

R. 12539

T962

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA**

**TESIS DOCTORAL**

**EVALUACIÓN DE PARAMETROS DE  
CALIDAD DE LA SEMILLA EN CICER  
ARIETINUM L.**

**DIRECTORES: DR. D. JUAN GIL LIGERO**

**DR. D. ANTONIO DE HARO BAILON**

**TUTOR: DR. D. MATIAS GUZMAN CHOZAS**

**DOCTORANDO: D. DIEGO JESUS LUNA MOYANO**

**SEVILLA, 1997**

CPB 1009578

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

**EVALUACIÓN DE PARAMETROS DE CALIDAD  
DE LA SEMILLA EN CICER ARIETINUM L.**

Trabajo presentado para optar a la titulación de Doctor en Farmacia por el Licenciado D. DIEGO JESUS LUNA MOYANO.

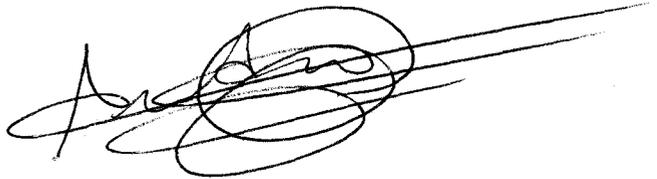
A handwritten signature in black ink, reading "Diego J. Luna Moyano". The signature is written in a cursive style and is underlined with a long, horizontal stroke.

Fdo.: D. Diego Jesús Luna Moyano

El DR. D. JUAN GIL LIGERO, Profesor Titular del Departamento de Genética (E.T.S.I.A.M.) de la Universidad de Córdoba y el DR. D. ANTONIO DE HARO BAILON, Colaborador Científico del Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC) de Córdoba, como directores de la tesis.

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo de investigación " Evaluación de parámetros de calidad de la semilla en Cicer Arietinum L." realizado bajo nuestra dirección por D. DIEGO JESUS LUNA MOYANO, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.



Fdo.: Dr. D. Juan Gil Ligerero Fdo.: Dr. D. Antonio De Haro Bailon

El DR. D. MATIAS GUZMAN CHOZAS, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, como tutor de la tesis.

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación " Evaluación de parámetros de calidad de la semilla en Cicer Arietinum L." realizado por D. DIEGO JESUS LUNA MOYANO, bajo la dirección del Dr. D. Juan Gil Ligerero y Dr. D. Antonio De Haro Bailon, reúne las condiciones para ser presentado para optar al grado de Doctor en Farmacia.

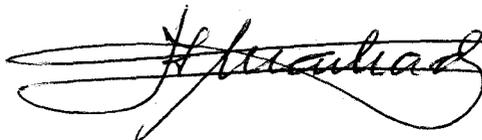
A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Guzmán", with a long, sweeping horizontal flourish underneath.

Fdo.: Dr. D. Matías Guzmán Chozas

D. ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación " Evaluación de parámetros de calidad de la semilla en Cicer Arietinum L." realizado por D. DIEGO JESUS LUNA MOYANO, bajo la dirección del Dr. D. Juan Gil Ligerero y Dr. D. Antonio De Haro Bailon, reúne las condiciones para ser presentado para optar al grado de Doctor en Farmacia.



Fdo.: Dr. D. Alberto Machado de la Quintana

A mis padres y hermano

A Rosa

A Diego Jose y Maria Rosa

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado en la realización de esta tesis:

A los directores de esta, Juan Gil y Antonio de Haro, por sus enseñanzas y continuo estímulo.

A Matias Guzman, por su continua orientación y disponibilidad en todo momento.

A todo el equipo de la Unidad de Leguminosas del C.I.D.A. de Córdoba, especialmente a M<sup>a</sup> Teresa Moreno, Jose Ignacio Cubero, Fernando Flores, Salvador Nadal, Rafi Moral, Mercedes Moreno, Amparo Martinez y M<sup>a</sup> Dolores Fernandez, por la amistad y ayuda prestada en todo momento.

A Leonardo Velazco, Mercedes del Rio, Gloria Fernandez, Antonia Herruzo y Jose Bejarano que de forma incondicional me ayudaron.

Al Laboratorio Regional Agrario de Córdoba y en particular a Amador Sillero por su colaboración y apoyo.

A los Departamentos de Genética y Zootécnia de la E.T.S.I.A.M. de la Universidad de Córdoba, que de una forma u otra, han participado en la realización de este trabajo.

Y particularmente a toda mi familia, por sus constantes muestras de apoyo, comprensión y cariño.

## INDICE GENERAL

<b>I.- INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	1
I.1.- DATOS HISTÓRICOS . . . . .	3
I.2.- ASPECTOS GENERALES . . . . .	6
I.2.1.- EL CULTIVO . . . . .	7
I.2.2.- ASPECTOS TAXONÓMICOS . . . . .	13
I.2.3.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA . . . . .	17
I.3.- CALIDAD DE LA SEMILLA . . . . .	19
I.3.1.- PROTEÍNA. . . . .	19
I.3.2.- PROTEÍNA BRUTA vs PROTEÍNA VERDADERA . . . . .	22
I.3.3.- GRASA . . . . .	24
I.3.4.- FIBRA . . . . .	26
I.3.5.- HIDRATOS DE CARBONO . . . . .	30
I.4.- TÉCNICA DE ANÁLISIS DE REFLECTANCIA DEL INFRARROJO CERCANO (NIRS) . . . . .	32
<b>II.- OBJETIVOS</b> . . . . .	36
<b>III.- MATERIAL Y MÉTODOS</b> . . . . .	38
III.1.- MATERIAL VEGETAL . . . . .	38
III.2.- METODOS ANALÍTICOS DE REFERENCIA . . . . .	43
III.2.1.- PROTEÍNA BRUTA . . . . .	43
III.2.2.- NITRÓGENO NO PROTEICO (NNP) . . . . .	45
III.2.3.- GRASA . . . . .	46
III.2.4.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS. CROMATOLOGRAFIA DE GASES . . . . .	48
III.2.5.- FIBRA ÁCIDO DETERGENTE (ADF) . . . . .	49
III.2.6.- FIBRA NEUTRO DETERGENTE (NDF) . . . . .	51
III.2.7.- AZÚCARES . . . . .	51

III.2.8.- REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO	53
III.3.- MÉTODOS NUMÉRICOS . . . . .	69
III.3.1.- DESCRIPTIVOS . . . . .	609
III.3.2.- ANÁLISIS DE LA VARIANZA . . . . .	69
III.3.3.- HEREDABILIDAD Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN GENÉTICO . . . . .	63
III.3.4.- CORRELACIONES . . . . .	64
III.3.5.- PROCEDIMIENTOS DE CALCULO . . . . .	64
<b>IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN . . . . .</b>	<b>66</b>
IV.1.- PROTEÍNA . . . . .	66
IV.2.- NITRÓGENO NO PROTEICO (NNP) . . . . .	74
IV.3.- GRASA . . . . .	89
IV.4.- ÁCIDOS GRASOS . . . . .	86
IV.5.- FIBRA: FIBRA ÁCIDO DETERGENTE (ADF) Y NEUTRO DETERGENTE (NDF) . . . . .	97
IV.6.- AZÚCARES . . . . .	108
IV.7.- CORRELACIONES . . . . .	116
IV.8.- HEREDABILIDAD . . . . .	121
<b>V.- DISCUSIÓN GENERAL . . . . .</b>	<b>123</b>
<b>VI.- CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>132</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA . . . . .</b>	<b>135</b>

## INTRODUCCIÓN

Garvanços ay de dos maneras, blancos y prietos. Los blancos son calientes en primer grado y húmidos en la meytad del primer grado, y son de gran nutrimento, mas son malos de moler y engendran ventosidad y acrecientan la simiente.....Y los garvanços mejores blancos desta ciudad son de Coria y de la Puebla; y el caldo de los garvanços que están a remojar una noche y cozidos con perexil y con culantro seco, y con su azeyte lavado es bueno para esforçar los dolientes y es assaz templado; è queriéndolo más resfriar, echen allí cogollos de lechugas o cerrajas.

(Del capítulo XII del libro "SEVILLANA MEDICINA" escrito por Juan de Aviñón en la última década del siglo XIV y publicado en Sevilla en 1545 por el médico Nicolás Monardes).

### I.- INTRODUCCIÓN:

Las leguminosas han sido unas de las primeras plantas cultivadas por el hombre. La familia Leguminosae comprende unos 700 géneros y 17.000 especies, ocupando el segundo lugar, en orden de importancia, entre las familias de las plantas provistas de semilla. Como es bien sabido, las raíces de muchas de estas especies contienen nódulos de bacterias, Rhizobium, que están dotadas de la facultad de fijar el nitrógeno atmosférico, por lo que las leguminosas se consideran mejorantes de suelo y tienen un gran valor en las rotaciones de cultivos.

Por su alto contenido en proteína, las leguminosas se han utilizado desde la antigüedad, como alimento de hombres y ganado. En el Cercano Oriente, se han encontrado restos arqueológicos de semillas de leguminosas con una antigüedad de unos diez mil años. También se han hallado restos de judías en México, en Cuevas de Ocampo, datados en 4000 años a.d.C.. Aunque los restos más antiguos de frijol común, Phaseolus vulgaris L., encontrados han sido datados 7000-8000 años a.d.C. (Kaplan, 1965; Berglund-Brücher y Brucher, 1976).

Desde antiguo las leguminosas fueron consideradas como "carne del pobre", tal denominación presenta a estas plantas como

un "sustitutivo de la carne". El hecho de que esta frase sea más antigua que el descubrimiento de que las leguminosas tienen un alto contenido en proteínas, indica que este aspecto de la nutrición se conocía empíricamente antes de que se demostrase mediante el análisis químico. En armonía con esta sugerencia se halla el hecho de que la Iglesia en tiempos medievales recomendase las leguminosas como un alimento conveniente durante el ayuno cuaresmal, época en la que estaba prohibido el consumo de carne.

Actualmente las leguminosas siguen siendo una fuente importante de proteínas en las dietas de muchos países, fundamentalmente de aquellos que se encuentran en vías de desarrollo, donde las leguminosas constituyen una fuente proteica más barata que la carne, leche, huevos y pescado.

Por otro lado, en las zonas desarrolladas, las proteínas de origen vegetal se utilizan principalmente para la alimentación del ganado y así obtener proteínas de origen animal. Esta transformación de proteínas vegetales "baratas" en proteínas animales "más caras" requiere un gasto de energía, que se invertirá en dicho proceso de transformación. En general se considera que en un futuro no muy lejano el consumo de proteínas vegetales se realizará sin su transformación en proteínas animales, especialmente en zonas áridas y semiáridas, donde el coste de transformación será tan caro que no se podrá llevar a

cabo (Passmore et al, 1975).

### **I.1.- DATOS HISTÓRICOS:**

Los primeros indicios del uso del garbanzo como cultivo, aparecen en los yacimientos fósiles de finales del quinto milenio a.d.C., en la zona del Cercano Oriente, donde su presencia es abundante (Zohary y Hopf, 1973). Los restos más antiguos aparecieron en Hacilar (Turquía) datados en el año 5450 a.d.c. (Helbaek, 1970). Así mismo otras dataciones posteriores han sido encontradas, por ejemplo en una tumba del cementerio real de Ur (ca 2500 a.d.C.) donde se encontraron impresiones en barro de semillas de garbanzo dentro de una jarra de plata (Ellison et al, 1978) o como regalo funerario en el antiguo Egipto donde se encontró un cuenco con semillas de garbanzo, situándose en el año 1400 a.d.C. (Darby et al, 1977). En la India, donde esta leguminosa es muy importante, la primera aparición de garbanzos data del 2000 a.d.C., en Atranjikhhera, en Uttar Pradesh (Chowdury et al, 1971; Vishnu-Mittre, 1974).

Es lógico suponer que el Egipto faraónico conocía este cultivo desde su domesticación. Existen pruebas de que era suficientemente utilizado durante el Imperio Nuevo (siglo XVI-XI a.d.C.) (Dixon, 1969). La primera cita literaria aparece en la Iliada (escrita entre 1.000-800 a.d.C.). Teofrasto (s. IV a.d.C.)

nos dice que los garbanzos no eran conocidos en la India aunque como ya hemos citado anteriormente la existencia de granos fósiles en niveles arqueológicos de unos tres mil años de antigüedad en esta región no está de acuerdo con este dato histórico. Es posible que los habitantes de Mohenjo Daro los conocieran, debido a las relaciones de la civilización del Indo con Mesopotamia.

Una nueva referencia durante el Imperio Romano la encontramos en Catón (s. II a.d.C.) y no precisamente como cultivo, sino como mala hierba en el trigo. Sin embargo más tarde, Varrón (s. I a.d.C.) lo cita como cultivo apto para consumo, al menos para animales. Columela (s.I) menciona al menos dos clases de garbanzo; en una de ellas incluye a Cicer arietinum L. y Cicer punicum L., que pueden ser sembrados en marzo, dos meses más tarde que la variedad ordinaria, de la que se dice que es más dañina para la tierra (quizás sea la citada por Catón). Es difícil pensar en una especie silvestre de Cicer (no las hay en Europa), como no fuera la propia especie no domesticada o en vías de domesticación. Algo más tarde que Columella, Plinio menciona una variedad enana llamada cicerula (nombre italiano actual para las almortas) y siete variedades comunes (Moreno, 1985).

San Isidoro de Sevilla (s. VI-VII) solo hace breves referencias al garbanzo. Al-Awan (s. XII) le dedica algo

más de espacio. Más suerte tiene en las obras renacentistas, donde se lo considera no tanto por sus propiedades alimenticias como por las medicinales. Dodaneus (s. XVI-XVII; citado por Van der Maesen, 1972) menciona cinco clases de garbanzos: el cultivado o redondo, el garbanzo con "gancho" y tres tipos silvestres. Solo la segunda es realmente Cicer, en la que reconoce tres clases: blancos, negros y rojos; las otras cuatro clases más bien parecen relacionarse con Vicia ervilia, como ya ha sido señalado por varios comentaristas (Moreno, 1985).

Gabriel Alonso de Herrera (Obra de Agricultura, 1513, edición de 1970) da abundantes datos sobre el cultivo del garbanzo, pero sólo menciona tres clases: "Blancos, rubios y prietos".

En el siglo XVIII, las noticias sobre el garbanzo son abundantes. Así, por ejemplo, Valcárcel en su Agricultura General y Gobierno de la Casa de Campo (Valencia, 1767) le dedica un largo capítulo en los que ya no hay mención de los "silvestres". En su época eran suficientemente conocidos los caracteres del grano de buena calidad: "carita de vieja, costilla de ganapán y pico de papagayo" (Moreno, 1985).

### I.2.- ASPECTOS GENERALES:

Además de como alimento de hombres y ganado, el garbanzo ha tenido un uso medicinal, lo que no sólo puede establecerse por la lectura de autores antiguos, sino por su uso actual en la India. Popularmente sus propiedades medicinales van desde ser considerado como elemento afrodisíaco hasta utilizarse como agente apropiado para curar inflamaciones, úlceras y verrugas, sin que falten los textos con recomendaciones contrarias. En la India se ha utilizado también la secreción ácida de la planta como vinagre astringente y en multitud de otras enfermedades sin relación alguna entre sí.

Los garbanzos han sido una comida popular en todas las épocas: En Roma se vendían por las calles tostados o cocidos, de igual forma, cabe pensar, que en las actuales ferias españolas. En el subcontinente indio, la forma más habitual es el "Dhal", garbanzos cocidos y aliñados, una vez eliminada la testa. En la cultura árabe el "Homos bitihenen" consiste en garbanzos cocidos, previo remojo y posteriormente se trituran junto con semillas de sésamo (Pushpamma y Geervani, 1987). Ha constituido, asimismo, la base de platos fuertes en la mesa popular de las regiones mediterráneas (potajes, cocidos, cus-cus, etc).

Siempre se ha empleado la asociación cereal-leguminosa en los sistemas agrícolas, particularmente en aquellos en los

que la dieta no podía complementarse suficientemente con proteína animal. La composición de las proteínas de las leguminosas ricas en lisina y deficientes en aminoácidos azufrados, hace que se complementen con las de los cereales, ricas en aminoácidos azufrados y pobres en lisina, consiguiéndose así dietas equilibradas.

### **I.2.1.- EL CULTIVO:**

Las leguminosas por su alto contenido en proteínas pueden ayudar a dar soluciones a la alarmante crisis alimenticia mundial, ya que el porcentaje medio de proteínas en la semilla madura se sitúa, en general, entre el 20 y 25% (Moreno, 1983), conteniendo un 70% de globulinas, 10-20% de albúminas, 10-20% de glutenina y una pequeña fracción de prolamina (De Haro, 1983).

Si estudiamos la situación de las leguminosas en el mundo y la evolución de su superficie y producción, nos sorprenderá comprobar que su cultivo se encuentra en general en un notable retroceso. Si hacemos este análisis para España vemos que tanto la superficie como la producción de las leguminosas grano ha descendido notablemente desde 1950 hasta 1994 (Figs. 1 y 2) (MAPA, 1994). No obstante, las leguminosas pueden desempeñar un papel importante en los sistemas agrícolas actuales en los que no se busca la máxima producción, sino el

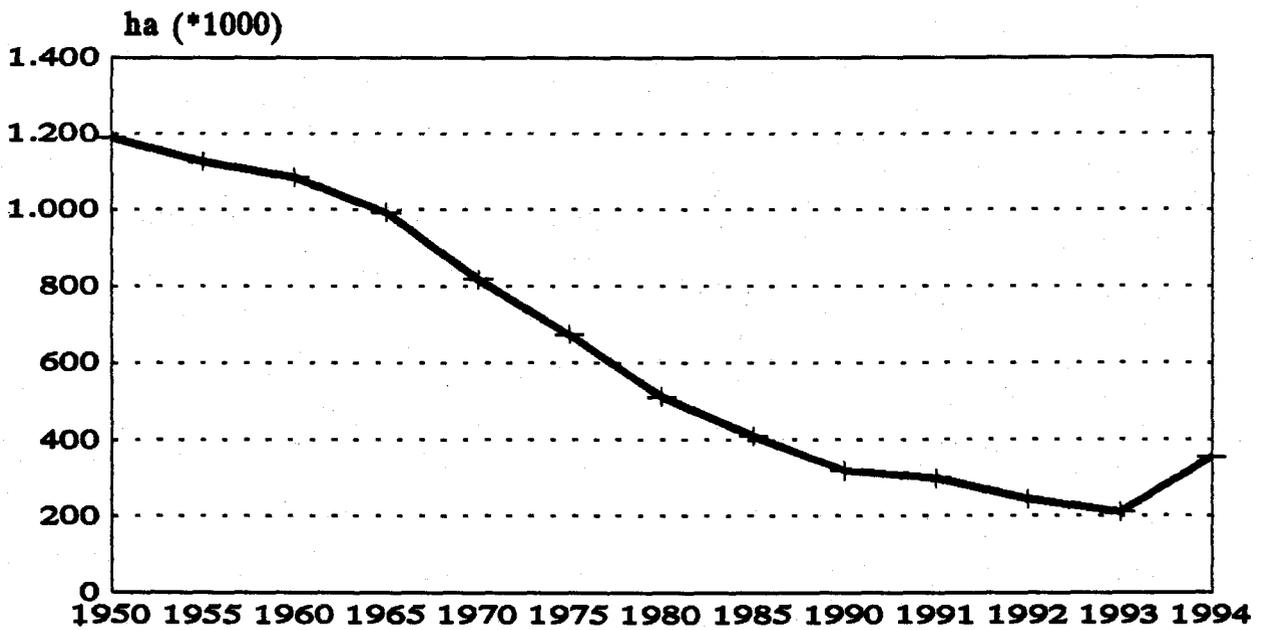


Fig. 1. Leguminosas grano. Superficie cultivada en España (Anuario de estadística agraria 1994).

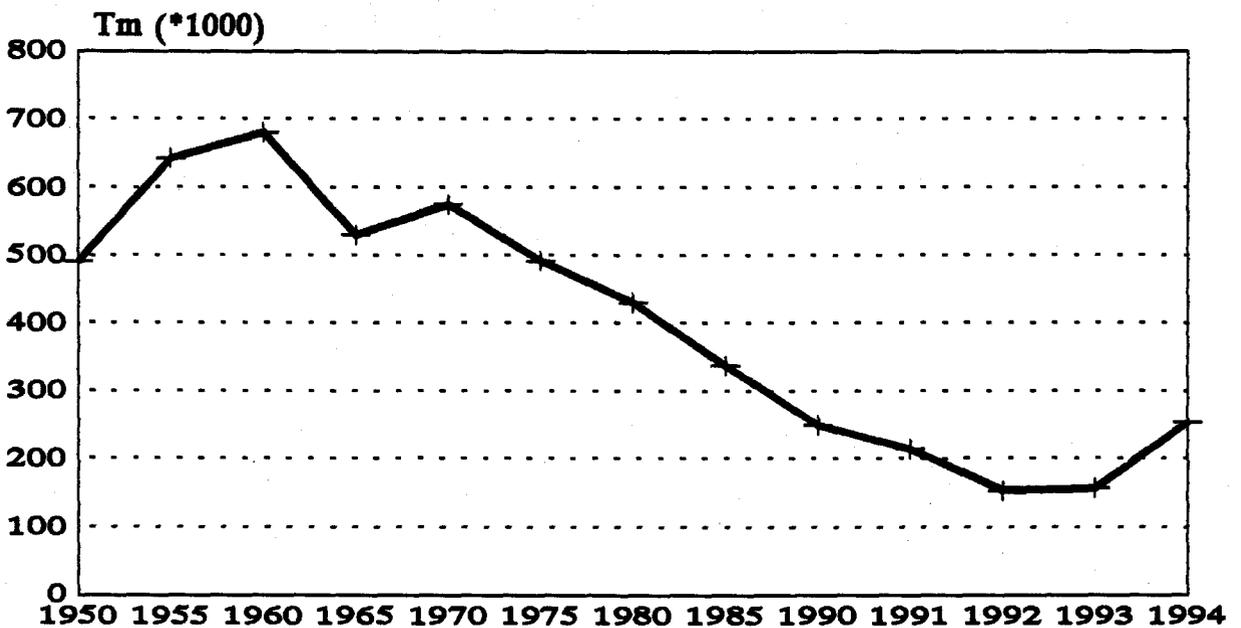


Fig. 2. Leguminosas grano. Producción en España (Anuario de estadística agraria 1994).

equilibrio entre gastos, producción y fertilidad del suelo. Como ya se ha dicho anteriormente, las leguminosas poseen la capacidad de autoabastecerse fijando el nitrógeno atmosférico, gracias a la simbiosis con Rhizobium y de mejorar la estructura del suelo, por lo que su cultivo supone un ahorro de fertilizantes nitrogenados, y un ahorro de energía.

