

Efecto de la interacción genotipo-ambiente sobre la expresión del contenido de alicina y ácido pirúvico en ajo (*Allium sativum* L.)¹

Genotype-environment interaction on the expression of allicin and pyruvic acid in garlic (*Allium sativum* L.)

Verónica Carolina Soto Vargas^{2,3}
Roxana Elizabeth González^{2,3}
María Mirta Sance^{2,3}

José Luis Burba⁴
Alejandra Beatriz Camargo^{2,3}

Originales: Recepción: 19/05/2009 - Aceptación: 22/03/2010

RESUMEN

La expresión de la intensidad del flavor en los bulbos de ajo (*Allium sativum* L.), depende tanto de factores genéticos como ambientales. Las características organolépticas se manifiestan por la presencia de compuestos organoazufrados, específicamente tiosulfatos, siendo el representante mayoritario la alicina (diallil tiosulfato). El ácido pirúvico constituye un producto secundario de la reacción enzimática generadora del flavor, por lo que su medición se asocia a la intensidad de pungencia en ajo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si la variabilidad en el contenido de alicina y pirúvico está más asociada a las características genéticas o a la influencia de las regiones de cultivo. Se seleccionaron cuatro cultivares (Castaño INTA, Sureño INTA, Lican INTA y Unión) pertenecientes al banco de germoplasma del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) La Consulta, Mendoza, Argentina, cultivados en diferentes zonas geográficas: La Consulta (Dpto. San Carlos, Mendoza), Esquel (Chubut) y Ushuaia (Tierra del Fuego). Se cuantificó la alicina mediante Cromatografía Líquida de Alta

ABSTRACT

The intensity of flavor in garlic bulbs (*Allium sativum* L.), depends on both genetic and environmental factors. Volatile organosulfur compounds, specifically thiosulfates, are responsible for organoleptic characteristics in freshly cloves, being allicin (diallyl thiosulfate) the main compound of this group. Pyruvic acid is a product of the enzymatic reaction generating of the flavor upon crushing raw garlic, so its measurement is associated with the intensity of pungency in garlic. The aim of this study was to examine whether the variability in the content of pyruvic and allicin are more associated with the genetic characteristics or the influence of the cultivation areas. For this purpose we selected four garlic cultivars (Castaño INTA, Sureño INTA, Lican INTA and Union) from the germplasm bank of INTA La Consulta, Mendoza, Argentina, grown in different geographical areas: La Consulta (San Carlos, Mendoza), Esquel (Chubut) and Ushuaia (Tierra del Fuego). Allicin was quantified by Liquid Chromatography (HPLC) and

- 1 Trabajo de investigación subsidiado por los siguientes proyectos: Proyecto SECTyP "Caracterización de cultivares argentinas de ajo para su aprovechamiento industrial y fitoterápico" y Proyecto Ajo INTA 1125 "Bases de diferenciación por calidad en productos y procesos para ajo exportable".
- 2 Laboratorio de Análisis de Residuos Tóxicos. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. vsoto@fca.uncu.edu.ar
- 3 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- 4 Estación Experimental Agropecuaria INTA La Consulta. C. C. 8. Ruta 40. km 96. (5567) La Consulta. San Carlos. Mendoza. Argentina.

Resolución (HPLC) y pungencia mediante espectrofotometría. A partir del análisis estadístico de los valores obtenidos se puede inferir que existen diferencias significativas en el contenido de alicina y pirúvico entre distintos cultivares de una misma zona y en el contenido de alicina y pirúvico para la misma cultivar en distintas zonas.

pungency by spectrophotometry. From the statistical analysis of the results obtained we may conclude that there are significant differences in the content of pyruvic and allicin among different cultivars from the same area and the content of pyruvic and allicin for the same cultivar in different areas.

Palabras clave

Allium sativum • tiosulfatos • pungencia • genotipo • efectos ambientales • HPLC

Keywords

Allium sativum • thiosulfates • pungency • genotype • environmental conditions • HPLC

INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) ha sido cultivado por más de 4000 años por sus características organolépticas y propiedades medicinales. Se han estudiado muchos resultados favorables y efectos clínicos benéficos para la salud por la ingesta de preparaciones de ajo (20). Entre dichos efectos se incluyen la reducción de los factores de riesgo asociados a enfermedades cardiovasculares, cáncer, hipercolesterolemia, glucemia e hipertensión, entre otros (4, 9, 11, 13).

