



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN Y TRANSFERENCIA A  
TEMPERATURA AMBIENTE EN LA BROTAÇÃO Y  
CONTENIDO DE GIBERELINAS LIBRES Y LIGADAS EN AJO  
Var. PERLA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**BELÉN MARTÍNEZ GARIBAY**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. EDMUNDO MERCADO SILVA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.**

**BIBLIOTECA CENTRAL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H70193

No. Título \_\_\_\_\_

Clas. 15

664.852

M385e

\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN Y TRANSFERENCIA A  
TEMPERATURA AMBIENTE EN LA BROTAÇÃO Y  
CONTENIDO DE GIBERELINAS LIBRES Y LIGADAS EN AJO  
Var. PERLA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**BELÉN MARTÍNEZ GARIBAY**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. EDMUNDO MERCADO SILVA**

**SINODALES**

**Dr. EDMUNDO MERCADO SILVA**  
DIRECTOR

**M.en C. MA. ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS**  
SINODAL

**M. en C. JORGE ÁLVAREZ DOMÍNGUEZ**  
SINODAL

**Q.A. RAFAEL PÉREZ MUÑOZ**  
SINODAL

---

---

---

---

*El Presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica  
Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y  
Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química, bajo la dirección del  
Dr. Edmundo Mercado Silva.*

*Donde la esperanza no existe, no puede existir el esfuerzo.*

*Samuel Johnson*

## *Dedicatorias*

A Dios por esta guiarme en cada momento de mi vida, porque me dio la fuerza necesario para salir adelante cuando creía que ya no podía más y por ayudarme a culminar un sueño más.

A mi papá Rodolfo por su amor, a mi mamá Guadalupe porque es mi motor de vida y un gran ejemplo de lo que es ser madre, porque gracias a todo su cariño, apoyo y comprensión pude desempeñarme mejor cada día y así lograr esta meta. Porque cada una de sus palabras me dieron el valor necesario para continuar, porque simplemente eres lo mejor de mi vida.

A mi hermana Ana la cual siempre me ha apoyado en todos los aspectos y cuyos consejos me son de gran utilidad, a mi cuñado Israel el cual me ha acompañado en diferentes etapas de mi vida siempre con un apoyo incondicional y a mi hermoso sobrino Jared el cual me inyecto una gran alegría.

A mi abuelita Ángela por darme su confianza, sus palabras de apoyo y por su amor, a mi abuelito Rodolfo que aunque no pudo ver culminado este sueño se que desde el cielo el esta feliz.

A David por su amor, por estar a mi lado y apoyarme en cada decisión, porque hizo que mi vida tuviera la felicidad completa y por ser el hombre de mi vida, te amo.

A mis amigas incondicionales, Bety, Isabel, Rosa, Rita, Lupita, Marú, Mónica y Alfredo, los cuales han sido parte importante en la culminación de este proyecto.

## *Agradecimientos*

Al Consejo de Productores de Ajo del municipio de Rincón de Romos, Aguascalientes. Por el apoyo material brindado para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Edmundo Mercado por su interés, paciencia y confianza que mostró a lo largo de la realización de este trabajo

A la M. en C. Estela Vázquez por compartir sus conocimientos y experiencias, por el apoyo dado en cada una de las etapas del proyecto, por motivarme a seguir adelante y brindarme su tiempo pero sobre todo su amistad.

A mis compañeros de generación Lupita, Tere, Marilú, Don Raúl Rita, Rosy, Isabel, Lupapa, Marú y Alfredo, porque siempre me dieron una palabra de aliento y porque juntos compartimos una de las etapas más bonitas de la vida.

A mis profesores de la Universidad Autónoma de Querétaro por compartir sus conocimientos.

A mis compañeros del Laboratorio, Gerardo, Estela, Judith, Ale, Lorenzo, Sayn, Rafael, Elizabeth, Chucho y Gisela ya que hicieron más fácil y alegre mi estancia en el laboratorio, y porque cada uno de ellos ayudaron a que yo alcanzara esta meta brindándome sus conocimientos y confianza.

## RESUMEN

El ajo se considera un producto poco perecedero y por ello su conservación generalmente se realiza a temperatura ambiente. No obstante, bajo esta condición los bulbos pierden peso y firmeza y empieza a emerger una nueva planta; por ello se recomienda que este producto se almacene a 0°C. Esta práctica es poco utilizada en nuestro medio y no se sabe como se comporta el producto cuando se traslada desde el ambiente de refrigeración a las condiciones de comercialización normales puesto que hay evidencias que las temperaturas de refrigeración inducen el proceso de brotación. Por ello el objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios en el índice de brotación y la síntesis de giberelinas libres y ligadas en ajos almacenados a Temperatura Ambiente, 0 °C y 15 °C y después transferidos a 23 °C y con este dato indicar su vida de almacenamiento. 1200 bulbos de ajo variedad Perla con calibre 5cm procedentes de Rincón de Romos Aguascalientes fueron almacenados a las temperaturas indicadas y después transferidos a 23 °C por 15 y 30 días. En diferentes periodos del almacenamiento continuo, se tomaron muestras de bulbos para analizar su índice de brotación y su contenido de giberelinas libres y ligadas; de forma simultánea y en los mismos periodos de muestreo se tomaron otras muestras para ser transferidos a 23 °C durante 15 y 30 días y posteriormente se analizaron los mismos parámetros. La temperatura de 23 °C fue más inductora de la brotación que la Temperatura Ambiente puesto que el brote mostró crecimiento después de 15 y 30 días a esa temperatura. Las temperaturas a 23 °C parecen inducir la brotación lo que explica el porque a Temperatura Ambiente la vida de anaquel del ajo es relativamente corta (3 meses). La temperatura de 0 °C inhibió el crecimiento del brote durante tres meses de almacenamiento; no obstante, las muestras transferidas de 0 °C a 23 °C por 15 y 30 días recuperaron su capacidad de brotación y mostraron índices de brotación al inicio de aproximadamente 20% y 58% a los 75 días, los cuales son muy similares a los mostrados por las muestras almacenadas a Temperatura Ambiente (19% a 55% respectivamente) por lo que periodos de almacenamientos cortos (3 meses) se obtienen resultados similares si se almacena a 0 °C o a temperatura ambiente. Para periodos más largos es mejor almacenar a 0 °C. El almacenamiento a 0 °C y su posterior transferencia a 23 °C hasta por un mes, es adecuado y durante ese periodo no se presentaran problemas de brotado. Las fracciones de giberelinas (F2 y F3) parecen ser las giberelinas más involucradas con el crecimiento del brote. El análisis de las giberelinas ligadas mostró una nueva giberelina diferente a las obtenidas en forma libre. El análisis de giberelinas por cromatografía de capa fina presuntivamente identificó a las fracciones GA<sub>4</sub> y el metil ester de la GA<sub>9</sub>; no obstante, esto no fue demostrado por análisis de las fracciones a través del HPLC.

# ÍNDICE GENERAL

Contenido.	Página.
ÍNDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
Resumen.	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.	4
II.1. Aspectos generales del ajo	4
II.1.1. Origen e historia del ajo	4
II.1.2. Importancia del ajo como alimento	5
II.2. Producción y Comercio Mundial del ajo	6
II.3. La actividad económica de ajo en México	8
II.4. Procedimientos de almacenamiento	10
II.5. Morfología de la planta de ajo	13
II.5.1. Bulbo	15
II.5.2. Bulbillo y Diente	15
II.6. Fisiología del cultivo	17
II.6.1. Letargo	18
II.6.2. Fitohormonas en la regulación del letargo	20
II.6.2.1. Giberelinas	21
II.6.2.2. Función de las Giberelinas	23
II.6.2.3. Biosíntesis de las Giberelinas	24
II.6.2.4. Factores que influyen en los niveles de Giberelinas	26
III. HIPÓTESIS	28

IV. OBJETIVOS	29
General	29
Específicos	29
V. METODOLOGÍA	30
V.1. Materiales	30
V.1.1. Origen del material biológico	30
V.2. Métodos	30
V.2.1. Procedimiento Experimental	30
V.2.2. Determinación del índice de brotación	32
V.2.3. Extracción de giberelinas	32
V.2.3.1. Extracción de Giberelinas libres	32
V.2.3.2. Extracción de Giberelinas ligadas	33
V.2.4. Identificación presuntiva de giberelinas por Cromatografía de Capa Fina	35
V.2.5. Separación de Giberelinas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	35
V.2.6. Cuantificación de Giberelinas	37
V.3. Diseño Experimental	37
VI. RESULTADOS	38
VI.1. Efecto de la temperatura sobre el índice de brotación	38
VI.1.1. Almacenamiento a Temperatura Ambiente	38
VI.1.2. Almacenamiento a 15 °C	42
VI.1.3. Almacenamiento a 0 °C	44
VI.2. Identificación presuntiva de Giberelinas por Cromatografía en Capa Fina (TLC)	46
VI.3. Separación de Giberelinas	51
VI.3.1. Giberelinas libres	51
VI.3.2. Giberelinas ligadas	54
VI.4. Cuantificación de Giberelinas	57
VI.4.1. Giberelinas Libres	57

VI.4.1.1. Bulbos almacenados a Temperatura Ambiente y su transferencia a 23 °C	57
VI.4.1.2. Bulbos almacenados a 15 °C y su transferencia a 23 °C	60
VI.4.1.3. Bulbos almacenados a 0 °C y su transferencia a 23 °C	62
VI.3.2. Giberelinas ligadas	64
VII. DISCUSIÓN	68
VII.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el índice de brotación.	68
VII.1.1. Almacenamiento a Temperatura Ambiente y su transferencia a 23°C	68
VII.1.2. Almacenamiento a 15 °C y su transferencia a 23 °C	68
VII.1.3. Almacenamiento a 0 °C y su transferencia a 23 °C	69
VII.2. Identificación presuntiva de Giberelinas por Cromatografía en Capa Fina (TLC)	70
VII.3. Separación de giberelinas	71
VII.3.1. Giberelinas libres	71
VII.3.2. Giberelinas ligadas	72
VII.4. Cuantificación de Giberelinas	73
VII.4.1. Giberelinas libres	73
VII.4.1.1. Almacenamiento a Temperatura Ambiente y su transferencia a 23°C	73
VII.4.2. Almacenamiento de ajo a 15 °C y sus transferencias a 23 °C	73
VII.4.3. Almacenamiento del ajo a 0°C y sus transferencias a 23°C	74
VII.4.3.1. giberelinas ligadas	75
VIII. CONCLUSIONES	76
IX.BIBLIOGRAFÍA	79

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales países productores de ajo en el periodo 2000-2004.	7
2	Precio medio por Kg de ajo para exportación de los principales países exportadores de ajo.	8
3	Superficie cosechada (Has) de ajo en los estados productores más importantes de la República Mexicana, período 1999-2003.	9
4	Cambios en los precios por kilogramo de ajo (pesos) en distintas centrales de abasto en el periodo de 1993-2005.	10
5	Gradiente de concentración de las fases utilizadas para la separación de Giberelinas por HPLC.	36
6	Valores de Índice de Brotación (IB%) y su significancia estadística en ajo 'Perla' almacenado a Temperatura Ambiente y su transferencia a 23 °C durante 15 y 30 días.	39
7	Valores de Índice de Brotación (IB%) y su significancia estadística en ajo 'Perla' almacenado a 15 °C y su transferencia a 23 °C durante 15 y 30 días.	42
8	Valores de Índice de Brotación (IB%) y su significancia estadística en ajo 'Perla' almacenado a 0 °C y su transferencia a 23 °C durante 15 y 30 días.	45
9	Factor de retención ( $R_f$ ) de estándares comerciales y de extractos de ajo almacenados a 0 °C durante 15 y 90 días en su fracción libre y ligada.	47
10	Factor de retención ( $R_f$ ) de extractos de ajo transferidos de 0 °C a 23 °C durante un periodo de 15 y 30 días.	49
11	Contenido de fracciones tipo giberelinas libres y ligadas de ajo 'Perla' durante los dos primeros periodos de almacenamiento a diferentes temperaturas.	65

- 12 Contenido de fracciones tipo giberelinas libres y ligadas de bulbos de ajo 'Perla' almacenado a diferentes temperaturas y sus transferencias a 23 °C por 15 Y 30 días.

67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ubicación de la región de origen del ajo	4
2	Diseño del almacenamiento a granel de ajos	11
3	Partes de la planta de ajo	14
4A	Corte longitudinal del diente de ajo	15
4B	Corte transversal del diente de ajo	15
5	Bulbillo de brotación	16
6	Ciclo del cultivo del ajo	17
7	Estructura de ent-giberelina	22
8	Giberelinas Conjugadas	23
9	Síntesis de GA <sub>12</sub> a partir del ácido mavalónico	24
10	Biosíntesis de Giberelinas a partir de GA <sub>12</sub>	25
11	Procedimiento general llevado durante el estudio	31
12	Procedimiento para la separación de giberelinas libres y ligadas de las hojas de brotación de ajo 'Perla'	34
13	Índice de brotación para dientes de ajo Cv. Perla almacenados a Temperatura Ambiente y sus transferencias a 23°C durante 15 y 30 días	40
14	Temperaturas medias, máximas y mínimas en la ciudad de Querétaro durante los meses de Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre del 2004	41
15	Índice de brotación para dientes de ajo almacenados a 15 °C y sus transferencias a 23°C durante 15 y 30 días	44
16	Índice de brotación para dientes de ajo almacenados a 0°C y sus transferencias a 23°C durante 15 y 30 días	46
17A	Cromatografía de capa fina de los estándares comerciales de Giberelinas	48
17B	Cromatografía de los extractos de ajo (fracción libre y ligada) almacenados a 0 °C durante 15 y 90 días	48

18A	Cromatografía de las fracciones libres y ligadas de ajo transferido al inicio del almacenamiento a 23 °C durante 15 y 30 días	50
18B	Cromatografía de fracciones libres y ligadas de ajo almacenado durante 90 días a 0°C y posteriormente transferidos a 23°C durante 15 y 30 días	50
19	Cromatograma obtenido de un extracto de ajo 'Perla' almacenado a Temperatura Ambiente-30 días, 15°C-22días y 0°C-30días	51
20A	Espectros de los estándares comerciales GA <sub>3</sub> ,GA <sub>4</sub> ,GA <sub>7</sub> y GA <sub>9</sub>	52
20B	Espectros de F1,F2 y F3 de los bulbos almacenados 30 días a Temperatura Ambiente	52
21A	Cromatograma de los extractos libres de ajo almacenado a 15°C y trasferido a 23°C	53
21B	Cromatograma de los extractos libres de ajo almacenado a 0°C y trasferido a 23°C	53
21C	Cromatograma de los extractos libres de ajo almacenado a Temperatura Ambiente y trasferido a 23°C	53
22	Cromatograma de los extractos hidrolizados de ajo almacenado a 15°C, 0°C y Temperatura Ambiente al inicio y 15 días de almacenamiento	56
23	Espectro de los extractos hidrolizados de ajos almacenados a 15°C, Temperatura Ambiente y 0°C	56
24	Cambios en el contenido de las fracciones F1,F2 y F3 e índice de brotación de ajo almacenado a Temperatura Ambiente	58
24A	Durante 90 días en forma continua	58
24B	Transferido a 23°C por 15 días	58
24C	Transferido a 23°C por 30 días	58
25	Cambios en el contenido de las fracciones F1,F2 y F3 e índice de brotación de ajo almacenado a 15°C	61

25A	Durante 90 días en forma continua	61
25B	Transferido a 23°C por 15 días	61
25C	Transferido a 23°C por 30 días	61
26	Cambios en el contenido de las fracciones F1,F2 y F3 e índice de brotación de ajo almacenado a 0 °C	63
26A	Durante 90 días en forma continua	63
26B	Transferido a 23°C por 15 días	63
26C	Transferido a 23°C por 30 días	63

## I. INTRODUCCION

El ajo, *Allium Sativum* L. y su antecesor silvestre *Allium longicuspis* Regel, son especies que pertenecen a la familia Alliaceae, y su origen se reporta en las regiones de Asia Central.

Su aroma y sabor característicos hacen del ajo una de las especies culinarias más populares en todo el mundo, en la cocina mediterránea y oriental es un elemento esencial. En México el consumo de ajo es fundamentalmente en fresco; pero también la agroindustria procesa ajo en diversos productos como salmueras, pastas, sales y ajo deshidratado, entre otros.

Es una planta bulbosa, el bulbo está compuesto de pequeños y diversos bulbillos o "dientes" los cuales pueden ser blancos o púrpuras dependiendo del color de las membranas o túnicas que los cubren. El ajo se reproduce casi exclusivamente por vía agámica, esto lo transforma en una especie plurianual en la cual, a las limitaciones impuestas por el ambiente actual, se suman los efectos ambientales anteriores acumulados en el "diente".

La secuencia de procesos hasta la obtención de una "semilla" de ajo, se inicia en el campo durante el llenado del bulbo y culmina en la poscosecha al reasumir los bulbillos el crecimiento macroscópico. En este proceso se presentan dos ambientes marcadamente diferentes, el de la bulbificación y el del almacenamiento. En este último periodo, los bulbos de ajo se encuentran en estado de reposo o letargo y los cambios en su fisiología parecen menores; no obstante, las condiciones de dicho almacenamiento provocan cambios al interior de cada uno de los dientes que los llevan a romper dicho estado el cual termina el periodo de almacenamiento del producto. Para que se de el proceso de bulbificación intervienen fitohormonas, las cuales en pequeñas cantidades se encargan de regular los procesos fisiológicos de la misma.

En México, la conservación de este producto, se lleva a cabo a temperatura ambiente pues se considera que es un producto poco perecedero y bajo este criterio puede ser almacenado en buenas condiciones por 1 – 2 meses a temperaturas de 20° a 30° C con baja humedad relativa (<75 %). Sin embargo, dentro de estas condiciones los bulbos pueden ablandarse, contraerse y volverse esponjosos debido a la pérdida de agua y al inicio del proceso de ruptura de letargo.

Para largos periodos de almacenamiento se recomienda que el ajo se mantenga a temperaturas de -1 hasta 0 °C y con baja humedad relativa (60-70%). La aeración es también necesaria para evitar la acumulación de humedad y el consecuente desarrollo de hongos. No obstante, estas condiciones no son las que comúnmente se aplican en el comercio nacional aunque esta práctica se está incrementando.

Uno de los principales problemas que enfrenta la cadena de comercialización de ajo es la brotación; la cual ocasiona una serie de cambios fisiológicos que lo llevan a perder rápidamente su valor comercial. Este proceso se ve afectado fuertemente por la temperatura de almacenamiento entre otros factores. Cuando el ajo se almacena a bajas temperaturas y luego se transfiere a temperatura ambiente para su venta, se induce el proceso de brotación que ocasiona una reducción de la vida de anaquel.

El proceso de brotación, o ruptura del letargo, se ve favorecido por las temperaturas intermedias (5 -20 °C), las cuales inducen la síntesis de giberelinas que a su vez desencadenan el proceso. No obstante, también hay evidencia que la temperatura de 0°C induce el mismo proceso y se supone que esta síntesis rompe el letargo de los dientes de ajo cuando se transfieren a temperatura ambiente; pero no se conoce si el proceso es simplemente una síntesis de giberelinas activas o existe un proceso de activación de las mismas y tampoco se conoce si el periodo de almacenamiento a baja temperatura tiene efectos diferentes en la síntesis de esta fitohormona o en su activación.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tiempo de conservación a 0 °C y 15 °C y la transferencia del producto a Temperatura Ambiente en la brotación y contenido de giberelinas libres y ligadas en ajo 'Perla' y determinar los periodos de vida de anaquel máxima de este producto en estas condiciones de almacenamiento.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Aspectos generales del ajo

#### II.1.1. Origen e historia del ajo

El ajo nace en el antiguo Turkeistán (ubicado entre China y Afganistán e Irán) desde donde fue llevado a China, India, norte de Europa y los márgenes del Mediterráneo (Figura 1) (Seelig, 1974).

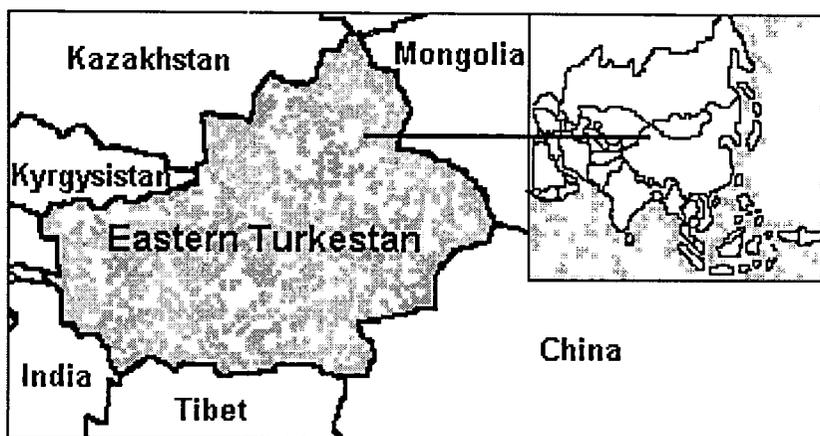


Figura1. Ubicación de la región de origen del ajo. (saberes y sabores, 2005)

Existen evidencias a favor de su origen asiático ya que se utilizaba como remedio curativo en la India en siglo VI antes de Cristo. En las pirámides egipcias (2700-2100 a.C.) existen pruebas de su consumo y cultivo (García-Alonso, 1998), en esa época el ajo fue elevado a rango de divinidad por lo que formó parte de la dieta de las clases más privilegiadas del antiguo Egipto, también en ese país se ordenaba que los obreros y esclavos que construían las pirámides lo ingirieran en su alimentación diaria ya que según la tradición permitía recuperar la fuerza (Anónimo, 1999).

Los gladiadores romanos lo ingerían en cantidades abundantes, ya que les atribuía virtudes como las de mayor vigor y fuerza, necesarias para los trabajos que estos realizaban. En la Edad Media, se le consideró como un importante preventivo del cólera y desde entonces, se le tiene en primer lugar entre los medicamentos vegetales.

En América Latina, se considera que los primeros ajos llegaron a Cuba hace cerca de 500 años con los colonizadores españoles. La llegada del producto a nuestro país todavía no está bien definida pero se considera que desde principios del siglo veinte se sembraba ajo en la región del Bajío alcanzando una importancia comercial en la década de los cuarenta (Anónimo, 1999).

