

ESTUDIO SOBRE LA GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE GARBANZO (*Cicer arietinum* L. cv *Castellana*)

M. GRAÑA GONZÁLEZ; F. JUNCAL JUNCAL; X. LÓPEZ GOLDAR; E. PÉREZ GARCÍA &
L. VAZQUEZ BUGALLO.

martitag7@hotmail.com, helenita115@hotmail.com, xolopez@alumnos.uvigo.es, esthperez@alumnos.uvigo.es, lucia-
vazquez@alumnos.uvigo.es

Alumnos 5º Bioloxía, Materia: Métodos en Fisioloxía Vexetal (2007-2008), Universidade de Vigo

Profesora: Mercedes Gallardo Medina

Resumen: En este estudio se efectuó una aproximación experimental al proceso de germinación de semillas de *Cicer arietinum* L. cv. *Castellana*. Para ello, se evaluaron la toma de agua (mgPF), el porcentaje de germinación, el contenido de proteínas (mg/gPF) y de azúcares (mg/gPF) totales en diferentes estadios germinativos (0, 3, 24 y 72 horas) de las semillas. Los resultados demostraron que todo el proceso de germinación es muy eficaz en esta variedad y que está sujeto a una estricta regulación.

Palabras clave: peso fresco, germinación, contenido de proteínas, contenido de azúcares, garbanzo, *Cicer arietinum*.

Resumo: Neste estudo efectuouse unha aproximación experimental ó proceso de xerminación de sementes de *Cicer arietinum* L. cv. *Castellana*. Para elo, avaliáronse a toma de auga (mgPF) a porcentaje de xerminación, o contido de proteínas (mg/gPF) e de azúcares (mg/gPF) totais en diferentes estadios xerminativos (0, 3, 24 e 72 horas) das sementes. Os resultados demostraron que todo o proceso de xerminación é moi eficaz nesta variedade e que está suxeito a unha estricta regulación.

Palabras chave: peso fresco, xerminación, contido de proteínas, contido de azúcares, garavanzo, *Cicer arietinum*.

INTRODUCCIÓN

La germinación de la semilla comprende una serie de procesos que comienzan con la imbibición de agua y culminan con la emergencia de la radícula a través de las cubiertas. La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluyen la activación del proceso respiratorio, la síntesis proteica y la movilización de las reservas (Bewley, 1997). La hidratación inicial de la semilla depende en gran parte del potencial hídrico de las células que la componen. En muchos casos los valores iniciales del potencial hídrico son muy bajos, pudiendo ser menor que -100 Mpa (Matilla, 2000a).

Con la toma de agua se activa el proceso respiratorio y con ello toda la maquinaria metabólica, se induce la síntesis proteica que da lugar, entre otras proteínas, a la formación de enzimas hidrolíticas que producen la movilización de las reservas (Matilla, 2000a).

Las principales reservas de las semillas suelen componerse de lípidos, proteínas, carbohidratos y compuestos inorgánicos. En el caso de las leguminosas, se almacenan proteínas junto con cantidades considerables de almidón, siendo en éstas los lípidos muy escasos. Además, las proteínas y los hidratos de carbono de reserva están localizados en los cotiledones, que generalmente son muy voluminosos (Matilla, 2000a). La movilización de estas reservas requiere un proceso previo de hidrólisis para liberar compuestos de menor peso molecular, que pueden ser utilizados durante el crecimiento inicial de la plántula. El eje embriionario en desarrollo puede regular la movilización de las reservas a través de mecanis-

mos hormonales como la acción de giberelinas sintetizadas por el propio eje, induciendo la síntesis de enzimas hidrolíticas (Debeaujon y Koornneef, 2000; Matilla, 2000a). Cabe destacar la acción del etileno en la inducción de la germinación de muchas especies. De hecho, la semilla de garbanzo requiere la síntesis de esta hormona para que se produzca la germinación (Gallardo et al., 1994; Matilla, 2000b).