En las plantas del género *Allium* las características organolépticas están dadas por los tiosulfatos; éstos y la gran serie de compuestos organoazufrados derivados de ellos, son los responsables de las diversas actividades benéficas para la salud que se atribuyen a los representantes de este género (1). Los tiosulfatos se producen cuando el tejido es dañado, a partir de los S-alquencil-L-cisteín sulfóxidos (ACSOs) localizados en el citoplasma, mediante una reacción catalizada por la enzima allinasa (una C-S liasa, presente en las vacuolas). Una vez iniciada la reacción se genera piruvato, amoníaco y ácidos sulfénicos, compuestos muy inestables, que mediante una reacción de condensación producen los tiosulfatos (11). Entre ellos, el mayoritario es el diallil tiosulfato (allicina), compuesto característico del flavor en ajo y considerado como un indicador de la calidad medicinal (5). La medición de piruvato se asocia a la intensidad de pungencia en ajo y en cebolla.

La intensidad del flavor en los bulbos depende de sus características genéticas y del ambiente en el cual son cultivados (3). Los factores ecológicos que afectan el flavor incluyen la disponibilidad de azufre, nitrógeno y selenio, temperatura de cultivo y disponibilidad de agua (8, 16). En numerosos trabajos se ha investigado cómo estos factores ecológicos afectan las características del flavor en cebolla. Hamilton *et al.* (10) estudiaron los cambios en la pungencia y el contenido de azúcar en bulbos de cebolla debidos a la fertilización del suelo con azufre. Randle *et al.* (15, 16, 17, 18) en varias publicaciones explican la influencia de la temperatura, disponibilidad de agua y de nutrientes en el crecimiento y el desarrollo de los bulbos de cebolla.

En ajo existe una menor cantidad de antecedentes en esta dirección. En un trabajo publicado por Baghalian *et al.* (2), respecto de los aspectos que influyen en la variabilidad del contenido de alicina, se menciona la influencia debida al varietal,

pero cuando éstos son cultivados en distintas zonas ecológicas, las diferencias que se reflejan son mayores y además se informa que hay un aumento en los niveles de alicina cuando las plantas son fertilizadas con azufre y nitrógeno.

La situación actual del sector de producción de ajo en la Argentina ha variado desde 1989, momento de inicio del Proyecto AJO/INTA, el cual promueve desde entonces el desarrollo de una estrategia nacional para el sector. Como resultado de esta tarea de mejoramiento se han obtenido cultivares monoclonales de ajo de los tipos comerciales violeta, blanco, colorado y castaño, que actualmente se encuentran en etapa de adopción (6).

En este contexto, estas cultivares también son evaluadas en cuanto a su *performance* en distintas localidades de Argentina. Las zonas elegidas para el presente trabajo se caracterizan por su diferencia latitudinal, la cual determina diferentes fotoperíodos anuales por lo que se esperan distintas respuestas en los parámetros de calidad evaluados (14). El conocimiento de la respuesta de cada cultivar a las distintas zonas geográficas en cuanto a la generación de principios bioactivos resulta de gran interés a la hora de planear estrategias de diferenciación de productos. Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar la influencia de algunas de estas regiones agroecológicas sobre distintas cultivares, en cuanto a su variación en el contenido de alicina y pirúvico e investigar si éstos responden principalmente a factores genéticos, ambientales o ambos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se seleccionaron cuatro cultivares (Castaño INTA, Sureño INTA, Lican INTA y Unión), cada uno perteneciente a un tipo comercial de ajo argentino, Norma IRAM/INTA 155.003, "castaño", "colorado", "violeta" y "blanco" respectivamente, las cuales fueron plantadas en diferentes zonas geográficas argentinas: La Consulta (Dpto. San Carlos, Mendoza), Esquel (Chubut) y Ushuaia (Tierra del Fuego).

