Septiembre-Diciembre. División de Biotecnología, Fisiología y Resistencia del Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, Cuba. p. 39-55.
- Jang, S.; Hamayun, M; Sohn, E.; Shin, D.;Kim, K.; Lee, B; Lee, I. (2008).** Effect of elevated nitrogen levels on endogenous gibberellin and jasmonic acid contents of three rices (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 171: 181-186.
- Jaume, R. A.; Corral, M. (1997)** Possible involvement of jasmonic acid in bulb forming of garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Hort.* 433: 381-388.
- Kakar, A. A.; Abdullahzal, M. K.; Saleem, M.; Qaim, S. S. (2002).** Effecto of nitrogenous fertilizer on growth and yield of garlic. *J. Assian of Plant Sci.* 1: 544-548.
- Kamiya, Y.& García, J. L. (1999).** Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Current Opinion in Plan Biol.* 2: 398-403.
- Kim, S.; Gou, D. P.; Jung, D. C.; Kwon, S. T. (2003).** Multiple shoots regeneration and *in vitro* bulblet formation form garlic callus. *J. Plant Biothec.* 5: 95-99.
- Koch, H. P.; Lawson, L. D. (1996).** Garlic: The science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species. 2<sup>nd</sup> Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, p. 13.
- Koda, Y. (1992).** The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. *Int. Rev. Cytol.* 133: 133-199.
- Koda, Y. (1997).** Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events, *Physio. Plantarum.* 100: 639-646.
- Koda, Y. and Okasawa, Y. (1983).** Characteristic changes in levels of endogenous plant hormones in relation to the onset of potato tuberisation. *Jpn. J. Crop Sci.* 52: 592-597.
- Lee, B. Y. and Moon, W. (1982).** Effect of night breaks with intermittent or continuous light on the growth and bulbing of garlic plants. *J. Korean Soc. of Hort. Sci.* 23: 1-17.
- 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.

- Le Guen-Le Saos, F.; Hourtman, A.; Esnault, F.; Chauvin, E. (2002).** *In vitro* bulb development in shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group): effects of anti-gibberellins, sucrose and light. *Ann. of Botany*. 89:419-425.
- Lercari, B. (1982).** The effect of far-red light on the photoperiodic regulation of carbohydrate accumulation in *Allium cepa* L. *Anal. of Botany*. 89: 419-425.
- Lin, K. H.; Pai, F. H.; Hwang, S. Y. (2006).** Pre-treating paclobutrazol enhanced chilling tolerance of sweetpotato. *Plant Growth Regul.* 49: 249-262.
- 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.
- Losso, J. N.; Nakai, S. (1997).** Molecular size of garlic fructooligosaccharides and fructopolysaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4342-4346.
- López-Echeverría, G. (2004).** Evaluación de 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. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- 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.
- Macias-Valdez, L. M.; Valadez-Marín C. C. López-Frías, L. C. (2007).** Guía para cultivar ajo en Aguascalientes. Folleto para productores (21).
- Mann, L. K. (1952).** Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. *Hilgardia*. 21: 195-251.
- Matsuki, T.; Tazaki, H.; Fujimori, T. (1992).** The influence of jasmonic acid methyl ester on microtubules in potato cells and formation of potato tuber. *Biosci. Biotech. Biochem.* 36: 1329-1330.
- McCleary, V. B. and Murphy, A. (2000).** Measurement of total fructan in foods by enzymatic/spectrophotometric method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 83(2): 356-364.