#### II.1.2. Importancia del ajo como alimento

El ajo es probablemente la segunda especie del género *Allium* más consumida en el mundo. Éste es un componente ampliamente utilizado en todas las cocinas del mundo debido a su sabor característico y también por los beneficios a la salud (Brewster, 1994).

Debido a su gran uso en la gastronomía, lo encontramos en diferentes formas procesado tales como polvo, en escamas y sal, sin embargo en nuestro país su consumo sigue siendo en fresco fundamentalmente (Arpide, 2005).

El ajo está ubicado como una de las hortalizas a la que se le han encontrado infinidad de usos, desde los que van como condimento alimenticio, hasta los usos medicinales y casi mágicos que algunos suelen atribuirle (Anónimo, 1999) sin embargo, el aprovechamiento del ajo no radica en sus propiedades bactericidas, antisépticas o medicinales en general (García-Alonso, 1998), sino en su sabor característico que hace que sea utilizado en diversos platillos, pero principalmente en carnes, vegetales, sopas, ensaladas y pan (Seelig, 1974).

## II.2 Producción y Comercio Mundial del ajo

De acuerdo a un informe dado por el Instituto de Desarrollo Rural de Argentina, el mercado mundial de ajo ha crecido gracias a los cambios producidos en los hábitos de consumo y se reconocen cuatro grandes centros mundiales de producción y consumo. El primero es el centro asiático, formado por India, Indonesia, China, las dos Coreas y Tailandia que producen el 83% del ajo del mundo; el segundo es el centro europeo integrado por España, Francia e Italia (a los que se agregan Egipto y Turquía por su proximidad geográfica) que aportan el 5% del ajo mundial; el tercer grupo esta conformado por México y Estados Unidos cuya aportación es 3%, y finalmente el grupo centro sudamericano, integrado por Brasil, Argentina y Chile, este centro produce alrededor del 1.5% de la producción global (Jacqueline, 2005).

Las regiones con invierno suave, con lluvias ligeras seguidas de primavera y verano secos se consideran como las más adecuadas o ideales para la producción del ajo (Brewster, 1994). A nivel mundial se tiene un progresivo interés en el cultivo de esta hortaliza tanto en África como en América del Norte y central. En el continente Americano el país que ha tenido una notable evolución en el mercado del ajo es Estados Unidos debido quizá a la influencia de las colonias hispanas. En éste país el estado de California es el que tiene la mayor producción y el 65% de la producción se destina a la industria de ajo deshidratado mientras que sólo el 20% se consume en fresco (García-Alonso, 1998).

En el Cuadro 1 se observa que la producción de ajo ha incrementado en países asiáticos, en tanto que hay una notable disminución en los países de América del Sur, la situación en México es distinta ya que a pesar de tener una disminución de producción en el 2002 esta volvió a incrementarse y se ha mantenido constante por dos años.

Cuadro 1. Principales países productores de ajo en el periodo 2000-2004.

Producción (TM)	2000	2001	2002	2003	2004
China	7,486,112	7,894,066	9,080,049	10,078,351	10,578,00
India	524,600	496,800	500,000	500,000	500,000
Ex. URSSS	397,993	455,816	437,246	407,558	428,435
Rep. Corea	474,388	406,385	391,182	378,846	378,846
USA	253,150	266,570	256,280	283,090	236,960
Egipto	266,555	215,420	216,000	220,000	220,000
España	162,833	183,016	195,178	188,900	168,300
Argentina	149,186	133,818	125,228	145,891	142,735
Turquía	102,000	103,000	96,000	125,000	125,000
Brasil	84,215	101,917	114,436	122,133	89,674
México	55,432	55,766	41,300	44,431	44,431

TM= tonelada métrica

(FAO, 2005)

La disminución de la producción de ajo en la Unión Europea y en los otros países productores se debe principalmente a la incursión de ajo de China en los mercados internacionales ya que los empresarios agrícolas, los industriales y los exportadores europeos y americanos no pueden competir en precio con las importaciones procedentes de este país debido al diferencial de costo de la mano de obra (García-Alonso, 1998).

Esto ha constituido la causa más importante que ha ocasionado una disminución en la producción de ajo del resto de los países productores. En el Cuadro 2 se listan los precios internacionales (dólares/Kg.) de ajo procedente de distintos países donde se observa claramente los bajos costos del ajo procedente de las regiones asiáticas. (FAO, 2001).

Cuadro 2. Precio medio por kg de ajo para exportación de los principales países exportadores de ajo.

País Exportador	Precio (dólares/Kg)
China	0,54
China-RAE de Hong Kong	0,31
Argentina	1,08
España	1,71
México	2,27
Países Bajos	1,05
Singapur	0,49
Francia	2,17

(FAO, 2001)

### II.3 La actividad económica de ajo en México

En México, uno de los estados con una enorme tradición en el cultivo de ajo es Guanajuato, se considera que su producción comercial así como su exportación se da a partir de los años cuarenta.

En 1997 se estimó que ese estado colaboró con el 50 a 70 % de las cuotas de exportación, lo que lo ubico no sólo como el segundo productor, sino también como una de las entidades exportadoras más importantes del país (Anónimo, 1999).

El ajo se cultiva en 25 estados de la República Mexicana de los cuales Zacatecas, Guanajuato, Aguascalientes, Puebla y Sonora son los cinco estados más importantes donde se concentra el 82% de la superficie sembrada a nivel nacional (Cuadro 3) (SAGARPA, 2003).

Cuadro 3. Superficie cosechada (Has) de ajo en los estados productores más importantes de la República Mexicana, período 1999-2003.

ESTADO	1999	2000	2001	2002	2003
Zacatecas	2,260	1,878	1,776	1,396	1,682
Guanajuato	1,877	2,491	2,394	1,009	1,456
Aguascalientes	612	509	307	324	306
Baja California	656	427	459	487	476
Puebla	938	392	448	421	406
Sonora	660	756	462	397	328
Otros	1056	968	815.5	720	749
NACIONAL	8,059	7,420.70	6,661.50	4,753.96	5,403

(SAGARPA, 2003)

Considerando los volúmenes de producción durante los años de 1998 al 2002; la producción de México se ha reducido notablemente de 66 700 a 41 123 toneladas, sin embargo sigue teniendo presencia internacional debido a su calidad (SIACON, 2002).

Con una larga trayectoria en su cultivo, los productores mexicanos han realizado modificaciones en los mecanismos de distribución del producto con el fin de cumplir con las exigencias actuales. Del total de ajo fresco que se destina para el mercado nacional, se calcula que el 90% se canaliza a las principales centrales de abasto del país como son la del Distrito Federal, Guadalajara y Monterrey, el 10% restante se comercializa en forma directa con las tiendas de autoservicio (Heredia y Delgadillo, 2000).

En el Cuadro 4 se puede observar que los precios pagados al mayoreo en las principales centrales de abasto mostraron un importante crecimiento, esto se puede deber a los cambios que se presentan en el mercado internacional de esta hortaliza, que obligó a fuertes reducciones de la superficie sembrada y a los altos aranceles fijados a los ajos de importación.

Cuadro 4. Cambios en los precios por kilogramo de ajo (pesos) en distintas centrales de abasto en el periodo de 1993-2005.

Año	D.F.	Guadalajara	Monterrey
1993	4.23	2.44	4.35
1995	10.14	9.25	10.59
1998	17.18	15.91	18.50
2005	17.00	16.50	18.00

(Heredia y Delgadillo, 2000) y (SAGARPA, 2005)

#### II.4. Procedimientos de almacenamiento

El ajo tiene mayor capacidad de conservación respecto a otras hortalizas debido a la composición estructural de los bulbos y a sus características fisiológicas tales como baja actividad metabólica, baja tasa de respiración ( $5 \text{ ml CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{ hr}^{-1}$  a  $5^\circ\text{C}$ ) y poca producción de etileno ( $0.1 \text{ ml Kg}^{-1} \text{ hr}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ ). La vida comercial también está dada por el tipo de cultivar, madurez y por factores externos de cultivo, cosecha y curado que influyen en la calidad del producto a conservar (Rivero, 1997).

Para tener un buen almacenamiento del ajo, se deben de tomar en cuenta ciertos cuidados previos al mismo.

Por un lado un manejo adecuado de los bulbos para no producir daños mecánicos que disminuyen la calidad y aumentan la incidencia de enfermedades, y por otro, realizar un buen “curado”, es decir desecamiento de las catáfilas externas y de la zona del cuello para evitar la pérdida de agua y el ingreso de patógenos (Rivero,1997). Si no se realiza de una manera correcta este procedimiento, el bulbo perderá rápidamente su calidad y aun más cuando se almacena arriba de 0°C (Ryall y Lipton, 1972).

La Figura 2 muestra un diseño de un adecuado almacén de ajos a granel; los sistemas de ventilación deben diseñarse para proporcionar aire al almacén desde la parte inferior a razón de 2 pies cúbicos por minuto por cada pie cúbico de producto, si el producto esta en cajas de cartón, el apilado debe permitir el movimiento libre del aire, para lo cual las filas de recipientes se acomodan paralelas a la dirección del flujo de aire manteniendo un espacio entre ellas de 6 a 7 pulgadas (Kader, 1992).

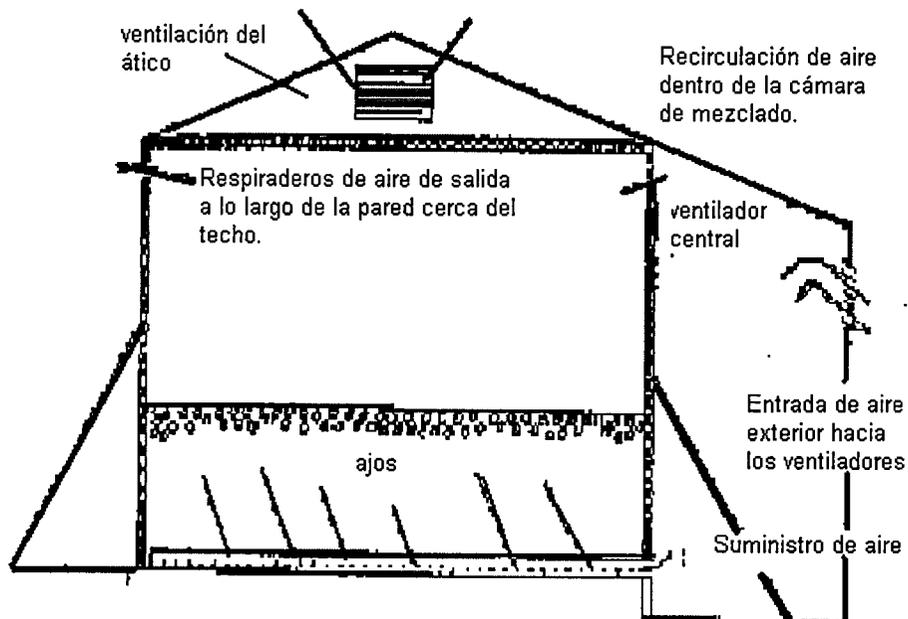


Figura 2. Diseño del almacenamiento a granel de ajos (Kader ,1992).

Por otro lado es conveniente tener en cuenta las siguientes consideraciones para evitar el deterioro de los bulbos y no comprometer su conservación:

- A temperaturas entre 5 y 18 °C el ajo brota fácilmente.
- Humedades superiores al 70% favorecen la emisión de raíces y aumentan la incidencia de enfermedades; humedades inferiores producen pérdida de catáfilas externas.
- Inadecuada ventilación puede provocar una disminución excesiva del oxígeno, los bulbos se tornan amarillos, cerosos, se arrugan y se vuelven translucidos.
- El producto almacenado que esté en mal estado se debe sacar ya que es una fuente de producción de etileno y puede inducir la brotación (Rivero , 1997).

Todos las consideraciones anteriormente mencionadas son fundamentales para que el ajo mantenga su calidad; evitando la pérdida de peso, los cambios en la textura y en el color. López-Echevarría (2004), después de almacenar durante 120 días ajos obtuvo una menor pérdida de peso en los que permanecieron a 0 °C y 5 °C con respecto a los almacenados a Temperatura Ambiente, sin embargo a los 190 días los bulbos almacenados a 5 °C fueron los que obtuvieron la mayor pérdida de peso (33%) en tanto que los almacenados a 0 °C tuvieron pérdidas de 3.6 a 5%. Este mismo autor al evaluar textura y color obtuvo menos cambios en los ajos almacenados a 0 °C sin humedad relativa controlada y 0 °C con 70% HR

Ryall y Lipton (1972), recomiendan temperaturas de -0.6 a 0 °C y 80% de humedad relativa para almacenar ajo por un periodo mínimo de 6 ó 7 meses. Altas temperaturas (26.4 – 32 °C) son satisfactorias para almacenarlo por un mes. Por su parte Pantastico y col. (1975), recomiendan la temperatura de 0 °C con 65% de humedad relativa para almacenar bulbos secos de ajo por 7 ó 9 meses.

El ajo se puede almacenar en un amplio rango de temperaturas pero su brotación se presenta más rápidamente cuando se almacena a 4.4 °C es por esto que se recomiendan bajas temperaturas en conjunto con bajas humedades de almacenamiento para disminuir la probabilidad de desarrollo y formación de nuevas raíces (Warade y Shinde, 1998).

Vázquez-Barrios (2005), menciona que las mejores condiciones para inhibir la brotación y así mismo incrementar la vida de anaquel en ajos 'Taiwan' y 'Chino' son 0 °C y 30 °C sin importar si estos son irradiados o no, mientras que el almacenamiento a 15 °C desencadenó los procesos de brotación en las dos variedades incluso en las muestras irradiadas.

Para que el ajo pueda tener una buena comercialización debe de estar en periodo de letargo, este estado esta controlado genéticamente aunque también existen factores ambientales que pueden tener influencia sobre él, principalmente la temperatura de almacenamiento. Como ya se indicó la temperatura intermedia (15 °C) provoca que el proceso de brotación se presente ocasionando que el tiempo de comercialización se disminuya debido a que la calidad del ajo se deteriora lo cual provoca una pérdida económica para los productores.

## II.5. Morfología de la planta de ajo

El ajo es un miembro del genero *Allium* y de la familia Amaryllis (Amaryllidaceae), es un bulbo y su crecimiento es similar a el de la cebolla (*Allium cepa*) (Seelig, 1974). Purseglove (1985) describe al ajo como planta herbácea erecta de 30 a 60 cm de altura y de raíces adventicias superficiales. Los bulbos están compuestos por un tallo discoidal, hojas escamosas secas y delgadas que constituyen la base de las hojas fotosintéticamente funcionales (hojas aéreas) y bulbillos o "dientes" formados de yemas axilares de las hojas funcionales más jóvenes éstas hojas se encargan de llevar a cabo la fotosíntesis de la planta. La Figura 3 muestra las principales partes que forman la planta del ajo.

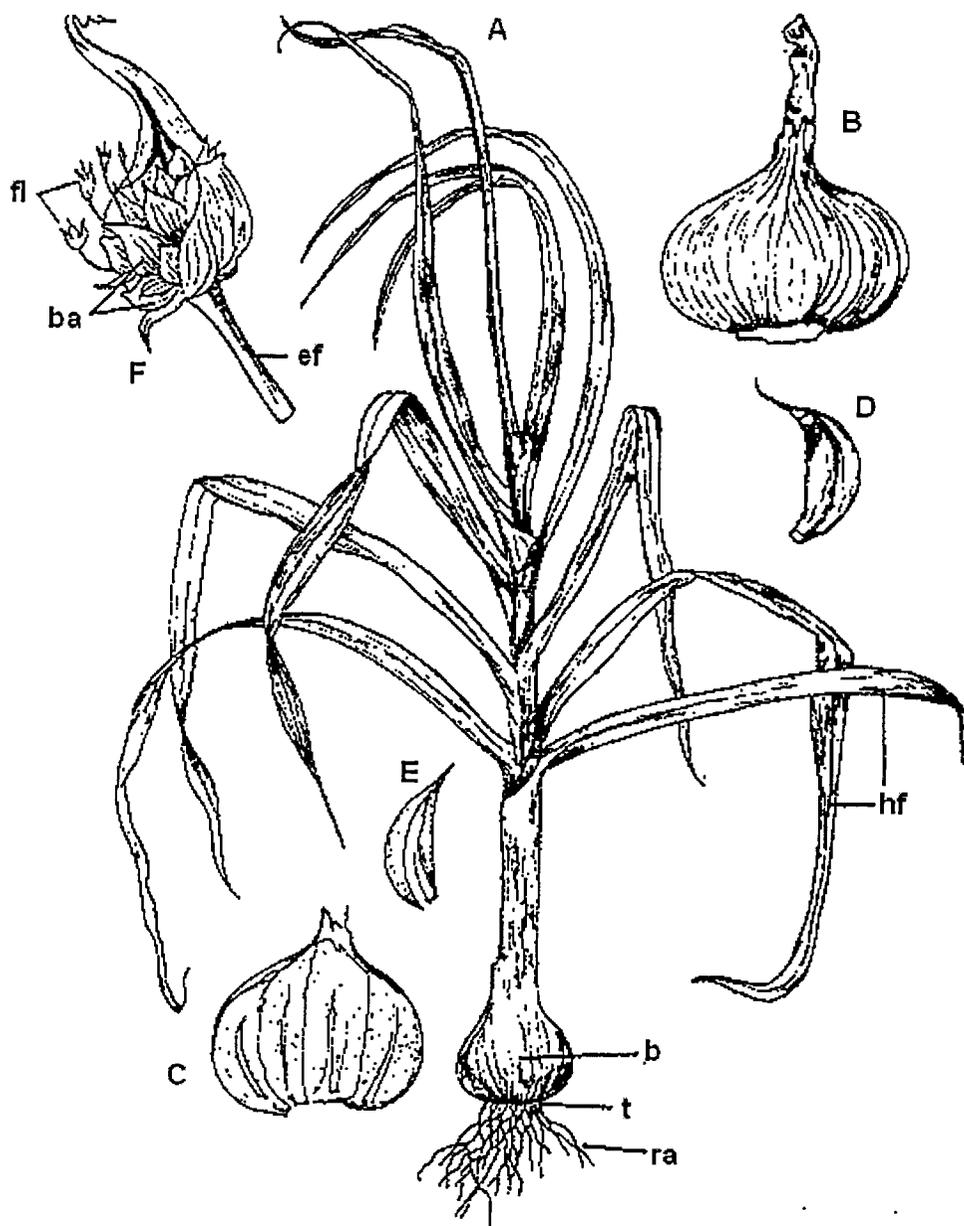


Figura 3. Partes de la planta de ajo. **A.** Planta joven de ajo que muestra raíces adventicias (ra), tallo (t), bulbo (b) y hojas funcionales (hf); **B.** bulbo; **C.** sección longitudinal del bulbo; **D.** bulbillo o diente; **E.** sección longitudinal del bulbillo; **F.** inflorescencia, nótese el escapo floral (ef), bulbillos aéreos (ba) y flores (fl) (Purseglove, 1985).

### II.5.1. Bulbo

Cada bulbo de ajo consiste de hojas escamosas-membranosas de protección que no cubren las yemas; otra serie de hojas cubre cada una de ellas a determinado número de yemas axilares (dientes) y más distalmente un número de hojas funcionales. Los dientes son producidos en la axila de la hoja, sobre el lado del bulbo en el cual la hoja diverge (Mann, 1952)

### II.5.2. Bulbillo y Diente

Purseglove (1985) mencionó que cada bulbillo consiste de una envoltura protectora, una hoja de almacenamiento engrosada y una pequeña yema central. Bell y Bryan (1991) señalan que cada bulbillo tiene un prófalo protector u hoja de protección en la parte más externa, una segunda hoja escamosa de almacenamiento, una tercera llamada hoja de brotación y hojas subsecuentes llamadas funcionales (Figuras 4A y 4B)

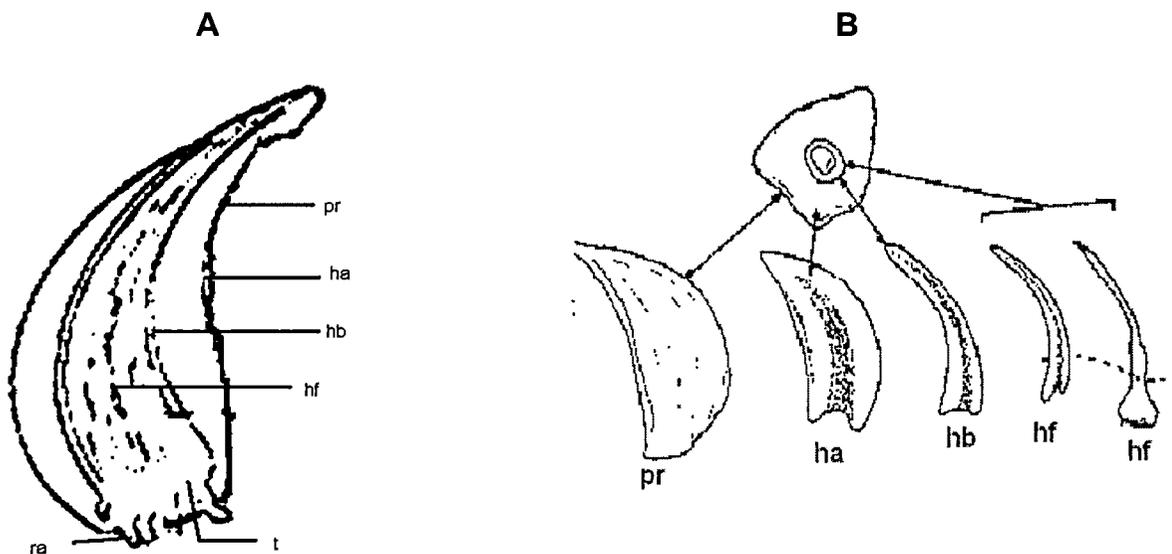


Figura4. Bulbillo o diente de ajo: **A** corte longitudinal; **B**. Corte transversal y separación longitudinal de sus partes; prófalo (pr), hoja de almacenamiento (ha), hoja de brotación (hb), hoja funcional (hf), raíces adventicias (ra) y tallo (t) (Mann, 1952).

Durante la brotación, la tercera hoja se elonga y emerge del poro en el ápice de la hoja de almacenamiento, luego emerge la primera hoja funcional (hf) a través del poro, cerca de la hoja de brotación (Figura 5).