Dentro de las leguminosas de grano, el garbanzo es una de las tres más cultivadas a nivel mundial después de la judía y el guisante. Su cultivo se distribuye principalmente por el subcontinente de la India, Cuenca Mediterránea, Cercano Oriente, Este de Africa, Centro y Norte de América y más recientemente por Australia. En la actualidad se cultiva en más de treinta países, la mayoría de los cuales pertenecen a las franjas climáticas mediterránea y tropical semi-árida. Estas áreas coinciden en gran medida con países en vías de desarrollo. Esta puede haber sido la razón del poco avance experimentado en cuanto a su mejora genética pese a la antigüedad de su cultivo.

En 1994 la producción mundial de garbanzo fue de 7.860.000 toneladas, siendo la superficie cultivada de 10.239.000 ha., siendo la India el principal productor, con aproximadamente el 65% de la superficie y el 70% de la producción mundial (FAO, 1994).

En España según datos del año 1994, la mayor superficie

cultivada corresponde al garbanzo (75.936 has), a continuación se encuentra los guisantes secos (70.544 has), veza grano (69.692 has) y judías secas (51.504 has) (MAPA, 1994). Si analizamos su desarrollo en nuestro país veremos igualmente un retroceso muy importante en su cultivo y producción (Figs. 3 y 4) (MAPA, 1994).

En general, se asiste a una disminución de la superficie cultivada de garbanzos en países en vías de desarrollo. Pero en aquellos en que el garbanzo ha formado parte de la dieta tradicional se asiste a un resurgimiento "especializado". En efecto, en algunos casos los platos tradicionales han abandonado las mesas populares, para pasar a restaurantes de lujo, esto ha provocado una demanda de tipos de garbanzos de alta calidad culinaria, hecho que explica la disminución general de la superficie de cultivo y el aumento de precio en el mercado. Esta "moda" está alcanzando a países donde el garbanzo solo se ha conocido en épocas críticas, como por ejemplo en Francia (Moreno, 1985).

Andalucía es la principal región productora con el 64% de la superficie nacional. El rendimiento medio en nuestro país está en 708 Kg/ha. para seco y 1354 kg/ha para regadío (MAPA, 1994). El rendimiento apenas se ha modificado en los últimos 25 años, mostrando las variaciones propias características de nuestro clima. Así pues uno de los problemas que presenta su

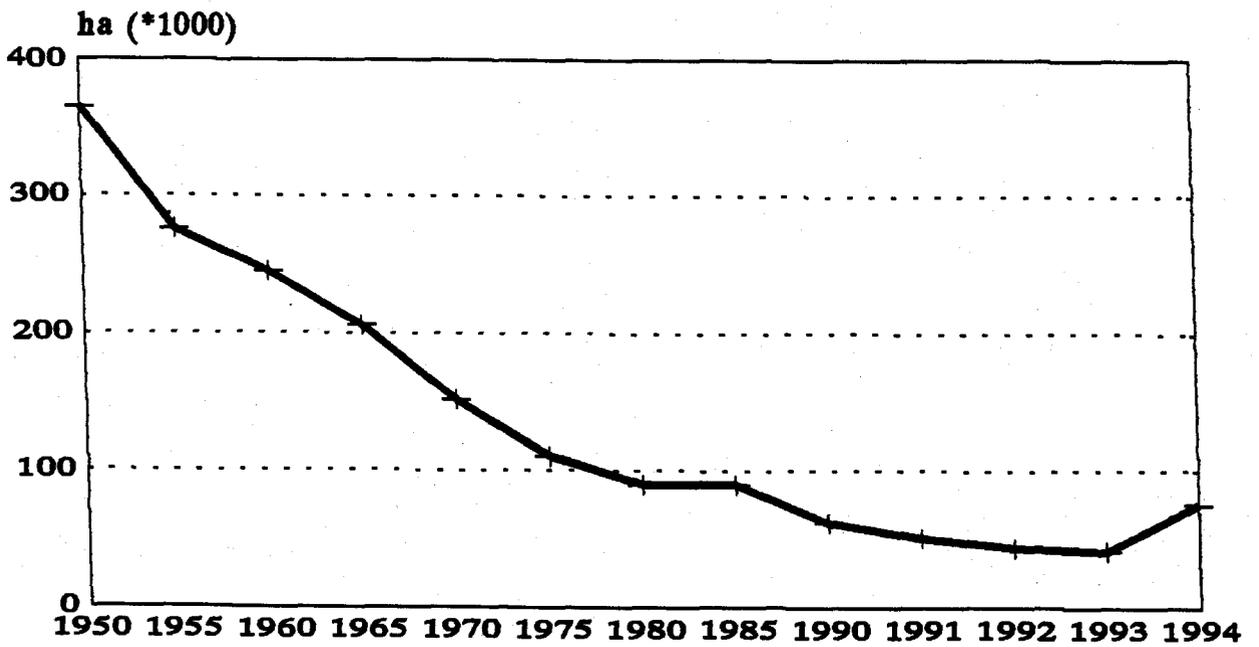


Fig. 3. Superficie cultivada de garbanzos en España (Anuario de estadística agraria 1994).

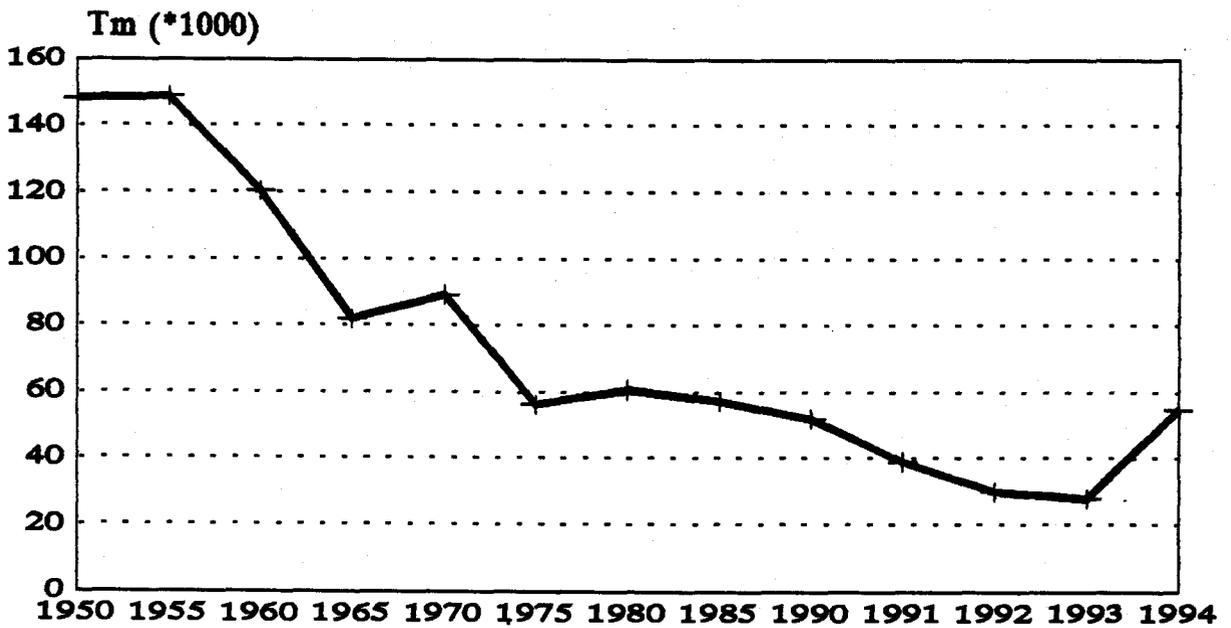


Fig. 4. Producción de garbanzos en España (Anuario de estadística agraria 1994).

cultivo son los bajos rendimientos, en parte debido, al estrés hídrico que sufre el cultivo durante fases críticas de su desarrollo.

En la zona mediterránea, el garbanzo se siembra tradicionalmente en primavera, en suelos que presentan gran capacidad de retener agua, permitiendo mantener el cultivo en seco, lo que da lugar a una baja producción de biomasa, y repercute también en bajos rendimientos. El cultivo de invierno podría solucionar este problema, ya que en la zona mediterránea el frío no suele ser un factor limitante, siendo en este caso el factor limitante el ataque de "rabia" (Ascochita rabiei (Pass.) Labr.) hongo aéreo que puede ocasionar la pérdida total del cultivo.

En la actualidad el desarrollo de líneas resistentes a rabia en el International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA) en Aleppo (Siria) ha permitido el cultivo del garbanzo en invierno. Con la siembra de invierno se pueden aprovechar mejor los períodos de lluvia de otoño-primavera. Esto supone un incremento del rendimiento importante, lo que convierte al garbanzo en un cultivo más rentable (Saxena, 1980).

En la India, el International Crop Research Institute for the Semiarid Tropics (ICRISAT) y en Siria el ICARDA, están desarrollando una labor, paralela a la de mejora genética,

investigando sobre nuevos usos de la proteína del garbanzo, normas para aprovechar al máximo su poder nutritivo, fabricación de aperitivos, etc.. Hasta el momento no se han seleccionado tipos adecuados a cada modo de preparación, como ocurre por ejemplo, en el maíz, quizás porque casi todas las recetas versan sobre el grano cocido, lo que ha motivado la única separación varietal por motivos de utilización (los granos de buena cocción son grandes, rugosos y blancuzco-amarillentos). Las semillas verdes y los tallitos jóvenes son conocidos únicamente en la cocina india, que también emplea el garbanzo en forma de harina, 4posible reliquia del uso que de él hizo el hombre prehistórico (Moreno, 1985).

### I.2.2.- ASPECTOS TAXONÓMICOS:

Las leguminosas o fabáceas son una familia muy numerosa de árboles, arbustos o hierbas con una gran variabilidad en su porte, existiendo especies acuáticas, xerofíticas y trepadoras. Los aproximadamente 700 géneros y 17000 especies de la familia presentan una distribución cosmopolita y se encuentran repartidas por las regiones templadas, tropicales y subtropicales.

Tradicionalmente, las leguminosas de grano se han dividido en dos tribus: PHASEOLEAE y VICIEAE. Esta última, agrupa a cuatro géneros de marcada importancia económica: Lens L.,

Pisum L., Vicia L. y Cicer L.. Sin embargo, existen varios antecedentes basados en distintos parámetros (morfología al microscopio electrónico de barrido, perfiles electroforéticos, afinidades por distintas cepas de Rhizobium etc.) que indican, que el género Cicer presenta suficientes peculiaridades propias y podría constituir por sí mismo una tercera tribu (CICEREAE) que sería monogénica (Gapochka, 1975; Clarke y Kupicha, 1976; Kupicha, 1977; Nozzolillo, 1985). Esta nueva tribu, podría ser la conexión entre Vicieae y Trifoliae ya que presentaría características de la primera, en la que siempre figuró Cicer, así como de la segunda, sobre todo por el parecido con el género Onomis. El género Cicer agrupa a 9 especies anuales herbáceas y 34 perennes semiarbusivas (Van der Maesen, 1987).

Existen dos especies anuales silvestres estrechamente relacionadas o cercanas con la especie cultivada: Cicer echinospermum Davis y Cicer reticulatum Ladizinsky. En un principio se pensó en Cicer echinospermum como posible antecesor de la especie cultivada (Zohary y Hopf, 1973), pero posteriormente se descubrió en la zona SE de Turquía una nueva especie, Cicer reticulatum (Ladizinsky, 1975), que cuando se cruza con Cicer arietinum da híbridos totalmente fértiles, mientras que los híbridos de C. arietinum x C. echinospermum presenta una fertilidad muy baja. Todo esto unido a la similitud de caracteres morfológicos, cromosómicos y bioquímicos entre Cicer reticulatum y Cicer arietinum, hace que se considere a

la primera como el posible antecesor de la especie cultivada (Ladizinsky y Adler, 1975). Moreno y Cubero (1978) consideran que ambas deben formar una única especie agrupando a dos subespecies: reticulatum para las formas silvestres y arietinum para las formas cultivadas, proponiendo dentro de esta última dos razas macroserma y microserma, basándose para ello principalmente en caracteres morfológicos. La descripción dada para estas dos razas es la siguiente:

- La raza macroserma se caracteriza por presentar vainas, granos, hojas y foliolos grandes, con granos generalmente de color claro y cubierta rugosa. El número de granos por vaina raramente excede de uno o dos. La flor es en la mayoría de los casos de color blanco.

- La raza microserma se caracteriza por tener vainas, granos, hojas y foliolos pequeños, los granos presentan diversidad de colores, formas y relieves, existiendo de 1 a 3 en cada vaina. Las flores pueden ser de diversos colores.

La raza microserma se distribuye principalmente en la India, Etiopía, Irán y Méjico; la macroserma por la Cuenca Mediterránea y Cercano Oriente y su frecuencia aumenta hacia el Oeste del Mediterráneo (Moreno y Cubero, 1978; Ocampo, 1995). Según diversos estudios, la raza macroserma parece derivar de microserma donde se encuentra mas variabilidad (Moreno y Cubero,

1978; Gil y Cubero, 1993, Ocampo, 1995).

Desde el punto de vista de mejora genética, los mejoradores a menudo distinguen dos tipos dentro de C. arietinum, el tipo "kabuli" y el tipo "desi", ambos tienen cierta similitud con las razas macrosperma y microsperma (Moreno y Cubero, 1978). Hawtin y Singh (1980) describieron ambos tipos de la siguiente forma:

- Tipo kabuli: Tiene gran variabilidad en cuanto a tamaño de semilla, pero éstas suelen ser gruesas (peso de 100 semillas superior a 26 g) más o menos redondeadas y de color crema pálido. Las plantas son relativamente altas con flor blanca, tienden a tener más ramificaciones primarias, mayor tolerancia al frío, mayor resistencia a la clorosis causada por una escasez de hierro disponible en el suelo, resistencia a rabia y menor grosor de cutícula que los tipo desi. Se distribuye principalmente por la Cuenca Mediterránea y Cercano Oriente.

- Tipo desi : Se caracteriza por poseer semillas pequeñas y de colores variados. Con respecto al tipo kabuli, las plantas son generalmente más cortas y con pequeños foliolos, presentando con frecuencia pigmentación de antocianinas en flores y tallos. Poseen mayor número de semillas por vaina; mayor número de vainas por planta; mejor tolerancia al calor y la sequía y resistencia a Fusarium sp. Este tipo es el más

frecuente en la zona de la India, Afganistán, Etiopía y México.

Dentro de los tipo kabuli parece existir menor variabilidad que dentro de los tipo desi, aunque hay autores como es el caso de Hawtin y Singh (1980) que piensan que esto puede ser debido a que se ha estudiado más el tipo desi y que no se ha evaluado suficientemente el tipo kabuli. La menor variabilidad presente en kabuli unido a que en este grupo se encuentra mayor tamaño de semilla, vaina, hoja y hábitos más erectos, caracteres que se consideran más evolutivos en leguminosas (Smarth, 1976), es el motivo por el que se acepta en general que los tipo kabuli se originaron a partir de los desi (Moreno y Cubero, 1978; Salimath et al., 1984).

### **I.2.3.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA:**

El garbanzo es una especie anual herbácea que posee un porte variable entre erecto, semierecto y postrado según el tipo de cultivar, con tallos lignificados en la base al llegar a la madurez y con gruesa cutícula. Su altura puede oscilar entre 20 y 100 cm pudiendo llegar hasta 150 cm en ambientes favorables (Cubero, 1987). La raíz es potente y capaz de ahondar en las capas profundas de los suelos de ambiente semiáridos haciendo posible la búsqueda de agua. Toda la planta, incluidas las vainas, está recubierta de tricomas, siendo algunos glandulosos.

El tallo puede presentar ramificaciones primarias, secundarias y terciarias, estas son menos vigorosas. Las hojas son pseudo-imparipinnadas con un número de folíolos variable que puede oscilar de 6-7 a 16-18 por hoja, siendo los folíolos subelípticos y dentados.

Presenta inflorescencias axiales reducidas a una sola flor pedunculada y raramente dos, cambian de color con la marchitez, pasando de rosa a celeste antes de decolorarse. La flor es papilionácea, pentámera y formada por estandarte, quilla y alas. La fecundación es por autogamia estricta. Malhotra y Singh (1986) obtuvieron ausencia de fecundación cruzada en condiciones mediterráneas aunque en otro ensayo realizado en el ICRISAT se obtuvo un 2% de fecundación cruzada (Gowda, 1981). Las vainas son pilosas y contienen generalmente 1 ó 2 granos por vaina aunque pueden aparecer más. El ciclo del cultivo presenta una duración entre 90 y 180 días, aunque depende del clima y época de la siembra.

Los granos presentan una forma redondeada o ligeramente alargada, siendo su superficie lisa o fuertemente rugosa con un saliente muy característico. Los colores son muy variados: verde, rojo, amarillo, anaranjado, negro etc.

### I.3.- CALIDAD DE LA SEMILLA:

El estudio de la composición química de las leguminosas es de gran interés a la hora de evaluar su calidad nutritiva. En la Tabla 1, aparecen los valores de distintos parámetros estudiados para varias leguminosas alimenticias según Williams y Singh (1988).

Tabla 1. Composición aproximada, expresada en porcentaje sobre materia seca, según Williams y Singh (1988), de distintos parámetros, para varias leguminosas de grano.

Especies	Proteína	Almidón+ Azúcares	Grasa	Fibra bruta	Cenizas
Garbanzo	20.1	61.5	4.5	4.9	2.9
Guisante	22.5	62.1	1.8	5.5	2.6
Judía	22.1	61.4	1.7	4.2	3.8
Lentejas	24.2	60.8	1.8	3.1	2.2
Habas	23.4	60.2	2.0	7.8	3.4

#### I.3.1.- PROTEÍNA:

Las proteínas desempeñan un papel vital en el organismo humano como la regeneración y formación de tejidos, la síntesis de enzimas, anticuerpos y hormonas, y como constituyente de la sangre. Además, forman parte del tejido conectivo de los animales, de la piel, el pelo y de otros tejidos estructurales.

Para la síntesis de sus propias proteínas, el hombre solamente puede utilizar nitrógeno orgánico procedente de las proteínas animales y vegetales. Las plantas sintetizan las proteínas a partir de moléculas sencillas, como nitrógeno inorgánico, agua y dióxido de carbono, a diferencia de los animales que precisan un consumo directo de proteínas. Como ya hemos visto, una de las fuentes importantes de proteínas vegetales para consumo humano son las semillas de leguminosas.

El porcentaje medio de proteína en la semilla madura de las leguminosas se sitúa, en general, entre el 20% y 25%. Algunas superan estos valores: los altramuces (Lupinus albus L.) sobrepasan el 30%, incluso sin haber sido seleccionados para ello; soja (Glycine max L.) y cacahuete (Arachis hypogaea L.), después de haber sufrido una extraordinaria labor de selección, superan el 35% el primero y el 25% el segundo (Moreno, 1983).

Atendiendo a su solubilidad (Osborne, 1924), las proteínas vegetales se pueden clasificar en cuatro clases:

- Albúminas: Solubles en agua y soluciones salinas diluidas.
- Globulinas: Solubles en soluciones salinas pero no en agua (o solo ligeramente).
- Prolaminas: Solubles en etanol acuoso al 70-80% pero no en agua ni en soluciones salinas.
- Glutelinas: Solubles en ácidos y bases pero no en

soluciones salinas, etanol acuoso o agua.

En general las leguminosas contienen un 70% de globulinas, 10 a 20% de albúminas, 10 a 20% de glutelina y una pequeña fracción de prolaminas. En cereales, en cambio, las prolaminas y las glutelinas son las fracciones predominantes. Interesa destacar que, mientras que en cereales existe un claro equilibrio (correlación negativa) entre producción y contenido en proteínas, este no es tan claro en leguminosas (salvo en soja), lo que nos permite poder elevar el contenido en proteínas sin que la producción se vea afectada (De Haro, 1983). Posiblemente esto sea debido a la poca labor de mejora realizada sobre ellas, lo que permite aún actuar sobre una amplia variabilidad.

Como se puede apreciar en la Tabla 1 el contenido proteico medio del garbanzo es más bajo que el de otras leguminosas. No obstante hay que destacar que su proteína es una de las más digestibles (Williams y Singh, 1987) y, en segundo lugar que dentro de la especie existe una alta variabilidad para contenido en proteína, como se ha puesto de manifiesto en los trabajos de Chandra (1968, 18.4 a 29.8%), Chavan et al (1986, 12.4 a 30.6%), Newman et al (1987, 12.6 a 30.5%), Williams y Singh (1987, 17 a 24%), Hadsell y Sommerfeldt (1988, 19 a 25%) y De Haro y Moreno (1992, 15.5 a 28.2%). Como se puede ver en estos trabajos, es factible seleccionar líneas con alto

contenido proteico.

Parece que no existen diferencias significativas en cuanto al contenido en proteínas entre los dos grupos o razas en que se divide esta especie (kabuli y desi o macrosperma y microsperma) (Jambunathan y Singh, 1980; Singh et al, 1991; De Haro y Moreno, 1992).

### **1.3.2.- PROTEÍNA BRUTA vs PROTEÍNA VERDADERA:**

Cuando se analiza el contenido de proteína en semillas por métodos clásicos (Kjeldahl, Dumas, etc.) lo que se mide realmente, es el contenido de nitrógeno total que se multiplica por un factor (6.25 en el caso de leguminosas) para convertirlo en "proteína bruta". Esto implica una doble imprecisión:

1) Teóricamente el contenido en nitrógeno de las proteínas puede variar entre dos valores extremos: 8.6% para la politiroxina y 35% para la poliarginina, lo que daría lugar a unos factores de conversión nitrógeno-proteína de 11.63 y 2.79 respectivamente. Como en la mayoría de las proteínas el contenido de nitrógeno está alrededor del 16%, esto explica el uso casi universal del factor de conversión 6.25.