- Meza-Hernández, S. (2005).** Estudio de homogenización de la brotación de ajo destinado para siembra y fisiología de ajo mínimamente procesad. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química, Querétaro, México.
- Miller, G. L. (1959).** Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Mita, T. and Shibaoka, H. (1984).** Gibberellin stabilizes microtubules in onion leaf sheath cells. En: Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiol. Plantarum.* 100: 639-646.
- Moongngarm, A.; Trachoo, N.; Sirigungwan, N.(2011).** Low Molecular Weight Carbohydrates, Prebiotic Content, and Prebiotic Activity of Selected Food Plants in Thailand. *Adv. J. Food Sci. Technol.* 3(4): 269-274.
- Moreiras, O.; Carbajal, A.; Cuadrado, C. (2007).** Tabla de composición de alimentos (11ª Ed.) Ed. Pirámides. España.
- Morvan, A.; Challe, G.; Prud'Homme M.; Le Saos, J. (1997).** Rise of fructan exhydrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. *New Phytol.* 136: 81-88.
- Nicholls, P. B. and Paleg, L. G. (1963).** A barley endosperm bioassay for gibberellins. *Nature.* 199(48): 823-824
- Nojiri, H.; Yamane, H.; Seto, H. (1992).** Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonic acid in bulbing and non-bulbing onion plants. *Plant Cell Physiol.* 33: 1225-1231.
- Odeny, D. A. and Narina, S. S. (2011).** *Allium*. En: Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Vegetables. p. 1-2.
- Pilon, S.; Ebskamp, M. J. M.; Paul, M. J.; Jeuken, M. J. W.; Weisbeek, P. J. Smeekens, S. C. M. (1995).** Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. En Vjin, I. y Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate. *Plant Physiol.* 120: 351-359.
- Portela, J. A. (1996).** El ambiente como regulador del desarrollo de las plantas. Su efecto sobre el ajo (*Allium sativum* L.). *Avances en Horticultura.* 1: 19-40.
- Portela, J. A. (1997).** Anormalidades fisiogénicas en el cultivo de ajo: malformaciones. En: 50 temas sobre producción de ajo. Mendoza, Argentina. 3: 294-311.
- Portela, J. A. (1998).** Factores involucrados en el “rebrote” del ajo (*Allium sativum* L.) e implicaciones en el manejo del cultivo. *Avances en Horticultura.* 3: 1-12.

- Portela, J. A 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. Ed. Longman. p. 607.
- Rademacher, W. (2000).** Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Ann. Rev. Plant Physiol and Plant Molec. Biol.* 51:501-531.
- Rahim, M. A. and Fordham, R. (1990a).** 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. (1990b).** The advancement for bulbing in garlic (*Allium sativum*, L.) with specific reference to late season production in Banbladhes. *Acta Horticulturae.* 267: 271-277.
- Rahim, M. A. and Fordham R.; Midmore, D. J. (1994).** Control of bulbing in garlic. *Acta Horticulturae.* 358: 369-374.
- Rahim, M. A. and Fordham, R. (2001).** Environmental manipulation for controlling bulbing in garlic. *Acta Hort.* 555: 180-188.
- Ravnikar, M.; Vilhar, B.; Gogala, N. (1992).** Stimulatory effect of jasmonic acid on potato stem node and protoplast culture. *J. Plant Growth Regul.* 11: 29-33.
- Ravnikar, M.; Zel, J.; Plaper, I. (1993).** Jasmonic acid stimulates shoot and bulb formation of garlic *in vitro*. *J. Plant Growth Regul.* 12: 73-77.
- Rakhimbaev, I. R. and Ol'shanskaya, R. V. (1976).** Dynamics of endogenous gibberellins during the process of transition of garlic bulbs from the state of dormancy to active growth. Central Botanical Garden, Academy of Sciences of the Kasakh SSR, Alma-Ata. *Fiziologiya Rastenii.* 23: 76-79.
- Ravnikar, M.; Zel, J.; Plaper, I.; Spacapan, A. (1994).** Jasmonic acid stimulates shoot and bulb formation of garlic *in vitro*. En: Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiol. Plantarum.* 100: 639-646.
- Red Nacional de Estaciones Climatológicas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).** <http://clima.inifap.gob.mx/redclima>
- Resende, G. M. and Souza, R. J. (2002).** Efeito de doses de paclobutrazol na cultura do alho. *Pesq. Agropc. Bras.* 37(5): 637-641.