Manejo de cultivo

Todos los ensayos se condujeron de la misma forma con la finalidad de asegurar condiciones lo más homogéneas posibles entre localidades, a la hora de realizar las comparaciones. Se trabajó con parcelas con un diseño de bloques completos al azar, en forma consecutiva una al lado de la otra, siguiendo un orden determinado por la época probable de cosecha, de las más tempranas a las más tardías (14). Fueron cosechadas al alcanzar su estado óptimo de maduración, curadas en galpón y luego remitidas al laboratorio para su procesamiento previo al análisis de alicina y pungencia. Las características climáticas de las diferentes regiones se detallan a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Características climáticas de las regiones de cultivo.

Table 1. Climatic characteristics from crop regions.

Región	Temperatura promedio (°C)	Precipitaciones (mm/año)	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
Ushuaia	6,2	45,8	54° 08' S	68° 32' O	16
Esquel	8,6	32,7	42° 55' S	71° 21' O	540
La Consulta	15,5	13,9	33° 45' S	69° 02' O	950

Acondicionamiento de las muestras

De cada cultivar se tomaron tres muestras compuestas de diez bulbos seleccionados al azar y se analizó por quintuplicado cada una de ellas. Las muestras fueron acondicionadas mediante la preparación de polvo de ajo en condiciones estandarizadas de laboratorio, para lo cual los dientes de ajo fueron pelados, feteados y deshidratados en estufa a $50 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 horas (12). Luego fueron pulverizados y envasados en recipientes de vidrio color caramelo, bajo atmósfera de nitrógeno.

Determinación de alicina

La cuantificación de alicina se realizó siguiendo la metodología propuesta por Lawson *et al.* (12). Se empleó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), acoplado a un detector ultravioleta. Se utilizó una columna de fase reversa (250 mm x 4,6 mm; ODS, 5 μm), y un guarda columna con las mismas características. Las muestras (10 μl) fueron inyectadas en la columna. El eluyente usado para la separación fue metanol (50% v/v) grado HPLC, con una velocidad de flujo de 1 ml min^{-1} . Los picos fueron detectados a 254 nm y procesados mediante un integrador. Como estándar externo de cuantificación fue utilizado un polvo de ajo de concentración conocida de alicina (7).

Determinación de ácido pirúvico

El contenido de ácido pirúvico fue cuantificado de acuerdo con el método de Schwimmer y Weston (19), adaptado por Natale y Camargo (13). De cada cultivar, se tomaron tres muestras al azar que fueron analizadas por quintuplicado. El color desarrollado por las muestras fue medido en un espectrofotómetro UV/Visible a 420 nm. La concentración de ácido pirúvico fue calculada a partir de una curva estándar de piruvato de sodio.

Análisis de los datos

Los datos del contenido de alicina y ácido pirúvico fueron expresados como la media y desviación estándar de cinco repeticiones por tratamiento. Para establecer las diferencias estadísticas se empleó el Análisis de la Varianza (ANOVA) utilizando el software Statgrafics. Las medias de los tratamientos se compararon por el test de Tukey HSD. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de alicina

Variabilidad en el contenido de alicina entre cultivares de una misma región

Tras la evaluación estadística de los resultados se pudo inferir que en las zonas de Ushuaia y Esquel, las cultivares evidenciaron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$), dentro de cada zona, *mientras* que en La Consulta, las cultivares Castaño INTA, Sureño INTA y Unión no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), situación que coincide con los resultados obtenidos por Camargo *et al.* (7).

El valor medio de alicina para las cuatro cultivares cosechadas en Ushuaia fue de $11,7 \pm 4,29 \text{ mg g}^{-1}$ mientras que en Esquel y La Consulta las medias fueron de $5,4 \pm 2,76 \text{ mg g}^{-1}$ y $7,3 \pm 2,29 \text{ mg g}^{-1}$ respectivamente, es decir que los niveles medios de alicina para las cuatro cultivares en Ushuaia fueron 2,1 veces mayores que las cultivares cosechadas en Esquel y 1,6 que las cosechadas en La Consulta. Estos

valores elevados pueden atribuirse a las bajas temperaturas de la región, las cuales podrían constituir uno de los factores causales de la producción de bulbos de escaso tamaño; en consecuencia, el hallazgo de mayores niveles de alicina en ajos procedentes de esta región podría deberse al aumento en la relación alicina/peso del bulbo.