Los cambios fisiológicos y metabólicos que sufren las semillas no latentes después de la imbibición de agua culminan con el inicio de la división celular en el embrión y el desarrollo posterior de la plántula. Por lo general, este proceso comienza por la radícula, que es el primer órgano que emerge, produciendo la ruptura de la testa. En las plántulas hipogeas, los cotiledones permanecen bajo el suelo, con un corto hipocótilo. Con posterioridad, el epicótilo se alarga y aparecen las primeras hojas verdaderas, como sucede en la semilla de garbanzo (Matilla, 2000a).

MATERIAL Y MÉTODOS

Con objeto de realizar un seguimiento del proceso germinativo de semillas de garbanzo, se seleccionaron un total de 1100 semillas por homogeneidad de tamaño, sin tratar y conservadas previamente en cámara fría a 4°C y en oscuridad. Éstas se distribuyeron en 4 grupos: T_0 (semilla "seca"), T_1 (imbibición 3 horas), T_2 (incubación 24 horas) y T_3 (incubación 72 horas).

Procedimiento.

Todas las semillas, excepto las correspondientes al estadio T_0 , se sumergieron en hipoclorito sódico al 1% con el fin de evitar la contaminación de la cubierta. Posteriormente, las semillas del grupo T_1 se sumer-

gieron en agua destilada durante 3 horas en oscuridad; las de los grupos T₂ y T₃ se distribuyeron en grupos de 50 semillas sobre bandejas de germinación de 30x20 cm, con dos papeles de filtro humedecidos con 150 ml de agua destilada y cubiertas con papel de aluminio. Finalmente, las bandejas se dispusieron en una estufa termostatzada Sanyo Incubator a 25°C en oscuridad, con una humedad relativa del 70%.

Determinación del Peso Fresco (PF) y Porcentaje de Germinación.

Se determinó el peso de las semillas del estadio T₀ (mg PS/semilla). A continuación se separaron manualmente los ejes embrionarios y cotiledones de las mismas y se obtuvieron los mg PS/eje y mg PS/cotiledón, respectivamente. Para la determinación del peso de las semillas del estadio T₁ (mg PF/semilla), el procedimiento fue idéntico al anterior. En este caso, las semillas se secaron previamente y la extracción de los órganos se ejecutó sobre hielo picado. Transcurrido el tiempo de germinación estipulado más arriba para las semillas correspondientes a los estadios T₂ y T₃, se calculó el porcentaje de germinación por bandeja, considerando como semilla germinada aquella cuyo eje embrionario hubo atravesado la cubierta seminal. Después, las semillas y órganos se pesaron análogamente al grupo T₁.

Para cada estadio se obtuvieron 3 g de ejes embrionarios y 3 g de cotiledones para el ulterior análisis de proteínas y azúcares totales.

Activación Metabólica. Síntesis de Proteínas y Movilización de las Reservas.

3 g de ejes embrionarios y cotiledones de cada estadio se homogenizaron en morteros de porcelana, preenfriados en congelador, colocados sobre hielo picado para evitar la degradación de la muestra. A continuación, se homogenizó con tampón de extracción fosfato sódico 200 mM pH = 7.0 en proporción 1:2 (p/v). Los homogenizados se trasladaron a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 4°C, 15.000 r.p.m. durante 15 minutos en una supercentrifuga Sorvall modelo RC 5B Plus. El sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Determinación de Proteínas Totales. Método de Bradford.

A partir del sobrenadante anterior se realizó la determinación de la cantidad de proteínas totales correspondientes a los ejes embrionarios y cotiledones de cada estadio (T₀, T₁, T₂ y T₃) mediante el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina (BSA) 1 µg/µL como patrón. Para que las medidas entrasen en el rango de absorbancias de la curva patrón se hizo necesaria la dilución de las muestras de la forma que se indica en la tabla 1.

Determinación de Azúcares Totales.

Se determinó el contenido de azúcares totales a partir de los sobrenadantes almacenados a -20°C por el método de Dubois *et al* (1956), utilizando glucosa 100 µg/mL como patrón. En algunos casos tuvieron que

Muestra	E T ₀	CT ₀	ET ₁	CT ₁	ET ₂	CT ₂	ET ₃	CT ₃
Dilución	1/50	1/50	1/50	1/50	1/10	1/50	1/10	1
Vol. Muestra (µL)	20	20	20	20	50	20	100	
Vol. Agua (µL)	980	980	980	980	950	980	900	

Tabla 1. La nomenclatura **E** corresponde a ejes embrionarios y **C** a cotiledones.