2) Lamentablemente tampoco se tiene en cuenta que una parte de ese nitrógeno no es proteico (De Haro, 1984). Dentro del denominado nitrógeno no proteico, se encontrarían compuestos del tipo de: bases púricas y pirimidínicas, aminoácidos libres, ácidos nucleicos, complejos lipídicos, alcaloides, etc., pero la literatura es escasa en datos cuantitativos referidos a los diferentes componentes del nitrógeno no proteico (Mossé y Pernollet, 1983). Interesantes trabajos de revisión sobre alcaloides y aminoácidos libres han sido llevados a cabo respectivamente por Means y Mabry (1971), Fowden (1970) y Bell (1971). También hay que destacar el trabajo de De Simone et al. (1983) sobre aminoácidos libres en Vicia faba L.

Así mismo son escasas las referencias bibliográficas sobre la influencia del nitrógeno no proteico en la determinación del contenido proteico real, y prácticamente nulas las referidas a su variación en función del valor del contenido en proteína de la semilla. Para habas (Vicia faba L.), se cita un margen de 0.32 a 0.70% (De Haro et al, 1985a), equivalente al 10% del nitrógeno total de la semilla.

Según Williams y Singh (1987), una gran variación en nitrógeno no proteico sobreestimaría el verdadero contenido de proteína de la muestra y consecuentemente afectaría la estimación de proteína en la dieta. Estos autores citan un rango de variación para el garbanzo de 0.16 a 0.91%.

### I.3.3.- GRASA:

El contenido en grasa de las leguminosas grano es bajo en general (Tabla 1), entre el 1 y el 2%, siendo algo superior en el garbanzo y guanzú (Voandzeia subterranea Thouars.): del 4 al 6%. Excepciones notables son el cacahuete (43.3%) y la soja (18%) que son dos de las más importantes oleaginosas pertenecientes a esta familia y que no son consideradas como leguminosas grano ya que normalmente su grano no se usa para su consumo directo (De Haro, 1983).

Entre los límites de variación para grasa en el garbanzo encontrados por distintos autores podemos citar los siguientes: Jambunathan y Singh (1980) dan un intervalo comprendido entre 3.1 y 7.5%, Chavan et al (1986) entre 3.1 y 6.9%, Williams y Singh (1987) entre 3.8 y 10.2% y De Haro y Moreno (1992) entre el 3.06 y 7.02%. Como se puede ver en general se pueden encontrar líneas con contenido en grasa alrededor del 7%.

De Haro y Moreno (1992) encontraron diferencias en el contenido medio de grasa entre desi y kabuli, siendo más alto en el segundo. Estos resultados contrastan con la ausencia de diferencias encontradas por Jambunathan y Singh (1980). Sin embargo estos últimos autores evaluaron un número pequeño de líneas (15 líneas) respecto a las evaluadas por los primeros (52

líneas).

La grasa de la semilla de esta especie esta constituida principalmente por ácidos grasos insaturados, mientras que los ácidos grasos saturados se encuentran en menor proporción. Entre los principales ácidos grasos saturados se encuentran el ácido palmítico (16:0) y entre los insaturados el oleico (18:1) y linoleico (18:2) (Ghirardi et al, 1974; Ling y Robinson, 1976; Chavan et al, 1986; De Haro y Moreno, 1992).

Se ha demostrado que los ácidos grasos del garbanzo tienen efectos hipocolesterolémicos debido fundamentalmente al alto contenido de ácidos grasos esenciales insaturados en la semilla (Ghirardi et al, 1974).

Estudios realizados en humanos por Mathur et al (1968) demuestran que el garbanzo es capaz de bajar los niveles de colesterol inducidos experimentalmente. Similares observaciones han sido obtenidas en ratas y conejos (Mathur et al, 1963, 1964; Chavan et al, 1986). Parece ser que a un significativo aumento de excreción de ácidos biliares fecales le corresponde una disminución de colesterol en suero. Una posible explicación puede ser un aumento del catabolismo del colesterol en ácidos biliares en el hígado (Mathur et al, 1968).

### I.3.4.- FIBRA:

La importancia de la fibra en la alimentación humana, ha aumentado considerablemente en los últimos años, ya que se ha sugerido que tal componente puede ejercer una acción protectora contra un determinado grupo de dolencias. Estudios epidemiológicos han señalado que las poblaciones que consumen un bajo contenido de fibra vegetal y/o una elevada cantidad de harinas y azúcares refinados muestran una mayor frecuencia de enfermedades digestivas (diverticulosis, apendicitis, cáncer de colon, hernia de hiatus), cardiovasculares (afecciones coronarias), metabólicas (colelitiasis, diabetes, obesidad, caries dental) y otras (hemorroides, varices).

El aporte de fibra varía ampliamente de los países industrializados (5 gramos per cápita y día) a los no industrializados (25 gramos per cápita y día) (Rojas, 1983).

La fibra puede ser definida desde dos puntos de vista:

- Nutricional: Aquellas partes de la pared celular de un vegetal que atraviesan el intestino sin ser digeridas ni absorbidas. Es lo que se conoce como "fibra dietética" o "fibra alimentaria".

- Analítico: Es el residuo orgánico que queda tras una digestión en caliente con determinados reactivos químicos. Según los casos hablaremos de fibra bruta, ácido detergente (ADF) o neutro detergente (NDF).

### Fibra bruta:

Por fibra bruta se entiende, el residuo seco libre de cenizas, que persiste tras dos hidrólisis, una con ácido débil (ácido sulfúrico 1.25%) y otra con base débil (hidróxido sódico 1.25%) y representaría la parte no digestible de un alimento.

Este método puesto a punto por Henneberg y Stohman en 1860, ha recibido numerosas críticas porque las hidrólisis, por un lado solubilizan sustancias indigestibles (80% de la hemicelulosa, 50 a 90% de la lignina, 20 a 50% de la celulosa) y por otro, no solubilizan sustancias digestibles por rumiantes (pentosas y parte de la celulosa).

### Fibra ácido y neutro detergente:

Van Soest, un siglo después, puso a punto una técnica más precisa para la determinación de la fibra y sus componentes usando soluciones de detergentes a diferente pH.

Cuando la solución empleada es de pH ácido (bromuro de cetiltrimetil amonio en ácido sulfúrico 1N) hablamos de ADF y cuando es de pH neutro (lauril sulfato sódico, EDTA, borato sódico decahidratado, fosfato disódico anhidro y 2-etoxietanol) nos referimos a NDF. De esta forma se separan las proteínas del resto de los componentes y al hacer innecesario el reflujó con solución alcalina, hace que la lignina permanezca en el residuo de fibra obteniendo por lo tanto un valor más exacto del contenido de fibra en el material analizado (Van Soest, 1963; Van Soest y Wine, 1967). Dentro de la fracción ADF se incluyen la celulosa, lignina, cutina y sílice, mientras que en la NDF se incluyen todos los componentes anteriores más la hemicelulosa.

Entre las principales ventajas de este método se encuentran las siguientes:

- La celulosa y lignina se encuentran incluidas, en la fracción insoluble.
- Pueden determinarse separadamente los distintos componentes de la fibra.
- Los valores obtenidos están muy correlacionados con los valores de digestabilidad del alimento.

La técnica de Van Soest, se ha usado generalmente para la determinación de fibra y sus componentes en forrajes. Cuando se emplea este método para la determinación de la NDF en

materiales de alto contenido en almidón, la gelificación de éste obstruye los poros del crisol y la filtración se hace muy lenta y a veces imposible, lo que provoca resultados erróneos y faltos de reproducibilidad. Varias modificaciones del método de Van Soest, han resuelto este problema, mediante hidrólisis enzimática con alfa-amilasa. Entre las modificaciones destacan las de American Association of Cereal Chemists (1978), la de McQueen y Nicholson (1979), la de Robertson y Van Soest (1981) y especial mención merece la de Mascarenhas Ferreira et al (1983), que hace un estudio comparativo de todas las modificaciones publicadas hasta entonces.

La fibra bruta es un constituyente importante del garbanzo, su concentración está directamente relacionada con la cubierta de la semilla y hay una gran variabilidad para esta dentro de la especie (Singh et al, 1980; Singh, 1984). El rango de variabilidad de la fibra bruta oscila entre 1.7 a 10.3% (Shobhana et al, 1976); para Williams y Singh (1987) de 1.7 a 10.7%; Newman et al (1987) dan un rango de 2.4 a 9.5%.

Jambunathan y Singh (1980) encontraron diferencias entre desi y kabuli para el contenido en fibra bruta, no encontrando solapamiento entre sus intervalos de variación (4.9 a 10.8% para desi; y 2.2 a 4.7% para kabuli). Resultados similares han sido encontrados también para ADF (9.6 a 14.8% para desi; 4 a 6.7% para kabuli) y NDF (15.6 a 20% para desi;

8.2 a 11.7% para kabuli) (Singh, 1984).

**I.3.5.- HIDRATOS DE CARBONO:**

Los hidratos de carbono, también llamados sacáridos o glúcidos se definen, como polihidroxialdehidos o polihidroxiacetonas. Dentro de estos, los monosacáridos, también llamados azúcares sencillos, están constituidos por una sola unidad de polihidroxialdehidos o polihidroxiacetona. El monosacárido más abundante es la D-glucosa, tiene seis átomos de carbono; es el monosacarido originario del que se derivan muchos más. La D-glucosa es el combustible principal para la mayor parte de los organismos, y es también la unidad estructural básica de los polisacáridos más abundantes, tales como el almidón y la celulosa. Los polisacáridos, contienen muchas unidades de monosacáridos enlazadas, formando cadenas lineales o ramificadas y desempeñan dos funciones biológicas principales: una como almacenadores de combustible y otra como elementos estructurales.

El almidón es la principal forma de almacenamiento de combustible en la mayor parte de los vegetales, mientras que la celulosa, es el principal componente extracelular de las paredes celulares rígidas y de los tejidos fibrosos y leñosos de los mismos.

Las semillas de garbanzo contienen un rango de 52.4 a 70.9% de carbohidratos totales, donde la principal proporción esta constituida por el almidón, la proporción de azúcares solubles es de 4.8 a 9%, donde los azúcares no reductores comprenden la mayor parte de los azúcares solubles (Chavan et al, 1986). Los garbanzos de tipo kabuli contienen valores ligeramente superiores de azúcares solubles, que los de tipo desi (Jambunathan y Singh, 1980).

Varios estudios han mostrado que los oligosacáridos no reductores de la familia de la rafinosa, están involucrados en la producción de flatulencias en humanos y animales, que se caracteriza por la producción de gran cantidad de hidrogeno, dióxido de carbono y pequeña cantidad de gas metano (Andersson et al, 1979; Reddy et al, 1980; Chavan et al, 1986).

En resumen la mayoría de los datos actualmente disponibles sobre la composición química de la semilla de garbanzo proceden de un pequeño número de líneas y, en muchos casos, sin tener en cuenta las dos razas o grupos en que se divide esta especie, y que pueden poseer fondos genéticos distintos para estos caracteres. Por lo que seria interesante llevar a cabo evaluaciones más amplias que nos permitan estimar mejor la variabilidad existente dentro de la especie, por la importancia no solo de su calidad nutritiva, sino también por la relación que puedan tener con otros parámetros de calidad

culinaria o de procesamiento industrial. Otro factor importante y que no ha sido suficientemente evaluado es la influencia que el ambiente puede tener sobre ellos, información muy importante desde el punto de vista de la mejora de la calidad de esta especie ya que el mercado demandará variedades comerciales cuya composición química sea lo mas homogénea posible a lo largo de los años o de diferentes localidades.

### I.4.- TÉCNICA DE ANÁLISIS DE REFLECTANCIA DEL INFRARROJO CERCANO (NIRS):

El análisis de elevado número de muestras en la industria agroalimentaria o en los programas de mejora para caracteres de calidad ha hecho necesario el desarrollo de técnicas de análisis rápidas que permitan analizar grandes cantidades de muestras en poco tiempo. Una de estas técnicas es la basada en la absorción o reflectancia de energía de los distintos compuestos químicos en la región del infrarrojo cercano.

El infrarrojo cercano es una región del espectro electromagnético que comienza justo por encima de la región visible, a 700 nm, y se prolonga hasta 3000 nm, aunque la mayoría de sus aplicaciones están basadas en la región comprendida entre 1000 y 2600 nm (Hruschka, 1987). Para llevar a cabo el uso de

esta técnica se necesita una calibración previa, para lo cual es necesario analizar mediante los métodos tradicionales un grupo de muestras que serán empleadas para la calibración y comprobación de dicha calibración (validación).

El uso de la técnica NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) para el análisis rápido de componentes nutritivos de semillas fue introducido por Norris y Hart en 1965. La técnica fue originalmente desarrollada para la medida del contenido en humedad (Norris, 1964), siendo este trabajo la base del comienzo de uso de esta tecnología en la industria agroalimentaria. Las primeras presentaciones técnicas de la aplicación de un instrumento NIRS comercial al análisis de cereales y semillas oleaginosas se realizaron en 1973 (Williams 1973 a, b). Desde ese momento, el uso de la tecnología NIRS empezó a extenderse fundamentalmente para análisis de humedad, fibra, grasa y proteína, aunque la aplicación de la misma con fines de investigación pronto demostró la utilidad del NIRS para el análisis de otros constituyentes como aminoácidos, distintas fracciones de fibra, minerales, etc. (Williams y Norris, 1987).

Su aplicación en la industria farmacéutica es cada vez mas amplia, ya que es una técnica rápida, no destructiva, con un alto grado de automatización y que supone un ahorro de tiempo y dinero. Entre estas aplicaciones está la determinación del

tamaño de partícula, de principios activos y la cuantificación de estos en las preparaciones farmacéuticas (Blanco et al, 1992; Monfre y DeThomas, 1992; Ciurczak, 1992), de la humedad residual en productos liofilizados y ampollas ya que es una técnica muy sensible al agua (Röttele et al, 1995), y de compuestos puros y mezclas complejas, ya que su espectro es como una huella digital que sirve para su identificación y cuantificación (Weiler y Sarinas, 1995; Schilling et al, 1995).

En los programas de mejora esta técnica es empleada para evaluar grandes colecciones de material vegetal para proteína, grasa, fibra, ADF, NDF, etc., siendo hoy día una herramienta imprescindible que permite evaluar en poco tiempo un elevado número de muestras.

Así por ejemplo la técnica NIRS se ha aplicado en Triticum aestivum L. para medir el contenido proteico (Diachuk et al., 1981), en la determinación del contenido de grasa en diferentes leguminosas: Lupinus mutabilis Sweet (Gross et al., 1983), L. albus L. (De Haro et al., 1984), Vicia faba y Lupinus spp. (Biston et al., 1983), en colza (Koester y Paul, 1986) y en otras semillas oleaginosas (Ribaillier y Maviel, 1984; Starr et al., 1985; Biston et al., 1987; Wathelet et al., 1989; Daun et al., 1994). En Vicia faba también se ha determinado proteína, ADF y NDF (De Haro et al., 1980) así como fibra bruta, ADF y NDF en Lupinus albus (De Haro et al., 1984). Otros componentes que se

han medido con esta técnica han sido el contenido de polifenoles en el tabaco (McClure y Williamson, 1982), glucosinolatos en las semillas de colza (Evans et al., 1989; Velasco, 1996) humedad en trigo duro (Diachuk et al., 1981) y en semillas oleaginosas (Ribaillier y Maviel, 1984), la composición en ácidos grasos en girasol (Sato et al., 1995) y en semillas intactas de especies del genero Brassica L. (Reinhardt y Röbbelen, 1991; Reinhardt et al, 1992; Velasco, 1996). En garbanzo, se ha utilizado la técnica NIRS para evaluar el contenido de proteína (Singh et al., 1991; De Haro y Moreno, 1992), proteína, ADF, NDF (Kharrat, 1988), proteína, grasa, y ADF (Gil et al., 1996).

## **OBJETIVOS**

**II.- OBJETIVOS:**

Los objetivos de esta tesis, se encuentran enmarcados dentro del Programa de Mejora Genética del Garbanzo, que se lleva a cabo en Córdoba por miembros del grupo de Mejora Genética Vegetal. Desde sus comienzos este programa ha tenido como objetivos principales la mejora del rendimiento y de la resistencia a enfermedades. Más recientemente se ha fijado también como objetivo la mejora de la calidad de la semilla, dentro del cual se incluiría el trabajo desarrollado en esta tesis.

Como ya se ha visto en los apartados anteriores la calidad nutritiva de la semilla del garbanzo es bastante aceptable, pero es necesario conocer más acerca de la variabilidad que estos componentes químicos presentan dentro de la especie y de la influencia que el ambiente pueda tener sobre su valor fenotípico. Esta información sería muy importante para conocer mas exactamente cual podría ser su potencial uso industrial así como sus posibles relaciones con la calidad culinaria de esta especie.

Por todo ello los objetivos concretos de este trabajo de tesis han sido los siguientes:

1.- Estudiar las posibilidades de empleo de la técnica de reflectancia en el infrarrojo cercano en el análisis de los distintos parámetros químicos relacionados con la calidad nutritiva de esta especie.

2.- Evaluar y caracterizar una colección de garbanzos de amplia distribución mundial, para diversos caracteres relacionados con la calidad de la semilla.

3.- Estudiar la variabilidad genética y ambiental para estos caracteres y conocer las relaciones existentes entre ellos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

**III.- MATERIAL Y MÉTODOS:**

**III.1.- MATERIAL VEGETAL:**

Las líneas o poblaciones utilizadas se encuentran recogidas en la Tabla 2, donde se indica el origen y número de registro de cada línea usada, la morfología de las semillas se puede ver en las Figs. 5 y 6. Esta colección de 50 líneas (24 tipo Desi + 26 tipo Kabuli) fueron sembradas durante dos años en la finca "Alameda del Obispo" del CIDA (Córdoba), según un diseño de bloques al azar con tres repeticiones.

Los parámetros de calidad de la semilla evaluados fueron los siguientes:

- Contenido en proteínas, expresado en porcentaje sobre materia seca.
- Contenido en nitrógeno no protéico (NPN), expresado porcentaje sobre materia seca.
- Contenido en grasa, expresado en porcentaje sobre materia seca.
- Contenido en ácidos grasos, expresado en porcentaje sobre grasa.
- Contenido en fibra ácido detergente (ADF), expresado en porcentaje sobre materia seca.
- Contenido en fibra neutro detergente (NDF), expresado

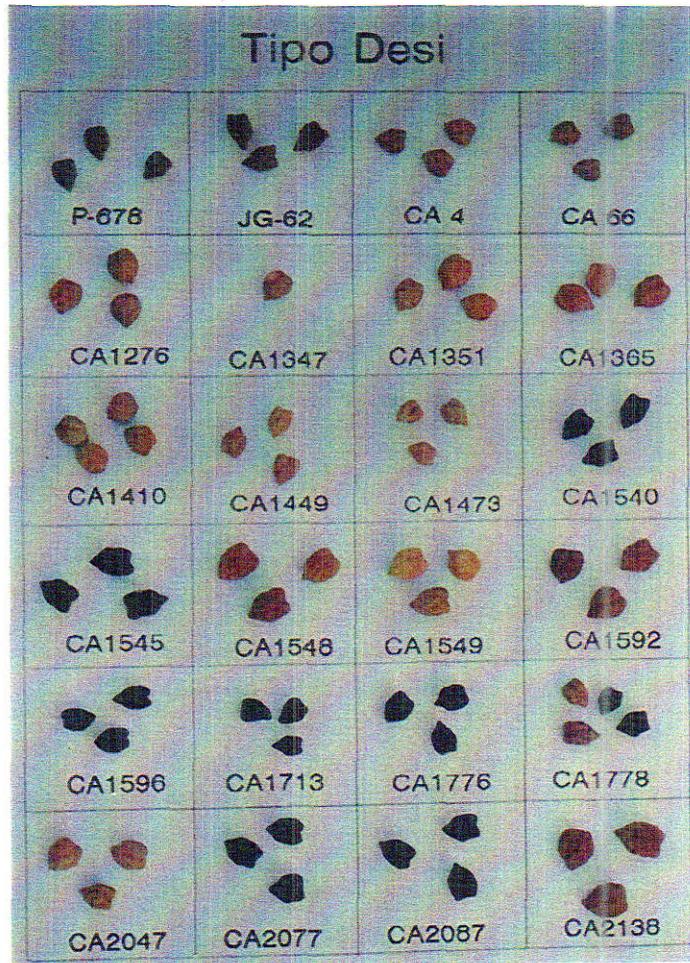
en porcentaje sobre materia seca.

- Contenido en azúcares totales, expresado en porcentaje sobre materia seca.

El número de muestras total a analizar sería de 300 (50 genotipos x 3 repeticiones x 2 años). Un número determinado de estas fueron elegidas para llevar a cabo los análisis mediante métodos de referencia de laboratorio para la mayoría de los parámetros anteriores y posteriormente realizar la calibración NIRS. El resto de las muestras serían posteriormente analizadas mediante esta técnica, salvo para NPN que se evaluó solo mediante los métodos tradicionales de laboratorio.