En todos los casos la cultivar Lican INTA mostró los menores contenidos de alicina en las tres zonas, con un valor mínimo de $2,9 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$. Estos resultados coincidieron con los reportados por Camargo *et al.* (7) dado que la cultivar Lican INTA se clasificó en el grupo de cultivares con menores niveles de alicina, lo que permite suponer que entre las evaluadas en el presente estudio representa la cultivar que sintetiza metabólicamente menor concentración de ACSOs (figura 1).

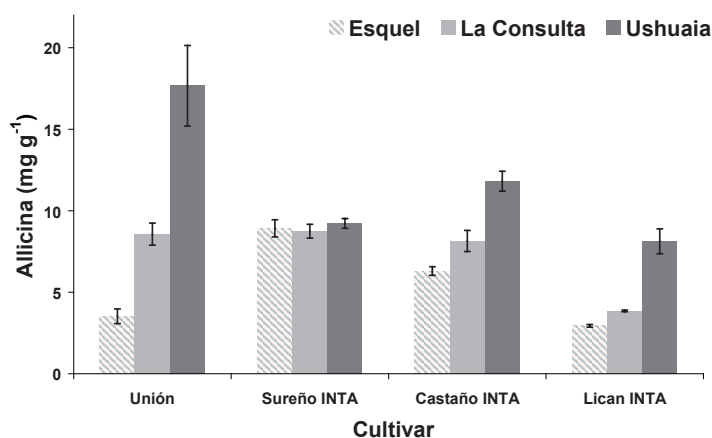


Figura 1. Contenido de alicina para cada cultivar de ajo en las distintas regiones de cultivo. Valores expresados en mg g^{-1} ($n = 5$) \pm DS.

Figure 1. Allicin content of each garlic cultivar from different crop regions. Values of allicin content are expressed in mg g^{-1} ($n = 5$) \pm SD.

Variabilidad en el contenido de alicina de cada cultivar en las distintas regiones

Las cultivares Unión y Castaño INTA presentaron diferencias significativas en las tres regiones de cultivo ($p < 0,05$) mientras que Sureño INTA no evidenció diferencias cuando fue cultivado en Ushuaia, Esquel y La Consulta, comportándose en las tres regiones estudiadas de manera regular, por lo que se podría decir que representa la cultivar de conducta más estable en cuanto al contenido de alicina en las diferentes regiones de cultivo. La cultivar Lican INTA sólo se manifestó diferente para los bulbos provenientes de Ushuaia.

La mayor cantidad de alicina fue medida en la cultivar Unión procedente de Ushuaia ($17,7 \pm 2,5 \text{ mg g}^{-1}$). (figura 1, pág. 19). Comparando los valores medios de las cultivares para cada zona se pudo además observar que la cultivar Castaño INTA se diferenció significativamente del resto.

Efecto de la interacción entre la zona de cultivo y la cultivar en el contenido de alicina

Tras el análisis estadístico de los datos se pudo observar que existió un efecto de interacción entre la zona de cultivo y la cultivar (tabla 2), es decir que el contenido de alicina se ve influenciado tanto por la cultivar como por la región donde fueron plantadas; sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la región de cultivo es determinante en la explicación de la variabilidad del contenido de alicina (45,6%).

Tabla 2. Tabla de ANOVA para la variabilidad del contenido de alicina debido a las diferentes cultivares, zonas y su interacción.

Table 2. ANOVA table for the variability of the alicin content due to the different cultivars, crop regions and their interaction.

Fuente	g.l	Suma de cuadrados		F	p
Cultivar	3	128,264	23,45%	62,159	0,0000
Zona	2	249,368	45,60%	181,273	0,0000
Cultivar x zona	6	152,665	27,91%	36,992	0,0000
Error	24	16,508	3,01%		
Total	35	546,804	100%		

Determinación de ácido pirúvico*Variabilidad en el contenido de ácido pirúvico entre cultivares de una misma región*

Teniendo en cuenta las condiciones experimentales antes mencionadas y los resultados obtenidos tras el análisis estadístico, se puede inferir que para las tres regiones las cultivares evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Las cuatro cultivares presentaron el mismo comportamiento en las tres regiones de estudio, encontrando mayores niveles en el contenido de ácido pirúvico en La Consulta con un valor medio de $243,7 \pm 17,26 \mu\text{mol g}^{-1}$, seguido de Ushuaia $168,8 \pm 55,60 \mu\text{mol g}^{-1}$ y por último Esquel donde se encontraron los valores menores presentando un valor medio de $49,7 \pm 20,84 \mu\text{mol g}^{-1}$.