Muestra	E T ₀	C T ₀	E T ₁	C T ₁	E T ₂	C T ₂	E T ₃	C T ₃
Dilución	1/100	1/200	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50
Vol. Muestra (µL)	10	5	20	20	20	20	20	20
Vol. Agua (µL)	990	995	980	980	980	980	980	980

Tabla 2. La nomenclatura E corresponde a ejes embrionarios y C a cotiledones.

diluirse las muestras como consecuencia del excesivo color resultante de la determinación. Las diluciones y volúmenes utilizados se muestran en la tabla 2.

RESULTADOS

Peso Fresco de las Semillas y Porcentaje de Germinación.

En este ensayo, los resultados revelaron una ganancia de peso de las semillas, cotiledones y ejes embrionarios en los tiempos analizados, alcanzándose el valor más alto a las 72 horas en todos ellos (Tabla 3).

1a y 1b). En relación a los ejes embrionarios, el incremento de peso alcanzó su mayor pendiente a partir de las 24 horas, llegando a aumentar aproximadamente en 21 veces a las 72 horas en comparación con el control (Fig. 1c). A las 0 horas (control), el peso de los cotiledones fue aproximadamente 54 veces superior al de los ejes embrionarios, mientras que a las 72 fue de 5 veces.

	<u>0 horas (control)</u> mgPS/semilla	<u>3 horas</u> mgPF/semilla	<u>24 horas</u> mgPF/semilla	<u>72 horas</u> mgPF/semilla
Semillas enteras	282.76 ± 17.51	518.57 ± 3.96	622.49 ± 10.10	721.62 ± 17.23
Cotiledones	273.68 ± 11.97	486.41 ± 11.45	586.79 ± 21.93	599.97 ± 9.80
Ejes embrionarios	5.73 ± 1.27	7.93 ± 2.44	11.93 ± 1.56	119.79 ± 14.20

Tabla 3. Pesos frescos de las semillas de garbanzo en los diferentes estadios evaluados

En relación al porcentaje de germinación, los valores fueron superiores al 80% tanto para las semillas evaluadas a 24 como a 72 horas (Tabla 4).

	24 horas	72 horas
% Germinación	84.29 ± 6.97	96.50 ± 1.0
Nº semillas germinadas	42.14 ± 3.48	48.25 ± 0.50

Tabla 4. Porcentaje de germinación y del número de semillas germinadas por bandeja.

En cuanto al peso de las semillas enteras y de los cotiledones, el mayor incremento se observó tras las 3 primeras horas en imbibición, momento en el que se obtuvo casi el doble de peso con respecto al control (Figs.

Por otro lado, las semillas mantenidas durante 24 y 72 horas para el estudio de la germinación tuvieron un porcentaje de éxito de más de un 80% (Tabla 4). En base al número de semillas germinadas, las bandejas analizadas a las 24 horas presentaron un rango amplio (38-48 semillas germinadas) mientras que a las 72 horas dicho rango fue muy estrecho (48-49 semillas germinadas).

Contenido de Proteínas.

Nuestros resultados revelaron un descenso en el contenido de proteínas durante la germinación tanto en los cotiledones como en