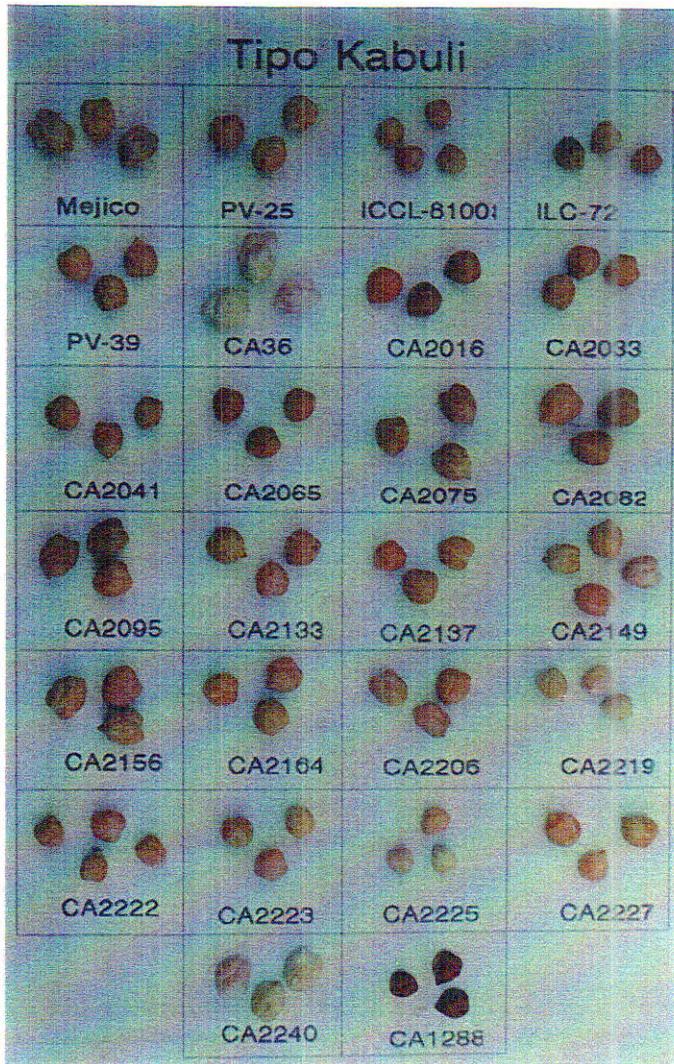
Tabla 2. Origen y número de registro de 50 líneas de garbanzos (24 desi y 26 kabuli) evaluados para parámetros de calidad.

Tipo	Origen	Líneas	Registro
<b>Desi</b>			
	India	8	P678, JG62, CA1449, CA1473 CA1545, CA1549, CA1548, CA1778
	España	7	CA4, CA66, CA1540, CA2047 CA2077, CA2087, CA2138
	Méjico	5	CA1276, CA1347, CA1351, CA1365 CA1410
	Hungría	2	CA1592, CA1596
	Marruecos	1	CA1776
	Irán	1	CA1713
<b>Kabuli</b>			
	España	17	PV25, PV39, CA36, CA2016 CA2033, CA2041, CA2065, CA2075, CA2082, CA2095 CA2133, CA2137, CA2149, CA2156, CA2164, CA2206, CA2240
	Rusia	3	ILC72, CA2223, CA2227
	Méjico	2	Mejicano, CA1288
	Afganistan	2	CA2219, CA2225
	India	1	ICCL81001
	Turquía	1	CA222



  
 1 cm

Fig. 5. Variación para forma, color y tamaño de semillas de garbanzo tipo desi, de las líneas empleadas en nuestro estudio.



1 cm

Fig. 6. Variación para forma, color y tamaño de semillas de garbanzo tipo kabuli, de las líneas empleadas en nuestro estudio.

**III.2.- METODOS ANALITICOS DE REFERENCIA:**

**III.2.1.- PROTEINA BRUTA:**

Para la determinación de proteína se ha empleado el tradicional método de Kjeldahl, que sigue siendo el más ampliamente aceptado y utilizado como referencia, debido a su excelente precisión y reproducibilidad.

El método básicamente consta de las tres fases siguientes (Joslyn, 1970):

1. Digestión: En caliente y en presencia de catalizador, el ácido sulfúrico actúa sobre la proteína contenida en la muestra, formando sulfato amónico.

2. Destilación: Una vez digerida la muestra, se añade hidróxido sódico en exceso y se destila al vapor, formándose sulfato sódico e hidróxido amónico que se transformará en amoníaco y agua.

3. Recolección y titulación: El amoníaco obtenido en la fase anterior es recogido sobre ácido bórico (al que se le añade una mezcla de rojo de metilo:verde de bromocresol en proporción 3:1) valorándolo posteriormente con ácido clorhídrico de normalidad conocida.

Para el análisis del contenido en nitrógeno total de nuestro material utilizamos: 0.750 g de muestra, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y catalizador formado por 5 g de sulfato potásico mas 0.005 g de selenio. La digestión se realizó a 400°C durante una hora en un bloque digestor (Selecta). Una vez digerida la muestra, se adicionaron 50 ml de agua destilada y 60 ml de sosa al 40%, destilandose a continuación al vapor en un equipo automático Kjeltec System modelo 1028 (Tecator AB, Höganäs, Suecia). La recolección del amoníaco desprendido se hizo sobre 25 ml de ácido bórico al 4% al que se le añadió una mezcla de indicadores (rojo de metilo y verde de bromocresol en la proporción 3:1).

La valoración del amoníaco recogido se llevo a cabo con una solución de ácido clorhídrico de normalidad 0.5. El porcentaje de nitrógeno (N) contenido en la muestra se determinó usando la formula siguiente:

$$N(\%) = \frac{A(Vc - Vb)(14.008)}{P} 100$$

Siendo:

A: Normalidad del ácido clorhídrico.

Vc: Volumen (ml) de ácido clorhídrico gastado con la muestra.

Vb: Volumen (ml) de ácido clorhídrico gastado con el blanco.

14.008 es el valor del peso atómico del nitrógeno.

P: Peso de la muestra (g).

En base a las consideraciones teóricas expuestas en la introducción, hemos estimado el contenido en proteína de las muestras de garbanzo multiplicando por 6.25 el contenido en nitrógeno determinado por este método.

### **III.2.2.- NITRÓGENO NO PROTEICO (NNP):**

El método de determinación de nitrógeno no protéico (Osborne y Voogt, 1986), se basa en la solubilización de las proteínas y su posterior precipitación con acetato de cobre, con lo que las sustancias nitrogenadas no proteicas quedan en solución. Posteriormente se filtra esta solución y el nitrógeno no protéico, se determina sobre el filtrado, por el método de Kjeldahl.

La cantidad de muestra a emplear dependerá del contenido proteico de la muestra. En general se recomienda 2 g hasta el 25% de proteína bruta, del 25 al 50 % de proteína bruta 1 g, por encima del 50% de proteína bruta 0.5 g (Osborne

y Voogt, 1986). En nuestro caso, a partir de ensayos previos, empleamos 1.5 g. El proceso seguido fue el siguiente: A la muestra se le añade agua desionizada y unas gotas de antiespumante, después de agitar se pone en el bloque digestor, durante 30 minutos. Pasado este tiempo se retira y se añade 1 ml de una solución de sulfato aluminico potásico, se agita de nuevo y se mantiene en el bloque digestor hasta que comience a hervir, a continuación se retiran y se añade una solución de acetato de cobre, se agita y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente se realiza una filtración, para separar el precipitado de la solución, usando para ello papel Whatman 541. Finalmente se siguen las mismas pautas que para la determinación de proteína, con la salvedad de que aquí se usa una alícuota del filtrado y que usamos una escala de temperatura que se incrementa paso a paso hasta llegar a 380°C.

### III.2.3.- GRASA:

El método analítico usado en la determinación de grasa es el conocido como método Soxhlet, consiste básicamente en un proceso de extracción con un solvente orgánico empleando una cantidad de muestra comprendida entre 2 y 5 gramos.

En nuestro caso, se tomaron 3 g de muestra y se

uso éter de petróleo como solvente en lugar de éter etílico, por ser menos peligroso su manejo además de que está comprobado que su sustitución, no produce variación significativa en los resultados (Joslyn, 1970). El éter de petróleo estuvo en contacto con la muestra durante unas 18 horas en el equipo Soxhlet. Trascurrido este tiempo, se encendió la placa calefactora graduándola a una temperatura de unos 60°C, permaneciendo así durante unas 6 horas. Posteriormente se introdujo el erlenmeyer en una estufa a 60°C durante unas 18 horas, con el fin de eliminar los restos de solvente que hayan quedado en el aceite extraído.

El contenido en extracto etéreo se determinó gravimétricamente, de la forma siguiente:

$$\text{Grasa (\%)} = \frac{P2 - P1}{S} 100$$

Siendo:

P2: Peso del matraz más la grasa extraída.

P1: Peso del matraz vacío.

S: Gramos de muestra.

**III.2.4.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS. CROMATOGRAFÍA DE GASES:**

La cromatografía de gases, es la técnica analítica de separación que ha experimentado un desarrollo más espectacular desde sus inicios en los años cincuenta. Se ha utilizado para resolver numerosos problemas en la industria, medicina, biología y análisis ambiental. Actualmente se emplea como técnica de rutina y control en una gran variedad de áreas. Además, sus posibilidades han ido ampliándose a medida que se ha mejorado la instrumentación disponible.

Para la determinación de ácidos grasos el método empleado está basado en el de Garcés y Mancha (1993). Se parte de la grasa obtenida de las muestras correspondientes y se las somete a una esterificación, empleando una mezcla compuesta por la combinación de metanol, tolueno, dimetoxipropano y ácido sulfúrico, utilizándose finalmente heptano como solvente.

En cada vial, se puso el aceite extraído con éter de petróleo, la mezcla anteriormente citada y heptano, y se mantuvo 2 horas en un baño termostático a la temperatura de 80°C. Los esterios metílicos de los ácidos grasos se localizan en la fase superior, siendo ésta la que se inyecta en el cromatógrafo de gases.

En nuestro caso se utilizó un cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Autosystem (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, Estados Unidos), con detector de ionización de llama. El tipo de columna usada fué una columna empaquetada, con 3% SP-2310 + 2% SP-2300 como fase estacionaria.

Las condiciones de trabajo del cromatógrafo han sido:

Temperatura del inyector: 275°C.

Temperatura del detector: 250°C.

La temperatura del horno inicial fue de 195°C y la final de 220°C, el gas utilizado ha sido nitrógeno. Para la llama del detector se ha usado una mezcla de hidrógeno y aire puro. El procesado de los datos se ha hecho mediante el uso del Software Turbochrom-3.

### **III.2.5.- FIBRA ACIDO DETERGENTE (ADF):**

Para la determinación de ADF se empleó un equipo Fibertec (Tecator). Basándonos en la técnica de Van Soest (1963) se pesan 0.5 gramos de muestra, previamente desecada, y se pusieron en crisoles filtrantes de porosidad 2.

A continuación se introducen los crisoles en el

Fibertec y se añaden 100 ml de solución ácido detergente, compuesta por bromuro de cetiltrimetil amonio en ácido sulfúrico 1 N, y unas gotas de antiespumante (n-octanol). Se calienta hasta la ebullición, y se mantiene durante 1 hora. Pasado este tiempo, se filtra y lava tres veces con agua caliente y dos veces con acetona. Por último, los crisoles con el resto de muestra se desecan en estufa a 110°C y pesan.

El porcentaje de fibra ácido detergente sobre sustancia seca viene dado por la siguiente fórmula:

$$ADF(\%) = \frac{P - P1}{P2} 100$$

Siendo:

P: Peso del crisol más la muestra.

P1: Peso del crisol más la muestra después de la extracción con la solución ácido detergente.

P2: Peso de la muestra seca.

**III.2.6.- FIBRA NEUTRO DETERGENTE (NDF):**

Una vez que tenemos las muestras y los crisoles desecados en estufa a 100°C, se ponen 0.5 gramos de muestra en los crisoles (porosidad 1). Estos se colocan en el Fibertec y añadimos 50 µl de una solución de alfa-amilasa además de 100 ml de la solución neutro detergente, la cual esta formada por: Lauril sulfato sódico, EDTA, borato sódico decahidratado, fostato disódico anhidro y 2-etoxietanol.

Una vez obtenida la solución se ajusta el pH hasta que se encuentre en el rango de 6.9-7.1. El resto del análisis es similar al de ADF.

**III.2.7.- AZUCARES:**

Para la determinación de su contenido se usó la técnica descrita en la Norma UNE 64-108-77, la cual se aplica para calcular el contenido en azúcares solubles totales y azúcares reductores. En nuestro caso solo se ha usado para calcular azúcares totales, ya que al realizar un estudio preliminar los azúcares reductores (glucosa, fructosa etc) se encontraban en proporción de trazas.

La concentración de azúcares totales fue determinada previa inversión, expresados en tanto por ciento

de glucosa. Para ello se pesaron 2.5 gramos de muestra y se introdujeron en un matraz aforado de 250 ml, añadiendo 200 ml de etanol al 40% y manteniéndolo durante una hora en agitación.

A continuación se añadió 5 ml de las soluciones de Carrez I (acetato de cinc dihidrato y ácido acético glacial) y Carrez II (hexaciano ferrato (II) de potasio) agitando después de añadir cada una de ellas, se enrasa con etanol al 40% y se filtró tras homogenizar.

De este filtrado se toman 200 ml y se evaporan hasta la mitad del volumen, con el fin de eliminar la mayor parte del etanol. El residuo de evaporación con ayuda de agua caliente se trasvasa a un matraz aforado, enrasando cuando se haya enfriado. Esta solución será utilizada para la determinación de azúcares totales previa inversión.

Se toman 50 ml de esta solución y la llevamos a un matraz aforado de 100 ml, añadimos unas gotas de naranja de metilo y adicionamos lentamente agitando una solución de ácido clorhídrico 4N hasta viraje a rojo, posteriormente se añaden 15 ml de ácido clorhídrico 0.1N, sumergiendo el matraz en un baño de agua caliente a 100°C durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo se refrigera hasta 20°C y añadimos una solución de hidróxido sódico 0.1N, enrasando hasta

100 ml con agua destilada.

Tomamos 25 ml de esta solución y otros 25 ml del reactivo de Luff-Schoorl (carbonato sódico, ácido cítrico, sulfato de cobre) montamos el erlenmeyer sobre un refrigerante y calentamos a ebullición durante 10 minutos, después refrigeramos y añadimos una solución de ioduro de potasio y ácido sulfúrico 6N.

Por último valoramos con tiosulfato sódico hasta cambio de color, usando como indicador una solución de almidón. Para calcular la cantidad de glucosa correspondiente a cada muestra, usamos una tabla de equivalencia.

### **III.2.8.- REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO:**

La técnica NIRS se basa en la existencia de relaciones entre las características físicas, químicas y sensoriales de una muestra con la absorbancia a longitudes de onda específicas en la región del infrarrojo cercano (700-3000 nm). Los equipos NIRS, básicamente, presentan cinco componentes esenciales: fuente de energía radiante, dispositivo para la discriminación de las longitudes de onda, sistema de presentación de la muestra (molida, entera, líquida etc.), detector para convertir la energía radiante en señal eléctrica y un procesador

de la señal.

Para la discriminación de las longitudes de onda, se pueden utilizar filtros o monocromadores. Aunque en los inicios del desarrollo de la tecnología NIRS los equipos utilizados fueron los de filtros, desde 1978 en que se comercializó el primer monocromador, la expansión de estos últimos ha sido muy importante. Generalmente se usan de sílice para la región del visible (400 a 1100 nm) y de sulfuro de plomo para la región del infrarrojo (900 a 2600 nm). El equipo utilizado en nuestro trabajo NIRSystems 6500, cubre el rango completo sin cambio en los detectores (McClure y Hoy, 1990).

De una forma simplificada la técnica consiste, en la emisión de un haz de luz sobre la muestra, la cual en función de su composición o de la naturaleza de los enlaces presentes en sus moléculas, absorbe una cantidad determinada de energía.

En el campo de la espectroscopía NIRS, la energía de absorción (A) se puede expresar a partir de la reflectancia (R) y su ecuación sería:

$$A = \log_{10}(1/R)$$

Es precisamente la medida de  $\log_{10}(1/R)$  a

diferentes longitudes de onda lo que origina un patrón ondulante conocido como espectro. Las salidas espectrales pueden ser utilizadas tanto para análisis cualitativos (espectro "per se") como cuantitativo, siendo esta última la aplicación más extendida tras los primeros trabajos de aplicación en la determinación de humedad en grano (Norris, 1964).

Realizar una calibración NIRS consiste, en usar un conjunto de muestras para desarrollar una relación matemática entre espectros generados por el instrumento y valores químicos y/o biológicos obtenidos por un método de referencia de laboratorio (Windham et al, 1989). Se trata, en resumen, de una conversión de información de absorción NIRS en información química y/o biológica del método de referencia.

El proceso de la calibración se puede resumir en las siguientes etapas:

- 1.- Seleccionar un grupo de muestras para la calibración.
- 2.- Recogida de sus espectros.
- 3.- Análisis por el método de referencia.
- 4.- Obtener las ecuaciones de calibración usando distintos tratamientos matemáticos y elegir la mejor.
- 5.- Validación de la ecuación por un conjunto de muestras que no estén incluidas en el grupo de

calibración.

Morrey (1968) fue el primero que sugirió el tratamiento matemático de los valores de  $\log(1/R)$ , para la reducción de los solapes de bandas existentes a lo largo de la región NIR; desde entonces diferentes autores han utilizado distintos tratamientos matemáticos, siendo los más usuales, los denominados de "suavización" de  $\log(1/R)$ , primera y segunda derivada de  $\log(1/R)$  y el cociente de derivadas (Norris y Williams, 1984).

Debido a la gran cantidad de valores a manejar, se han desarrollado complejos métodos matemáticos, donde se reduce la información espectral a un pequeño número de variables, en ellos se maneja información sobre las longitudes de onda y valores de laboratorio, como es el caso del denominado Mínimo cuadrado parcial (PLS). El Mínimo cuadrado parcial modificado (MPLS) es una variante modificada del anterior, siendo este último el utilizado para obtener nuestras calibraciones. Finalmente se obtiene para el parámetro en estudio, una ecuación que explica su concentración en función de una serie de variables o términos, que a su vez son combinaciones de absorbancias a diferentes longitudes de onda.

Una vez obtenida la ecuación de calibración, el paso siguiente es evaluarla. Para determinar la capacidad de predicción de cada ecuación, se aplica dicha ecuación a un grupo

de muestras distinto del de calibración, del cual se conoce el valor del constituyente analizado en el laboratorio mediante métodos de referencia. Este proceso se conoce como validación de la ecuación.

Para evaluar la fiabilidad y exactitud de las ecuaciones de calibración se han empleado los siguientes parámetros estadísticos:

- 1)  $R^2$ : Coeficiente de determinación de la calibración. Es el cuadrado del coeficiente de correlación entre los valores de referencia y los valores estimados por NIRS, e indica la proporción de la varianza del componente, en el grupo de muestras de calibración, que es explicada con la ecuación de calibración.
- 2) SEC: Error estándar de la calibración. Es el error estándar de las diferencias entre los valores de referencia y los valores estimados por el NIRS en el grupo de calibración. Indica el error medio cometido en la estimación por NIRS de los valores del componente de la calidad en el grupo de muestras de calibración.
- 3) SECV: Error estándar en la validación cruzada. Es una estimación del error medio que se comete al estimar por el NIRS los valores del componente de la calidad en muestras no incluidas en el grupo de calibración.
- 4)  $r^2$ : Coeficiente de determinación en validación: Es el cuadrado

del coeficiente de correlación entre los valores de referencia y los valores estimados por el NIRS, e indica la proporción de la varianza del componente, en el grupo de muestras de validación, que es explicada con la ecuación de calibración.

5) SEP: Error estándar de la predicción. Indica el error medio cometido al estimar por NIRS los valores del componente de la calidad en muestras usadas en la validación externa.

En la Tabla 3 se detallan el número de muestras utilizadas en la calibración y la validación, su intervalo de variación y su media, así como el método aplicado en las calibraciones de los parámetros motivo de nuestro estudio.

Tabla 3. Datos de las muestras utilizadas para la calibración y validación de los distintos parámetros.

	Calibración <sup>a</sup>			Validación		
	N	Intervalo	Media	N	Intervalo	Media
Proteína <sup>b</sup>	40	21.28-27.34	23.93	19	22.16-25.79	23.71
Grasa <sup>b</sup>	39	2.61-5.86	4.21	13	3.18-5.77	4.25
ADF (Kabuli) <sup>b</sup>	43	3.52-6.49	4.63	14	3.54-5.99	4.53
ADF (Desi) <sup>b</sup>	49	9.96-16.28	12.99	18	10.55-15.11	12.89
NDF <sup>b</sup>	80	4.25-19.95	11.83	40	4.18-18.86	11.60
Azúcares <sup>b</sup>	75	1.22-5.15	2.85	33	1.28-4.50	2.77
Oleico <sup>c</sup>	85	18.81-43.96	27.26	40	19.56-39.81	26.72
Linoleico <sup>c</sup>	95	40.22-66.90	57.40	30	46.47-64.40	57.79

<sup>a</sup>En todas las calibraciones el método aplicado fue el MPLS.

<sup>b</sup>= Porcentaje sobre materia seca.

<sup>c</sup>= Porcentaje sobre aceite.

N= Número de muestras.

**III.3.- MÉTODOS NUMÉRICOS:**

**III.3.1.- DESCRIPTIVOS:**

Se han calculado la media, desviación típica de la media, coeficiente de variación y límites de variación para cada carácter estudiado.

**III.3.2.- ANÁLISIS DE LA VARIANZA:**

Considerando que la varianza total o fenotípica  $V_F$  es la suma de la varianza genotípica  $V_G$  y la varianza ambiental  $V_E$  la relación entre estos parámetros es:

$$V_F = V_G + V_E$$

Mediante el análisis de la varianza se puede contrastar si las diferencias o variación observadas para cada parámetro se deben solo al azar, a factores intrínsecos como el genotipo, a factores extrínsecos como el ambiente, o a la interacción de ambos. En nuestro caso al disponer de datos de los dos años, mediante el análisis de la varianza podemos conocer que parte de la variación descrita se debe al efecto año, al efecto genotípico o línea y a la interacción entre ambos, además de poder saber si las diferencias encontradas son significativas o no.