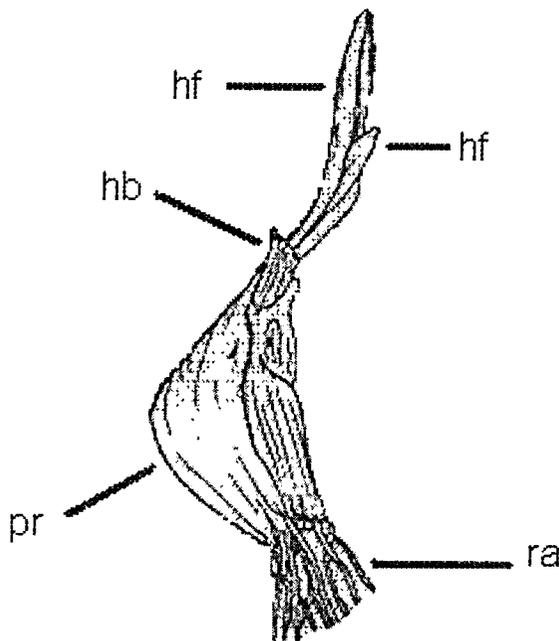


Figura 5. Bulbillillo de brotación (Mann, 1952)

En el desarrollo de los dientes de ajo intervienen diversos factores. Cuando la temperatura del aire aumenta, cada yema lateral inicia en forma sucesiva el desarrollo de hojas y crecen vigorosamente; sin embargo, las dos primeras hojas de cada yema lateral se diferencian de una manera particular, se promueven e inician debido a fotoperíodos largos, y se desarrollan en envolturas engrosadas. La primera envoltura (la más vieja) deja de engrosar cuando la segunda empieza a aumentar de tamaño, pero sigue creciendo al mismo tiempo que la segunda hoja para poder encerrarla (Heredia y Delgadillo, 2000).

## II.6. Fisiología del Cultivo

El ajo no procede de una semilla, todas las plantas son propagadas por la plantación de sus bulbillos o "dientes" (Seelig, 1974). En las hortalizas, el ajo presenta un caso extremo en el proceso de control del ambiente sobre la expresión genotípica. Cada planta de ajo persiste y se multiplica a través de los años como un individuo con ciclo plurianual, los bulbillos representan clones del individuo que lo originó por lo que su desarrollo posterior como nueva planta estará supeditado a las condiciones ambientales en las que transcurrió su ontogenia.

Durante el desarrollo normal esta nueva planta pasará por etapas sucesivas (Figura 6) estrictamente ligadas al nuevo ambiente, por lo que, la posibilidad final para que esta planta prospere va a estar dada por el efecto conjunto de todos los condicionantes ambientales actuales y anteriores (Portela, 1996).

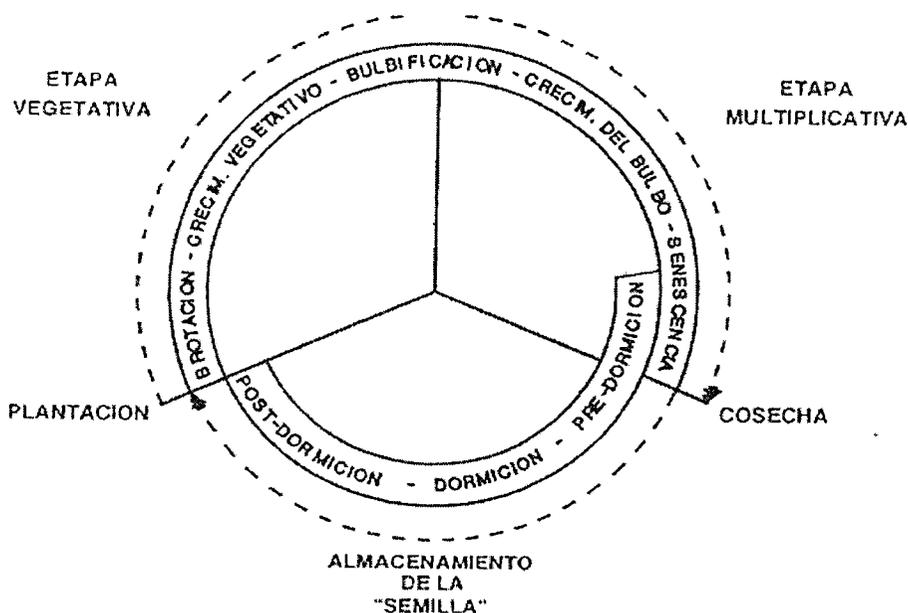


Figura 6. Ciclo del cultivo del ajo (Portela, 1996).

### II.6.1. Letargo

El letargo o dormancia es un estado fisiológico que presentan muchos órganos vegetales como las semillas, yemas y bulbos en el que el crecimiento se suspende temporalmente con el objeto de sincronizar el desarrollo general con los factores ambientales permitiéndose superar condiciones ambientales adversas. Entre los factores externos están la temperatura y la disponibilidad de agua; en conjunto con estos, otros factores internos pueden interactuar para impedir el crecimiento, aún cuando las condiciones ambientales sean favorables (Weaver, 1976).

Se podría decir que las plantas entran en un estado de letargo instantáneamente sin embargo no es así ya que pasan por tres etapas, la primera es conocida como pre-dormancia o dormancia tardía, en la cual las plantas están a una fase en la que no han perdido completamente la habilidad del crecimiento. En esta etapa se pueden utilizar distintos tratamientos para reiniciar su crecimiento. La segunda etapa es llamada dormancia profunda la cual es considerada como la expresión de un inhibidor endógeno y la etapa tres o de post-dormancia, en la cual la planta sale del estado de letargo (Saure, 1985).

La dormancia en bulbos es esencial para que puedan sobrevivir a las bajas temperaturas presentes durante el invierno (Raven y col., 1986). Los bulbos del género *Allium* son órganos dormantes adaptados para mantener a la planta disponible durante un periodo desfavorable de crecimiento (Brewster, 1994). Inmediatamente después de su cosecha, los dientes de ajo están profundamente en letargo (Warade y Shinde, 1998); durante y al final del letargo el tejido de las plantas comienzan con numerosos cambios físicos y fisiológicos para preparar a la planta para el invierno, éste proceso se conoce como aclimatación. El principal factor involucrado en la inducción de dormancia en brotes es la disminución de horas luz ya que generalmente se encuentra una mayor concentración de inhibidores de crecimiento en hojas y brotes en estas condiciones (Raven y col., 1986).

El número de días para que el brote emerja de los dientes plantados (en condiciones óptimas de crecimiento) varía con el grado de maduración de los dientes y con la temperatura de almacenamiento. Los dientes que tienen el follaje verde requieren más tiempo para la brotación que los dientes maduros (Warade y Shinde, 1998).

Después del período de letargo, el crecimiento en la planta se reanuda cuando la temperatura es templada o cuando el agua o cualquier otro factor limitante ésta de nuevo disponible (Raven y Curtis, 1975). Para que se lleve a cabo este proceso conocido como ruptura del letargo es necesario que se realicen tres fases.

1. En esta fase se elimina la primera causa de la dormancia, mediante la producción de enzimas más activas a bajas temperaturas. Estos cambios causan la transición de la dormancia profunda a la tardía.
2. Fase catabólica; con alta actividad que se caracteriza por el incremento en la actividad de giberelinas, las cuales promueven la biosíntesis y la activación de enzimas hidrolíticas como amilasas, proteasas y ribonucleasas ocasionando el traslado de las reservas que requiere la planta para su crecimiento. Esta etapa requiere de altas temperaturas, y es marcada por el incremento del brote indicando que la transición de profunda dormancia a dormancia tardía ha ocurrido.
3. Hay un incremento en la actividad de giberelinas y citocininas, continúa la transportación de reservas, la remoción de inhibidores endógenos y el aumento en la actividad de auxinas. La finalización de esta fase se manifiesta por el inicio del proceso de brotación.  
(Saure, 1985).

## II.6.2. Fitohormonas en la regulación del letargo

Las fitohormonas desempeñan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de los vegetales. Se definen como compuestos orgánicos (diferentes de los nutrientes) que en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican los procesos fisiológicos.

En la actualidad, se reconocen cinco tipos de fitohormonas de las plantas: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido absicico (ABA).

El letargo es controlado por mecanismos hormonales; y se ha planteado la idea que la correlación o balance entre inhibidores y promotores endógenos (ABA y giberelinas) que ocurre en algunas yemas y semillas, determina tanto el inicio como la terminación del letargo, si hay una proporción elevada de inhibidores con respecto a los promotores se induce el reposo y lo contrario pone fin al letargo (Weaver, 1976).

Los niveles de hormonas de crecimiento son bajos en bulbos dormantes, pero conforme comienza la brotación hay un incremento en la actividad de citocininas, seguida de giberelinas y después las auxinas. El almacenamiento de bulbos a temperaturas templadas (25 – 30°C) previene el incremento en la actividad de las citocininas que ocurre en bulbos almacenados a bajas temperaturas (Brewster, 1994). No obstante, también se ha señalado la posibilidad de que los promotores de crecimiento (giberelinas) se encuentren preformados y que la ruptura de letargo implica una transformación de estos a su estado activo. Aunque este aspecto no ha sido demostrado plenamente, Rakimbaev y Ol'shanskaya (1976) plantearon la hipótesis de que un crecimiento activo es acompañado por un incremento en los niveles de la actividad de giberelinas, como un resultado a la transformación de las giberelinas de su forma inactiva a activa.

### II.6.2.1. Giberelinas

Las giberelinas son un grupo importante de fitohormonas que se encuentran en pequeñas cantidades en plantas superiores y regulan diferentes procesos de crecimiento (Brückner y Blechschmidt, 1991).

Fueron descubiertas por Kurosawa (1926), el cual estudio la enfermedad “bakanae” en arroz. En las primeras etapas de la enfermedad, las plantas afectadas tenían una altura que superaba en un 50 % a las plantas sanas; pero formaban menos semillas, dicha enfermedad era originada por un ascomiceto (*Gibberella Fujikuroi*), en 1935, se obtuvo una preparación activa a la que se le denominó giberelina en base al hongo de donde se había aislado (Weaver, 1976).

Brückner y Blechschmidt (1991), reportan que Yabuta y Sumiki en 1938 realizaron el aislamiento de dos sustancias cristalinas, giberelinas A y B, ambas sustancias eran biológicamente activas pero tenían diferentes propiedades químicas aunque fueron encontradas impuras. Después de la segunda Guerra Mundial en Inglaterra, Industrias Químicas (ICI) aisló una giberelina a la que la llamaron “ácido giberélico”. Esta giberelina tenía una fórmula molecular de  $C_{19}H_{22}O_6$  y sus propiedades fisiológicas eran distintas a la giberelina A encontrada por los japoneses.

Años después los japoneses separaron productos de la giberelina A y los clasificaron como giberelina A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, siendo esta última idéntica al ácido giberélico.

Desde el punto de vista de su estructura química, las giberelinas se definen como diterpenoides que se caracterizan por una estructura de anillos tetracíclicos. De acuerdo a la nomenclatura química, esta estructura es llamada ent-giberelina y se muestra en la Figura 7 (Brückner y Blechschmidt, 1991).

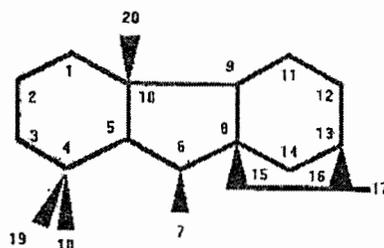


Figura7. Estructura de ent-giberelina (Brückner y Blechschmidt, 1991).

Las giberelinas son clasificadas en dos grupos, el primero esta conformado por las giberelinas que tienen 20 átomos de carbono y en el segundo se encuentran aquellas giberelinas que tienen 19 átomos de carbono y que presentan una alta actividad biológica, en este grupo están las giberelinas A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub> y A<sub>7</sub>.

El número de giberelinas identificadas es más de cien pero pocas de estas tiene actividad biológica debido a que la estructura que determina esta actividad es la 3 $\beta$ -hidroxilación y puede ser inactivada por la hidroxilación en la posición 2 $\beta$  (Richards y col., 2001), solo un tercio de las giberelinas naturales encontradas en plantas son fisiológicamente activas y la única que se encuentra más comúnmente en las plantas es la GA<sub>3</sub> (Brückner y Blechschmidt, 1991).

McComb (1961), junto con diversos autores descubrieron en semillas, frutas, papas, bulbos de tulipanes y otras plantas la presencia de sustancias tipo giberelinas mucho más polares que las giberelinas conocidas químicamente. En adición a esto, existen derivados de GA en plantas superiores, entre estos se incluyen alquil-esteres tal como n-propil ester de GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub> y el metil-ester de GA<sub>17</sub> y GA conjugadas, además hay otros derivados los cuales se obtienen de la hidrólisis de fracciones solubles en agua de extractos de plantas que contienen GA<sub>5</sub> o compuestos con actividad giberélica, también se pueden encontrar en forma natural giberelinas conjugadas las cuales son de dos tipos, ester-es-glucosidicos y eter-es-glucosidicos Figura 8 (Jones y MacMillan, 1990).

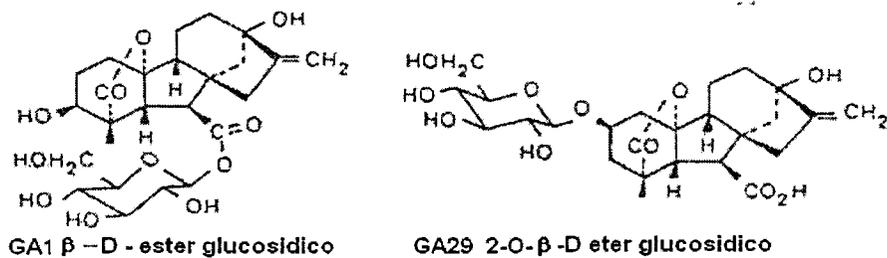


Figura 8. Giberelinas conjugadas (Jones y MacMillan, 1990).

Lang (1970), indicó que las giberelinas glucosídicas juegan un papel importante en el control de los niveles de giberelinas libres dentro de la planta y mencionó que Barendse en 1968 planteó que la conjugación de las giberelinas a un azúcar puede ser importante en el secuestro de giberelinas y en la subsiguiente transportación de éstas a lo largo de los árboles.

#### II.6.2.2. Función de las Giberelinas

Según Graebe (1987), las giberelinas interactúan con otros reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido abscísico y tienen diversos efectos en las plantas como:

- 1.- Marcada elongación del tallo
- 2.- Reversión del enanismo
- 3.- Inducción de la floración
- 4.- Promoción del amarre del fruto
- 5.- Rompimiento de la dormancia
- 6.- Aceleración de la germinación de la semilla
- 7.- Modificación de la expresión sexual en algunas especies de plantas

También las giberelinas provocan cambios a nivel genético que estimulan la síntesis enzimática en las células; así mismo provocan la estimulación de la síntesis de Ácido Ribonucleico (RNA) en las capas de aleuronas (Weaver, 1976).

En la industria y en la agricultura la giberelina más empleada es GA<sub>3</sub>, ya que es la más económica y fisiológicamente efectiva, ésta giberelina se emplea principalmente en la fabricación de la cerveza porque se aplica a la cebada para llevar a cabo el proceso de malteado. Su utilización en este proceso se basa en que el endospermo de la semilla de cebada tiene un incremento en la actividad d  $\alpha$ -amilasa cuando esta presente GA<sub>3</sub> convirtiendo el almidón en azúcares, pépticos y aminoácidos (Brückner y Blechschmidt, 1991).

### II.6.2.3. Biosíntesis de las Giberelinas

Las giberelinas inician su biosíntesis a través de la ruta de isoprenoides a partir del ácido mevalónico (MVA); éste ácido se produce por tres moléculas de acetyl-coenzima A, la cual es un intermediario para la producción de poliketina y un derivado del ácido mevalónico (MVA) (Brückner y Blechschmidt, 1991). El MVA es transformado a geranylgeranyl bifosfato (GGPP) que a su vez es convertido a ent-kaureno y por medio de oxidaciones se obtiene GA<sub>12</sub> siendo éste el precursor general de todas las giberelinas descritas. En la Figura 9 se muestran los principales pasos de la biosíntesis de GA<sub>12</sub> (Hedden y Kamiya, 1997).

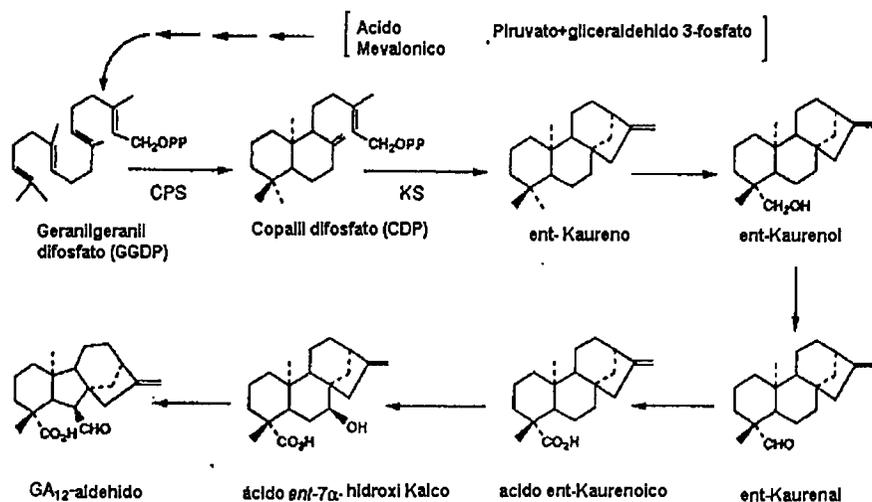


Figura 9. Síntesis de GA<sub>12</sub> a partir del ácido mavalónico (Heeden y Kamiya, 1997)

Una vez obtenido la  $GA_{12}$  y por acción de diversas enzimas se obtienen otras giberelinas de importancia como  $GA_7$ ,  $GA_9$ ,  $GA_4$  y  $GA_3$ , ésta transformaciones se muestran en la Figura 10.

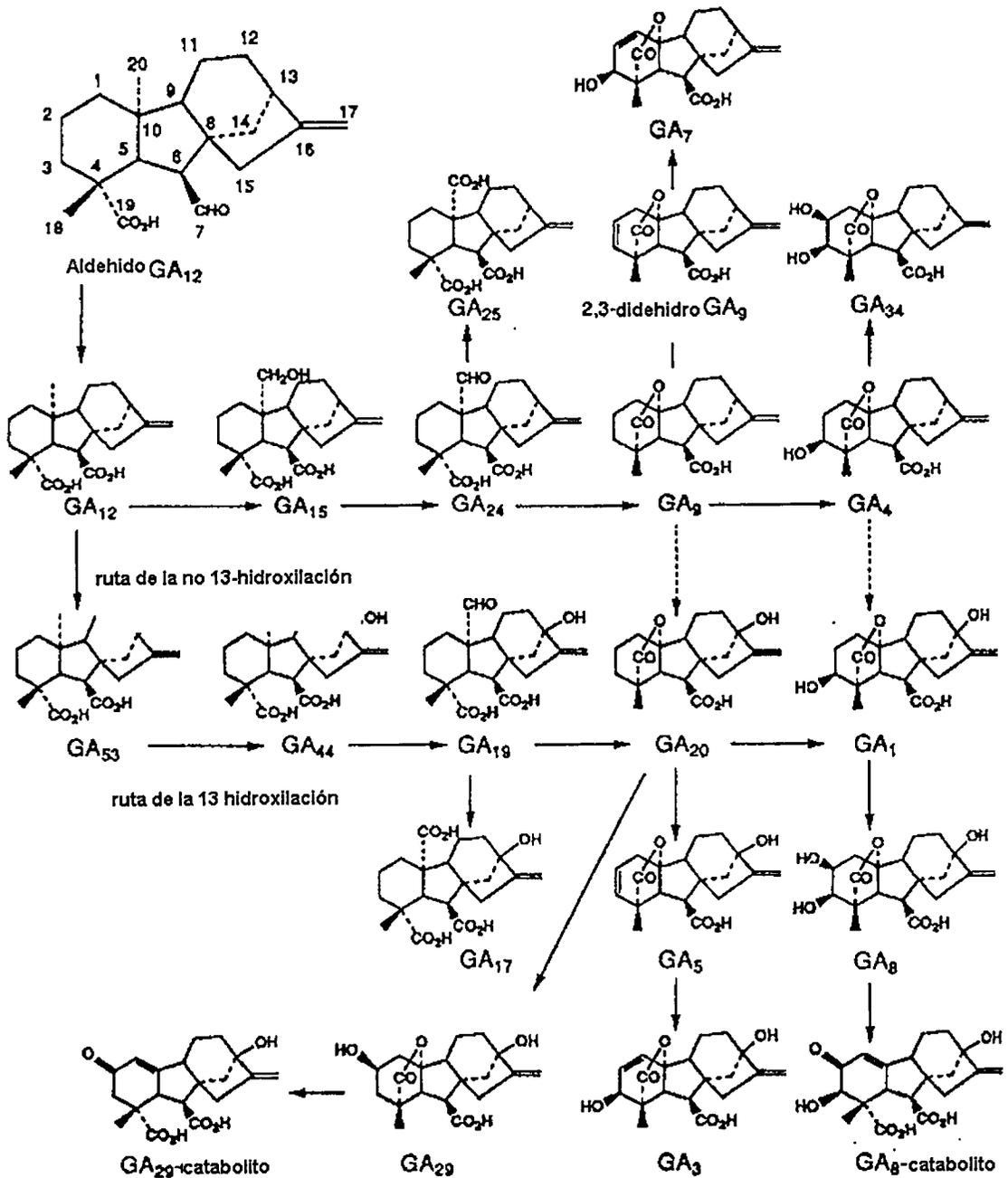


Figura 10. Biosíntesis de Giberelinas a partir de  $GA_{12}$  (Heeden y Kamiya, 1997).

#### II.6.2.4. Factores que influyen en los niveles de giberelinas

Diversos autores señalan que pueden existir cambios cualitativos y cuantitativos en las giberelinas debido a factores ambientales tales como luz, fotoperiodo, horas de frío necesarias para la floración y para romper el estado de letargo pero aun no está bien establecido como estos factores alteran la biosíntesis de las giberelinas.