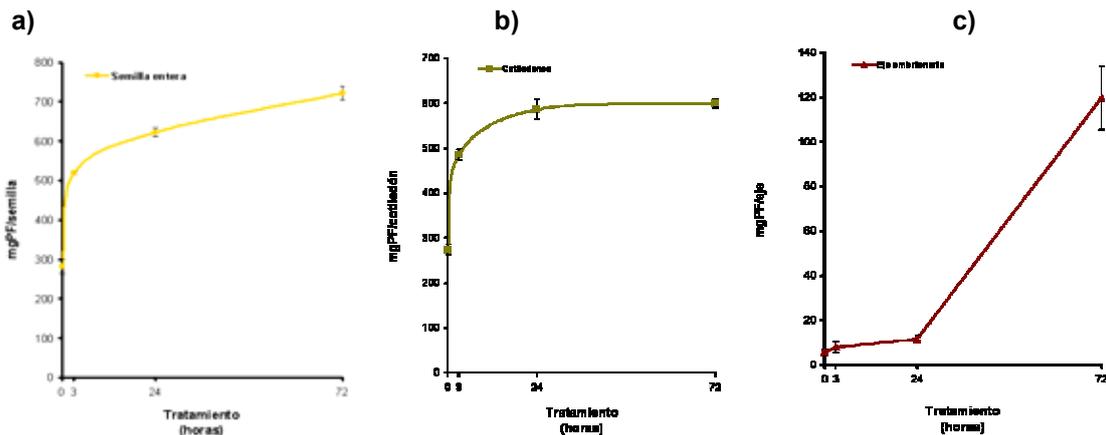


Figura 1. Variación de peso fresco (mgPF/semilla) de las semillas de garbanzo a 0, 3, 24 y 72 horas; a) Semilla entera; b) Cotiledón; c) Eje embrionario. Los resultados representados son producto de la media de cuatro réplicas. Las líneas verticales en cada punto se corresponden con la desviación típica.

	0 horas (control) mg proteína/gPS	3 horas mg proteína/gPF	24 horas mg proteína/gPF	72 horas mg proteína/gPF
Cotiledones	385.31 ± 112.72	61.07 ± 6.62	195.17 ± 8.66	1.78 ± 0.20
Ejes embrionarios	190.03 ± 31.42	62.14 ± 4.16	62.73 ± 1.71	50.24 ± 4.27

Tabla 5. Contenido de proteínas en las semillas de garbanzo en los tiempos analizados

los ejes embrionarios (Tabla 5, Fig. 3). Los mayores niveles se registraron en ambas estructuras a las 0 horas. En esta fase, además, los cotiledones presentaron el mayor contenido en proteínas siendo, incluso, más del doble respecto a los ejes embrionarios

(385.31 y 190.03 mg proteína/gPF, respectivamente). A las 3 horas post-imbibición, se produjo un descenso en el contenido de proteínas de cotiledones y ejes embrionarios llegando a presentar valores idénticos (61.07 mg/gPF y 62.73 mg/gPF, respectiva-

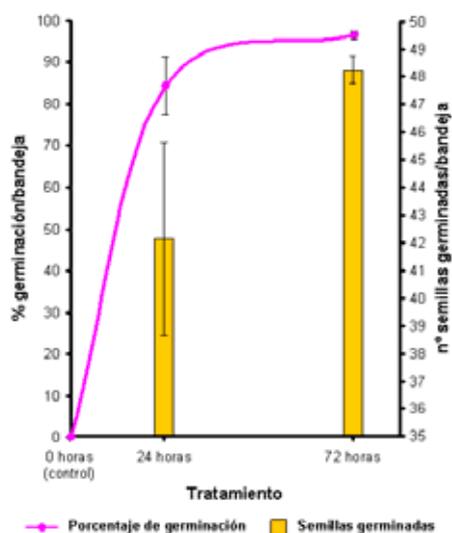


Figura 2. Porcentaje de germinación y número de semillas por bandeja a 24 y 72 horas de germinación. Los resultados representados son producto de la media de siete (24 horas) y cuatro (72 horas) réplicas. Las líneas verticales en cada punto se corresponden con la desviación típica.

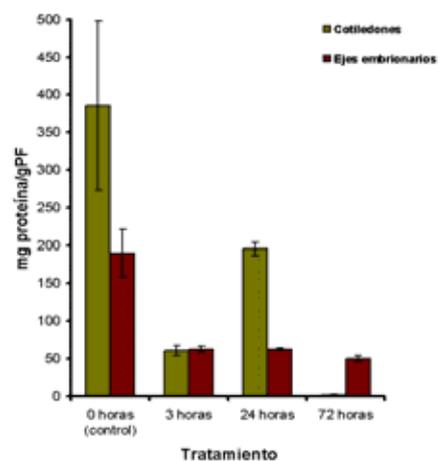


Figura 3. Contenido de proteínas (mg/gPF) en cotiledones y ejes embrionarios de garbanzo a 0, 3, 24 y 72 horas. Los resultados representados son producto de la media de tres réplicas. Las líneas verticales en cada punto se corresponden con la desviación típica.