No obstante, la correcta aplicación de la distribución F en la contrastación de las hipótesis establecidas en este tipo de análisis requiere que la variable aleatoria observada cumpla una serie de condiciones, denominadas "condiciones paramétricas". Estas condiciones son (Little y Hills, 1976):

a) Los errores deben estar normalmente distribuidos. De no estarlo, se debe realizar una transformación que produzca errores que se distribuyan de manera más cercana a la normal. En nuestro caso al tratarse de datos en tanto por ciento se ha realizado la transformación  $\sqrt{x}$ .

b) Las varianzas de los errores deben ser homogéneas: El test clásico para contrastar la hipótesis de igualdad de varianzas, es el de Bartlett, el cual es también muy sensible a la no-normalidad.

c) Independencia de medias y varianzas: En el caso de que no se cumpla esta condición, podemos transformar los datos (por ejemplo sometiéndolos a la transformación raíz cuadrada) de forma que el supuesto de independencia entre varianzas y medias sea válido.

d) Los efectos principales deben ser aditivos: De no cumplirse la aditividad, podemos aplicar a los datos una

transformación logarítmica la cual corregirá la falta de aditividad.

El modelo aplicado en nuestro caso ha sido:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{k(i)} + (\alpha * \beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Siendo:

$Y_{ijk}$  = El valor fenotípico del genotipo j-ésimo en la k-ésima repetición del i-ésimo ambiente.

$\mu$  = Media total de todas las observaciones, genotipos y ambientes.

$\alpha_i$  = Efecto aditivo del año i-ésimo.

$\beta_j$  = Efecto aditivo del genotipo j-ésimo.

$\gamma_{k(i)}$  = Efecto aditivo de la k-ésima repetición, con repetición dentro de año.

$(\alpha * \beta)_{ij}$  = Interacción del genotipo j-ésimo y del año i-ésimo.

$\epsilon_{ijk}$  = Variación residual del año i-ésimo del genotipo j-ésimo y de la repetición k-ésima.

Para el contraste de los cuadrados medios se han considerado todos los efectos aleatorizados. En la Tabla 4 se puede ver la esperanza de cuadrados medios en nuestro caso, así como el contraste para la prueba F.

Tabla 4. Contraste de cuadrados medios.

Fuentes de variación	Cuadrados medios	Esperanzas de cuadrados medios <sup>a</sup>	F
Año	M <sub>1</sub>	$\sigma_e^2 + r\sigma_{AG}^2 + t\sigma_{B(A)}^2 + rt\sigma_A^2$	$(M_1+M_5)/(M_2+M_4)$
Bloques/Año	M <sub>2</sub>	$\sigma_e^2 + t\sigma_{B(A)}^2$	
Genotipo	M <sub>3</sub>	$\sigma_e^2 + r\sigma_{AG}^2 + rl\sigma_G^2$	M <sub>3</sub> /M <sub>4</sub>
Año*Genotipo	M <sub>4</sub>	$\sigma_e^2 + r\sigma_{AG}^2$	M <sub>4</sub> /M <sub>5</sub>
Error	M <sub>5</sub>	$\sigma_e^2$	

<sup>a</sup> r, l y t son número de repeticiones, años y genotipos respectivamente.

Se ha realizado la descomposición ortogonal del efecto genotipo, en efectos debidos al grupo desi, al grupo kabuli y efectos debidos a diferencias entre ambos grupos. Mediante este procedimiento los grados de libertad y suma de cuadrados del efecto genotipo serían igual a la suma de grados de libertad y suma de cuadrados de los tres efectos en que se ha descompuesto:

$$gl_G = gl_{Desi} + gl_{Kabuli} + gl_{Dvsk}$$

$$SS_G = SS_{Desi} + SS_{Kabuli} + SS_{Dvsk}$$

Como la suma de cuadrados es una medida de la variación, por este procedimiento podemos conocer si la variación genotípica total se debe principalmente a alguno de los tres factores ( $SS_{Desi}/SS_G$ ,  $SS_{Kabuli}/SS_G$ , y  $SS_{Dvsk}/SS_G$ ). Igualmente se ha procedido cuando la interacción genotipo-ambiente ha sido significativa.

### **III.3.3.- HEREDABILIDAD Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN**

#### **GENETICO:**

La heredabilidad es la proporción de variabilidad que es debida a la herencia genética, siendo el resto debido al medio ambiente. Más estrictamente, la heredabilidad es la proporción de la variabilidad debida a los efectos aditivos de los genes (Allard, 1960).

La heredabilidad en sentido amplio (H), se calculó a partir de los resultados del análisis de la varianza combinado de los dos años. Para ello a partir de las esperanzas de cuadrados medios se puede estimar la varianza genotípica ( $\sigma_e^2$ ) y la varianza fenotípica ( $\sigma_F^2 = \sigma_G^2 + \sigma_{GA}^2 + \sigma_e^2$ ) (Tabla 4).

Siendo su formula:

$$H = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_{G \times A}^2 + \sigma_E^2} = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_F^2}$$

El coeficiente de variación genético (CVG) fue estimado de la siguiente forma:

$$CVG = \frac{\sigma_G}{\bar{X}} * 100$$

#### **III.3.4.- CORRELACIONES:**

Para estudiar las relaciones existentes entre los distintos parámetros evaluados se han estimado los coeficientes de correlación simple entre ellos. La correlación, como la covarianza, es una medida del grado en que dos variables varían conjuntamente o una medida de la intensidad de asociación (Steel y Torrie, 1985).

#### **III.3.5.- PROCEDIMIENTOS DE CALCULO:**

Todos los cálculos contenidos en este trabajo se han realizado con los programas estadísticos SX (Statistix, versión 4.1 Analytical Software, 1994), SAS (Statistical

Analytical System, 1991). Para el análisis de la varianza se ha utilizado el procedimiento GLM (Modelo General Linear) que es válido para diseños desequilibrados (Steel y Torrie, 1985). También se han aplicado programas en Basic específicamente desarrollados para este trabajo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

Al no haberse podido obtener semillas de varias líneas pertenecientes a la primera repetición del primer año, se eliminó esta repetición y para tener un modelo equilibrado se suprimió al azar en el segundo año otra repetición, quedándonos al final con dos repeticiones para cada año en el análisis de la varianza para todos los parámetros evaluados.

**IV.1.- PROTEÍNA:**

Para la determinación del contenido de proteína de las muestras motivo de nuestro estudio se ha utilizado el método Kjeldahl y los datos obtenidos nos han servido para realizar la ecuación de calibración y su posterior validación.

**• Ecuación de calibración:**

En la Figura 7 se representa la evolución del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en la calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para proteína en función del número de términos o variables obtenidos mediante MPLS para la calibración de este parámetro. Se ha escogido la ecuación de calibración con siete terminos porque es la que alcanza el SECV más bajo, aunque siga aumentando  $R^2$  ligeramente.

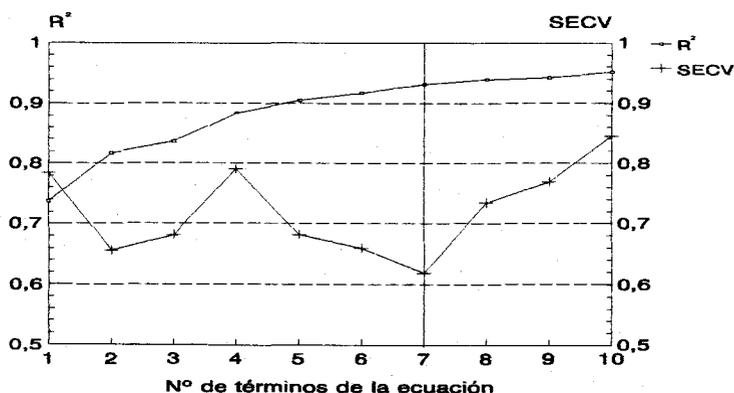


Fig. 7. Representación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para proteína.

Shmuetz (1983) realizó la estimación del contenido en proteína en Vicia faba y en Pisum sativum obteniendo para ambas un coeficiente de determinación de 0.98. Resultados similares ( $R^2=0.98$ ) se han alcanzado al evaluar el contenido en proteína en Lupinus albus por Velasco et al (1992). Kharrat (1988) en Cicer arietinum obtuvo un coeficiente de determinación de 0.81. Nuestro coeficiente de determinación ( $R^2=0.93$ ) es similar a los citados por los autores anteriores y las diferencias pueden ser debidas tanto al uso de diferentes materiales o especies como a diferencias en el método de referencia y del equipo utilizado. De todas formas en este estudio se ha obtenido una calibración de bastante fiabilidad para la estimación del contenido en proteína en semillas de garbanzo. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo pueden resumirse en la tabla siguiente:

Tabla 5. Resultados de la calibración y validación para proteína.

**CALIBRACIÓN**

---

Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.93
Error estándar en calibración (SEC)(%)	0.35
Error estándar en validación cruzada (SECV)(%)	0.61

---

**VALIDACIÓN**

---

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.81
Error estándar en la estimación (SEP)(%)	0.46

---

Entre las longitudes de onda más significativas obtenidas en nuestra ecuación de calibración de proteína destacan las de 2188 y 2300 nm correspondientes al primer sobretono de absorción del grupo amídico ( $RNH_2$ ) y a la combinación de grupos CH respectivamente, presentes en la estructura de las proteínas y coincidiendo con las longitudes de onda asignadas a estos grupos por Shenk et al (1992), Osborne et al (1993) y Murray (1993).

**• Análisis de la variación en la colección:**

De la observación de los resultados obtenidos para proteína en los dos años, se puede decir que no existen diferencias entre los valores medios de los grupos kabuli y desi (Tabla 6). Estos resultados en general, son similares a los obtenidos por otros autores (Jambunathan y Singh, 1980; De Haro y Moreno, 1992; Kharrat et al, 1990; Singh et al, 1991). Con

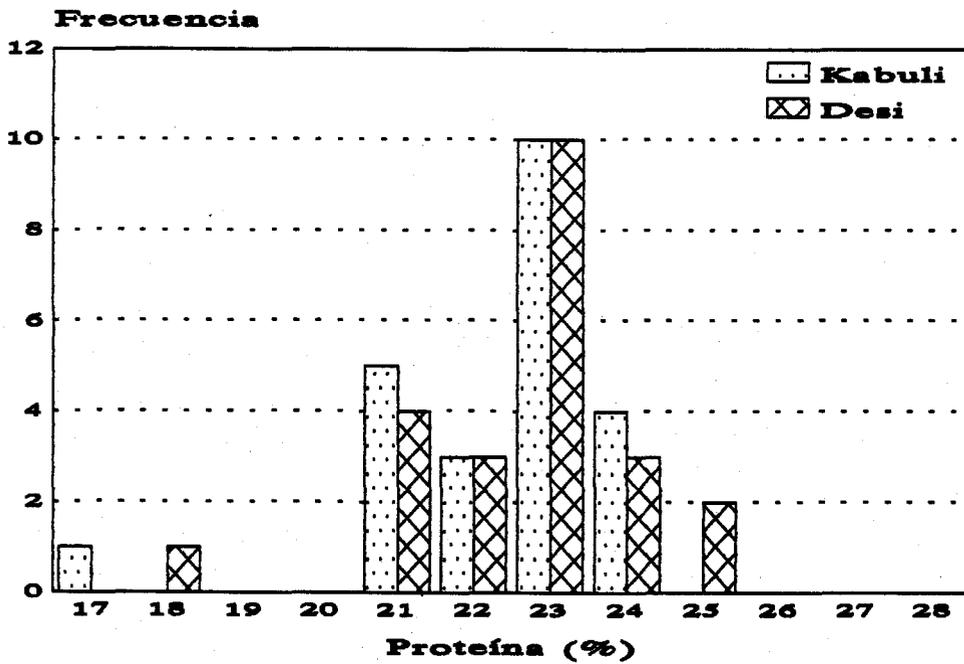
respecto a los coeficientes de variación no se observan grandes diferencias entre grupos ni entre años. En los límites de variación para este parámetro, la variación existente en ambos grupos, kabuli y desi, se solapan casi al completo (Fig.8).

Se puede ver que en nuestro material existe un alto grado de variación para proteína con valores que van desde un 17.5% a un 25.3% en el primer año y de 21.1% a 27.2% en el segundo (Tabla 6).

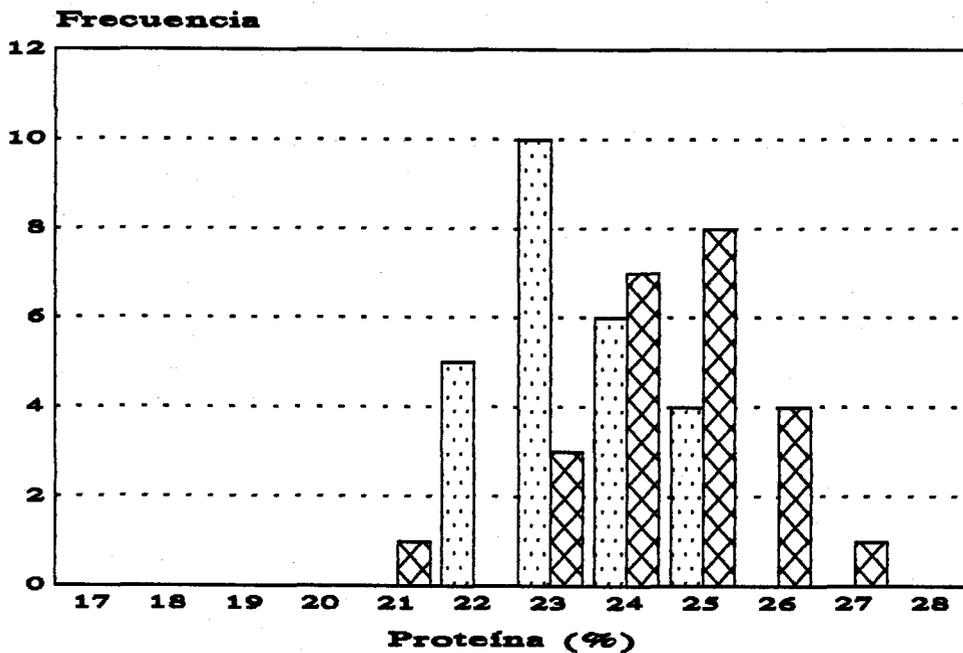
Tabla 6. Valores medios ( $\bar{X} \pm SD$ ), coeficientes de variación y límites de variación para el contenido de proteína (% sobre materia seca) en una colección de líneas de garbanzos (26 kabuli + 24 desi) durante dos años.

Año*		$\bar{X} \pm SD$	CV(%)	Límites de variación	
				Mínimo	Máximo
1	T	22.8±0.23	6.8	17.5	25.3
	K	22.7±0.33	6.9	17.5	24.8
	D	22.9±0.32	6.6	18.4	25.3
2	T	24.3±0.17	4.9	21.1	27.2
	K	23.8±0.18	3.7	22.3	25.3
	D	24.8±0.26	5.1	21.1	27.2

\* La primera fila (T) corresponde al total de las líneas evaluadas, la segunda fila (K) al grupo de líneas Kabuli y la tercera (D) al grupo de líneas Desi.



a



b

Fig. 8. Distribución para el contenido de Proteína (% sobre materia seca) en garbanzos Kabuli y Desi para el año I (a) y II (b).

Esta variabilidad en el contenido de proteína coincide con los resultados obtenidos por Jambunathan y Singh (1980) con intervalo de 17.7 a 25.9%, De Haro y Moreno (1992) obtuvieron un rango de 15.5 a 28.2%, Kharrat et al (1990) para kabuli muestra un intervalo de 20.6 a 27.3% y para desi de 19.9 a 26.8%, Singh et al (1991) dan un valor medio para kabuli de 20.4%, siendo para desi de 20.2%.

Según nuestros resultados, parte de esta variación es debida al efecto del ambiente sobre los distintos genotipos como se puede ver la tabla del del ANOVA (Tabla 7). Podemos ver como el factor línea o genotipo no fue significativo pese a suponer el 44.8% de la suma de cuadrados total. Esto es debido a que el cuadrado medio para contrastar el efecto línea es el de la interacción línea\*año, que en este caso fue bastante importante. La interacción entre ambos factores representó el 25.7% de la suma de cuadrados total y fue altamente significativa ( $P < 0.001$ ) lo que indica la existencia de dependencia de un factor respecto al otro, mientras que el factor año si fue significativo al 1% ( $P < 0.01$ ). Shandu et al (1974) obtuvieron también interacción genotipo x año significativa para este parámetro, mientras que Singh et al (1983) no encontraron interacción significativa. En trabajos posteriores Singh et al (1990) encontraron interacción genotipo x localidad significativa. En esta misma línea, Singh et al (1983) y Krober (1970), encontraron una influencia significativa del factor

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

localidad, si bien este último también encuentra diferencias significativas debidas al efecto línea. El que en algunos casos no se haya detectado interacción genotipo-ambiente puede ser debido a los distintos materiales empleados y a las condiciones ambientales en que se realiza el estudio.

Pese a esta interacción, en nuestro material existen algunas líneas estables (CA1473, CA1596, CA2219, CA1449 y CA2047) que han tenido altos valores de proteína en ambos años (Tabla 8).

Tabla 7. Análisis de la varianza para el contenido de proteína en una colección de 50 poblaciones de garbanzos sembradas durante dos años.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	R <sup>2</sup> *
<b>Año</b>	<b>1</b>	<b>0.01365</b>	<b>0.01365 **</b>	<b>18.3</b>
<b>Rep(Año)</b>	<b>2</b>	<b>0.00013</b>	<b>0.00006</b>	
<b>Línea</b>	<b>49</b>	<b>0.03345</b>	<b>0.00068</b>	<b>44.8</b>
Desi	23	0.01702	0.00074	(50.8)
Kabuli	25	0.01340	0.00053	(40.0)
D vs K	1	0.00303	0.00303	(9.0)
<b>Línea*Año</b>	<b>44</b>	<b>0.01918</b>	<b>0.00043 ***</b>	<b>25.7</b>
D*A	22	0.00825	0.00037 ***	(43.0)
K*A	21	0.00925	0.00044 ***	(48.2)
T*A	1	0.00168	0.00168 ***	(8.7)
<b>Error</b>	<b>82</b>	<b>0.01043</b>	<b>0.00012</b>	<b>13.9</b>
<b>Total</b>	<b>178</b>	<b>0.07454</b>		

\* Entre paréntesis porcentaje de variación explicada por cada uno de los componentes del Genotipo o línea y de la interacción.  
 \*, \*\*, \*\*\*: Nivel de significación para una probabilidad menor de 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

Tabla 8. Líneas de garbanzo seleccionadas por su alto y estable contenido proteico en dos años.

NºREGISTRO	TIPO	ORIGEN	PROTEINA (%)	
			1ºaño	2ºaño
CA1473	DESI	India	24.78	25.92
CA1596	DESI	Hungría	24.21	25.02
CA2219	KABULI	Afganistán	24.24	25.28
CA1449	DESI	India	24.95	26.94
CA2047	DESI	Cádiz	25.27	25.70
Valor medio de la colección			22.82	24.31

**IV.2.- NITRÓGENO NO PROTEICO (NNP):**

Como se ha expuesto en la introducción, cuando se determina el contenido en proteína en una muestra, lo que se mide es el contenido de nitrógeno total, no teniendo en cuenta que una parte de ese nitrógeno no es proteico (De Haro, 1984), de ahí el interés de determinar su concentración en nuestra colección para saber en que rango se encuentra el NNP. Para este parámetro no se ha obtenido una ecuación de calibración debido a que en el término nitrógeno no proteico, se incluyen compuestos muy distintos como: Bases púricas y pirimidínicas, aminoácidos libres, ácidos nucleicos, complejos lipídicos, alcaloides, etc. y como consecuencia cada valor cuantitativo es consecuencia de una absorción espectral que incluye componentes muy diferentes y heterogéneos, que dificultan el obtener la calibración. Se necesitarán estudios posteriores para determinar en que concentración se encuentran cada uno de los componentes que forman parte del denominado nitrógeno no proteico del garbanzo. Además el intervalo de concentración del NNP es muy bajo y obtaculiza de forma importante la calibración de 0.22 a 0.38%, Tabla 9. Existen pocos estudios sobre el contenido de nitrógeno no proteico en garbanzo, Williams y Singh (1987) citando los trabajos de Khanvilkar y Desai (1981) y Singh y Jambunathan (1981), dan unos límites de variación de 0.16 a 0.91% en garbanzo, con un total de muestras de 110, pudiendo justificar este hecho que su intervalo sea algo más amplio. Tampoco hay que

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

olvidar la importancia del método empleado en los resultados obtenidos por diferentes autores como ya puso de manifiesto Bhatti et al (1973) utilizando distintos métodos de extracción (NaOH, ácido tricloroacético, etanol, etc).

Tabla 9. Valores medios ( $\bar{X} \pm SD$ ), coeficientes de variación y límites de variación para el contenido de nitrógeno no proteico (% sobre materia seca), en un total de 33 muestras correspondientes a dos repeticiones.

Carácter *	N	$\bar{X} \pm SD$	CV(%)	Límites de variación	
				Mínimo	Máximo
NNP	33 T	0.28 $\pm$ 0.0049	13.86	0.22	0.38
	11 K	0.27 $\pm$ 0.0065	11.26	0.22	0.34
	22 D	0.29 $\pm$ 0.0063	14.25	0.23	0.38

\* La primera fila (T) corresponde al total de las líneas evaluadas, la segunda fila (K) al grupo de líneas Kabuli y la tercera (D) al grupo de líneas Desi.

Los límites de variación alcanzados en nuestro estudio para este parámetro en ambos grupos, kabuli y desi, se solapan casi al completo (Tabla 9 y Fig. 10). En este caso solo se han analizado 33 poblaciones o líneas (22 desi y 11 kabuli) pertenecientes a dos repeticiones del segundo año. El intervalo de concentración del NNP en el total de la colección esta comprendido entre 0.22% y 0.38%. Si se multiplican estos valores por el factor 6.25 para poder comparar con el total de proteína bruta obtendríamos un intervalo de 1.4 y 2.4 de "equivalente en no proteína" que habría que restar a la concentración de proteína

obtenida por el método Kjeldahl para obtener el contenido en "proteína verdadera" de cada muestra.