En Ushuaia las cultivares Castaño INTA, Sureño INTA, Unión y Lican INTA evidenciaron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$), con una variación del 32% entre las cultivares estudiadas mientras que en La Consulta, las cuatro cultivares no presentaron diferencias significativas, con diferencias entre cultivares de 7% para el contenido de ácido pirúvico. En Esquel, Castaño INTA fue la única cultivar que presentó diferencia significativa con respecto a las otras.

Variabilidad en el contenido de ácido pirúvico de cada cultivar en las distintas regiones

Todas las cultivares presentaron diferencias significativas para el contenido de ácido pirúvico en las distintas regiones ($p < 0,05$). Lican INTA en la zona de La Consulta fue la cultivar con el mayor contenido de ácido pirúvico, con un valor máximo de $263,1 \pm 23,2 \mu\text{mol g}^{-1}$ y a la vez presentó el menor contenido de ácido pirúvico en Ushuaia y en Esquel, con un valor mínimo de $30,3 \pm 1,3 \mu\text{mol g}^{-1}$ y un valor medio para las tres regiones de cultivo de $133,7 \mu\text{mol g}^{-1}$, como se detalla a continuación en la figura 2 (pág. 21). Unión fue la cultivar con mayores niveles de ácido pirúvico con un valor medio para las tres regiones de $176,7 \mu\text{mol g}^{-1}$. En La Consulta, Sureño INTA fue la cultivar con menor contenido de ácido y la de mayor contenido fue Lican INTA.

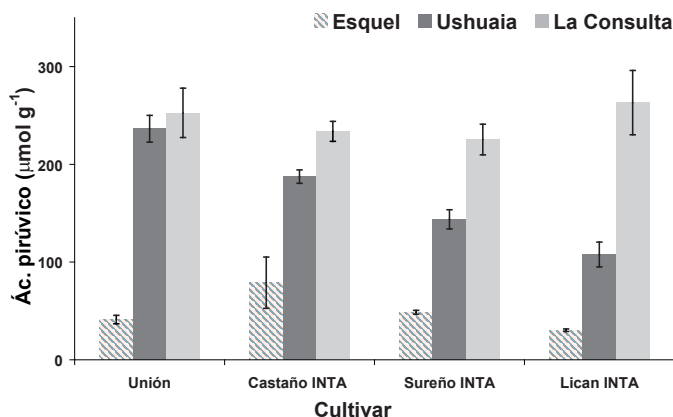


Figura 2. Contenido de ácido pirúvico para cada cultivar de ajo en las distintas regiones de cultivo. Valores expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ ($n = 5$) \pm DS.

Figure 2. Pyruvic acid content of each garlic cultivar from different crop regions. Values of pyruvic acid are expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ ($n = 5$) \pm SD.

Efecto de la interacción entre la zona de cultivo y la cultivar en el contenido de ácido pirúvico

Se pudo observar que el contenido de ácido pirúvico se vio influenciado tanto por la cultivar como por la región donde fueron plantadas, debido a un efecto de interacción entre la zona de cultivo y la cultivar que fue observado tras el análisis estadístico de los datos (tabla 3), pero una vez más, al igual que los resultados obtenidos para el contenido de allicina, la región de cultivo explica de manera determinante la variabilidad del contenido de ácido pirúvico (86,99%) ya que aporta un porcentaje muy superior al del efecto aportado por el tipo de cultivar sobre contenido de ácido pirúvico.

Tabla 3. Tabla de ANOVA para la variabilidad del contenido de ácido pirúvico debido a las diferentes cultivares, zonas y su interacción.

Table 3. ANOVA table for the variability of pyruvic acid content due to the different cultivars, crop region and their interaction.