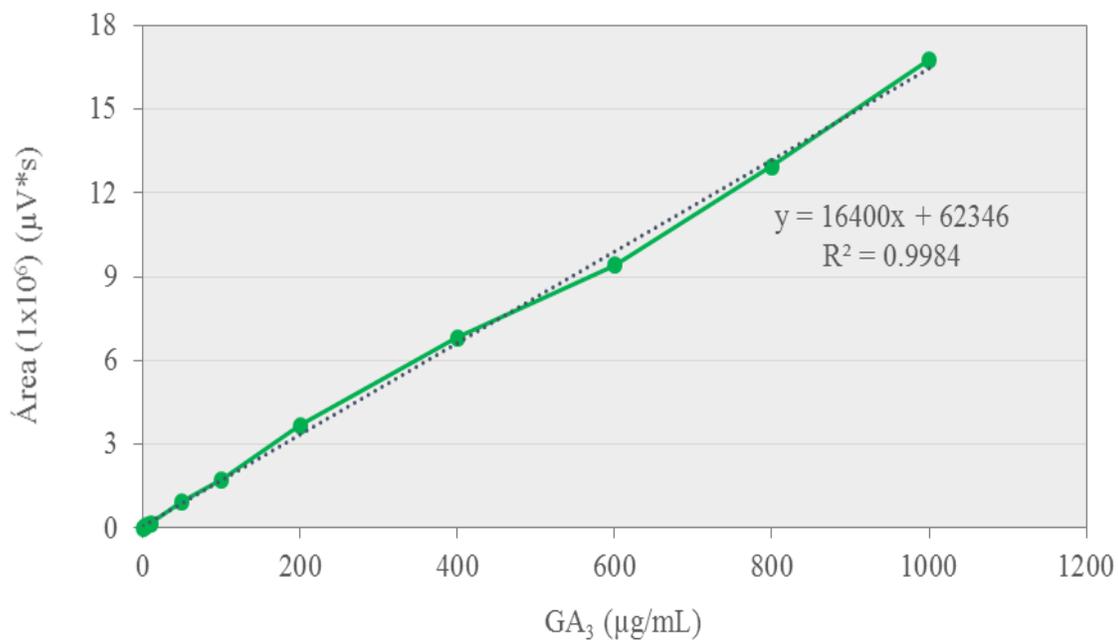
- Ritsema, T. and Smeekens, S. C. M. (2003).** Engineering fructan metabolism in plants. *J. Plant Physiol.* 160: 811-820
- Roberfroid; M.B. (2005).** Introducing inulin-type fructans. *Br. J. Nutr.* 93: S13–S25
- Saquib, A. A. N.; Whitney, P. J. (2011).** Differential behavior of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy.* 35: 4748-4750.
- Sarita, V. (1995).** Cultivo de ajo. Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc. Boletín técnico No. 5 (2ª Ed.). República Dominicana
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. (2011).** Cierre de la producción agrícola por cultivo. Consultado: 22 de septiembre de 2013. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350)
- Soberón, J. R.; Quiroga, E. N.; Samprieto, A. R; Vattuone, M. A. (2005).** Jasmonatos. Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales “Dr. A. R. Samprieto”. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina.
- Staswick, P. E.; Su, W. P.; Howell, S. H. (1992).** Methyl jasmonate inhibition of root-growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Science.* 89: 6837-6840.
- Still, J. R. and Pill, W. G. (2004).** Growth and stress tolerance of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in response to seed treatment with paclobutrazol. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 79: 197-203.
- 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.
- Takahashi, K.; Fujino, K.; Kikuta, Y. (1994).** Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* 100: 3-8.
- Thomas, S. G.; Rieu, I.; Steber, C. M. (2005).** Gibberellin metabolism and signaling. *Vitamins & Hormones.* 172: 289-338.
- USDA. (2007).** National Nutrient Database for Standar Reference. URL: [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit-pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit-pl)
- USNO. (2013).** Astronomical Applications Department of the U.S Navy Observatory. URL: <http://aa.usno.navy.mil>