Como se puede observar en la Fig. 9 parece que existe una cierta relación significativa entre el contenido en proteína y NNP alcanzando un coeficiente de correlación entre ambos de 0.65, por tanto a la hora de seleccionar líneas con alto contenido proteico habría que tener en cuenta que también fueran con bajo contenido en NNP como es el caso de las seleccionadas en la Fig. 9, las cuales poseen un valor de proteína aceptable y baja concentración en NNP. Entre estas líneas se encuentra la CA1596 que anteriormente se había citado en el apartado de proteína por poseer un alto valor proteico en los dos años.

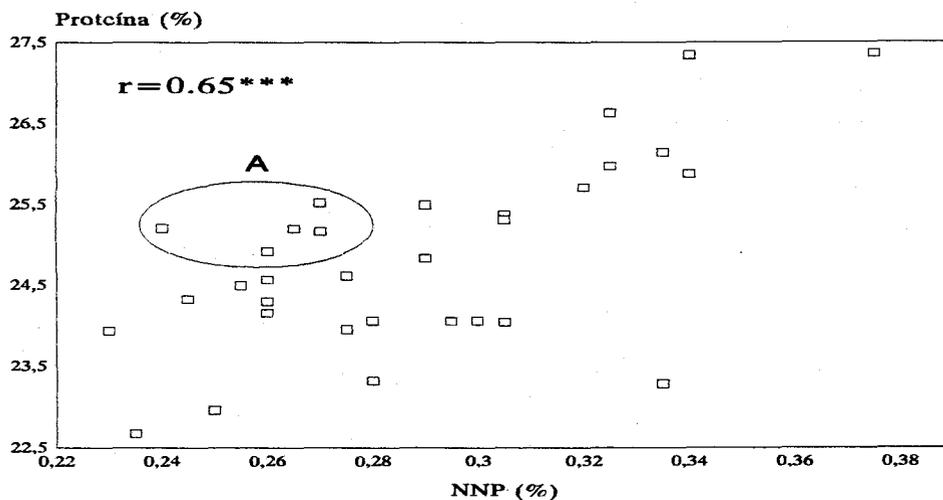


Fig. 9. Representación del contenido en Proteína frente al de NNP en 33 poblaciones de garbanzos. Dentro de A se encuentran las muestras seleccionadas por alto contenido en proteína y bajo de nitrógeno no proteico.

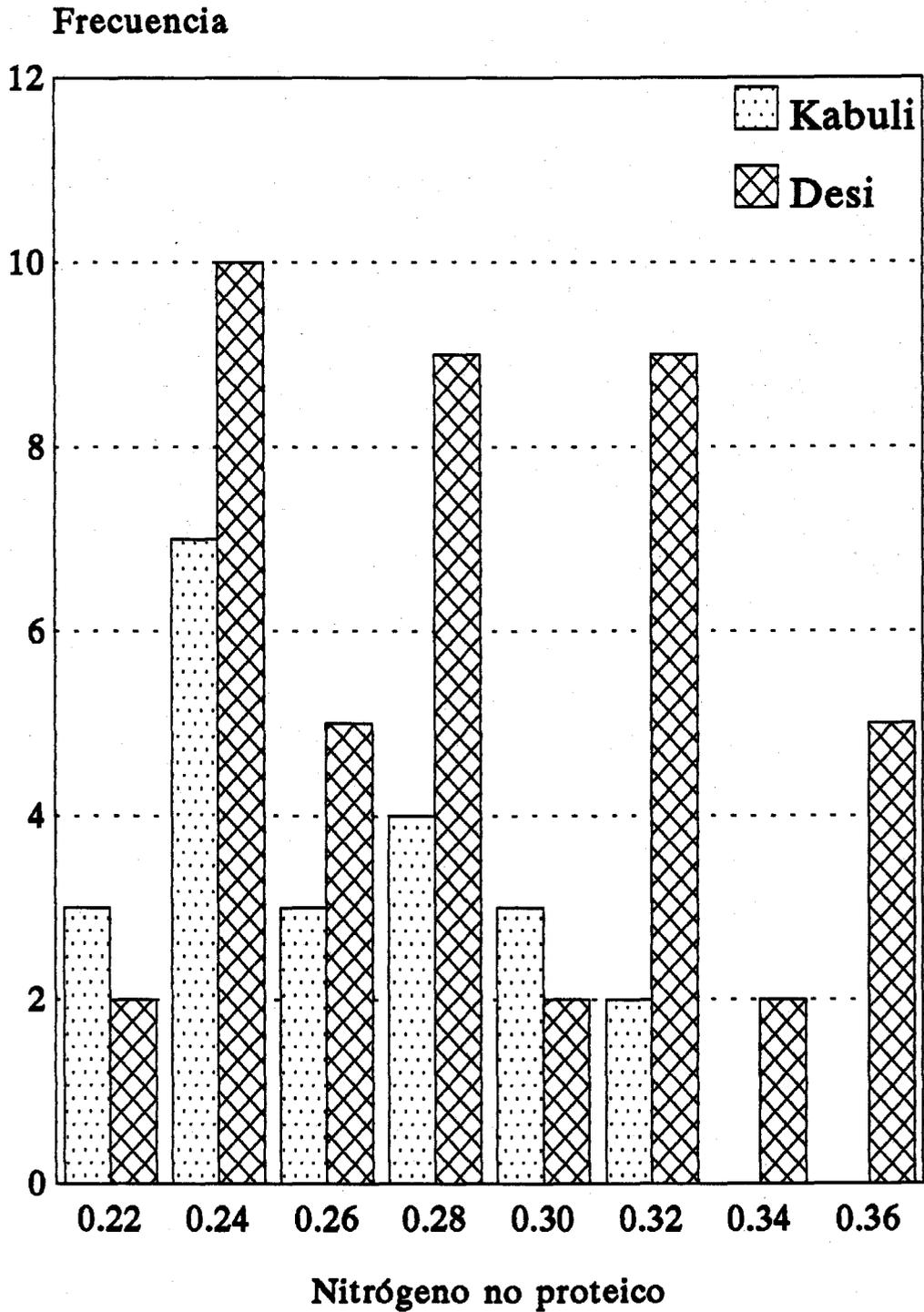


Fig. 10. Distribución del contenido de Nitrógeno no Proteico (% sobre materia seca) en garbanzos Kabuli y Desi.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados indican que a pesar de la correlación significativa encontrada existe aún suficiente variación en cuanto al contenido proteico real.

A la vista del análisis de la varianza que se expone en la Tabla 10, podemos observar que el factor línea fue altamente significativo explicando un 79.1% de la variación total, en este caso no es la diferencia entre grupos la fuente fundamental de la variación mostrada por el factor línea, sino las diferencias dentro de cada grupo, principalmente dentro de desi. Estos resultados indican que la variación detectada no es puramente ambiental sino debidas principalmente a diferencias genotípicas.

Tabla 10. Análisis de la varianza para el contenido de Nitrógeno no Proteico (NNP).

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>
Línea	32	6.972E-4	2.179E-5 ***	79.1
Desi	21	4.793E-4	2.282E-5 ***	(68.7)
Kabuli	10	1.545E-4	1.545E-5 *	(22.2)
D vs K	1	3.34E-5	6.34E-5 **	(9.1)
Error	33	1.839E-4	5.57E-6	20.9
Total	65	8.811E-4		

<sup>a</sup> Entre paréntesis porcentaje de variación explicada por cada uno de los componentes.

\*,\*\*,\*\*\*: Nivel de significación para una probabilidad menor de 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

IV.3.- GRASA:

Para la determinación de grasa se ha utilizado como método de referencia el método Soxhlet. Una vez obtenidos los datos en el laboratorio se ha realizado la ecuación de calibración la cual posteriormente se ha validado.

• Ecuación de calibración:

En la gráfica siguiente se puede ver la evolución de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) en la calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para grasa. En este caso se ha escogido la ecuación con dos términos porque es con la que se obtiene un valor de SECV más bajo y un aceptable valor de  $R^2$  (0.89).

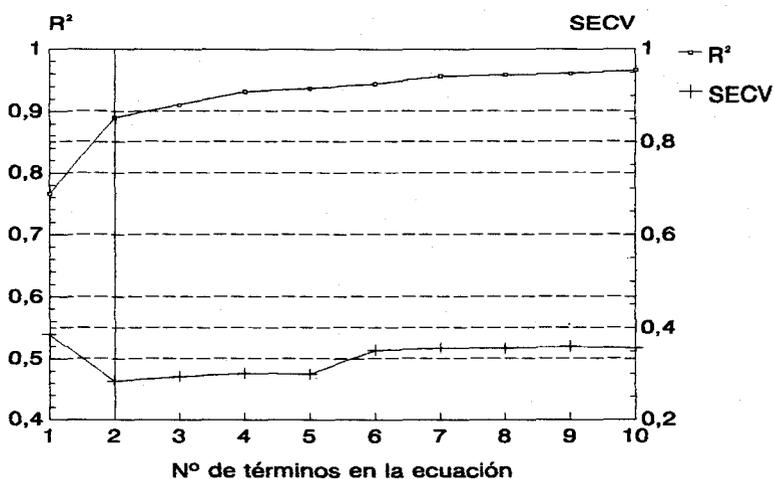


Fig. 11. Representación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para grasa.

Velasco et al (1992) obtuvo para el contenido de grasa en altramuz un coeficiente de determinación de 0.94 en su ecuación de calibración. También podemos destacar los coeficientes obtenidos en colza (entre 0.90 y 0.94) por Tkachuk (1981), Koester y Paul (1989) y Velasco (1996). Las diferencias entre nuestros resultados y los de otros autores pueden ser debidas a que las especies utilizadas por estos autores tienen una mayor variabilidad para contenido en grasa, lo que facilita la calibración de la misma. En nuestro caso se hubiera podido mejorar el coeficiente de determinación pero ello implicaría un mayor valor del error estándar de la validación cruzada. Los resultados de la ecuación de calibración y validación en nuestras muestras de garbanzo se exponen en la tabla siguiente:

Tabla 11. Resultados de la calibración y validación para grasa.

**CALIBRACIÓN**

---

Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.89
Error estándar en calibración (SEC)(%)	0.25
Error estándar en validación cruzada (SECV)(%)	0.28

---

**VALIDACIÓN**

---

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.84
Error estándar en la estimación (SEP)(%)	0.33

---

Las principales bandas de absorción encontradas en nuestra calibración de grasa son debidas al tercer sobretono de grupos  $CH_2$  a 928 nm, segundo sobretono de grupos  $CH_2$  a 1276

nm, primer sobretono de grupos CH<sub>2</sub> a 1724 nm y a la combinación de bandas estrechas de grupos CH<sub>2</sub> a 2324 nm, pertenecientes a las cadenas de ácidos grasos presentes en la grasa (Shenk et al, 1992; Osborne et al, 1993 y Murray, 1993).

• **Análisis de la variación en la colección:**

Al observar los resultados en los dos años, se puede ver que los valores medios de grasa para el grupo kabuli son mayores que los del grupo desi (Tabla 12).

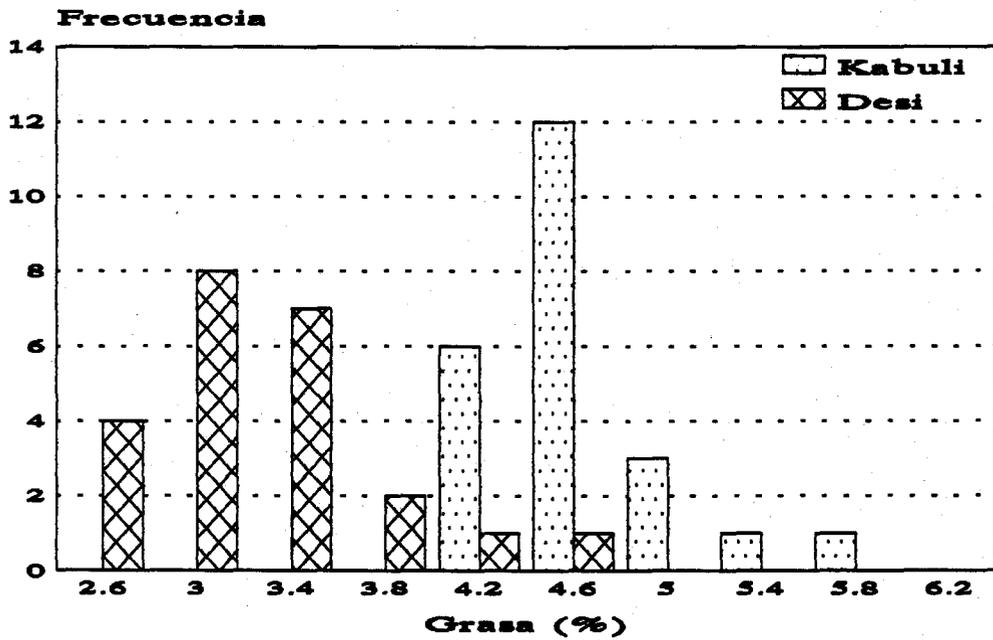
Tabla 12. Valores medios ( $\bar{X} \pm SD$ ), límites de variación y coeficiente de variación para el contenido de grasa (% sobre materia seca) en una colección de líneas de garbanzos (26 kabuli + 24 desi) durante dos años.

Año*		$\bar{X} \pm SD$	CV(%)	Límites de variación	
				Mínimo	Máximo
1	T	4.2±0.11	18.4	2.8	5.9
	K	4.9±0.08	7.9	4.4	5.9
	D	3.6±0.09	13.2	2.8	4.8
2	T	4.3±0.10	16.5	3.0	5.7
	K	4.8±0.06	6.7	4.3	5.7
	D	3.7±0.09	12.6	3.0	4.7

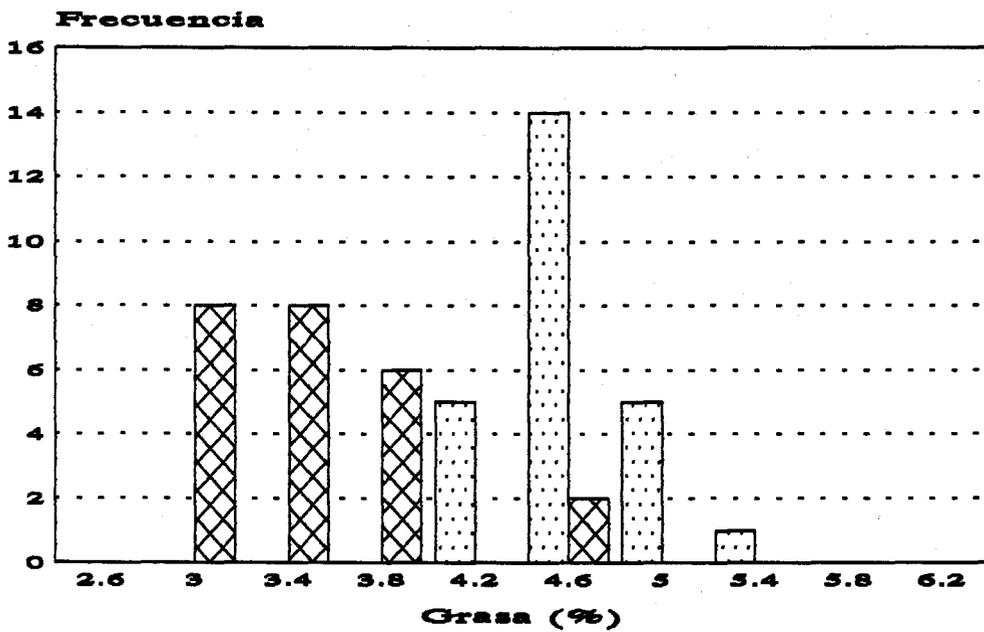
\* La primera fila (T) corresponde al total de las líneas evaluadas, la segunda fila (K) al grupo de líneas Kabuli y la tercera (D) al grupo de líneas Desi.

Los límites de variación encontrados en el total de nuestra colección (2.8% y 5.9%) en general están de acuerdo con los obtenidos por Jambunathan y Singh (1980), Singh et al (1991), De Haro y Moreno (1992) para grasa en garbanzo. Sin embargo Jambunathan y Singh (1980) y Singh et al (1991) no encontraron diferencias entre los dos grupos debido posiblemente al bajo número de líneas empleadas (15 y 10 respectivamente). No obstante sus valores medios totales son similares a los obtenidos en nuestro estudio. Según nuestros resultados los coeficientes de variación son menores para kabuli tanto en el primer año como en el segundo y entre los límites de variación de ambos grupos se aprecia un cierto grado de solapamiento (Fig. 12).

La variación encontrada para este carácter entre nuestras líneas resultó altamente significativa, lo que indica que hay variación genotípica, siendo prácticamente inexistente la influencia del factor año sobre la variación total del contenido en grasa (Tabla 13). La interacción entre genotipo y año fue también significativa, aunque solo representa un 5.3% de la variación, lo que indica que a pesar de su significación no es tampoco una fuente de variación muy importante y que en general las líneas de alto o bajo contenido en grasa serán las mismas en ambos años. Estos resultados apuntan a que cualquier variedad de garbanzo en el mercado podría ser caracterizada por su contenido en grasa en la semilla sin peligro a que



a



b

Fig. 12. Distribución para el contenido de Grasa (% sobre materia seca) en garbanzos Kabuli y Desi para el año I (a) y II (b).

existan grandes oscilaciones de un año a otro lo que es muy importante desde el punto de vista comercial y de la industria.

En la descomposición ortogonal efectuada para el factor línea (Tabla 13), en desi, kabuli y desi vs kabuli, en los tres casos se detecta significación pero son las diferencias entre grupos las que explican un mayor tanto por ciento de la variación existente entre líneas (71.6%), indicando que estos dos grupos, desi y kabuli, poseen distintos fondos genéticos para este carácter. Así mismo el grupo kabuli explica menos variación (8.4%) que el grupo desi (19.9%). Estos resultados confirman los observados anteriormente respecto a sus medias y coeficientes de variación fenotípica (Tabla 12).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 13. Análisis de la varianza para el porcentaje de grasa en una colección de 50 poblaciones de garbanzos sembradas durante dos años.

F. de V	G.L.	S.C.	C.M.	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>
<b>Año</b>	<b>1</b>	<b>0.00003</b>	<b>0.00003</b>	<b>0.04</b>
<b>Rep(Año)</b>	<b>2</b>	<b>0.00007</b>	<b>0.00003</b>	
<b>Línea</b>	<b>49</b>	<b>0.05854</b>	<b>0.00119***</b>	<b>90.1</b>
Desi	23	0.01167	0.00050***	(19.9)
Kabuli	25	0.00492	0.00019 **	(8.4)
D vs K	1	0.04195	0.04195***	(71.6)
<b>Línea*Año</b>	<b>44</b>	<b>0.00345</b>	<b>0.00007***</b>	<b>5.3</b>
D*A	22	0.00258	0.00011***	(74.7)
K*A	21	0.00085	0.00004	(24.6)
T*A	1	0.00002	0.00002	(0.5)
<b>Error</b>	<b>82</b>	<b>0.00258</b>	<b>0.00003</b>	<b>3.9</b>
<b>Total</b>	<b>178</b>	<b>0.06494</b>		

<sup>a</sup> Entre paréntesis porcentaje de variación explicada por cada uno de los componentes de Genotipo y de la interacción.

\*,\*\*,\*\*\*: Nivel de significación para una probabilidad menor de 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

**IV.4.- ÁCIDOS GRASOS:**

Para determinar su concentración en las muestras motivo de nuestro estudio se ha utilizado como técnica de referencia la cromatografía de gases. Como se puede ver en la Tabla 14 los ácidos grasos insaturados representan más del 80% del total de la grasa del garbanzo, siendo oleico y linoleico los más importantes. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Ghirardi et al, 1974; Sosulski y Gadan, 1988; De Haro y Moreno, 1992). Debido a que estos dos ácidos grasos fueron los más importantes de la grasa del garbanzo, es por lo que solo ellos fueron usados para llevar a cabo una calibración NIR y estudiar la influencia del efecto año, genotipo y su interacción sobre la variación total de estos dos parámetros de la calidad de la grasa.

• **Ecuación de calibración (ácidos grasos oleico y linoleico):**

La evolución del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en la calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para los ácidos oleico y linoleico se representa en las Figs. 13 y 14. En ambos casos se ha escogido la ecuación con diez términos alcanzando el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) un valor de 0.94 y 0.92 para los ácidos oleico y linoleico respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Composición de las semillas de garbanzo en ácidos grasos obtenidas en una colección de 48 líneas de garbanzos (24 desi + 24 kabuli).

ACIDOS GRASOS	TIPO <sup>a</sup>	X <sup>b</sup> ±SD	Límites de variación	
			MÍNIMO	MÁXIMO
PALMÍTICO C16:0	T	9.5±0.09	8.0	11.0
	K	9.3±0.12	8.4	10.8
	D	9.8±0.13	8.0	11.0
ESTEARICO C18:0	T	1.3±0.08	0.8	3.3
	K	1.4±0.11	1.0	3.3
	D	1.2±0.11	0.8	2.9
OLEICO C18:1	T	27.9±0.76	19.6	42.9
	K	31.2±0.84	24.7	42.9
	D	24.5±0.85	19.6	38.4
LINOLEICO C18:2	T	56.7±0.72	42.1	64.7
	K	53.6±0.80	42.1	60.1
	D	60.0±0.76	47.0	64.7
LINOLENICO C18:3	T	2.9±0.07	1.2	3.8
	K	2.8±0.11	1.2	3.8
	D	3.1±0.09	2.1	3.7
OTROS	T	1.6±0.04	1.1	2.4
	K	1.7±0.05	1.4	2.4
	D	1.4±0.04	1.1	1.9

<sup>a</sup> T= Total, K= Kabuli, D= Desi.

<sup>b</sup> = % sobre contenido en grasa.