Jones (1973) menciona que Köhler en 1965 examinó giberelinas endógenas en chícharos normales y enanos almacenados en la oscuridad, luz roja lejana y luz roja, no encontrando diferencias cuantitativas o cualitativas en estos reguladores; sin embargo, si hubo diferencia en el crecimiento de las variedades bajo luz roja ya que los chícharos enanos no presentaron crecimiento mientras que los chícharos normales por lo cual él sugiere que la inhibición del crecimiento en el tallo está relacionado a la capacidad de las plantas para responder a las giberelinas endógenas y que quizá la variedad enana contenga sustancias que interfieren en la respuesta a giberelinas.

Diversos experimentos indican que existe relación entre el fotoperiodo y el metabolismo de las giberelinas. Zeevaart (1971), aunque no encontró diferencia cualitativa o cuantitativa en los niveles de giberelinas extraídas de espinaca expuesta a días largos y cortos, sí observó una marcada diferencia en el metabolismo de éstas porque hubo un mayor crecimiento en las espinacas cuando eran transferidas de días cortos a días largos.

Por otro lado la temperatura es un factor que influye en la concentración de giberelinas, Bradbeer (1967), experimentando con semillas de avellana después del proceso de estratificación (frío requerido para romper el estado de letargo en semillas), observó incrementos en los niveles de sustancias tipo giberelinas cuando estuvieron doce semanas a 5 °C sin embargo estos niveles no fueron lo suficientemente altos para romper la dormancia en las semillas.

Cundo realizó una transferencia de estas semillas a 20 °C observó que los niveles de Giberelinas incrementaron por tal motivo sugiere que la estratificación a 5 °C prepara la semilla para la síntesis de giberelinas la cual ocurre posteriormente a 20 °C estimulando la germinación. Paiva y Robitaille (1978), coincidieron con estos resultados y concluyeron que las giberelinas promueven la ruptura del letargo después de un periodo de frío.

### III. HIPÓTESIS

El almacenamiento del ajo bajo condiciones de frío estimula la biosíntesis de giberelinas y su transformación a su estado activo induciendo la brotación.

## IV. OBJETIVOS

### GENERAL

Evaluar el efecto de la refrigeración y transferencia a temperatura ambiente en el índice de brotación y contenido de giberelinas libres y ligadas en ajo Var. 'Perla'.

### ESPECIFICOS

- Determinar el índice de brotación de ajos almacenados a 0, 15° C y Temperatura Ambiente.
- Determinar el índice de brotación de los ajos transferidos de 0, 15 y Temperatura Ambiente a 23 ° C.
- Establecer la influencia de la temperatura en la biosíntesis de giberelinas.
- Determinar la influencia de la temperatura en la activación de las giberelinas.
- Determinar la influencia de la transferencia desde la condición de frío a temperatura ambiente en la biosíntesis de giberelinas.
- Determinar el máximo periodo de almacenamiento de ajo bajo frío con el mínimo índice de brotación en la comercialización.

## V. METODOLOGÍA

### V.1. Materiales

#### V.1.1. Origen del material biológico

Se utilizaron bulbos de ajo blanco (*Allium sativum* L.) variedad 'Perla' cultivados en la región de Rincón de Romos Aguascalientes, los cuales se curaron en campo de acuerdo a la práctica comercial de la zona, posteriormente se les eliminó el follaje seco y se trasladaron a la empacadora donde fueron seleccionados por tamaño, firmeza de la cabeza y ausencia de defectos. Para este estudio se utilizaron cabezas de calibre 5 cm, con 10 dientes por bulbo.

### V.2. Métodos

#### V.2.1. Procedimiento Experimental

Los ajos provenientes del campo fueron seleccionados por su aspecto externo, y posteriormente se manejaron de acuerdo al procedimiento experimental indicado en la Figura 11.

Se almacenaron tres lotes de 400 cabezas de ajo cada uno durante 3 meses a 0 °C, 15 °C, y Temperatura Ambiente.

Cada 15 días se tomaron 15 cabezas de cada lote, se desgranaron y seleccionaron 3 dientes de cada cabeza. A cada uno se le midió la hoja de brotación y la longitud del diente para determinar el índice de brotación (IB).

De esos mismos periodos de muestreo se transfirieron, de cada temperatura, 30 cabezas a una cámara de almacenamiento con temperatura controlada a 23 °C.

A los 15 y 30 días se tomaron 15 cabezas de cada transferencia y se determinó el índice de Brotación (IB).

Las hojas de brotación de los ajos transferidos y de los lotes de 0 °, 15 °C, y Temperatura Ambiente se retiraron de los dientes de ajo, se congelaron con nitrógeno líquido, y fueron almacenadas a -70°C para posteriormente ser liofilizadas. Después se molieron en un mortero para después colocarse en bolsas de celofán y almacenarse a temperatura ambiente hasta su posterior análisis de giberelinas.

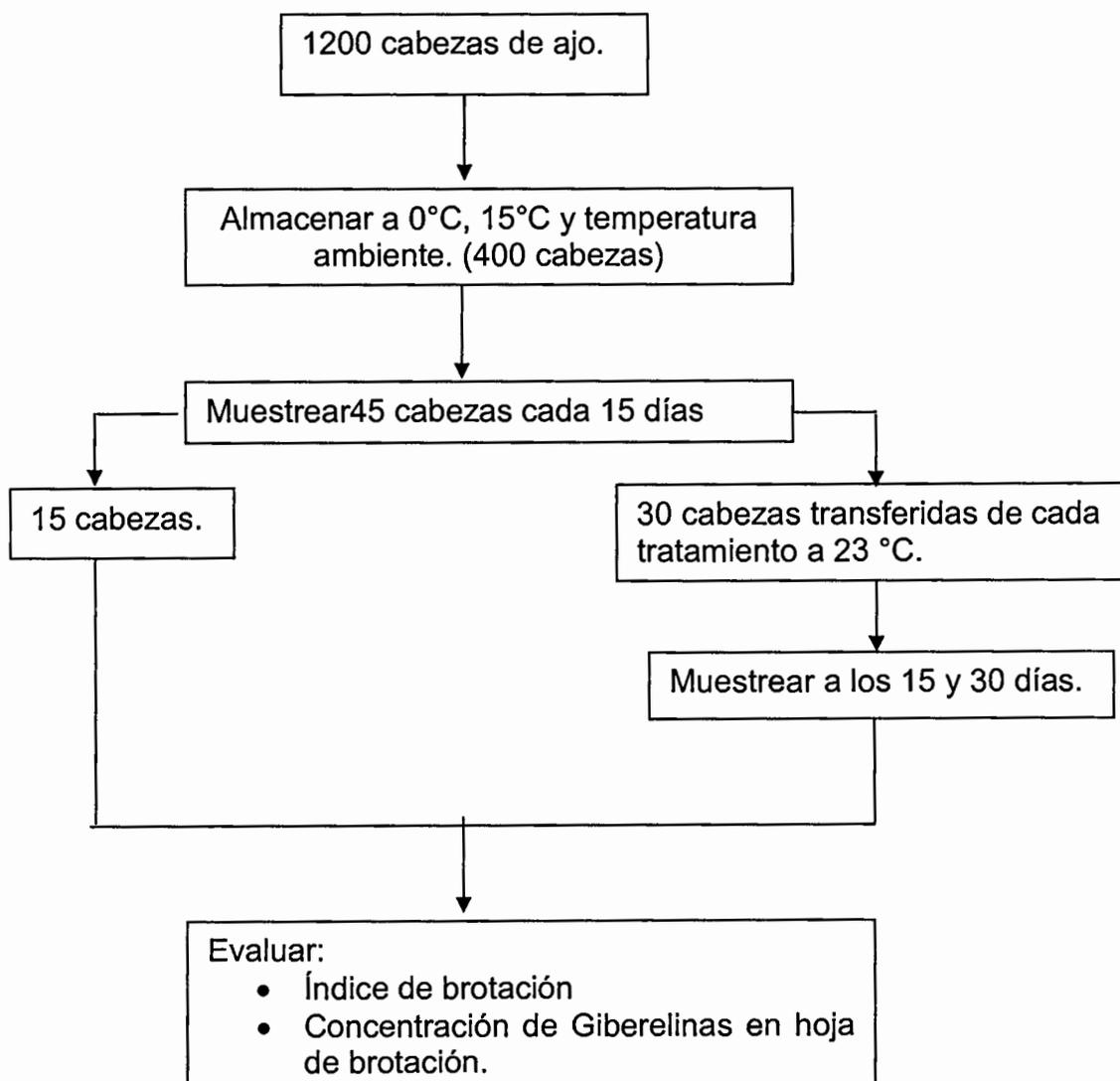


Figura 11. Procedimiento general llevado durante el estudio.

### V.2.2. Determinación del índice de brotación

Para determinar el Índice de Brotación (IB) se usaron 3 dientes de cada una de las 15 cabezas seleccionadas, a cada diente se le midió la longitud con un vernier; después se realizó un corte longitudinal y se midió el largo de la hoja de brotación. Con esos datos se calculó el IB con la siguiente expresión:

$$\%IB = \left[ \frac{\text{Longitud del brote}}{\text{Longitud del diente}} \right] * 100$$

### V.2.3. Extracción de giberelinas.

La Figura 12 indica los procedimientos que se realizaron para extraer las giberelinas libres y ligadas presentes en la hoja de brotación del diente de ajo.

Se empleó el método descrito por Rakhimbaev y Ol'shanskaya (1976) que consiste en pesar 1gr de muestra liofilizada, mezclarla con 40 ml de metanol 80% y dejar reposar de 18 a 24 hr, la mezcla se filtró a través de papel filtro Whatman No. 4 y el filtrado se evaporó a 37 °C con vacío hasta obtener un residuo acuoso.

#### V.2.3.1 Extracción de Giberelinas libres

El residuo acuoso se acidificó con HCl 1 N hasta un pH= 2.5-3.0, en embudos de separación las Giberelinas se extrajeron con acetato de etilo en 3 ocasiones, la fase orgánica que contenía las giberelinas libres se evaporó hasta sequedad y el residuo seco se redisolvió en 2 ml de metanol al 100% almacenándose las muestras en refrigeración hasta su análisis en el equipo HPLC para su cuantificación.

### V.2.3.2 Extracción de Giberelinas ligadas

La fase acuosa que contenía las giberelinas ligadas se hidrolizó con HCl 0.4 N (la mitad del volumen del extracto acuoso) durante 1hr a 60 °C. El pH se ajusto entre un intervalo de 2.5-3.0 con NaOH 1 N. Las Giberelinas ligadas se extrajeron 3 veces con acetato de etilo (1:1). El extracto acuoso se llevó a sequedad para después resuspenderse en 2 ml de metanol 100%, las muestras se almacenaron en refrigeración hasta su análisis en HPLC.

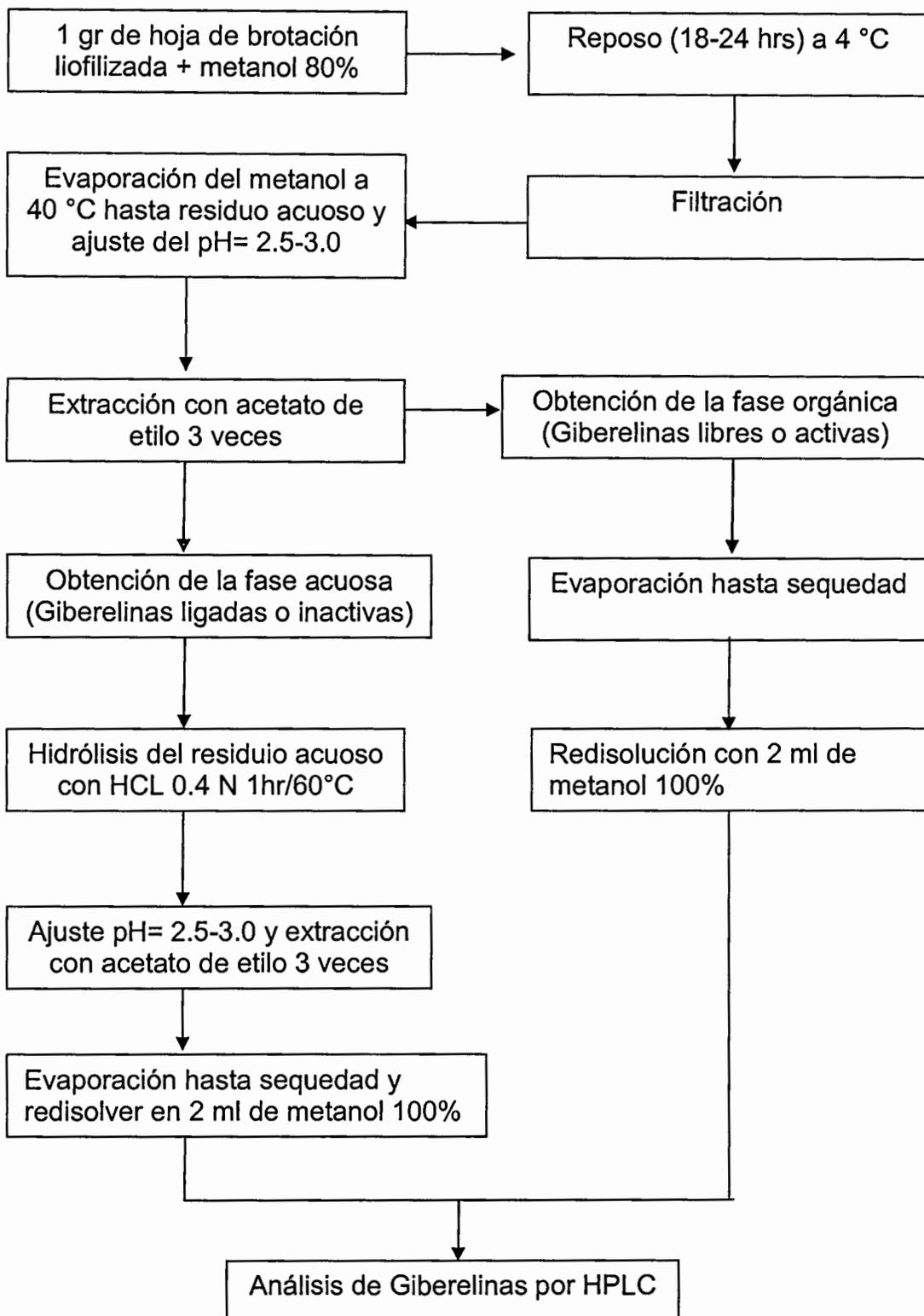


Figura 12. Procedimiento para separación de giberelinas libres y ligadas de las hojas de brotación de ajo 'Perla'.

#### V.2.4 Identificación presuntiva de giberelinas por Cromatografía de Capa Fina.

La identificación presuntiva de giberelinas en los extractos de ajo, se realizó por Cromatografía en Capa Fina (TLC). Para esto se emplearon placas de aluminio cubiertas con Sílica gel 60 con indicador de fluorescencia a 254nm (F<sub>254</sub>) marca Merck. Sobre cada placa en los puntos de corrida se colocaron 10µl de extractos de giberelinas libres y 20µl de extractos de giberelinas ligadas, así como también muestras de estándares puros (GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y metil ester de GA<sub>9</sub>), después de que las muestras se secaron la placa se llevó a la cámara de corrimiento que contenía un sistema de solventes de acetato de etilo-cloroformo-ácido acético (15:5:1) (Elson y col., 1964). Las placas se corrieron en forma ascendente hasta 1cm antes de finalizar la placa. Las placas permanecieron en la campana de extracción para que se secaran, luego se revelaron por aspersion de una mezcla de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y 5% de etanol, posteriormente las placas se calentaron a 110°C por 5 minutos y se observaron bajo luz ultravioleta a 366 nm determinando posteriormente el factor de retención (R<sub>f</sub>) mediante las distancias recorridas tanto del solvente como de las fracciones separadas en cada una de las muestras. El R<sub>f</sub> se determinó con la siguiente fórmula

$$R_f = \frac{\text{Fracción de la muestra (cm)}}{\text{Distancia del solvente (cm)}}$$

Los valores de R<sub>f</sub> obtenidos de las muestras fueron comparados con los R<sub>f</sub> estándares de giberelinas.

#### V.2.5. Separación de Giberelinas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

La separación de las diferentes giberelinas se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Utilizando un equipo Marca Waters modelo 510 equipado con una columna Symetry C<sub>18</sub> con un diámetro de 4.6 mm y 100 mm de largo, empacada con sílica gel así como con un tamaño de partícula de 3.5µm así como un detector de arreglo de diodos el cual registro la absorbancia a 205 nm.

Para la separación, se utilizó un doble gradiente de concentración de la fase B (acetonitrilo con 5% de agua y 0.01% de ácido fosfórico) en la fase A (agua con 5% de acetonitrilo y 0.01% de ácido fosfórico) a 25 °C en un tiempo de corrida para cada muestra de 35 minutos.

El gradiente de concentración de ambas soluciones durante el tiempo de análisis de cada muestra se indica en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Gradiente de concentración de las fases utilizadas para la separación de Giberelinas por HPLC.

Tiempo (min)	Fase A	Fase B
0	90	10
15	30	70
20	30	70
21	0	100
28	0	100
30	90	10
35	90	10

Durante el desarrollo del análisis de las muestras, se utilizó un flujo de 1 mL/min de la mezcla de ambas fases.

Los picos obtenidos en los cromatogramas del equipo HPLC fueron analizados en su espectro de absorción y tiempo de retención con los picos que mostraron los estándares de giberelinas puros (GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>9</sub>) (Sigma Chemical) inyectados en las mismas condiciones que las muestras.

### V.2.6. Cuantificación de Giberelinas

La cuantificación se realizó mediante la comparación de las áreas bajo la curva de los picos con espectro de giberelinas con el área bajo la curva del pico de GA<sub>3</sub> (estándar de referencia) el cual fue inyectado a una concentración de 1mg/ml y considerando los factores de dilución correspondientes para expresar el contenido de giberelinas como miligramos equivalentes de GA<sub>3</sub>/g de hoja de brotación liofilizado.

### V.3. Diseño Experimental

El análisis estadístico de los datos se realizó comparando los tratamientos a través del tiempo empleando el análisis de varianza de los datos en cada uno de los tiempos de muestreo mediante el paquete estadístico JMP. Cuando se detectaron diferencias entre los distintos tratamientos se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con un  $\alpha$  de 0.05.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Efecto de la temperatura sobre el índice de brotación

Como se indicó en la sección de antecedentes, el almacenamiento refrigerado del ajo a temperaturas cercanas a 0 °C es el mejor ambiente para conservar este producto. No obstante, esas mismas condiciones de refrigeración pueden propiciar la ruptura del letargo cuando el producto se traslada a Temperatura Ambiente poniendo fin al periodo de almacenamiento.

En el laboratorio donde se desarrolló la presente investigación, se han realizado diferentes trabajos que analizan el efecto de la temperatura sobre el proceso de brotación de los mismos. No obstante, en la variedad 'Perla', no se ha estudiado de forma sistemática cual es el efecto de la conservación a 0 °C por diferentes tiempos y sus correspondientes transferencias a temperatura ambiente y con ello establecer su vida máxima de anaquel; por ello fue importante estudiar dicha temperatura y sus transferencias y compararlas con el almacenamiento a temperatura ambiente y un caso de abuso de temperatura como es 15 °C.

#### VI.1.1. Almacenamiento a Temperatura Ambiente.

Los índices de brotación obtenidos durante el almacenamiento a Temperatura Ambiente y su correspondiente transferencia a 23 °C durante 15 y 30 días se observan en el Cuadro 6 así como su correspondiente análisis estadístico.

Los bulbos de ajo almacenados de forma continua durante 90 días a Temperatura Ambiente mostraron un índice de brotación menor comparados con aquellos transferidos a 23 °C por 15 y 30 días (Figura 13). Al inicio del experimento, el índice de brotación de las muestras fue de 12% y fue incrementándose hasta los 90 días de almacenamiento donde alcanzó 56% lo que indicó un proceso de ruptura de letargo en esas condiciones de temperatura.

Los bulbos que no fueron almacenados a Temperatura Ambiente y fueron directamente colocados a 23 °C durante 15 días presentaron un índice de brotación de 20% y de 22% para aquellos colocados a esa temperatura durante 30 días indicando que dicha temperatura es inductora del proceso de brotación. Las muestras que estuvieron almacenadas a Temperatura Ambiente por diferentes periodos de tiempo y posteriormente transferidas a 23 °C por 15 y 30 días alcanzaron índices de brotación de 63% y 71% respectivamente después de 90 días de almacenamiento a Temperatura Ambiente. Estos últimos datos confirman que la temperatura de 23 °C induce el proceso de brotación.

Cuadro 6. Valores de Índice de Brotación (% IB) y su significancia estadística en ajo 'Perla' almacenado a Temperatura Ambiente y su transferencia a 23 °C durante 15 y 30 días.

Días de almacenamiento	% IB Temperatura Ambiente	% IB 15 días a 23°C	%IB 30 días a 23°C
0	11.6863 <sup>a*</sup>	19.8714 <sup>b</sup>	21.0466 <sup>b</sup>
15	17.5030 <sup>a</sup>	23.4328 <sup>b</sup>	30.2505 <sup>c</sup>
30	17.9156 <sup>a</sup>	30.4901 <sup>b</sup>	35.0157 <sup>c</sup>
45	33.1800 <sup>a</sup>	40.2418 <sup>b</sup>	44.1724 <sup>c</sup>
60	39.2419 <sup>a</sup>	48.1265 <sup>b</sup>	45.9744 <sup>b</sup>
75	48.9457 <sup>a</sup>	55.0267 <sup>b</sup>	68.4174 <sup>c</sup>
90	55.6819 <sup>a</sup>	63.0558 <sup>b</sup>	71.2799 <sup>c</sup>

\*Letras diferentes por fila expresan diferencia significativa con  $\alpha= 0.05$ , prueba de Tukey

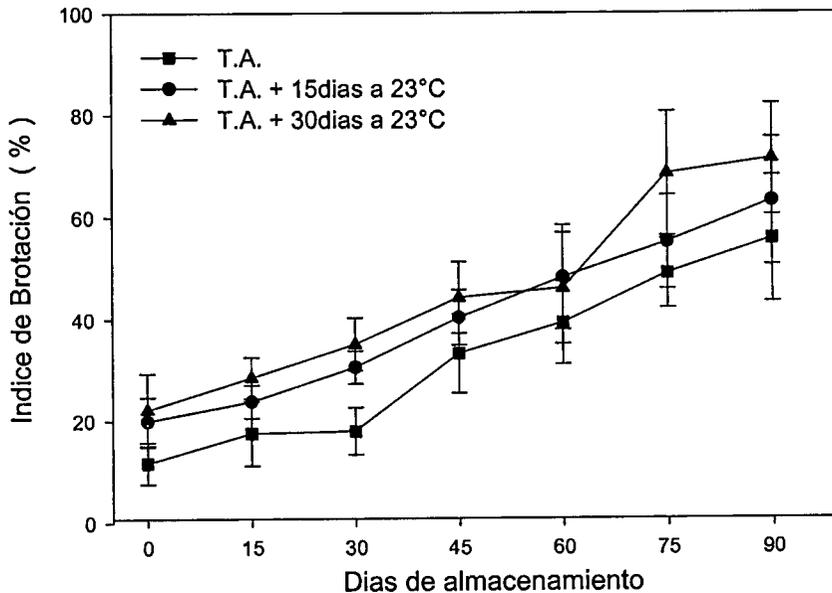


Figura 13. Índice de brotación para dientes de ajo Cv. Perla almacenados a Temperatura Ambiente y sus transferencias a 23 °C durante 15 y 30 días

Con el objeto de aportar una mayor información respecto a la Temperatura Ambiente que se presentó en el lugar donde se almacenaron los bulbos de ajo durante el desarrollo del experimento, la Figura 14 muestra la temperatura media diaria así como las temperaturas máximas y mínimas durante los meses de Agosto a Noviembre del año 2004 en el estado de Querétaro.