	0 horas (control) mg azúcar/gPS	3 horas mg azúcar/gPF	24 horas mg azúcar/gPF	72 horas mg azúcar/gPF
Cotiledones	476.62 ± 3.90	37.25 ± 4.09	73.48 ± 1.36	22.75 ± 0.67
Ejes embrionarios	107.12 ± 4.24	36.61 ± 2.98	22.12 ± 2.28	55.79 ± 0.32

Tabla 6. Contenido de azúcares en las semillas de garbanzo en los estadios estudiados.

mente). A las 24 y 72 horas, la cantidad de proteínas en los cotiledones tuvo un incremento inesperado de sus niveles en 3 veces (24 horas) seguido de un descenso de 35 veces (72 horas) respecto a las 3 horas en imbibición. De esta manera, a las 24 horas, el contenido de proteínas en los cotiledones se triplicó respecto al de los ejes embrionarios y a las 72 horas dicha cantidad se redujo hasta prácticamente 0. En los ejes embrionarios, a partir de las 3 horas post-imbibición los valores obtenidos permanecieron más o menos constantes hasta la última fase analizada, ésta inclusive.

Por último, se calculó el contenido de proteínas en porcentaje de esta variedad de garbanzo (por semilla), que fue de 57.53%.

Contenido de Azúcares.

Durante el proceso de germinación, el contenido de azúcares totales disminuyó tanto en los cotiledones como en los ejes embrionarios (Tabla 6, Fig. 4). A las 0 horas, tanto los cotiledones como los ejes embrionarios presentaron los valores más altos, si bien los cotiledones superaron en más de 4 veces la cantidad respecto a la de los ejes embrionarios (476.62 y 107.12 mg/gPF, en cada caso). Tras las 3 horas en imbibición, la cantidad de azúcares en los cotiledones y en los ejes se redujeron 13 y 3 veces respectivamente hasta alcanzar valores similares entre sí (37.25 y 36.61 mg/gPF, respectivamente). A las 24 horas, el contenido de azúcares en los cotiledones se duplicó mientras que en los ejes los niveles disminu-

yeron 1.5 veces con respecto al estadio anterior. A las 72 horas, en los cotiledones se produjo un nuevo descenso en los niveles de azúcares de 3 veces y, en los ejes, su contenido casi se triplicó en relación a los valores obtenidos a las 24 horas.

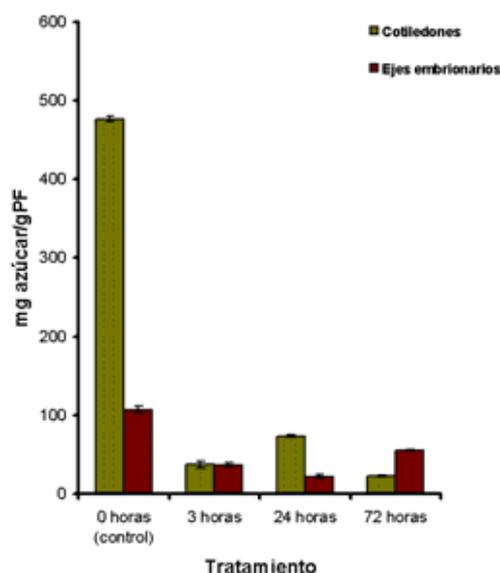


Figura 4. Contenido de azúcares (mg/gPF) en cotiledones y ejes embrionarios de garbanzo a 0, 3, 24 y 72 horas. Los resultados representados son producto de la media de tres réplicas. Las líneas verticales en cada punto se corresponden con la desviación típica.

INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

Peso Fresco de las Semillas y Porcentaje de Germinación.