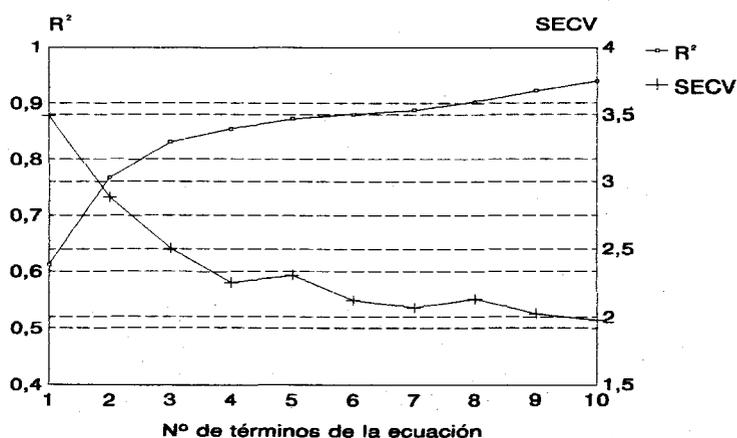


Fig. 13. Representación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para el ácido oleico.

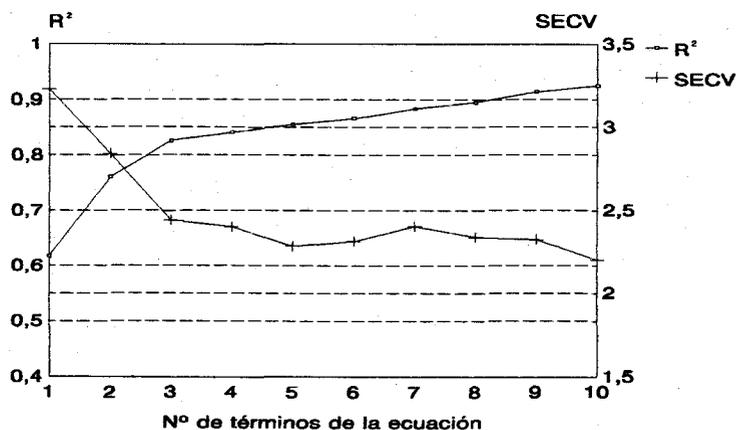


Fig. 14. Representación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para el ácido linoleico.

Velasco (1996) en mostaza etíope (*Brassica carinata* Braun) obtuvo un coeficiente de determinación en la calibración ( $R^2$ ) de 0.90 para ácido oleico y 0.96 para el ácido linoleico. Con nuestras muestras hemos alcanzado un coeficiente de determinación en la calibración ( $R^2$ ) de 0.94 para el ácido oleico y 0.92 para el ácido linoleico. Siguiendo al mismo autor vemos que cita un coeficiente de determinación en la validación  $r^2$  para oleico de 0.75 y 0.90 para linoleico; en nuestro trabajo

para ácido oleico hemos tenido un  $r^2$  de 0.88, siendo para el ácido linoleico de 0.91 (Tabla 15). Estos resultados demuestran la capacidad de la técnica NIRS para el análisis de estos ácidos grasos en la harina del garbanzo, siendo la primera vez que, tanto a nivel nacional como internacional se consiguen estos resultados.

Tabla 15. Resultados de la calibración y validación para los ácidos oleico y linoleico.

---

**CALIBRACIÓN DE ACIDO OLEICO**

---

Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.94
Error estándar de calibración (SEC)(%)	1.29
Error estándar en validación cruzada (SEC)(%)	1.97

---

**VALIDACIÓN DE ACIDO OLEICO**

---

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.88
Error estándar en la estimación (SEP)(%)	1.63

---

---

**CALIBRACIÓN DE ACIDO LINOLEICO**

---

Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.92
Error estándar en calibración (SEC)(%)	1.36
Error estándar en validación cruzada (SECV)(%)	2.02

---

**VALIDACIÓN DE ACIDO LINOLEICO**

---

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.91
Error estándar en la estimación (SEP)(%)	1.40

---

Las longitudes de onda 2108, 2188 nm encontradas en nuestra calibración indican la presencia de dobles enlaces. De acuerdo con Williams y Norris (1987) estas longitudes de onda están relacionadas con la presencia de dobles enlaces en los ácidos grasos. También destacan las de 1252, 1276, 1444, 1716, 1740, 2324, 2348 nm correspondientes al primer y segundo sobretono de grupos CH, y a la absorbancia de la combinación de grupos CH, presentes en los ácidos grasos (Williams y Norris, 1987; Shenk et al, 1992; Osborne et al, 1993 y Murray, 1993).

### • **Análisis de la variación en la colección:**

De la observación de la Tabla 16, donde se recogen los resultados de aplicar la calibración NIR al total de la colección en los dos años, podemos decir que el grupo kabuli se caracteriza por poseer valores medios mayores para oleico que el grupo desi en ambos años, siendo para ácido linoleico más altos en desi que en kabuli. Nuestros resultados en general coinciden con los encontrados por De Haro y Moreno (1992). Sosulski y Gadan (1988) en 26 entradas o poblaciones procedentes de la India encontraron también diferencias entre desi y kabuli para oleico (20.9% y 26.3% respectivamente) y linoleico (64.2% y 59.7% respectivamente), aunque estas no fueron tan amplias como las encontradas en este trabajo. Aparece también para los dos grupos un solapamiento en sus distribuciones como se observa en las

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figs. 15 y 16. Como se puede ver por sus coeficientes de variación parece existir más variación, dentro de la colección estudiada, para oleico que para linoleico.

Tabla 16. Valores medios ( $\bar{X} \pm SD$ ), límites de variación y coeficiente de variación para el contenido de ácido oleico y linoleico (% sobre contenido en grasa) en una colección de líneas de garbanzos (26 kabuli + 24 desi) durante dos años.

Año*		$\bar{X} \pm SD$	CV(%)	Límites de variación	
				Mínimo	Máximo
<b>OLEICO</b>					
1	T	29.3±0.88	20.3	19.9	40.6
	K	34.0±0.81	11.4	25.9	40.6
	D	24.7±0.75	14.6	19.9	35.1
2	T	28.1±0.80	20.0	19.2	42.6
	K	31.8±0.90	13.8	25.9	42.6
	D	24.4±0.82	16.5	19.2	37.3
<b>LINOLEICO</b>					
1	T	55.3±0.78	9.7	44.8	63.7
	K	51.2±0.80	7.3	44.8	60.3
	D	59.4±0.61	4.9	51.5	63.7
2	T	56.5±0.73	9.0	43.8	64.5
	K	53.0±0.75	7.1	43.8	59.9
	D	60.2±0.69	5.6	49.4	64.5

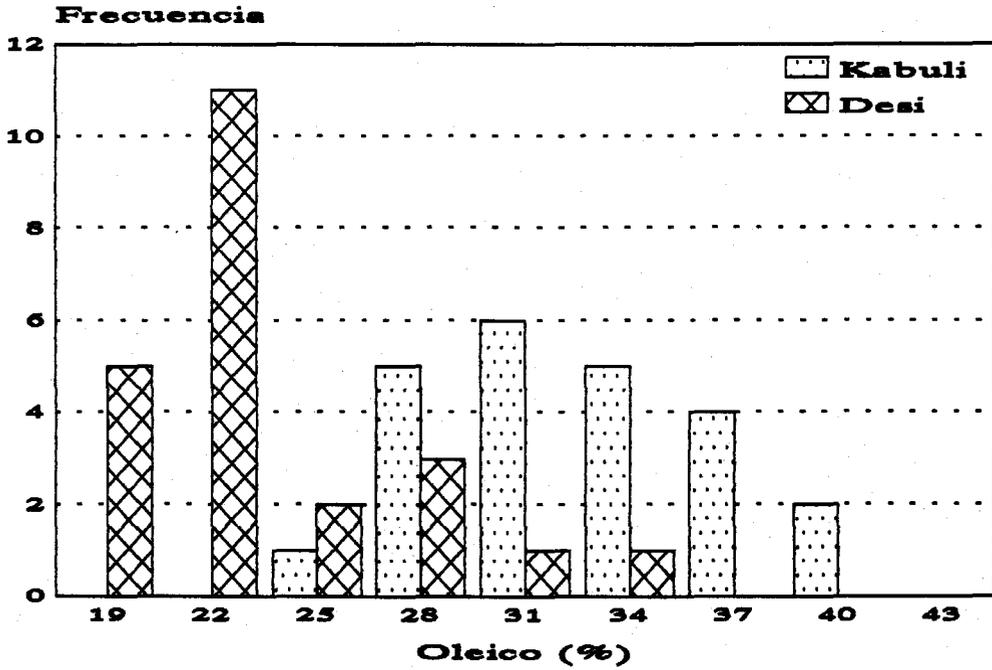
\* La primera fila (T) corresponde al total de las líneas evaluadas, la segunda fila (K) al grupo de líneas Kabuli y la tercera (D) al grupo de líneas Desi.

En la Tabla 17, donde se exponen los resultados del análisis de la varianza para el ácido oleico, observamos que es muy significativo el efecto del factor línea o población, que además explica el 88.4% de la variación total. La interacción entre línea y año fue también significativa, aunque solo explicó el 7% de la variación total. Por su parte, el efecto año es prácticamente nulo.

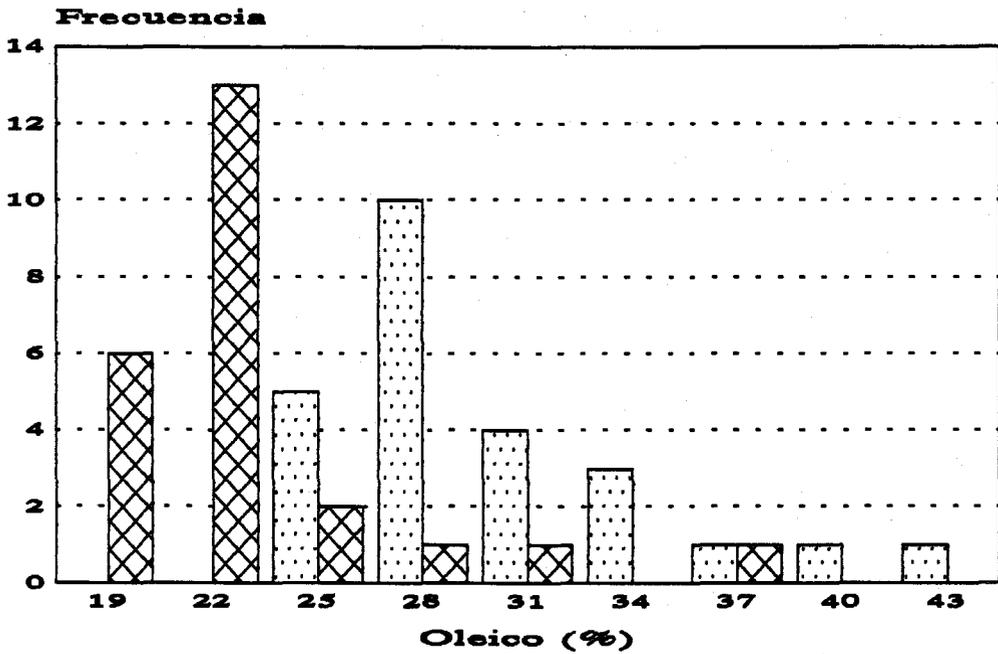
Un análisis detallado del factor población o línea muestra que las diferencias entre grupos son significativas y además son una fuente importante de variación (59.6% del total), lo que indica que deben existir alelos o frecuencias alélicas diferentes en ambos grupos.

Para el ácido linoleico los resultados del análisis de la varianza son muy similares a los obtenidos para ácido oleico (Tabla 18). El efecto del factor línea resultó altamente significativo, explicando el 89.2% de la variación, frente a la prácticamente inexistente influencia del factor año.

En la descomposición del factor línea, observamos que la diferencia entre grupos es de nuevo a la que le corresponde el mayor porcentaje de variación (60% del total).

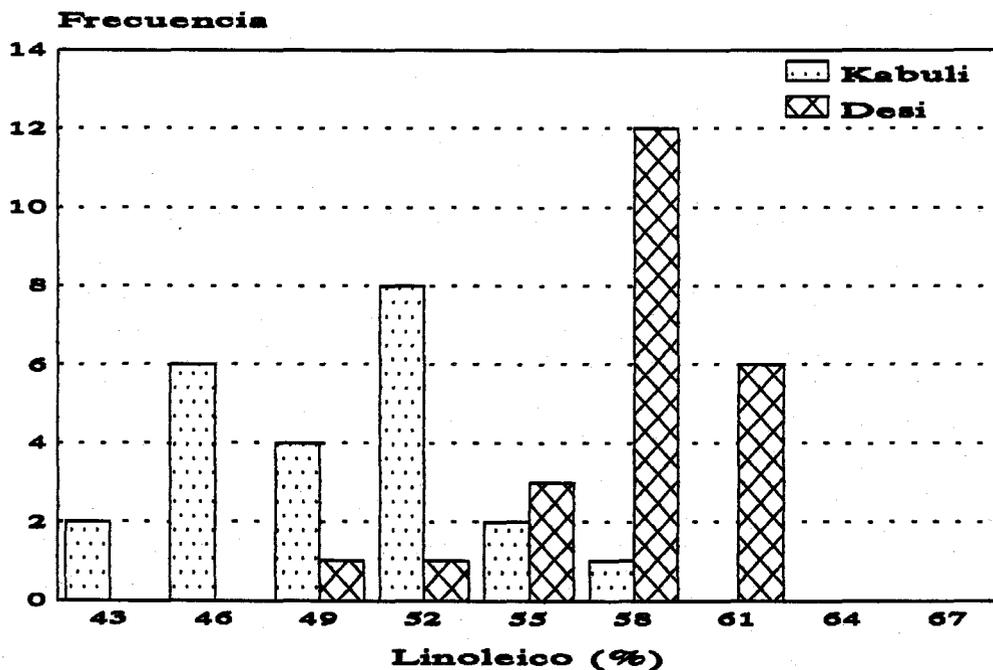


a

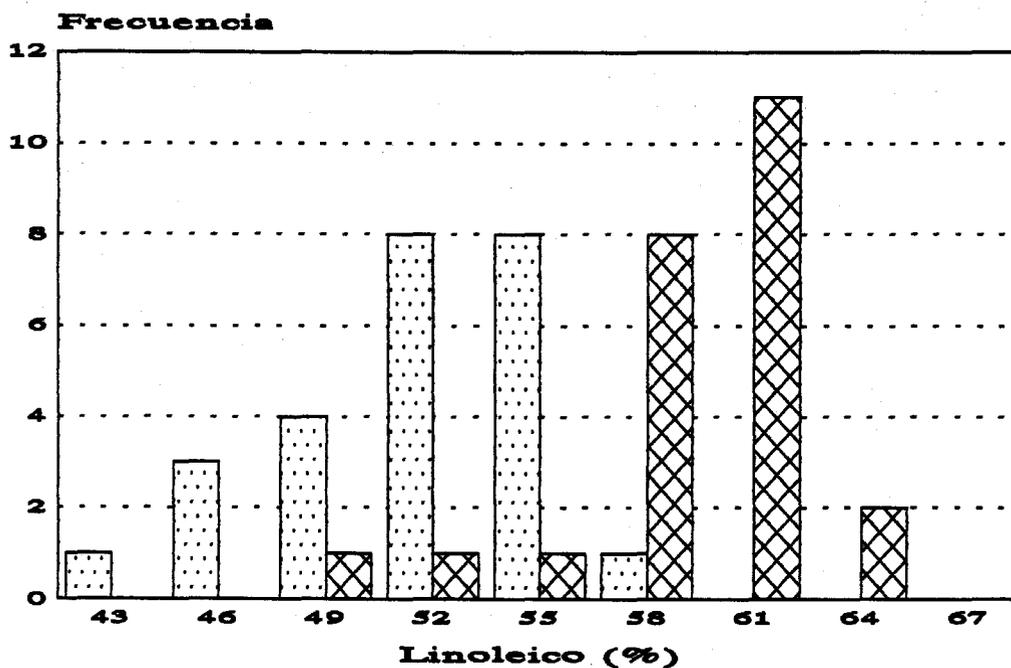


b

Fig. 15. Distribución para el contenido de Ácido Oleico (% sobre contenido en grasa) en garbanzos Kabuli y Desi para el año I (a) y II (b).



a



b

Fig. 16. Distribución para el contenido en Acido Linoleico (% sobre contenido en grasa) en garbanzos Kabuli y Desi para el año I (a) y II (b).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tabla 17. Análisis de la varianza para el contenido de Ácido Oleico en una colección de 50 poblaciones de garbanzos sembradas durante dos años.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.		R <sup>2</sup> <sup>a</sup>
<b>Año</b>	<b>1</b>	<b>0.00757</b>	<b>0.00757</b>		<b>0.9</b>
<b>Rep(Año)</b>	<b>2</b>	<b>0.00274</b>	<b>0.00137</b>		
<b>Línea</b>	<b>49</b>	<b>0.68466</b>	<b>0.01397</b>	<b>***</b>	<b>88.4</b>
Desi	23	0.14228	0.00618	***	(20.7)
Kabuli	25	0.13414	0.00536	***	(19.5)
D vs K	1	0.40824	0.40824	***	(59.6)
<b>Línea*Año</b>	<b>44</b>	<b>0.05498</b>	<b>0.00124</b>	<b>***</b>	<b>7.0</b>
D*A	22	0.01714	0.00077	**	(31.1)
K+A	21	0.03447	0.00164	***	(62.6)
T*A	1	0.00337	0.00337	**	(6.1)
<b>Error</b>	<b>82</b>	<b>0.02788</b>	<b>0.00034</b>		<b>3.6</b>
<b>Total</b>	<b>178</b>	<b>0.77441</b>			

<sup>a</sup> Entre paréntesis porcentaje de variación explicada por cada uno de los componentes de Genotipo y de la interacción.

\*,\*\*,\*\*\*: Nivel de significación para una probabilidad menor de 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 18. Análisis de la varianza para el contenido de Ácido Linoleico en un colección de 50 poblaciones de garbanzos sembradas durante dos años.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>
<b>Año</b>	<b>1</b>	<b>0.00519</b>	<b>0.00519</b>	<b>1.0</b>
<b>Rep(Año)</b>	<b>2</b>	<b>0.00277</b>	<b>0.00138</b>	
<b>Línea</b>	<b>49</b>	<b>0.44506</b>	<b>0.00908</b>	<b>***</b> <b>89.2</b>
Desi	23	0.07442	0.00323	*** (16.7)
Kabuli	25	0.10331	0.00413	*** (23.2)
D vs K	1	0.26733	0.26733	*** (60.0)
<b>Línea*Año</b>	<b>44</b>	<b>0.02459</b>	<b>0.00055</b>	<b>***</b> <b>4.9</b>
D*A	22	0.01145	0.00052	** (46.5)
K*A	21	0.01236	0.00058	** (50.2)
T*A	1	0.00078	0.00078	(3.1)
<b>Error</b>	<b>82</b>	<b>0.01816</b>	<b>0.00022</b>	<b>3.6</b>
<b>Total</b>	<b>178</b>	<b>0.49877</b>		

<sup>a</sup> Entre paréntesis porcentaje de variación explicada por cada uno de los componentes de Genotipo y de la interacción.

\*,\*\*,\*\*\*: Nivel de significación para una probabilidad menor de 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

**IV.5.- FIBRA ACIDO DETERGENTE (ADF) Y NEUTRO DETERGENTE (NDF):**

Para la determinación de ADF se ha empleado como método de referencia la técnica de Van Soest (1963) y para NDF nos hemos basado en la modificación de la técnica de Van Soest realizada por Mascarenhas Ferreiras et al (1983).

• **Ecuaciones de calibración:**

Los dos grupos de garbanzos, desi y kabuli, se caracterizan claramente por poseer diferentes contenidos en ADF y NDF (Singh, 1984, Karrat et al, 1990) esto da lugar a una distribución bimodal dentro de la especie para estos dos compuestos. Debido a este hecho y a que en el caso de ADF se ha realizado una calibración diferente para cada tipo de garbanzo (Fig. 17, 18). Para NDF solo se ha realizado una calibración para el total de la colección (Fig. 19) ya que se pudo contar con datos analíticos de plantas procedentes de un cruzamiento desi x kabuli empleadas en otros estudios dentro del grupo de mejora, las cuales junto con las de nuestro material nos permitió seleccionar un conjunto de muestras con distribución normal y una amplia variación.

Como se puede ver en las Figs. 17, 18, 19 las ecuaciones de calibración escogidas han sido las de cinco términos para ADF en kabuli, siete términos para ADF en desi y siete para NDF, debido a que el valor alcanzado por SECV fue

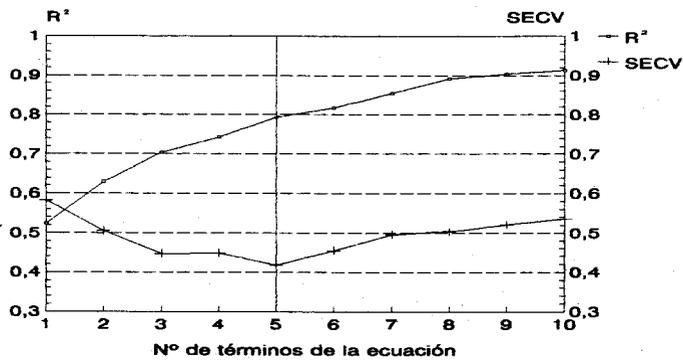


Fig. 17. Representación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para ADF de kabuli.

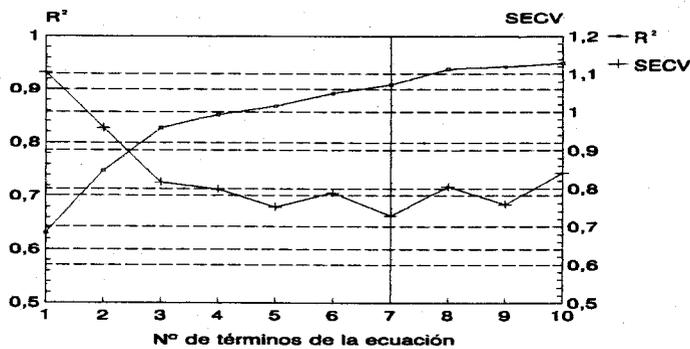


Fig. 18. Representación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para ADF de desi.