De forma general, durante los meses de Agosto, Septiembre y Octubre las temperaturas medias diarias estuvieron dentro del rango 18 °C a 22 °C mientras que para el mes de Noviembre el intervalo se situó entre 15 °C y 20 °C. Las temperaturas máximas se situaron entre 24 °C- 28 °C para los meses de Agosto, Septiembre y Noviembre, mientras que en Octubre el intervalo fue más amplio (22-30 °C). Las temperaturas mínimas se situaron entre 12 °C y 16 °C para los meses de Agosto, Septiembre y Octubre mientras que para Noviembre el intervalo fue de 15 °C – 2 °C aunque predominaron las temperaturas mínimas de alrededor de 6 °C- 8 °C.

Esta variación de las temperaturas ambientales y en particular los valores registrados tuvieron un efecto muy importante en la brotación de los dientes de ajo. Este aspecto se analiza con mayor profundidad en la sección de discusión de resultados.

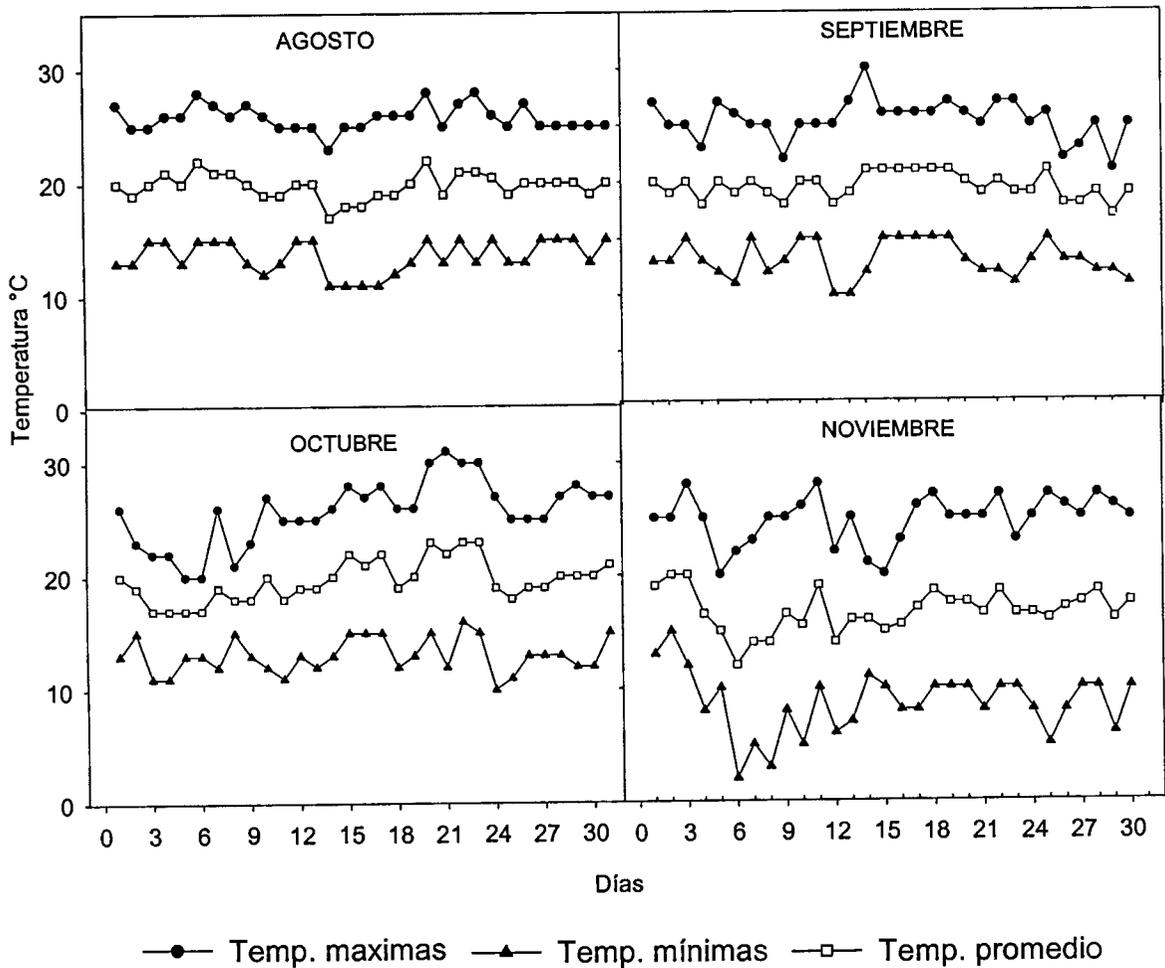


Figura 14. Temperaturas medias, máximas y mínimas en la ciudad de Querétaro durante los meses de Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre del 2004.

## VI.1.2. Almacenamiento a 15 °C

El efecto del almacenamiento de los bulbos de ajo a 15 °C y su posterior transferencia a 23 °C durante 15 y 30 días sobre el índice de brotación se detalla en el Cuadro 7, así como también se indica la comparación estadística del almacenamiento a ésta temperatura y sus transferencias a 23 °C por 15 y 30 días.

Cuadro 7. Valores de Índice de Brotación (%IB) y sus significancia estadística en ajo 'Perla' almacenado a 15 °C y su transferencia a 23 °C durante 15 y 30 días.

Días de Almacenamiento	% IB 15 °C	% IB 15 días a 23°C	%IB 30 días a 23°C
0	13.8148 <sup>a</sup>	20.3354 <sup>b</sup>	22.3752 <sup>b</sup>
15	39.0988 <sup>a</sup>	44.1507 <sup>a</sup>	53.7937 <sup>b</sup>
22	57.8109 <sup>a</sup>	58.4863 <sup>a</sup>	63.3618 <sup>b</sup>
29	55.5678 <sup>a</sup>	67.6970 <sup>b</sup>	72.0068 <sup>c</sup>
36	62.8814 <sup>a</sup>	63.4463 <sup>a</sup>	68.5544 <sup>b</sup>
43	67.1754 <sup>a</sup>	78.3680 <sup>b</sup>	76.4826 <sup>b</sup>
50	72.2415 <sup>a</sup>	77.4046 <sup>b</sup>	79.9533 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes por fila expresan diferencia significativa con  $\alpha= 0.05$ , prueba de Tukey

Los valores del índice de brotación de las muestras almacenadas de forma continua a 15 °C fueron notablemente superiores que los mostrados por las muestras almacenadas a Temperatura Ambiente indicando que ésta temperatura es notablemente más estimuladora del proceso de brotación y por ello no fue posible mantener las muestras durante 90 días ya que dentro este periodo de tiempo los brotes habían emergido del diente de ajo impidiendo su comercialización y por ello se decidió solo analizar las muestras dentro de un periodo de 50 días; dentro del cual el brote se encontraba dentro de cada uno de los dientes de ajo.

Los bulbos de ajo almacenados a 15 °C de forma continua (0 a 36 días) presentaron un índice de brotación similar a los transferidos a 23 °C durante 15 y 30 días (Cuadro 7 y Figura 15) lo cual indicó nuevamente que el almacenamiento a 15 °C es el factor principal que estimuló el crecimiento del brote. Por su parte los bulbos transferidos por 30 días a 23 °C presentaron un índice de brotación 5% mayor dentro del periodo de almacenamiento a 15 °C referido. Para los muestreos a los 43 y 50 días, el crecimiento del brote en las transferencias fue mayor que el mostrado por los dientes almacenados de forma continua a 15 °C; este dato sugiere que después de un periodo de almacenamiento el efecto de la temperatura de 15 °C se hace menor y se potencia ligeramente la influencia de la temperatura de 23 °C.

La Figura 15, permite observar que el crecimiento del brote a 15 °C mostró dos periodos distintos de crecimiento con diferentes velocidades, el primero de ellos fue lineal y comprendió hasta los 29 días; a partir de esa fecha el crecimiento se hizo más lento y alcanzó una meseta que terminó en el día 50 para nuevamente volver a incrementar su velocidad de crecimiento y rebasar la longitud del diente (datos no mostrados) esto sugiere una curva de crecimiento del brote doble sigmoide.

También en esta misma figura se nota que durante los primeros 29 días de almacenamiento, la temperatura que más influencia tiene en promover el crecimiento del brote es 15 °C y que las transferencias a 23 °C solo añaden un impulso menor que en ningún caso rebasan el efecto dado por aquella temperatura.

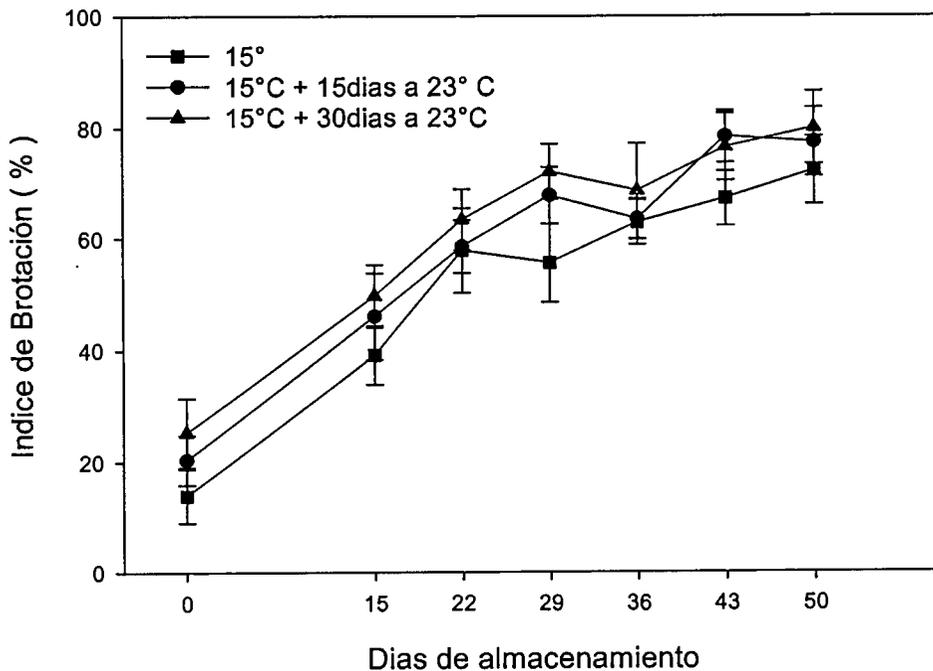


Figura 15. Índice de brotación para dientes de ajo almacenados a 15 °C y sus transferencias a 23 °C durante 15 y 30 días.

### VI.1.3. Almacenamiento a 0 °C

El cuadro 8 muestra los datos promedio y la comparación estadística de los índices de brotación de ajo almacenado a 0 °C y su transferencia a 23 °C durante 15 y 30 días.

Como era de esperarse, el crecimiento del brote de los dientes almacenados a 0 °C fue notablemente inhibido durante los primeros 30 días (Figura 16), no obstante después de ese periodo el brote empezó a crecer ligeramente hasta alcanzar el 21% de índice de brotación. La comparación con las otras temperaturas estudiadas permite indicar que 0 °C es la temperatura más adecuada para controlar la brotación durante el almacenamiento.

Esta figura permite también observar una mayor diferencia entre el índice de brotación de los dientes de ajo almacenados a 0 °C con el índice de brotación de los ajos transferidos a 23 °C durante 15 y 30 días.

Esto parece indicar que la capacidad de brotación de los dientes de ajo se recuperó al transferir las muestras a 23 °C. Respecto a las muestras de transferencia, los índices de brotación a 23 °C por 15 y 30 días no mostraron diferencias significativas entre si y describieron un patrón de crecimiento muy similar al mostrado por los dientes de ajo transferidos de temperatura ambiente a 23 °C (Figura 13) lo cual confirma que la capacidad de brotación se recuperó dentro del periodo de almacenamiento estudiado.

Cuadro 8. Valores de Índice de Brotación (%IB) y sus Significancia estadística en ajo 'Perla' almacenado a 15 °C y su transferencia a 23 °C durante 15 y 30 días.

Días de almacenamiento	% IB 0 °C	% IB 15 días a 23°C	%IB 30 días a 23°C
0	9.3971 <sup>a*</sup>	20.2857 <sup>b</sup>	18.3430 <sup>b</sup>
15	11.7358 <sup>a</sup>	33.4879 <sup>b</sup>	30.3439 <sup>b</sup>
30	12.5726 <sup>a</sup>	36.5650 <sup>b</sup>	38.5001 <sup>b</sup>
45	17.1773 <sup>a</sup>	39.8769 <sup>b</sup>	41.9798 <sup>b</sup>
60	19.8310 <sup>a</sup>	47.5603 <sup>b</sup>	52.5434 <sup>c</sup>
75	21.2677 <sup>a</sup>	58.4565 <sup>b</sup>	58.4565 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes por fila expresan diferencia significativa con  $\alpha= 0.05$ , prueba de Tukey

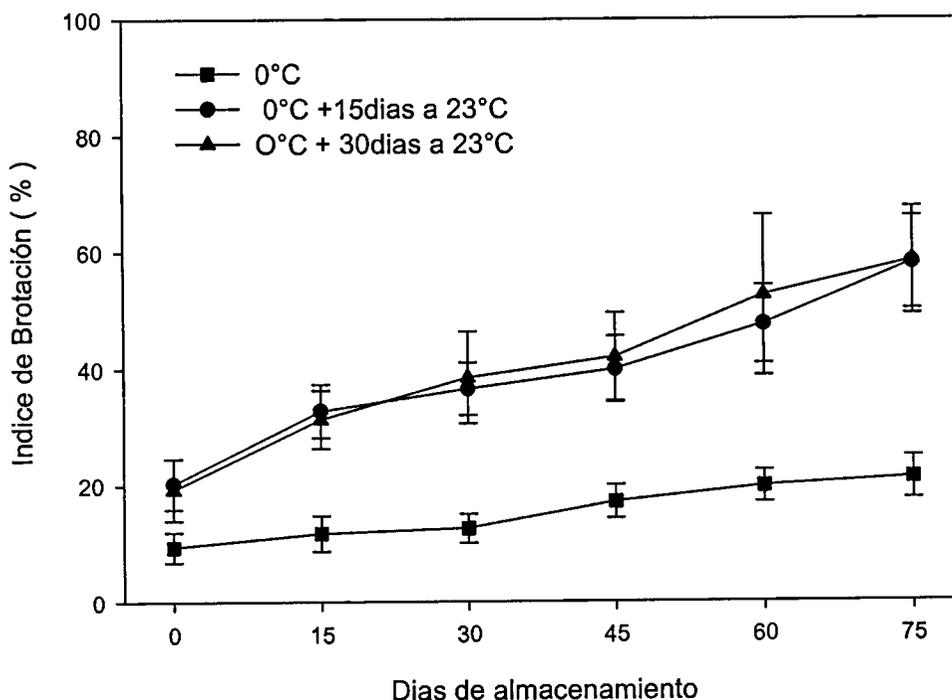


Figura 16. Índice de brotación para dientes de ajo almacenados a 0 °C y sus transferencias a 23 °C durante 15 y 30 días

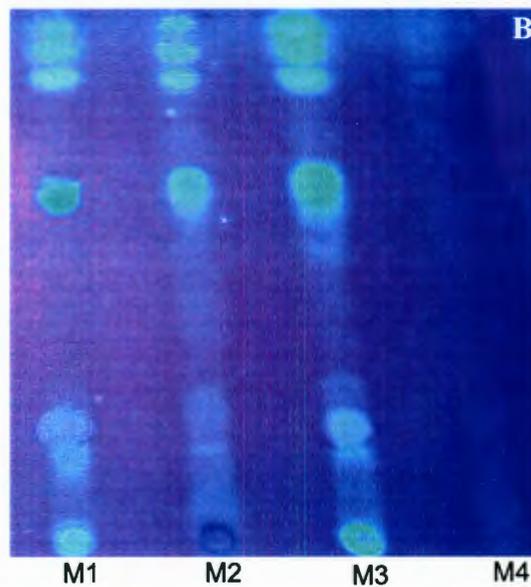
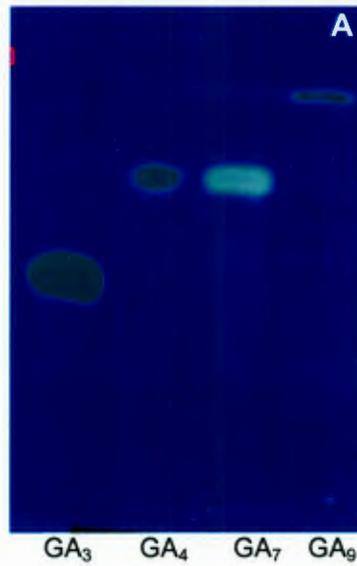
## VI.2. Identificación presuntiva de Giberelinas por Cromatografía en Capa Fina (TLC)

En la Figura 17A se muestra la placa cromatográfica de los estándares comerciales GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y metil ester de GA<sub>9</sub>, y en la Figura 17B se presenta la placa cromatográfica de los extractos de ajo tanto en su fracción libre y ligada almacenados a 0 °C durante 15 y 90 días, ambas placas fueron observadas bajo luz UV a 366 nm. La técnica de TLC fue empleada para la separación de los componentes de las muestras y determinar su R<sub>f</sub> que se comparó con el R<sub>f</sub> de los estándares.

En el Cuadro 9 se puede observar que el  $R_f$  de los extractos no coincide con ningún  $R_f$  de los estándares, aunque el valor de 0.98 es muy cercano al registrado por el estándar  $GA_9$  ( $R_f= 1.0$ ). La fracción ligada a los 15 días de almacenamiento presentó cuatro manchas fluorescentes cuyos  $R_f$  concuerdan con los obtenidos en las fracciones libres, por otro lado al final del periodo de almacenamiento la fracción ligada no presentó ninguna mancha de giberelinas.

Cuadro 9. Factor de retención ( $R_f$ ) de estándares comerciales y de extractos de ajo almacenados a 0 °C durante 15 y 90 días en su fracción libre y ligada.

Muestra	$R_f$
$GA_3$	0.44
$GA_4$	0.73
$GA_7$	0.75
$GA_9$	1.0
0°C – 15 días fracción libre	0.11, 0.15, 0.61, 0.83, 0.90, 0.98
0°C – 15 días fracción ligada	0.61, 0.83, 0.90, 0.98
0°C – 90 días fracción libre	0.15, 0.61, 0.83, 0.90, 0.98
0°C – 90 días fracción ligada	-----



M1= 0 °C – 15 días (lib.)

M2= 0 °C – 15 días (lig.)

M3= 0 °C – 90 días (lib.)

M4= 0 °C – 90 días (lig.)

**Figura 17. A.** Cromatografía de Capa Fina de los estándares comerciales de giberelinas. **B.** Cromatografía de los extractos de ajo (fracción libre y ligada) almacenados a 0 °C durante 15 y 90 días.

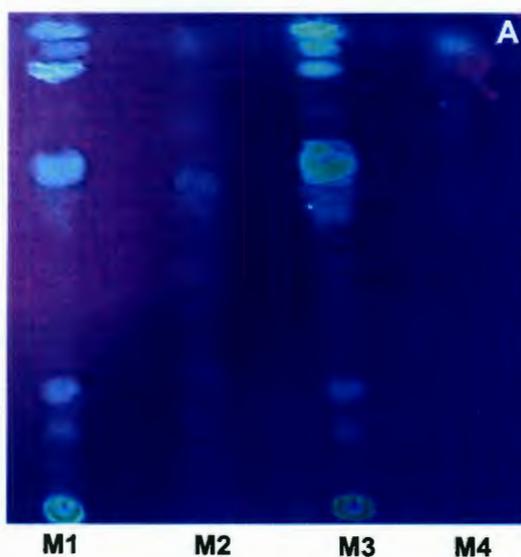
La figura 18A muestra la cromatografía de capa fina de las fracciones libres y ligadas de los extractos de ajo durante 15 y 30 días a 23 ° C. así mismo en la Figura 18B se muestra la placa para los extractos de ajo que permanecieron 90 días a 0 °C y posteriormente transferidos a 23 °C durante 15 y 30 días

El  $R_f$  fue determinado para cada una de las muestras y se presentan en el Cuadro 10. Las fracciones libres presentaron seis bandas en los dos periodos de almacenamiento a 23 °C, mientras las fracciones ligadas presentaron solo dos bandas a los 15 días y una a los 30 días a 23 °C. Por otro lado se puede ver que los extractos de ajo almacenados a 0 °C por 90 días y trasferidos a 23 °C por 15 y 30 días presentaron una mancha con  $R_f = 0.94$  en las fracciones libres y ligadas muy parecido al estándar  $GA_9$ , en esta misma transferencia la fracción libre a los dos periodos de almacenamiento presentó una mancha con  $R_f = 0.7$  el cual es similar al registrado en el Cuadro 9 para el estándar  $GA_7$  y  $GA_4$ .