En nuestro estudio, durante el proceso de germinación se observaron una serie de cambios importantes en las semillas, producidos por la imbibición inicial, que implicaron un aumento de peso y la degradación de las reservas (Khattak *et al.*, 2007). Durante las primeras horas (T₁) absorbieron gran canti-

dad de agua debido a la gran diferencia de potencial hídrico y, a simple vista, esto se tradujo en un aumento significativo del tamaño y del peso hasta las etapas finales de la germinación, donde se redujo progresivamente hasta ser prácticamente nula (Tabla 3).

En cuanto al porcentaje de germinación, los resultados obtenidos son consecuentes con los de Iglesias y Babiano (1995) y Hernández-Nistal *et al.* (2006). Desde nuestro punto de vista, el tiempo óptimo para evaluar el mayor porcentaje de germinación con un rango de variación mínimo sería entre 48-72 horas post-imbibición (Tabla 4).

Contenido de Proteínas Totales.

En nuestro estudio hemos observado que la diferencia entre T_0 y T_1 es muy acusada en los cotiledones (Fig. 3). La explicación más plausible es por la metodología utilizada ya que el peso del material en un estadio y en otro, a pesar de ser idénticos, no lo fueron en el número de cotiledones y tampoco en su contenido en agua. En este aspecto, en la fase T_1 las proteínas estaban más diluidas a consecuencia de la imbibición. A las 24 horas, se produjo un aumento desorbitado del contenido de proteínas, quizá debido a un error metodológico por realizar diluciones diferentes a las demás horas de los estadios. A las 72 horas se observa una acusada disminución provocada por la dilución debido al contenido hídrico de los cotiledones. Sin embargo, la variación existente entre este tiempo y las 24 horas es muy acusada como para que se produjera dicha disminución de esta manera según nuestros resultados. Además, este estudio reveló que nuestras semillas se comprendían dentro del valor biológico de las proteínas estipula-

do por la FAO (52-78%) (Hernández y Sastre, 1999).

En relación a los ejes embrionarios, a las 0 horas el contenido en proteínas fue obviamente menor que en los cotiledones ya que estos últimos actúan como reservorio de estos compuestos cuando la semilla está "seca". En nuestro estudio, la extracción del eje embrionario en esta fase del ensayo fue dificultosa y, además de extraer el eje, pudimos cortar parte del cotiledón y la cubierta externa, pudiendo influir en los resultados de las proteínas totales de los susodichos ejes. A las 3 horas de imbibición (T_1) el contenido de proteínas de los ejes se redujo de forma menos drástica que en el caso de los cotiledones. Esto fue debido a que el cotiledón, proporcionalmente, tomó más cantidad de agua del exterior, diluyendo más su contenido en proteínas que las del eje en este estadio. En esta fase, la cantidad de proteínas en sí no se vio afectada porque a este tiempo las hormonas no ejercieron su función sobre las reservas del cotiledón (Matilla, 2000a). Tanto en T_1 , T_2 y T_3 , la cantidad de proteínas permaneció a niveles similares dado que la relación actividad biosintética/degradativa fueron más o menos idénticas. A partir de las 24 horas, coincidiendo con el fuerte incremento de peso de los ejes, la acción de distintas hormonas en el cotiledón refuerza la hipótesis de que a este tiempo sus reservas ya comenzaron a ser hidrolizadas y transportadas a los ejes dando como resultado el crecimiento de la radícula.

Contenido de Azúcares Totales.

Con respecto al contenido de azúcares, se observó una alta cantidad en el cotiledón "seco" (T_0), debido a la presencia de las re-

servas de almidón. Con el inicio de la imbibición, transcurridas 3 horas, se pudo apreciar una disminución significativa en el contenido inicial de azúcares en cotiledones, debido a la toma de agua (Fig. 4). A las 24 horas se constató una acumulación de azúcares en los cotiledones que se corresponde con la hidrólisis de las reservas previa al transporte de sus productos hacia el eje, proceso regulado fundamentalmente por giberelinas (Debeaujon y Koornneef, 2000; Matilla, 2000a). La disminución observada a las 72 horas se debió enteramente al transporte hacia el eje embrionario de estos nutrientes para facilitar su crecimiento. De hecho, si sólo se tiene en cuenta el peso seco (sin agua) y la cantidad obtenida de azúcares, se observaría un rápido pero continuo descenso del contenido de azúcares en los cotiledones (por el transporte hacia el eje) y un sustancial incremento en los ejes embrionarios a partir de las 24 horas y hasta el final del periodo estudiado, que coincide con la hidrólisis de las reservas y su transporte hasta el eje embrionario (Fig. 5).