- 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.
- Vick, B. A. and Zimmerman, D. C. (1983).** The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophysics and Research Communications*. 111: 470-477.
- Vjin, I. y Smeekens, S. (1999).** Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant physiology*. 120: 351-359
- 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.
- Wasternack, C. and Hause, B. (2002).** Jasmonates and octadecaoids: signals in plant stress responses and development. *Progr. Nucleic Acid Research and Molec. Biol.* 72: 165-221.
- Webb, J. A. and Fletcher, R. A. (1996).** Paclobutrazol protects wheat seedlings from injury due to waterlogging. *Plant Growth Rev.* 16: 201-206.
- 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.
- Yadav, R. K.; Rai, N.; Yadav, D. S.; Asati, B. S. (2005).** Use of paclobutrazol in horticultural crops- A review. *Agric. Rev.* 26(2): 124-132.
- Yao, H. J. and Tain, S. P. (2005).** Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanism involved. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 941-950.
- 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.

## IX. ANEXOS

### 9.1 Curva estándar de giberelinas

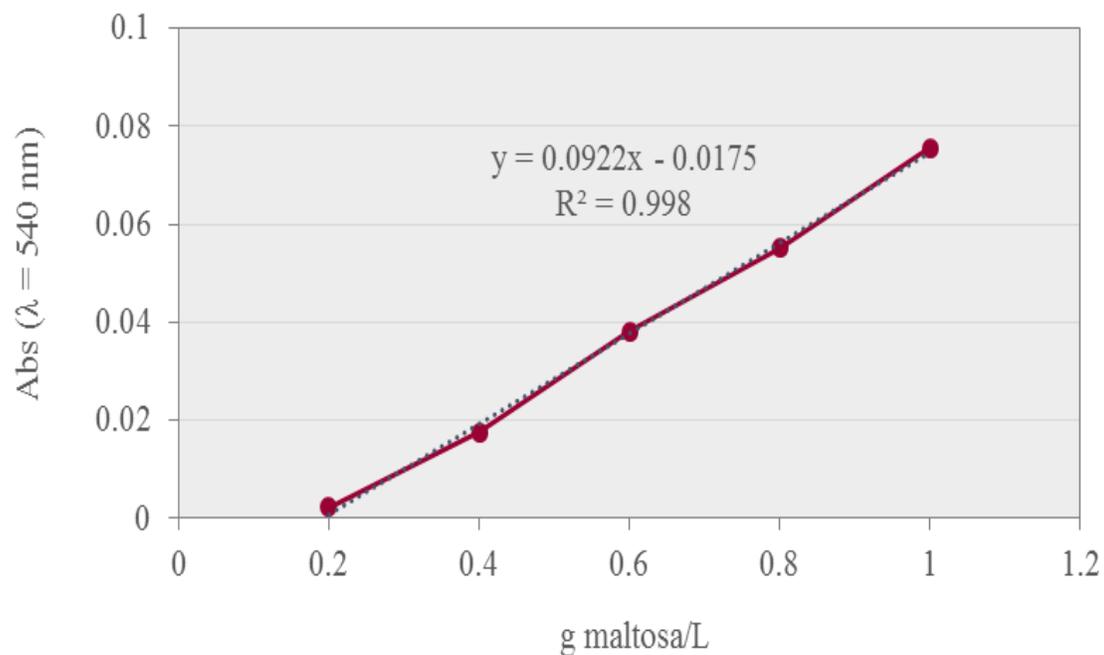
Se preparó una solución stock de GA<sub>3</sub> a una concentración de 1 mg/mL a partir de la cual se realizaron diluciones. Cada dilución fue inyectada por duplicado y se corrió con el mismo método de análisis en el sistema HPLC-PDA ( $\lambda=205$  nm) (Figura 49).