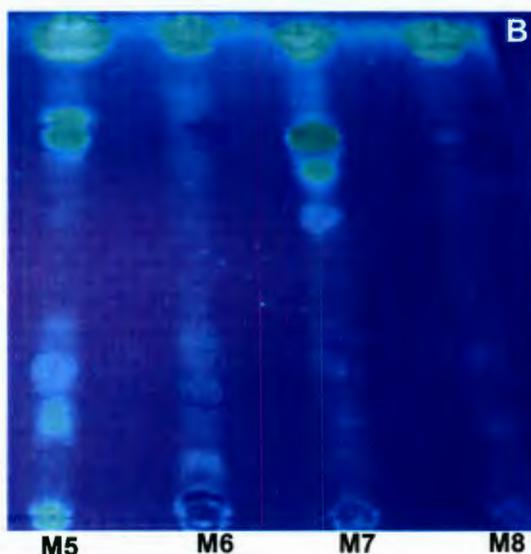
Estos resultados permitieron identificar presuntivamente que la giberelina  $GA_9$  parece estar presente en todas las muestras y que probablemente también puedan estar la  $GA_4$  y  $GA_7$ .

Cuadro 10. Factor de retención ( $R_f$ ) de extractos de ajo transferidos de 0 °C a 23 °C durante un periodo de 15 y 30 días.

Muestra	$R_f$
0 días a 0°C + 15 días a 23°C (libres)	0.11, 0.18, 0.62, 0.86, 0.91, 0.95
0 días a 0°C + 15 días a 23°C (ligadas)	0.60, 0.91
0 días a 0°C + 30 días a 23°C (libres)	0.11, 0.18, 0.63, 0.86, 0.91, 0.95
0 días a 0°C + 30 días a 23°C (ligadas)	0.91
90 días a 0°C + 15 días a 23°C (libres)	0.14, 0.2, 0.33, 0.7, 0.80, 0.94
90 días a 0°C + 15 días a 23°C (ligadas)	0.94
90 días a 0°C + 30 días a 23°C (libres)	0.53, 0.64, 0.7, 0.93
90 días a 0°C + 30 días a 23°C (ligadas)	0.94



M1= 0 días 0°C + 15 días 23°C (lib.)    M2= 0 días 0°C + 15 días 23°C (lig.)  
 M3= 0 días 0°C + 30 días 23°C (lib.)    M4= 0 días 0°C + 30 días 23°C (lig.)



M5= 90 días 0°C + 15 días 23°C (lib.)    M6= 90 días 0°C + 15 días 23°C (lig.)  
 M7= 90 días 0°C + 30 días 23°C (lib.)    M8= 90 días 0°C + 30 días 23°C (lig.)

**Figura 18. A.** Cromatografía de las fracciones libres y ligadas de ajo transferido al inicio del almacenamiento a 23 °C durante 15 y 30 días. **B.** Cromatografía de las fracciones libres y ligadas de ajo almacenado durante 90 días a 0 °C y posteriormente trasferidos a 23 °C durante 15 y 30 días.

### VI.3. Separación de Giberelinas

#### VI.3.1. Giberelinas libres

La Figura 19 muestra el cromatograma de los extractos de giberelinas libres procedentes de las hojas de brotación de dientes de ajo 'Perla' almacenado a Temperatura Ambiente, 0 °C y 15 °C, también a este cromatograma se añade el obtenido con la mezcla de estándares de giberelinas puros que incluyeron GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y el metil ester de GA<sub>9</sub>. Los tiempos de retención de cada uno de estos compuestos fueron 6.52, 12.17, 11.88 y 18.97 minutos, respectivamente. La comparación de los cromatogramas de las muestras con el de la mezcla de estándares mostró que los tiempos de retención de cada uno de estos estándares no coincidió con ninguno de los picos mostrados por los cromatogramas de las muestras; sugiriendo que estos compuestos no se encuentran en las muestras de ajo.

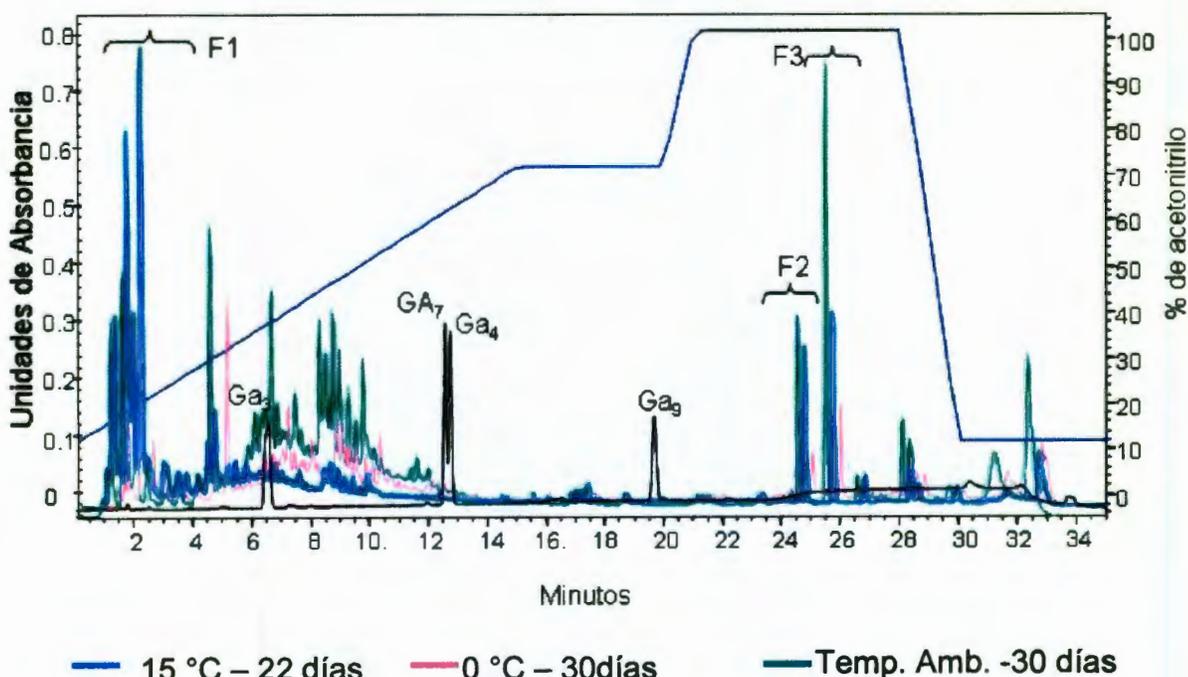
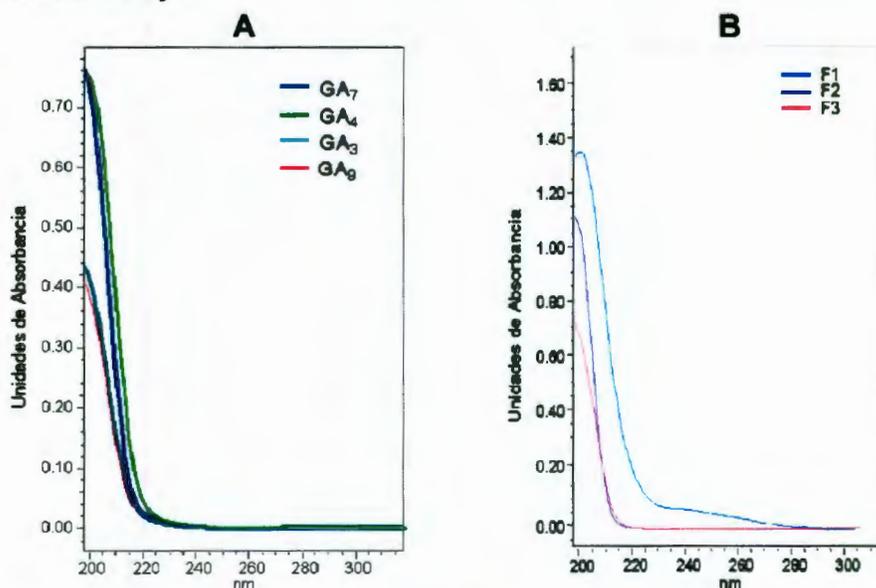


Figura 19. Cromatograma obtenido de un extracto de ajo 'Perla' almacenado a Temperatura Ambiente - 30 días, 15 °C – 22 días y 0 °C – 30 días.

A pesar de que los picos de las muestras no coincidieron con los de los estándares comerciales; se realizó un análisis espectral de cada uno de los picos de los estándares y de las muestras. La Figura 20A muestra el espectro de absorción, entre las longitudes de onda de 200 a 300 nm para cada uno de los estándares inyectados; los cuales son muy similares entre si. Este análisis aplicado a cada uno de los picos de los cromatogramas de las muestras almacenadas a distintas temperaturas identificó tres picos con espectros idénticos cuyos tiempos de retención fueron 1.67, 25.4 y 25.5 minutos que fueron clasificadas como fracciones F1, F2, y F3 respectivamente. La Figura 20B muestra los espectros de dichas fracciones seleccionadas de los bulbos almacenados a Temperatura Ambiente durante 30 días cuyo espectro fue similar al de los estándares inyectados. Estos estudios corroboran otros experimentos desarrollados en el laboratorio para esta misma variedad de ajo.



**Figura 20. A. Espectros de los estándares comerciales GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>9</sub>.  
B. Espectros de F1, F2 y F3 de los bulbos almacenados 30 días a Temperatura Ambiente.**

Las muestras transferidas de las tres temperaturas de almacenamiento a 23 °C durante un periodo de 15 y 30 días también mostraron los mismos tres picos que las muestras sin transferir (Figuras 21A, 21B y 21C)

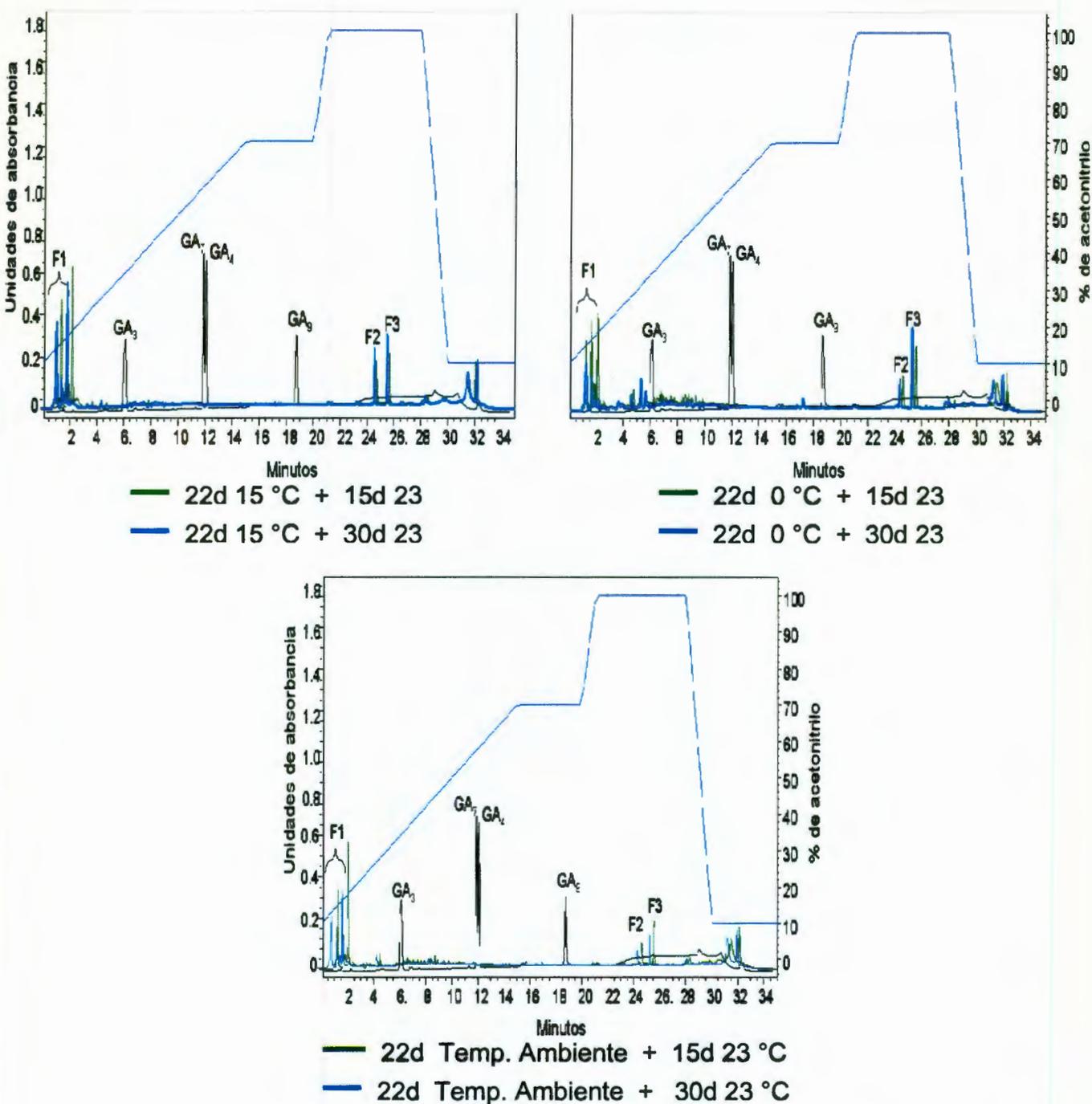


Figura 21. **A.** Cromatograma de los extractos libres de ajo almacenado a 15 ° C y transferido a 23 ° C. **B.** Cromatograma de los extractos libres de ajo almacenado a 0 ° C y transferidos a 23 ° C. **C.** Cromatograma de los extractos libres de ajo almacenado a Temperatura Ambiente y transferido a 23 ° C.

A los cromatogramas obtenidos de los muestras transferidas también se les analizó el espectro a las tres fracciones presentadas y se obtuvieron espectros idénticos a los mostrados en la Figura 20B, para las tres temperaturas transferidas durante los 15 y 30 días de almacenamiento a 23 °C.

### VI.3.2. Giberelinas ligadas

En los tejidos vegetales en crecimiento, las giberelinas pueden presentarse en forma libre o ligada a otras moléculas con lo que cambian su actividad biológica. Estas giberelinas pueden estar ligadas a moléculas de azúcar; se ha supuesto que este mecanismo puede ser un elemento de control del crecimiento que utilizan las plantas durante su desarrollo, por lo que en este trabajo se analizó la presencia de este tipo de giberelinas en diferentes periodos y condiciones de almacenamiento. El análisis de estas fracciones se basa en que las giberelinas al estar asociadas a moléculas de azúcar, su solubilidad en una fase orgánica disminuye y aumenta en una fase acuosa por lo que llevando a cabo una hidrólisis ácida de la fracción acuosa de los extractos, se liberaría una fracción de giberelinas libre que podría ser extraída mediante un solvente orgánico y analizada de la forma descrita en la metodología para giberelinas libres.

La Figura 22 muestra un cromatograma de los extractos acuosos hidrolizados, extraídos en fase orgánica e inyectada en el HPLC correspondiente a las tres temperaturas de almacenamiento a los 0 y 15 días. Las fracciones o picos observados en los análisis de giberelinas libres no se observaron en ninguna de las muestras y tampoco correspondieron con ninguno de los estándares comerciales. Lo anterior sugiere que las tres fracciones de giberelinas libres no tienen una giberelina ligada correspondiente. Sin embargo, apareció un nuevo pico (FL) con tiempo de retención de 5.3 minutos el cual es diferente al mostrado por los estándares y las fracciones libres, pero al analizar el espectro de este pico (Figura 23) se observó una similitud con el espectro de los estándares por lo que puede sugerir otro tipo de giberelina.

La presencia de esta nueva fracción no fue constante durante todo el proceso de almacenamiento, al inicio del almacenamiento sus valores fueron altos, y después de 15 días de almacenamiento aumentaron en la condición de temperatura ambiente y disminuyeron a 0 y 15 °C. Los periodos de almacenamiento subsecuentes no parecieron inducir, de forma evidente, la síntesis de esta fracción.

El almacenamiento directo a 23 °C por 15 y 30 días mantuvo altos los valores de esta fracción (FL), mientras que las transferencias de temperatura ambiente a 23 °C aparentemente bloqueó la síntesis de esta fracción, a 0 °C el contenido fue muy bajo hasta los 30 días de almacenamiento y su correspondiente transferencia a 23 °C por 30 días. Después de este periodo ya no se detectó la fracción mencionada. Para la transferencia de 15 °C a 23 °C presentó al inicio del muestreo una concentración de 0.11 mg equivalentes de GA3/gr de hoja de brotación al estar 15 días a 23 °C mientras que para el almacenamiento durante 30 días tuvo una concentración de 0.97 mg equivalentes de GA3/gr de hoja de brotación liofilizada cabe mencionar que las concentraciones obtenidas de la transferencia de ésta temperatura fueron menores que a Temperatura Ambiente hasta el almacenamiento constante a 15 °C por 15 días y su respectiva transferencia por 15 días ya que a los 30 días a 23 °C disminuyó considerablemente hasta que desaprecio en el siguiente periodo de muestreo.

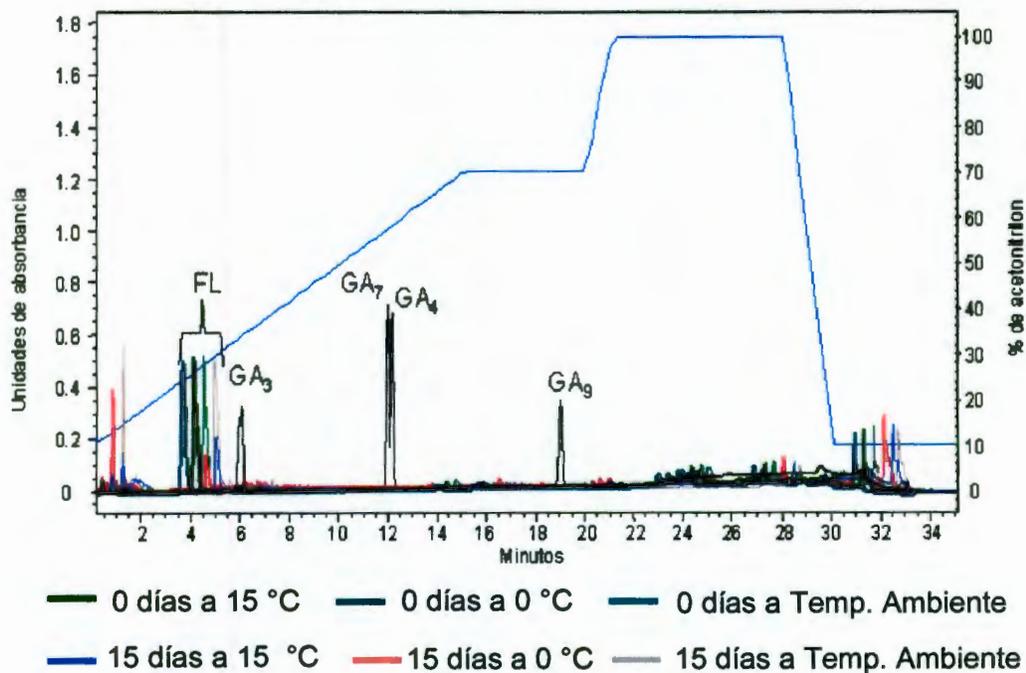


Figura 22. Cromatograma de los extractos hidrolizados de ajo almacenado a 15 °C, 0 °C y Temperatura Ambiente al inicio y 15 días del almacenamiento.

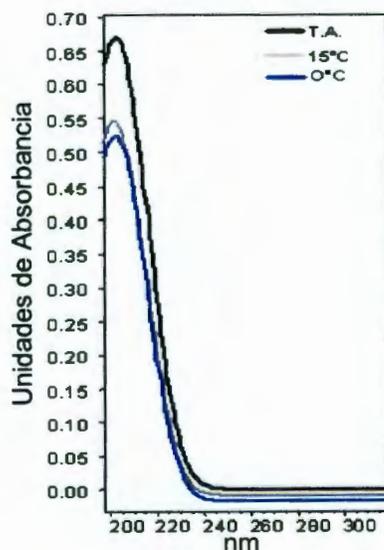


Figura 23. Espectro de los extractos hidrolizados de ajos almacenados a 15 °C, Temperatura Ambiente y 0 °C.

## VI.4. Cuantificación de Giberelinas

### VI.4.1. Giberelinas Libres

#### VI.4.1.1. Bulbos almacenados a Temperatura Ambiente y su transferencia a 23 °C

La cantidad de giberelinas en los extractos de las muestras de ajo se reporta como miligramos equivalentes de GA<sub>3</sub> dado que se tomó como estándar externo el área del pico de este compuesto. En la Figura 24A se presentan las variaciones de las tres fracciones de los extractos y su índice de brotación de ajos almacenados a temperatura ambiente. Al inicio del almacenamiento, la F2 y la F3 mostraron un contenido 0.087 y 0.195 mg equivalentes de GA<sub>3</sub> respectivamente, después de 30 días de almacenamiento las dos fracciones alcanzaron un máximo de concentración (F2= 0.33 y F3= 0.72), lo cual coincidió con el inicio del crecimiento del brote representado por el índice de brotación esto sugiere una relación causa efecto de estas fracciones con el proceso de brotación. Después de 30 días de almacenamiento todas las fracciones tendieron a disminuir hasta los 90 días que duro el presente trabajo.

La transferencia de temperatura ambiente a 23 °C permitió observar que después de 15 días de transferencia (Figura 24B) hubo cambios importantes en el comportamiento de las distintas fracciones que contrastaron con el comportamiento de las mismas bajo las condiciones de almacenamiento continuo a temperatura ambiente; la fracción F1 mostró un incremento notable mientras que la fracción F2 mostró un incremento muy discreto y prácticamente permaneció constante en todos los periodos de transferencia. La fracción F3 mostró un incremento más discreto respecto del almacenamiento continuo a Temperatura Ambiente pero con un patrón similar.