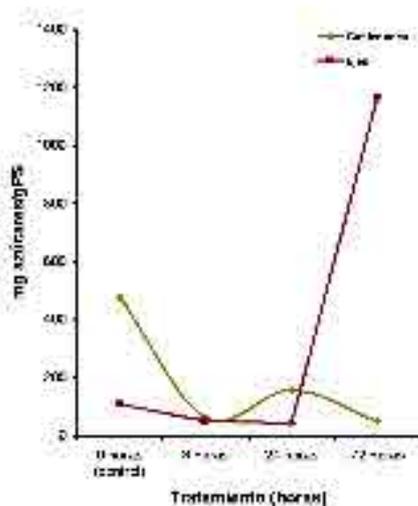


Figura 5. Contenido de azúcares (mg/gPS) en cotiledones y ejes embrionarios de garbanzo a 0, 3, 24 y 72 horas. Los resultados representados son la media de las tres réplicas de la tabla 4 descontando el peso del agua en cada tratamiento y órgano.

En los ejes, el contenido inicial de azúcares fue mucho más reducido a la espera de la reactivación metabólica que se produjo con la toma de agua para promover la movilización de reservas desde el cotiledón. Una cantidad mínima de polisacáridos en los ejes preexistió a pesar de estar en estado de letargia. En los ejes, como en los cotiledones, pudo producirse la dilución de estos azúcares tras la entrada de agua cuya activación metabólica posterior conllevó que en los estadios posteriores estas reservas remanentes empezasen a ser utilizadas.

En conclusión, podemos afirmar que el proceso de germinación es muy eficaz en esta variedad de semillas de garbanzo y, además, la toma de agua en la fase de imbibición es de vital importancia para la ruptura de la testa, con el consecuente aumento de peso. En cuanto a las reservas, vemos que, en general, la cantidad de proteínas y azúcares en el cotiledón es alta al principio de la germinación y va disminuyendo a medida que el embrión crece. Esta eficacia presentada por el proceso germinativo demuestra estar sujeta a una estricta regulación, tanto hormonal como metabólica.

BIBLIOGRAFÍA

BEWLEY, J. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9:1055-1066.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

DEBEAUJON, I. & KOORNNEEF, M. 2000. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology*, 122:415-424.

DUBOIS, M., GUILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. AND SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:530.

GALLARDO, M., MUÑOZ DE RUEDA, P., MATILLA, A.J. & SÁNCHEZ-CALLE I.M. 1994. The relationship between ethylene production and germination of *Cicer arietinum* seeds. *Biologia Plantarum*, 36:201-207.

HERNÁNDEZ, M. & SASTRE, A. 1999. Tratado de nutrición. Ed. Díaz de Santos. In: <http://books.google.es>

HERNÁNDEZ-NISTAL, J., LABRADOR, E., MARTÍN, I., JIMÉNEZ, T. & DOPICO, B. 2006. Transcriptional profiling of cell wall protein genes in chickpea embryonic axes during germination and growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:684–692.

IGLESIAS, R. & BABIANO, M. 1996. ABA levels in chick-pea seeds during the first twenty-four hours of germination. Effect of polyethylene-glycol. *Phytochemistry*, 41:681-683.

KHATTAK, A. B., ZEB, A., KHAN, M., BIBI, N., IHSANULLAH & KHATTAK, M. S. 2007. Influence of germination techniques on sprout yield, biosynthesis of ascorbic acid and cooking ability, in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chemistry*, 103:115-120.

MATILLA, A. J. 2000a. Germinación y dormición de las semillas. In: Fundamentos de Fisiología Vegetal. AZCÓN BIETO, J. & TALÓN, M. Interamericana. McGraw-Hill.

MATILLA, A.J. 2000b. Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research*, 10:111-126.