Fuente	g.l	Suma de cuadrados		F	p
Cultivar	3	11873,9	4,48%	10,534	0,0001
Zona	2	230284,5	86,99%	306,444	0,0000
Cultivar x zona	6	22549,5	8,51%	10,002	0,0000
Error	24	9017,7	3,40%		
Total	35	264707,9	100%		

CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que los niveles de allicina y ácido pirúvico en ajo están influenciados tanto por el genotipo como por la región agroecológica en la que fueron cultivados. Además, los datos sugieren que las diferentes condiciones agroecológicas de cultivo influyeron en mayor medida en la variabilidad de los datos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amagase, H.; Petesch, B.; Matsuura, H.; Kasuga, S.; Itakura, Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *American Society for Nutritional Sciences*, 955-962.
2. Baghalian, K.; Ziai, S.; Naghavi, M.; Badi, H.; Khalighi, A. 2005. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Scientia Horticulturae* 103: 155-166.
3. —————; Naghavi, M.; Ziai, S.; Badi, H. 2006. Post-planting evaluation of morphological characters and allicin content in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Scientia Horticulturae* 107: 405-410.
4. Banerjee, S.; Maulik, S. 2002. Effect of garlic on cardiovascular disorders: A review. *Nutrition Journal* 1, 1-14.
5. Block, E. 1985. The chemistry of garlic and onion. *Scientific American* 252: 114-119.
6. Burba, J. L. 2005. Proyecto INTA 2252. Bases para la diferenciación de ajo exportable por calidad de productos y procesos (Período 2005 -2007). IX Curso Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de Ajo. Ediciones INTA, 19-23.
7. Camargo, A. B.; Masuelli, R.; Burba, J. 2005. Characterization of Argentine garlic cultivars for their allicin content. *Acta Horticulturae* 688: 309-312.
8. Coolong, T.; Randle, W. 2003. Sulfur and nitrogen availability interact to affect the flavor biosynthetic pathway in onion. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(5): 766-783.
9. Corzo-Martínez, M.; Corzo, N.; Villamiel, M. 2007. Biological properties of onion and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 609-625.
10. Hamilton, B.; Yoo, K.; Pike, L. 1998. Changes in pungency of onion by soil type, sulphur nutrition and bulb maturity. *Scientia Horticulturae* 74: 249-256.
11. Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112: 3-22.
12. Lawson, L.; Wood, S.; Hughes, B. 1991. HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates. *Planta Medica* 57: 263-270.
13. Natale, J.; Camargo, A. B. 2005. Characterization of Argentine garlic cultivars by their pungency. *Acta Horticulturae* 688: 313-316.
14. Portela, J.; Italia, R.; Sossa, A.; Orecchia, E.; Gutiérrez, C.; Asid, I.; González, O.; Orell, R.; Astorquiza, R.; Miserendino, E.; García, D.; Saluzzo, J. 2005. Planta INTA. Red Nacional de cultivares de ajo INTA: resultados de los primeros años de trabajo. En: Curso Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de Ajo. Mendoza, INTA EEA La Consulta, 68-71.
15. Randle, W.; Bussard, M. 1993. Pungency and sugars of short-day onions as affected by sulfur nutrition. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 118(6): 766-770.
16. —————; Block, E.; Littlejohn, M.; Putman, D.; Bussard, M. 1994. Onion (*Allium cepa* L.) thiosulfinates respond to increasing sulfur fertility. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 42: 2085-2088.
17. —————; Kopsell, D.; Kopsell, D. 2002. Sequentially reducing sulfate fertility during onion growth and development affects bulb flavor at harvest. *HortScience* 37(1): 118-121.
18. —————; Lancaster, J. 2002. Sulphur compounds in Alliums in relation to flavour quality. En: *Allium Crop Science: Recent Advances*. Ed. Rabinowitch H.D and Currah L. CABI Publishing. U.K. 329-355.
19. Schwimmer, S.; Weston, W. 1961. Enzymatic development of pyruvic acid as a measure of pungency. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 9: 301-304.
20. Xiao, H.; Parkin, K. 2002. Antioxidant functions of selected Allium thiosulfinates and S-Alk(en)yl-L-Cysteine sulfoxides. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50: 2488-2493.