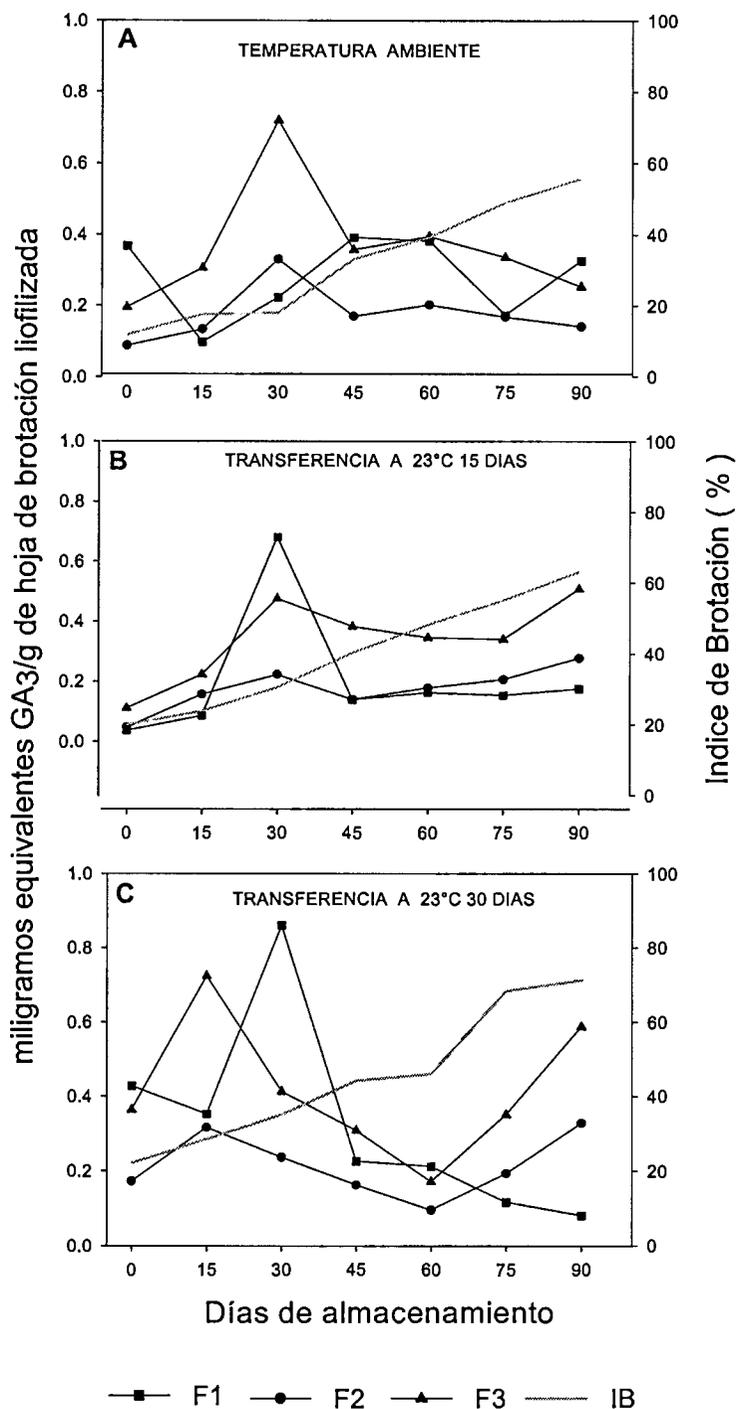


Figura 24. Cambios en el contenido de las fracciones F1, F2 y F3 e índice de brotación de ajo almacenado a Temperatura Ambiente. **A.** Durante 90 días en forma continúa. **B.** transferido a 23 °C -15 días. **C.** transferido a 23 °C - 30 días.

Para el caso de la transferencia de Temperatura Ambiente a 23 °C por 30 días (Figura 24C) la fracción F3 tuvo un máximo después de 10 días de almacenamiento a Temperatura Ambiente para después disminuir hasta un mínimo a los 60 días de almacenamiento a Temperatura Ambiente y a partir del cual vuelve a incrementarse hasta el final de los muestreos; los dos incrementos de esta fracción parecen tener relación directa con el crecimiento del brote. La fracción F1 mostró un incremento importante en su síntesis durante los primeros 30 días de almacenamiento a Temperatura Ambiente y su transferencia a 23 °C donde alcanzó un máximo que posteriormente disminuyó durante los demás muestreos. La fracción F2 mostró cambios menos importantes respecto de las otras dos fracciones, mostrando un ligero incremento durante los primeros 15 días de almacenamiento a Temperatura Ambiente para después disminuir hasta los 60 días y nuevamente incrementarse hasta el final del almacenamiento.

Bajo las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y transferencia a 23 °C; parece haber una participación diferenciada de las distintas fracciones tipo giberelinas sugiriendo que la fracción F3 tiene un papel más importante en condiciones de almacenamiento a temperatura cambiante como la ambiente y que bajo condiciones de temperatura constante (23 °C) las fracciones F1 y F2 asumen el papel de mayor importancia.

También las figuras 24 A,B y C permiten mostrar que el crecimiento final del brote durante las transferencias a 23 °C parece estar asociada a la síntesis final de las fracciones F2 y F3.

#### VI.4.1.2. Bulbos almacenados a 15 °C y su transferencia a 23 °C

La Figura 25A muestra los cambios en la concentración de sustancias tipo giberelinas de los bulbos de ajo almacenados a 15 °C. Los bulbos almacenados a esta temperatura en forma continua, presentaron un incremento en la concentración de sustancias tipo giberelinas en las tres fracciones (F1=0.94, F2=0.50, F3=0.76 mg equivalentes de GA<sub>3</sub>/g de hoja de brotación liofilizada) durante los primeros 15 días, este incremento se continuó hasta los 29 días para la fracción F1 mientras que las fracciones F2 y F3 disminuyeron su concentración hasta los 50 días de observación. Después de 29 días, la fracción F1 disminuyó su concentración hasta valores por debajo de las otras dos fracciones. El incremento inicial en el índice de brotación de los dientes de ajo estuvo asociado a la síntesis de las tres fracciones y aparentemente la disminución en el ritmo de crecimiento del brote se asocia a la disminución en la síntesis de las tres fracciones.

La transferencia de las muestras de 15 °C a 23 °C durante 15 días (Figura 25B) provocó una notable disminución de la síntesis de las tres fracciones, (F<sub>1</sub>=0.11, F<sub>2</sub>= 0.19, F<sub>3</sub>=0.45 mg equivalentes GA<sub>3</sub>/g de hoja de brotación liofilizada) al permanecer 50 días a 15 °C y 15 días a 23 °C aunque el brote continuó su crecimiento incluso con valores de índice de brotación mayores que los registrados a las condiciones de 15 °C en forma continua. Estos resultados parecen sugerir que la producción de giberelinas durante el almacenamiento a 15 °C son las responsables del mayor crecimiento del brote durante las transferencias a 23 °C.

Las transferencias de 15 a 23 °C durante 30 días (Figura 25C) indujo una nueva síntesis de las tres fracciones durante los primeros 15 días de almacenamiento continuo a 15 °C para después disminuir a un mínimo a los 29 días de almacenamiento y finalmente un nuevo incremento en las fracciones F2 y F3. La comparación de resultados sugiere que la transferencia a 23 °C por 30 días induce una nueva síntesis de giberelinas.

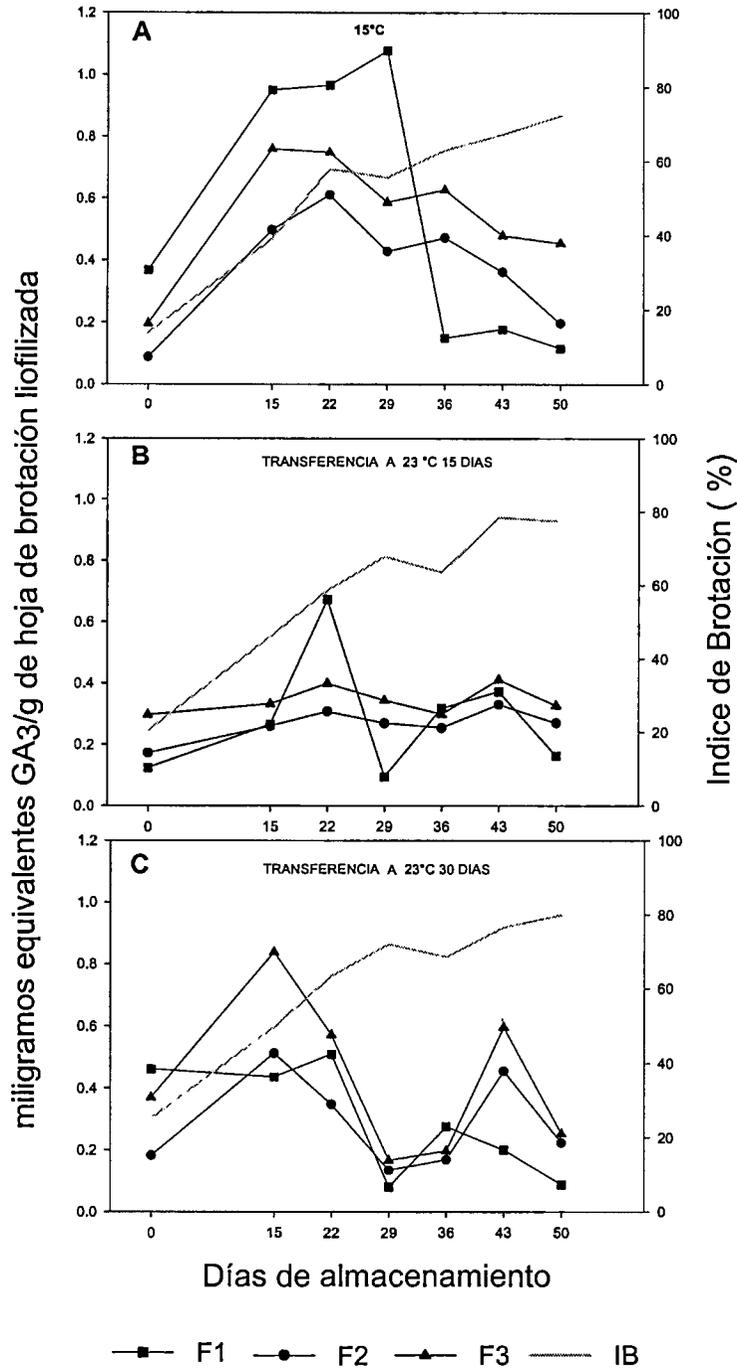


Figura 25. Cambios en el contenido de las fracciones F1, F2 y F3 e índice de brotación de ajo almacenado a 15°C. **A.** Durante 90 días en forma continua.

**B.** transferido a 23 °C - 15 días. **C.** transferido a 23 °C - 30 días.

#### VI.4.1.3. Bulbos almacenados a 0 °C y su transferencia a 23 °C

El contenido de las fracciones tipo giberelinas F2 y F3 fue baja (F2=0.15, F3=0.34) en las muestras almacenadas de forma continua a 0° C, así como también el desarrollo del brote fue muy pequeño (Figura 26A). No obstante, la fracción F1 mostró un máximo en el día 30 de almacenamiento. (F1=0.67) aunque esto no se correlacionó con el crecimiento del brote. El índice de brotación permaneció bajo durante el periodo de almacenamiento alcanzando solo 21% a los 75 días.

Las transferencias de 0 a 23 °C durante 15 días (Figura 26B) mostraron una baja concentración de las fracciones F1 y F2; sin embargo, F3 se incrementó hasta 0.57 mg equivalentes de GA<sub>3</sub>. En estas condiciones de almacenamiento, el índice de brotación empezó a crecer aunque solo alcanzó el 58% al final del periodo de almacenamiento estudiado. Lo anterior, parece indicar que aunque durante el almacenamiento a baja temperatura se sintetizan algunas sustancias tipo giberelinas, el crecimiento del brote no se da seguramente por otro factor directamente relacionado con la baja temperatura. El inicio del crecimiento del brote pareció estar relacionado con una ligera mayor cantidad de la fracción F3.

La transferencia de muestras de 0 a 23 °C por 30 días (Figura 26C) mostró un incremento en la síntesis de las fracciones F2 y F3 (0.41 y 0.58 mg equivalentes de GA<sub>3</sub> respectivamente) durante los primeros días de almacenamiento continuo a 0 °C; no obstante, el índice de brotación no mostró diferencias respecto de las muestras analizadas después de 15 días de transferencia.

Dado que el índice de brotación no mostró diferencias entre las transferencias a los 15 y 30 días y que al final de dichos periodos de almacenamiento solo alcanzó el 58%, sugiere que es seguro almacenar ajo a 0 °C sin que se presenten problemas visibles de brotación después de un mes de comercialización a temperatura de 23 °

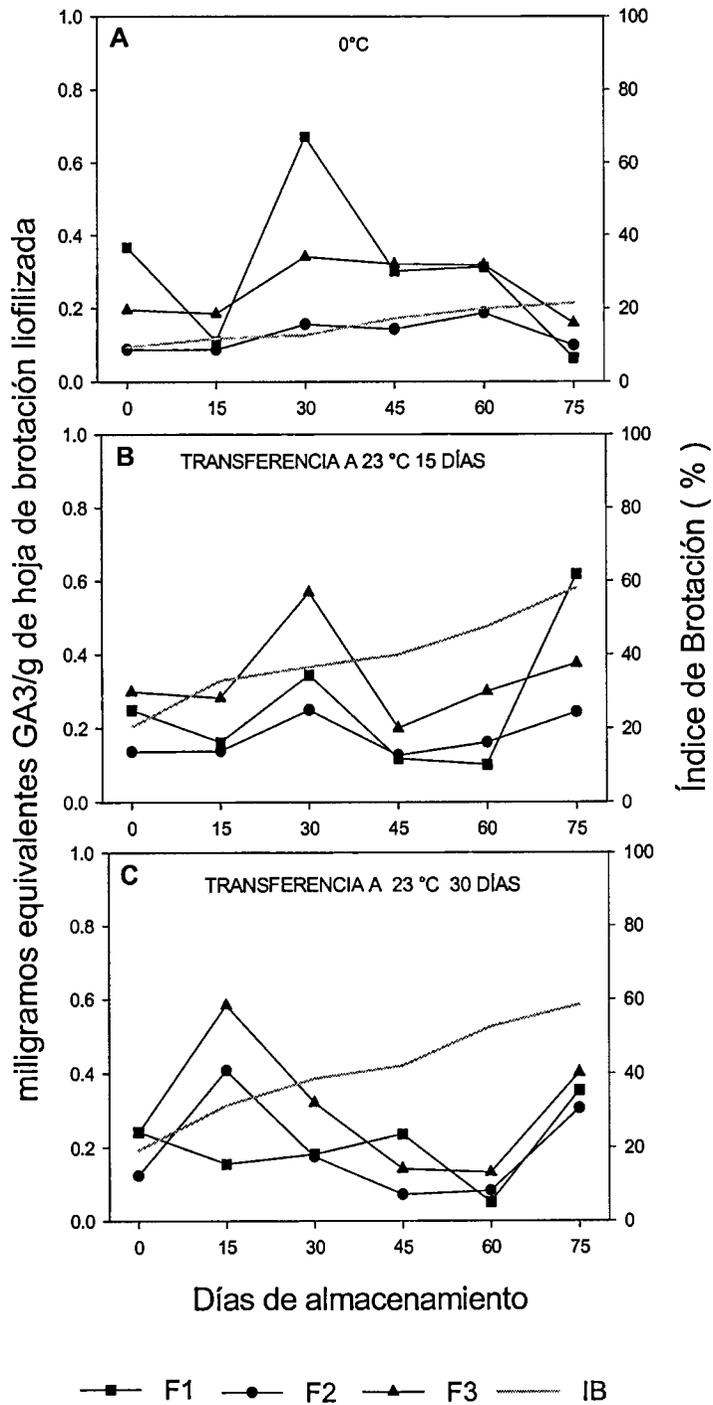


Figura 26. Cambios en el contenido de las fracciones F1, F2 y F3 e índice de brotación de ajo almacenado a 0 °C. **A.** Durante 90 días en forma continúa. **B.** transferido a 23 °C por 15 días. **C.** transferido a 23 °C por 30 días.

### VI.3.2. Giberelinas ligadas

Como se indicó en la sección de identificación de giberelinas ligadas; las fracciones F1, F2 y F3 no tuvieron sus correspondientes formas ligadas y apareció una nueva fracción (FL) sin relación con las formas libres. No obstante, y también como se indicó en aquella sección, esta no mostró un patrón definido de su producción en los distintos tratamientos estudiados. El Cuadro 11 concentra de forma comparativa los contenidos de ambos tipos de giberelinas en los distintos sistemas de almacenamiento estudiados.

Al inicio del muestreo (0 días) la fracción FL mostró un contenido de 0.95 mg equivalentes  $GA_3$  mientras que las libres presentaron una menor concentración (Cuadro 11). Los bulbos almacenados durante 15 días a Temperatura Ambiente tuvieron un incremento en las fracciones libres principalmente F3 pero este incremento fue más notable en la fracción ligada donde alcanzó un valor de 1.1 mg equivalentes  $GA_3$ .

El almacenamiento a 15 °C y 0 °C provocó un decremento en el contenido de la fracción ligada pasando de 0.95 a 0.33 y 0.18 mg equivalentes  $GA_3/g$  de hoja de brotación liofilizada respectivamente; mientras que a 15 °C, las fracciones libres F1 y F3 se incrementaron hasta una concentración de 0.94 y 0.76 mg equivalentes de  $GA_3$  respectivamente. De forma contrastante y dentro de los primeros 15 días de almacenamiento a 0°C las formas libres fueron notablemente menores que la fracción ligada que alcanzó un valor de 0.18 mg equivalentes  $GA_3/g$  de hoja de brotación liofilizada.

Cuadro 11. Contenido de fracciones tipo giberelinas libres y ligadas de ajo 'Perla' durante los dos primeros periodos de almacenamiento a diferentes temperaturas.

Temperatura	Tiempo de almacenamiento (días)	<sup>1</sup> Concentración de fracciones libres	<sup>1</sup> Concentración de fracción ligada
Ambiente	0	F1= 0.36 F2=0.08 F3=0.19	0.95
	15	F1= 0.09 F2=0.13 F3=0.19	1.11
15°C	0	F1= 0.36 F2=0.08 F3=0.19	0.95
	15	F1= 0.94 F2=0.50 F3=0.76	0.33
0°C	0	F1= 0.36 F2=0.08 F3=0.19	0.95
	15	F1= 0.11 F2=0.08 F3=0.18	0.18

<sup>1</sup> mg equivalentes de GA<sub>3</sub>/ g de hoja de brotación liofilizada

La aparición de esta fracción (FL) no fue constante en las transferencias, ya que durante el tiempo en el que se llevó a cabo el experimento solo se obtuvo cuando los ajos se almacenaron a 23 °C sin presentar un periodo previo de temperatura de conservación y cuando los ajos permanecieron 15 días en temperatura de conservación y posteriormente transferidos a 23 °C.

El cuadro 12 muestra los valores de esta fracción para las muestras transferidas de su condición de almacenamiento a 23 °C, se observa que los valores de las muestras que estuvieron 15 días a 23 °C (muestra destinada a Temperatura Ambiente), no presentó dicha fracción, en tanto que las muestras destinadas a 15 °C sí presentaron esta fracción al igual que las muestras de 0 °C aunque ésta en una concentración muy baja; por otro lado la muestra almacenada por 30 días a 23 °C proveniente del lote destinado al almacenamiento a Temperatura Ambiente, 15 °C y 0 °C registraron esta fracción pero nuevamente, el valor más bajo fue para la temperatura de 0 °C.

En el mismo cuadro se puede observar que las muestras que estuvieron 15 días a Temperatura Ambiente y transferidas por 30 días presentaron una concentración similar al de las muestras que estuvieron 15 días a 0 °C y transferidas a 23 °C durante el mismo periodo. Las muestras transferidas de 15 días a 15 °C tuvieron una concentración muy baja respecto a las otras dos temperaturas tanto a los 15 y 30 días a 23 °C.

Es importante hacer notar que después de 15 días de almacenamiento solo la temperatura de 0 °C presentó esta fracción, sin embargo después al igual que las otras dos temperaturas estudiadas no presentó cantidades apreciables de esta fracción de giberelina, es por ello que en el Cuadro 12 no se registran datos respecto de estos muestreos.

Cuadro 12. Contenido de fracciones tipo giberelinas libres y ligadas de bulbos de ajo 'Perla' almacenado a diferentes temperaturas y sus transferencias a 23 °C por 15 y 30 días.

Tratamiento	<sup>1</sup> Concentración de las fracciones libres			<sup>1</sup> Concentración de las fracciones ligadas
	F1	F2	F3	FL
0 días T.A – 15 días 23°C	0.03	0.04	0.11	
0 días T.A – 30 días 23°C	0.43	0.17	0.36	0.14
15 días T.A. – 15 días 23°C	0.08	0.15	0.22	0.15
15 días T.A. – 30 días 23°C	0.35	0.31	0.72	0.19
0 días 15°C – 15 días 23°C	0.12	0.17	0.30	0.11
0 días 15°C – 30 días 23°C	0.46	0.18	0.37	0.97
15 días 15°C – 15 días 23°C	0.25	0.26	0.33	0.10
15 días 15°C – 30 días 23°C	0.43	0.51	0.83	0.0019
0 días 0°C – 15 días 23°	0.24	0.13	0.30	0.03
0 días 0°C – 30 días 23°	0.24	0.12	0.24	0.0034
15 días 0°C – 15 días 23°	0.16	0.14	0.28	0.23
15 días 0°C – 30 días 23°	0.15	0.41	0.58	0.18
30 días 0°C – 15 días 23°	0.34	0.25	0.57	0.19
30 días 0°C – 30 días 23°	0.18	0.17	0.32	0.21

<sup>1</sup> mg equivalentes de GA3/ gr de hoja de brotación liofilizada

## VII.- DISCUSIÓN

### VII.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el Índice de Brotación.

#### VII.1.1. Almacenamiento a Temperatura Ambiente y su transferencia a 23 °C

El índice de brotación obtenido en el almacenamiento a Temperatura Ambiente mostró un nivel alto en el transcurso de los muestreos (71% IB) pero fue el más bajo respecto del obtenido a 15°C (80% IB). Resultados similares se han encontrado en trabajos realizados por Brewster (1987) el cual estudio la brotación en bulbos almacenados a 1°C, 10°C, 17°C y 25°C encontrando que el índice de brotación fue más bajo a 25°C que el encontrado en las otras tres temperaturas de almacenamiento. Cantwell (2005), menciona que el ajo puede ser almacenado en buenas condiciones por 1-2 meses a temperatura ambiente con una humedad relativa menor al 75% lo cual concuerda con los resultados obtenidos en las muestras almacenadas a dicha temperatura ya que el aspecto general del ajo permaneció adecuado para su comercialización.