**Figura 51.** Curva estándar de GA<sub>3</sub>

## 9.2 Curva estándar de maltosa

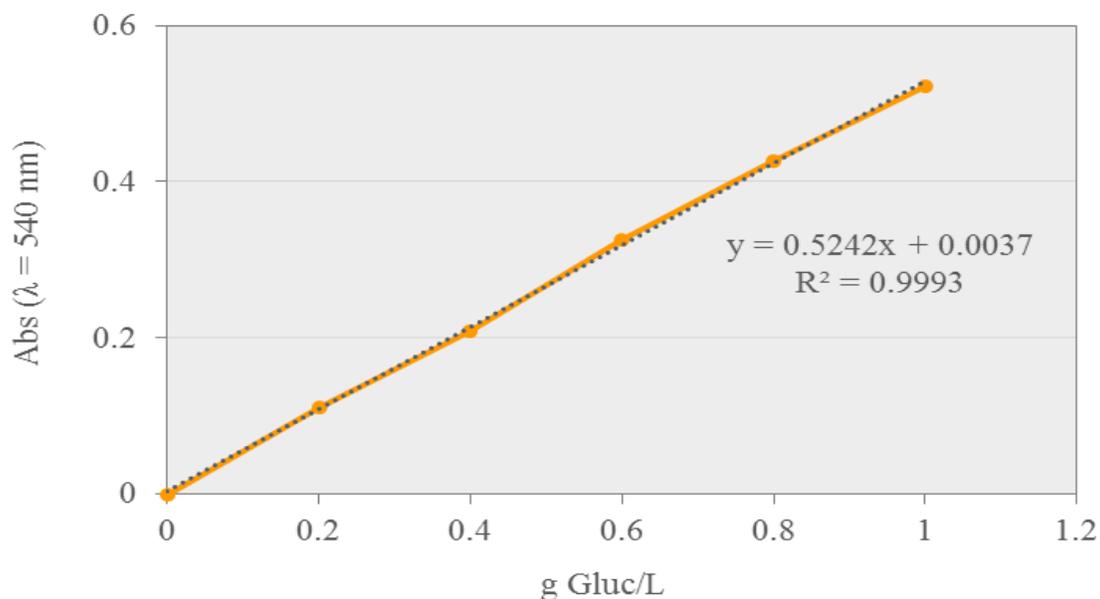
Se prepararon 50 mL de una solución stock de maltosa a una concentración de 1 g/L a partir de la cual se realizaron diluciones (duplicado). De cada dilución se tomaron 0.5 mL para llevar la reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Figura 50).



**Figura 52 .** Curva estándar de maltosa

### 9.3 Curva estándar de glucosa

Se prepararon 100 mL de una solución stock de glucosa a una concentración de 4 g/L a partir de la cual se realizaron diluciones (duplicado). De cada dilución se tomaron 0.5 mL para llevar la reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Figura 51).



**Figura 53.** Curva estándar de glucosa

### 9.4 Preparación del ácido 3,5-dinitrosalicílico

Preparar el reactivo en matraz volumétrico ámbar o bien cubrir el matraz con papel aluminio para evitar exposición a la luz.

- 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ( $C_7H_4N_2O_7$ ) (Merck)
- 150 g de tartrato de sodio-potasio ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ) (J.T. Baker)
- 8 g hidróxido de sodio (NaOH) (J.T Baker)

Se disolvieron los 8 g de NaOH en 200 mL de agua destilada y se le añadió lentamente el  $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$  mientras se mantenía en agitación. Se completaron 400 mL con agua destilada y finalmente se le agregó  $C_7H_4N_2O_7$ . Se mantuvo en agitación hasta homogenizar completamente y se aforó a 500 mL.

El reactivo debe mantener en frasco color ámbar y en lugar oscuro. Almacenado a temperatura ambiente es viable hasta por 6 meses.