Con respecto a las transferencias a 23 °C, en el Cuadro 6 se puede observar que al realizarse la transferencia de Temperatura Ambiente a 23 °C hubo diferencias significativas en el crecimiento del brote entre los 15 y 30 días de transferencia, solo a los 60 días de permanecer los ajos a Temperatura Ambiente y después ser transferidos a 23 °C no hay un cambio significativo en la brotación con respecto al tiempo que permanecen los ajos almacenados a 23 °C.

#### VII.1.2. Almacenamiento a 15 °C y su transferencia a 23 °C

El impulso presentado en el índice de brotación en el ajo 'Perla' almacenado a 15 °C ha sido observado en trabajos realizados por Vázquez-Barrios (2005), López-Echevarría (2004) y Flores-Flores (2005) quienes estudiando diferentes variedades de ajo encontraron que ésta temperatura favorece la brotación.

Cantwell (2005) y Rivero (1997), mencionan que el ajo pierde el estado de letargo más rápidamente cuando es almacenado a intervalos de temperaturas de 5° - 18°C. Los resultados del presente trabajo también añaden que la temperatura de 23°C es inductora de la brotación por lo que el rango de temperatura es más amplio que el indicado por estos autores.

En el cuadro 7 se observa que los ajos que fueron almacenados a 15 °C y posteriormente transferidos a 23 °C tuvieron un incremento significativo en el índice de brotación a los 30 días de permanecer a 23 °C, esta misma situación se presentó a los 22 y 36 días de estar almacenados a 15°C. Sin embargo a los 43 y 50 días ya no existió un incremento significativo en la brotación entre los 15 y 30 días de permanecer a 23 °C. Esos resultados son similares a los expuestos por López-Echevarría (2004), quien estudiando al ajo 'Chino' realizó una transferencia de 15 °C a 20 °C teniendo un incremento notorio en la brotación las primeras tres semanas de almacenamiento permaneciendo después el índice de brotación sin un cambio significativo. Por otro lado, Vázquez-Barrios (2005) trabajando con ajo 'Taiwan' y 'Chino' no encontró diferencias significativas en el proceso de brotación entre las muestras almacenadas a 15 °C con las transferidas a 20 °C durante 15 días.

### VII.1.3. Almacenamiento a 0 °C y su transferencia a 23 °C

Los resultados de brotación en los ajos almacenados a 0 °C mostraron claramente que esta temperatura retarda este proceso, ya que se obtuvo 21% de índice de brotación a los 75 días de almacenamiento.

Estos datos coinciden con los resultados encontrados por Vázquez-Barrios (2005), para el caso de ajos 'Taiwan' y 'Chino' quien encontró que a una temperatura de 0°C existía una inhibición del brote para las dos variedades.

Diversos autores recomiendan esta temperatura para el almacenamiento del ajo entre ellos Ryall y Lipton (1972), quienes aconsejan la temperatura de -0.6 a 0°C con un 70% de humedad relativa para que el almacenamiento del ajo sea satisfactorio hasta por un periodo de 6 a 7 meses, sin embargo Rivero (1997) menciona que temperaturas inferiores a 0°C pueden causar daños por congelación.

En el cuadro 8 se mostró que los bulbos transferidos de 0°C a 23°C durante 15 y 30 días tuvieron una diferencia significativa en el índice de brotación (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ), incrementando el valor de índice de brotación hasta tres veces en los ajos transferidos con respecto a los almacenados a 0°C; sin embargo, éste crecimiento no superó al obtenido por las muestras almacenadas a Temperatura Ambiente y 15 °C. Estos mismos comportamientos los obtuvieron López-Echevarría (2004) y Vázquez-Barrios (2005) al trabajar con ajo Perla, 'Taiwan' y 'Chino'.

Al realizarse la transferencia de 0 °C a 23 °C se pudo observar nuevamente que no hubo diferencia significativa entre las transferencias por 15 y 30 días de almacenamiento a 23 °C. Estos resultados sugieren dos cosas importantes; la primera de ellas es que la temperatura de 0 °C frena completamente el proceso de brotación y que el arranque del mismo se da por la influencia de las temperatura inductoras de brotación (23 °C), no obstante, ésta influencia solo se da en los primeros 15 días en que los dientes de ajo se encuentran a esa temperatura.

## VII.2. Identificación presuntiva de Giberelinas por Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La Cromatografía en Capa Fina es un buen método para la separación de giberelinas, sin embargo coincidiendo con lo mencionado por Cavell y col. (1967), los  $R_f$  no son reproducibles y no pueden ser estandarizados en términos de compuestos de referencia.

En la Figura 17B se puede apreciar que los extractos de los ajos que permanecieron a 0 °C durante 15 días presentaron un mismo  $R_f = 0.61$ , tanto en su fracción libre y ligada, mientras que a los 90 días de almacenamiento a esta temperatura se obtuvo este mismo valor pero solo en la fracción libre. Estos resultados llaman la atención dado que al realizar una separación de giberelinas por HPLC tampoco se observaron fracciones de este periodo de muestreo, pero esto se explica más detalladamente en la siguiente sección.

Vázquez-Barríos (2005) realizó esta técnica con la misma fase móvil para ajo Chino y 'Taiwan', sin embargo, los valores de  $R_f$  de las bandas no coinciden con los obtenidos en este estudio. El  $R_f = 0.98$  comparado con el  $R_f$  del estándar de  $GA_9$  ( $R_f = 1.0$ ) nos hizo suponer que posiblemente nuestras muestras presentaran esta giberelina.

La Cromatografía realizada para los extractos libres de ajos transferidos a 23°C durante 15 y 30 días sin permanecer previamente a una temperatura de conservación presentó seis bandas, pero solo el valor de  $R_f = 0.91$  es reproducible para los extractos hidrolizados. Sin embargo las bandas presentadas por los extractos libres de ajos almacenados durante 90 días a 0°C y transferidos durante 15 y 30 días presentan bandas muy diferentes entre ellas y solo coincide el  $R_f = 0.94$  con las fracciones ligadas.

### VII.3. Separación de giberelinas

#### VII.3.1. Giberelinas libres

Los cromatogramas obtenidos en el HPLC para los bulbos almacenados a 0°C, 15°C y Temperatura Ambiente y sus respectivas transferencias, presentaron 3 picos con el mismo tiempo de retención que los encontrados por Vázquez-Barríos (2005) en brotes de ajo 'Taiwan' y 'Chino', y por López Echevarría (2004) para el caso de ajo 'Perla' y 'Chino', éstos se ordenaron de forma ascendente según el

tiempo de retención y se clasificaron como F1, F2 y F3, las dos últimas fracciones tuvieron tiempos muy cercanos siendo F3 siempre la de mayor intensidad. Vázquez-Barrios (2005) al estudiar la producción de giberelinas en distintos ambientes de almacenamiento, (0 °C, 15 °C, 30 °C) determinó que la fracción F2 era la responsable de desencadenar el proceso de crecimiento del brote y que la fracción F1 tenía una participación menor. Los resultados aquí expresados parecen corroborar de forma general los hallazgos de esta autora aunque en este trabajo se observa una participación importante de la fracción F3 especialmente cuando las muestras se transfirieron de la condición de 0 °C a 23 °C.

Los resultados anteriores sugieren cambios en el metabolismo de giberelinas que pueden hacer pensar que hay una respuesta diferenciada a nivel metabólico de las giberelinas utilizadas en distintas condiciones de almacenamiento. Esto merece un estudio más profundo respecto del tipo de giberelinas a que corresponde cada una de las fracciones descritas y con ello tratar de deducir el papel de cada una de ellas.

### VII.3.2. Giberelinas Ligadas

El cromatograma obtenido de la fracción hidrolizada de los extractos de ajo presento un solo pico al inicio del muestreo (0 días) y en el siguiente muestreo de las diferentes temperaturas de almacenamiento así como en algunas de sus respectivas transferencias. No se sabe con precisión que factor provocó que en las siguientes muestras no se obtuviera dicha fracción.

## VII.4. Cuantificación de Giberelinas

### VII.4.1. Giberelinas Libres

#### VII.4.1.1. Almacenamiento a Temperatura Ambiente y su transferencia a 23 °C

La concentración de sustancias tipo giberelinas de los ajos almacenados a Temperatura Ambiente se mantuvo bajo en la mayoría de los muestreos presentando solo un máximo en la F2 y la F3 a los 30 días de almacenamiento coincidiendo con los resultados obtenidos por López-Echevarria (2004).

#### VII.4.2. Almacenamiento de ajo a 15 °C y sus transferencias a 23 °C

La concentración de las fracciones incrementó notablemente en esta temperatura de almacenamiento coincidiendo con el aumento presentado en el índice de brotación, ésta relación puede ser aceptable debido a que ya se ha citado por diversos autores que las giberelinas son importantes para que se presente la ruptura del letargo. Este incremento de concentración en las fracciones fue obtenido por Vázquez-Barrios (2005), en ajos variedad 'Taiwan' y 'Chino' almacenados a 15 °C.

Los ajos almacenados a 15 °C y posteriormente transferidos a 23°C durante 15 días presentaron una disminución de concentración en las tres fracciones. Según Hedden y col. (1978), la temperatura, la luz y otras fitohormonas pueden afectar los niveles de giberelinas. Por otro lado, el índice de brotación continuó incrementándose aunque con una diferencia mínima entre los que permanecieron a 15 °C. Sin embargo cuando los bulbos permanecieron 30 días a 23 °C la concentración de sustancias tipo giberelinas incremento nuevamente en las fracciones F2 y F3 sin tener una influencia marcada sobre el crecimiento del brote. Vázquez-Barrios (2005), al transferir a 20 °C bulbos de ajo variedad 'Taiwán'

almacenados a 15 °C obtuvo un incremento en la concentración de las tres fracciones al igual que en el ajo 'Chino'.

#### VII.4.3. Almacenamiento del ajo a 0 °C y su transferencia a 23 °C

La concentración de sustancias tipo giberelinas fue presentando un incremento a lo largo del periodo de almacenamiento disminuyendo marcadamente en el día 75, éste aumento no tuvo una relación directa con el crecimiento del brote lo cual fue también reportado por Vázquez.-Barrios (2005) en las variedades de ajo 'Taiwán' y 'Chino'.

Warein y Saunders (1971), asumen que el efecto de las bajas temperaturas se ve reflejado en el incremento de la actividad de giberelinas lo cual podría traer como resultado una rápida ruptura del periodo de dormancia, esto no ocurrió con los resultados obtenidos dado que a pesar de que existe un incremento en las sustancias tipo giberelinas no hubo un impulso en la brotación lo que sugiere que este proceso esta controlado no solo por la síntesis de giberelinas sino también por otros factores como la luz y la temperatura.

Vázquez-Barrios (2005), sugirió que a bajas temperaturas hay biosíntesis de giberelinas pero la ruptura del letargo está controlada por la baja temperatura y que al transferir el ajo a temperatura ambiente se desencadena un crecimiento acelerado debido a las giberelinas formadas, esto podría explicar el porque los bulbos no presentan un crecimiento del brote significativo hasta que son transferidos a temperatura ambiente.

#### VII.4.3.1. Giberelinas Ligadas

La obtención de giberelinas ligadas no fue en todos los muestreos como ya se planteo en los resultados pero en los que se tuvo su concentración aportan resultados interesantes, los bulbos almacenados a TA 15°C y 0°C presentan el mismo efecto ya que la fracción ligada disminuye un muestreo antes de que las fracciones libres alcancen el máximo de concentración y éstas ya no se presentan después de ese muestreo, estos resultados tienen relación con los citados por Eagles y Wareing (1963), quienes notaron que mientras ciertas fracciones de giberelinas endógenas incrementaban en el periodo de Diciembre a Abril otras decrecían durante este mismo intervalo de tiempo.

El comportamiento de la concentración de la fracción ligada obtenida en las transferencias fue muy similar a los bulbos que permanecieron sin transferir dado que cuando la concentración de sustancias tipo giberelinas ligadas era alto a los 15 días de permanecer a 23 °C la fracciones libres disminuían a los 30 días y viceversa.

## VIII.- CONCLUSIONES

El almacenamiento de ajo de 23°C propició un mayor crecimiento del brote respecto de la temperatura ambiente, lo cual indicó que esta temperatura es inductora del proceso de brotación.

Dado que trabajos previos han mostrado que temperaturas de 5 °C, 10 °C y 15 °C son inductoras de la brotación se puede decir que hay un intervalo de temperaturas más amplio que incluye la temperatura de 23°C.

La variación en la Temperatura Ambiente permite puntualizar que su margen de variación incluye todo el rango de temperaturas que propician el crecimiento del brote.

El almacenamiento a Temperatura Ambiente mantuvo al ajo dentro de un intervalo de temperaturas inductoras de brotación lo que explica su corta vida poscosecha en esta condición.

Para una mayor vida poscosecha es necesario almacenar el ajo a temperaturas cercanas a 0 °C.

Durante el periodo de almacenamiento considerado, las muestras almacenadas a 0 °C recuperaron su capacidad de brotación al transferirse a 23 °C y esta fue similar a las muestras almacenadas a temperatura ambiente. No obstante, dentro de los 90 días de almacenamiento el crecimiento interno del brote no superó el tamaño del diente por lo que no alteró la calidad de los bulbos almacenados.

De acuerdo al lo anterior y de los resultados de trabajos previos en la laboratorio, se puede decir que para almacenamientos por periodos cortos (3 meses) se tienen resultados aproximadamente similares si se almacena a 0°C o a temperatura ambiente; no obstante, para almacenamiento por periodos largos es mejor almacenar a 0°C pues en estas condiciones se inhibe la capacidad de brotación posterior al almacenamiento.

La Cromatografía en Capa Fina sugirió la presencia del metil ester de GA<sub>9</sub> y posiblemente GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>. Pero esto no fue confirmado por la técnica de HPLC.

El análisis de las giberelinas ligadas sugiere que las fracciones de giberelinas libres no tienen su correspondiente giberelina ligada en ninguna etapa de desarrollo del brote de ajo y parece mostrar un tipo de giberelina distinta a las encontradas en estado libre.

Bajo las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y transferencia a 23 °C; parece haber una participación diferenciada de las distintas fracciones de giberelinas sugiriendo que las fracción F3 tiene un papel más importante en condiciones de almacenamiento a temperatura cambiante, como la ambiente, y que bajo condiciones de temperatura constante de 23 °C las fracciones F1 y F2 asumen un papel más importante.

El almacenamiento a 23 °C induce la síntesis de giberelinas particularmente de la fracción F3.

El almacenamiento a 0 °C y su posterior transferencia a 23°C hasta por un mes, es adecuado y permite decir que durante un mes de comercialización a temperatura ambiente, no se presentarán problemas de brotado en los bulbos.

Existen tres fracciones tipo giberelinas las cuales tienen una relación con el incremento del índice de brotación, aunque las fracciones F2 y F3 parecen ser la más involucrada con este proceso.

## IX.- BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. 1999.** El ajo mexicano, una historia de eficiencia y calidad. Claridades Agropecuarias: 68: 3-10.
- Arpide, J.L. 2005.** El ajo. <http://afuegolento.com/noticias/39/firmas/arpide/1600>.
- Bell, A.D. y Bryan 1991.** Plant form: An illustrated guide to flowering plant morphology. Oxford University Press. 341.
- Bradbeer, J.W. 1967.** Studies in seed dormancy IV. The role of endogenous inhibitors and gibberellin in the dormancy and germination of *Corylus avellana* L. seeds. Planta: 78: 266 - 276
- Brewster, J.L. 1987.** The effect of temperature on the rate of sprout growth and development within stored onion bulbs. Annals of Applied Botany: 111:463-467.
- Brewster, J.L. 1994.** Onions and other vegetable *Alliums*. CAB Internacional, Wallingford U.K: 83: 147-156.
- Brückner, B., Blechschmidt, D. 1991.** The Gibberellin Fermentation. Critical Reviews in Biotechnology: 11: 163-172.
- Cantwell, M. 2005.** Recommendations for maintaining postharvest Quality. <http://aesric.ucdavis.edu/postharvest2/Produce/ProduceFacts/Veg/garlic.shtml>.
- Cavell, B.D., MacMillan, J., Pryce, R.J. y Sheppard, A.C. 1967.** Plant hormones-V. Thin-layer and gas-liquid chromatography of the gibberellins: direct identification of the gibberellins in a crude plant extract by gas-liquid chromatography. Phytochemistry: 6:867-874
- FAO, 2001.** [www.appps.fao.org](http://www.appps.fao.org).
- FAO, 2005.** [www.appps.fao.org](http://www.appps.fao.org).
- Eagles, C.F. y Wareing, P.F. 1963.** Dormancy regulators in woody plants. Experimental induction of dormancy in *Betula Pubescens*. Nature:199:874-875.
- Elson, G.W., Jones, D.F., MacMillan, J., Suter, P.J. 1964.** Plant hormones. Identification of the gibberellins of *Echinocystis macrocarpa* Greene by thin layer Chromatography. Phytochemistry: 3:93-101.

- Flores-Flores, J. 2005.** Efecto de la temperatura de almacenamiento, tratamientos hidro térmicos y de la bencil adenina en la brotación de ajo (*Allium sativum* L.) variedad PBC-74. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico en alimentos.36.
- García-Alonso-Alonso, C.R. 1998.** El ajo, Cultivo y Aprovechamiento. 2da. Mundi-Prensa, Madrid:17-18.
- Graebe, J.E. 1987.** Gibberellin biosynthesis and control. Ann. Rev. Plant Physiology: 38: 419
- Hedden, P., Macmillan, J. y Phinney, B.O. 1978.** The metabolism of the gibberellins. Annu. Rev. Plant Physiol: 29: 149-192.
- Hedden, P., Kamiya, Y. 1997.** Gibberellins biosíntesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. Plant Physiol: 48: 432-435.
- Heredia, E., Delgadillo, F. 2000.** El ajo en México, origen, mejoramiento genético, tecnología de producción. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Centro de Investigación regional del centro campo experimental bajo. Libro Técnico núm.3: 14-17 y 22-27.
- Jacqueline, J. 2005.** [www.copel.com.ar/mendozainforma/edito/jime/10.10\\_0.1.htm](http://www.copel.com.ar/mendozainforma/edito/jime/10.10_0.1.htm).
- Jones, L. y MacMillan, J. 1990.** Gibberellins. Advanced Plant Physiology: 2: 21-25
- Kader, A. A. 1992.** Postharvest Technology of Horticultural Crops. 2da. UC Publication 3311. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, California 94608.
- Kurosawa, E. 1926.** Experimental studies on the secretion of *Fusarium heterosporum*. Trans Nat. Hist. Soc. Formosa: 16:213-227.
- Lang, A. 1970.** Gibberellins: Structure and metabolism. Ann. Rev. Plant Physiology. 21:537-570.
- López-Echevarría, G. 2004.** Evaluación de los parámetros de calidad de ajo almacenado y efecto de la temperatura de almacenamiento en la ruptura del letargo. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y tecnología de los alimentos. 45, 49-58, 78.

- Mann, L.K. 1952.** Anatomy of garlic bulb and factors affecting bulb development. Hilgarla: 21:195-251.
- McComb, A.J. 1961.** "Bound" Gibberellin in mature runner bean seeds. Nature:192:575-576.
- Pantastico, E.B., Subramanyam, H., Batí, M.B., Ali, N., Akamine, E.K. 1975.** Harvest indices, in Postharvest Physiology, Handling and Utilization of tropical and sub-tropical Fruits and Vegetables. The AVI Pub.Co., Westport, CT: 56.
- Paiva, E., Robitaille, H.A. 1978.** Breaking bud rest on detached apple shoots: interaction of gibberellic acid with some rest-breaking chemicals. Hort-Science:13:57-58.
- Portela, J.A. 1996.** El ambiente como regulador del desarrollo de las plantas y su efecto sobre el ajo (*Allium sativum* L.). Avances en Horticultura: 1: 19, 22, 26-28.
- Purseglove, J.W. 1985.** Monocotyledons. Tropical crops: 1:607
- Rakhimbaev, R., Ol'shanskaya, V. 1976.** Dynamics of endogenous gibberellins during the process of transition of garlic bulbs from the state of dormancy to active growth. Translated form Fiziologiya Rastenii: 23: 59-61.
- Raven, P.H., Curtis, H. 1975.** Biología Vegetal. Omega, Barcelona: 194-197.
- Raven, P.H., Evert, R., Eichnorm, E. 1986.** Biology of Plants. 4ta. Freeman, New York: 506-509.
- Richards, D.E., King, E.K., Ait-ali, T., Harberd, N. 2001.** How Gibberellin Regulates Plant Growth and Development: A Molecular Genetic Analysis of Giberellin Signaling. Annu. Rev. Plant Physiology: 52:67-88.
- Rivero, M.L. 1997.** Consideraciones sobre conservación frigorífica y transporte de ajo para consumo. Temas sobre producción de ajo: 4: 38-40.
- Ryall, A.L. , Lipton, W.J. 1972.** Vegetables and Melons. Handling Transportation and storage of Fruits an Vegetables: 1:479.
- SAGARPA, 2003.** www.sagarpa.gob.mx.
- SAGARPA, 2005.** www.sagarpa.gob.mx.
- Saure, M.C. 1985.** Dormancy Release in Deciduous Fruit Trees. Horticultural Reviews: 7:241-242.

- Seeling, R.A. 1974.** Garlic. United Fresh Fruit y Vegetable Association: 1:5-6.
- SIACON, 2002.** version 1.1. Servicio de información y estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA.
- Vázquez-Barrios, E. 2005.** Efecto de diferentes ambientes de conservación sobre la ruptura del letargo de ajo (*Allium sativum* L.) cv. Taiwan y Chino. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias. 52-55, 74-77, 79-85 y 105-110.
- Warade, S.D., Shinde, K.G. 1998.** Production, Composition, storage and Processing. Hand book of vegetable science and Technology. : 401-406.
- Wareing, P.F., Saunders, P.R. 1971.** Hormones and dormancy. Annu. Rev. Plant Physiology.: 22:261-288.
- Weaver, R. J. 1976.** Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. 1ª. Ed. Trillas, México, DF: 103-195.  
<http://www.saberes y sabores.com.ar/ajo.htm>.
- Zeevaart, J.A.D. 1971.** Effects of Photoperiod on Growth Rate and Endogenous Gibberellins in the Long-Day Rosette Plant Spinach. Plant Physiology: 47: 821–827