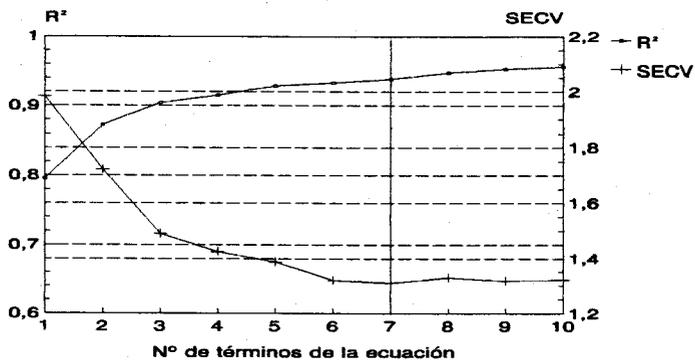


Fig. 19. Representación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para NDF total (kabuli y desi).

menor, siendo los valores de  $R^2$  en las calibraciones de 0.79; 0.90 y 0.93 respectivamente (Tabla 19). Se ha de destacar que los errores estándares de la estimación de ADF en kabuli y en desi han alcanzado valores óptimos (0.3 y 0.55 respectivamente) comparados con los límites de error normalmente aceptados en el análisis de este parámetro por vía húmeda (1% sobre el contenido total). En el caso de NDF estos valores son algo superiores debido a que las muestras de garbanzo al poseer almidón en su composición dificulta de forma considerable los procesos de filtración en la determinación de NDF lo cual puede estar contribuyendo a que su error estandar sea más alto. Es interesante destacar que la  $r^2$  para ADF (kabuli y desi) supera los valores alcanzados por el coeficiente de determinación en la calibración ( $R^2$ ) lo que confirma la fiabilidad de la calibración obtenida.

Kharrat (1988) en garbanzo obtuvo un valor de  $R^2$  de 0.81 tanto para ADF como NDF. En otra especie mas lejana Lolium multiflorum Lam. y en forraje Berardo (1992) encontró valores para el coeficiente de determinación de ADF y de NDF de 0.94 y 0.95 respectivamente. Las diferencias entre estos resultados y los nuestros pueden ser debida tanto a las diferencias entre los equipos empleados en cada caso (de filtros vs. espectro continuo) como a diferencias del material vegetal estudiado (garbanzo vs. forrajes).

Tabla 19. Resultados de la calibración y validación para ADF (kabuli y desi) y NDF.

**CALIBRACIÓN ADF DE KABULI**

---

Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.79
Error estándar en calibración (SEC)(%)	0.34
Error estándar en validación cruzada (SECV)(%)	0.41

---

**VALIDACIÓN ADF DE KABULI**

---

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.81
Error estándar en la estimación (SEP)(%)	0.30

---

**CALIBRACIÓN ADF DE DESI**

---

Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.90
Error estándar en calibración (SEC)(%)	0.51
Error estándar en validación cruzada (SECV)(%)	0.72

---

**VALIDACIÓN ADF DE DESI**

---

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.92
Error estándar en la estimación (SEP)(%)	0.55

---

**CALIBRACIÓN NDF**

---

Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.93
Error estándar en calibración (SEC)(%)	1.06
Error estándar en validación cruzada (SECV)(%)	1.31

---

**VALIDACIÓN NDF**

---

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.93
Error estándar en la estimación (SEP)(%)	1.19

---

Las longitudes de onda más características encontradas en nuestras calibraciones de fibra (ADF y NDF) fueron: 1444, 1724 nm, correspondientes al primer sobretono de absorción de grupos OH y CH respectivamente; además otra de las bandas seleccionadas es la de 2332 nm perteneciente a la combinación de grupos CH. Las longitudes de onda citadas pertenecen a la celulosa y hemicelulosa, coincidiendo con las citadas por Shenk et al (1992), Osborne et al (1993) y Murray (1993), para estos componentes presentes en la fibra.

### • Análisis de la variación en la colección:

Al observar los resultados alcanzados en los dos años (Tabla 20) vemos que los garbanzos tipo desi tienen valores medios más altos de ADF y NDF que los kabuli, lo que coincide, en general, con los resultados obtenidos por otros autores (Singh, 1984; Kharrat et al 1990).

Los valores del coeficiente de variación para ambos tipos de fibra son altos en el total de la colección y no existe solapamiento entre los límites de variación de ambos grupos desi y kabuli como se puede apreciar en las Figs. 20 y 21. Resulta pues evidente que la variabilidad para el contenido en fibra en garbanzo estos dos caracteres no se distribuye aleatoriamente por la especie sino que se distribuye claramente en dos grupos correspondientes a desi y a kabuli.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 20. Valores medios ( $\bar{X} \pm SD$ ), límites de variación y coeficiente de variación para el contenido de ADF y NDF (% sobre materia seca) en una colección de líneas de garbanzos (26 kabuli + 24 desi) durante dos años.

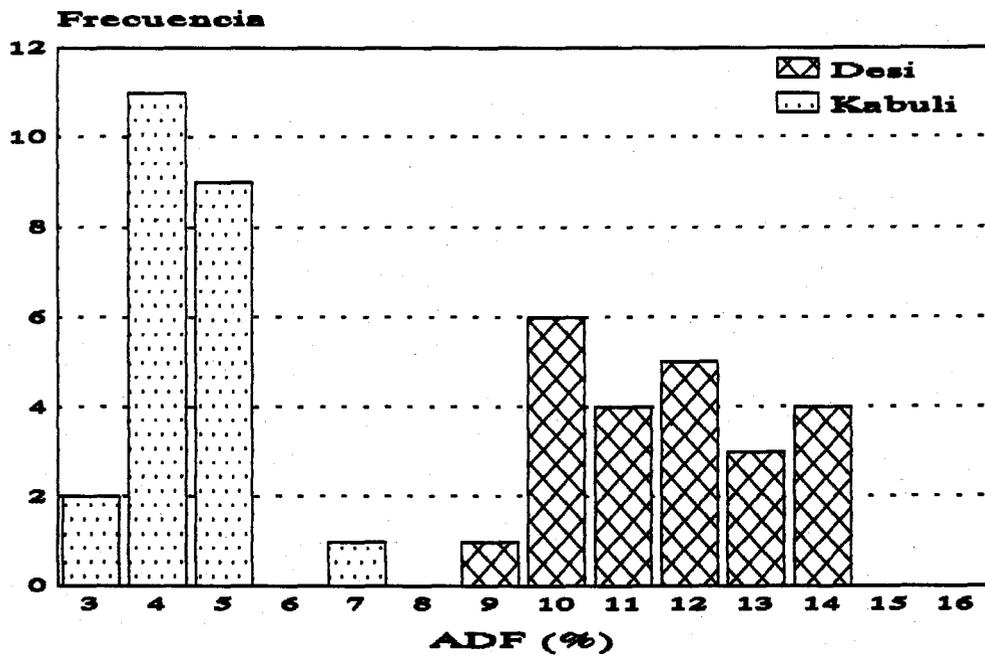
ADF		$\bar{X} \pm SD$	CV(%)	Límites de variación	
				Mínimo	Máximo
Año*					
1	T	8.5±0.55	43.8	3.9	14.4
	K	4.9±0.13	12.9	3.9	7.2
	D	12.0±0.30	11.9	9.9	14.4
2	T	8.7±0.61	49.3	3.8	15.4
	K	4.7±0.13	13.8	3.8	6.3
	D	12.8±0.33	12.8	10.4	15.4

### NDF

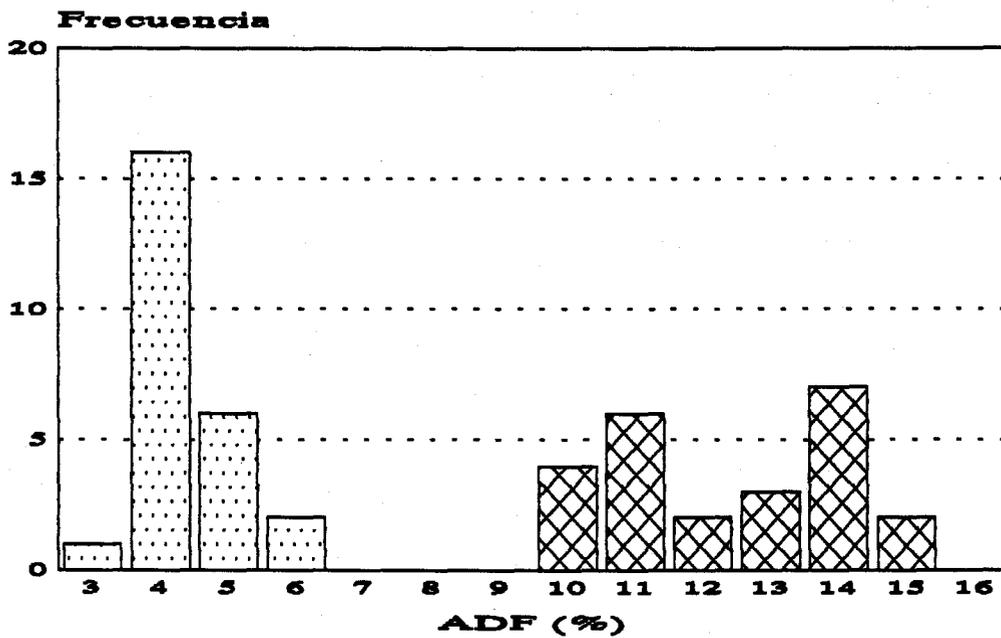
1	T	10.5±0.70	45.1	2.4	18.1
	K	6.1±0.3	20.5	2.4	8.3
	D	15.0±0.36	11.7	12.0	18.1
2	T	10.4±0.68	45.9	3.6	18.0
	K	6.1±0.25	20.9	3.6	9.6
	D	15.0±0.42	13.9	12.1	18.0

\* La primera fila (T) corresponde al total de las líneas evaluadas, la segunda fila (K) al grupo de líneas Kabuli y la tercera (D) al grupo de líneas Desi.

Datos expresados en porcentaje sobre materia seca.

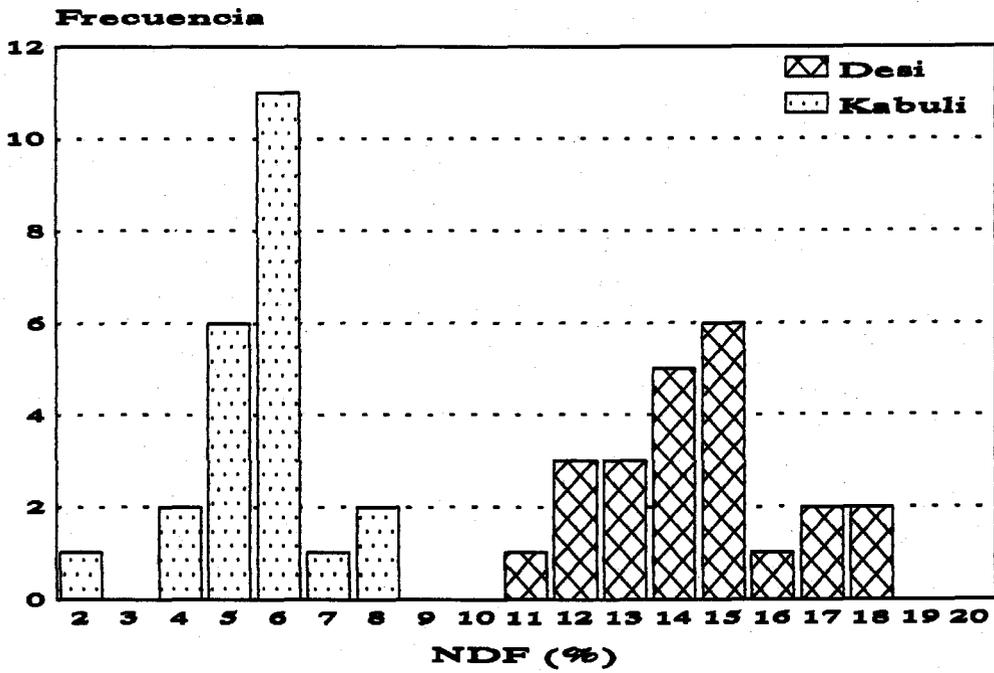


a

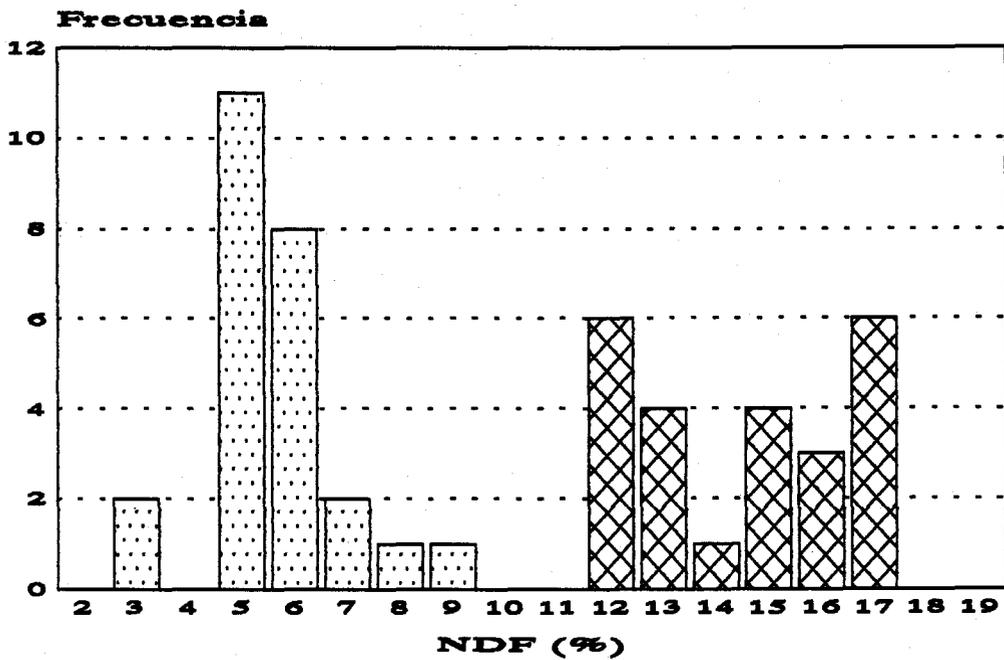


b

Fig. 20. Distribución para el contenido de ADF (% sobre materia seca) en garbanzos Kabuli y Desi para el año I (a) y II (b).



a



b

Fig. 21. Distribución para el contenido de NDF (% sobre materia seca) en garbanzos Kabuli y Desi para el año I (a) y II (b).

La variación descrita entre genotipos para ADF fue altamente significativa, explicando esta el 96.2% de la variación total (Tabla 21), no siendo estadísticamente significativa la influencia del factor año. La interacción línea\*año resultó altamente significativa pero el escaso porcentaje que representa de la variación total (1.5%), nos indica que a pesar de esa significación no es un efecto importante.

Un análisis detallado del factor población o genotipo muestra cómo prácticamente todo su efecto se debe a las diferencias entre grupos (93.8% del total), lo cual es lógico a la vista de la ausencia de solapamiento entre ambos grupos. La variación detectada dentro de kabuli no fue significativa y el porcentaje de variación explicada fue menor que en desi (Tabla 21).

Para NDF los resultados fueron similares a los de ADF (Tabla 22). El efecto del factor población fue altamente significativo explicando el 95.2% de la variabilidad total. El factor año y la interacción entre factores no fueron significativos.

No hay que olvidar que tanto los componentes de la ADF como los de la NDF se encuentran principalmente en la cubierta de la semilla, aproximadamente en un 80% (Singh, 1984). Si tenemos en cuenta que los garbanzos tipo desi poseen mayor

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

grosor de cutícula que los tipo kabuli, y que este carácter está controlado principalmente por un gen mayor (Gil y Cubero, 1993), podemos explicarnos de este modo las altas diferencias significativas entre los dos grupos encontradas en nuestro estudio.

Tabla 21. Análisis de la varianza para el contenido de Fibra Ácido Detergente (ADF) en una colección de 50 poblaciones de garbanzos sembradas durante dos años.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	R <sup>2</sup> *
<b>Año</b>	<b>1</b>	<b>0.00040</b>	<b>0.00040</b>	<b>0.04</b>
<b>Rep(Año)</b>	<b>2</b>	<b>0.00195</b>	<b>0.00097</b>	
<b>Línea</b>	<b>49</b>	<b>0.91655</b>	<b>0.01870 ***</b>	<b>96.2</b>
Desi	23	0.04466	0.00194 ***	(4.8)
Kabuli	25	0.01202	0.00048	(1.3)
D vs K	1	0.85987	0.85987 ***	(93.8)
<b>Línea*Año</b>	<b>44</b>	<b>0.01513</b>	<b>0.00034 ***</b>	<b>1.5</b>
D*A	22	0.00320	0.00014	(21.1)
K*A	21	0.00683	0.00033 **	(45.8)
T*A	1	0.005	0.005 ***	(33.0)
<b>Error</b>	<b>82</b>	<b>0.01124</b>	<b>0.00013</b>	<b>1.1</b>
<b>Total</b>	<b>178</b>	<b>0.95213</b>		

\* Entre paréntesis porcentaje de variación explicada por cada uno de los componentes de Genotipo y de la interacción.

\*, \*\*, \*\*\*: Nivel de significación para una probabilidad menor de 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 22. Análisis de la varianza para el contenido de Fibra Neutro Detergente (NDF) en una colección de 50 poblaciones de garbanzos sembradas durante dos años.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>
<b>Año</b>	<b>1</b>	<b>0.000001</b>	<b>0.000001</b>	<b>0.0</b>
<b>Rep(Año)</b>	<b>2</b>	<b>0.00066</b>	<b>0.00033</b>	
<b>Línea</b>	<b>49</b>	<b>1.06919</b>	<b>0.02182 ***</b>	<b>95.2</b>
Desi	23	0.06291	0.00273 ***	(5.8)
Kabuli	25	0.04663	0.00186 ***	(4.3)
D vs K	1	0.95965	0.95965 ***	(89.7)
<b>Línea*Año</b>	<b>44</b>	<b>0.01294</b>	<b>0.00029</b>	<b>1.1</b>
<b>Error</b>	<b>82</b>	<b>0.02423</b>	<b>0.00029</b>	<b>2.1</b>
<b>Total</b>	<b>178</b>	<b>1.12291</b>		

<sup>a</sup> Entre paréntesis porcentaje de variación explicada por cada uno de los componentes de Genotipo y de la interacción.

\*,\*\*,\*\*\*: Nivel de significación para una probabilidad menor de 0.05, 0.01, 0.001 respectivamente.

IV.6.- AZUCARES:

Para determinar su concentración en nuestras muestras de garbanzo nos hemos basado en el método de Luff-Schoorl (UNE 64-108-77), que normalmente se emplea para calcular el contenido de azúcares totales y reductores. En nuestro trabajo se llevó a cabo un estudio preliminar en el que solo se encontraron trazas de los azúcares reductores (glucosa, fructosa etc) como se muestra en la Tabla 23. Resultado que está de acuerdo con lo citado por Chavan et al, 1986. Dentro de los azúcares no reductores, la rafinosa y estaquiosa, causantes principales de las flatulencias, parecen encontrarse en una alta proporción del total de azúcares solubles en garbanzo (Singh et al, 1982; Chavan et al, 1986), aunque no se ha encontrado correlación entre estos azúcares y el total de azúcares solubles (Singh et al, 1982).

Tabla 23. Resultados preliminares del análisis de azúcares reductores.

	Número de muestras	$\bar{X}^{**} \pm SD$	Azúcares reductores	
			Mínimo	Máximo
T	19	0.13±0.02	0.02	0.29
K	8	0.11±0.03	0.02	0.27
D	11	0.15±0.03	0.04	0.29

\* La primera fila (T) corresponde al total de las líneas evaluadas, la segunda fila (K) al grupo de líneas kabuli y la tercera (D) al grupo de líneas Desi.

\*\* Datos expresados en porcentaje sobre materia seca.

• Ecuación de calibración:

Teniendo en cuenta los valores del coeficiente de determinación en calibración  $R^2$  y el error estándar en la validación cruzada (SECV), es la ecuación con 10 términos la que mayor valor de  $R^2$  y menor de SECV obtiene (Fig. 22).

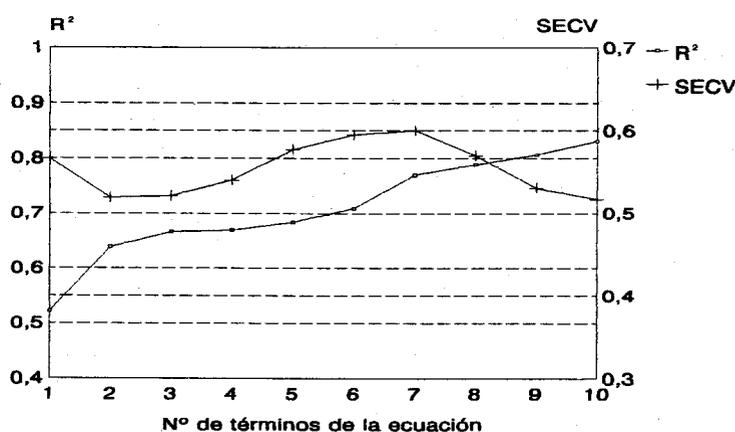


Fig. 22. Representación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en calibración y el error estándar en la validación cruzada (SECV) para azúcares totales.

No se ha encontrado en la literatura resultados en garbanzo u otras leguminosas con los que contrastar nuestros resultados. En cereales para el desayuno Baker y Norris (1985) determinaron mediante técnica NIRS el contenido de azúcares, obteniendo un coeficiente de determinación de 0.96 en su ecuación de calibración, mientras que Ootake (1992) obtuvo en tomates un coeficiente de determinación de 0.94. En nuestras muestras de garbanzo hemos obtenido en la calibración un  $R^2 = 0.83$

(Tabla 24). Las diferencias de los resultados de nuestra calibración y la de los autores antes mencionados se pueden deber además de usar materiales de estudio diferentes a que ambos emplearon un grupo de muestras de calibración con un intervalo de concentración más amplio de 0 al 53.9%.

Tabla 24. Resultados de la calibración y validación para azúcares totales.

---

**CALIBRACIÓN**

---

Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.83
Error estándar en calibración (sec) (%)	0.32
Error estándar en validación cruzada (SECV)(%)	0.51

---

**VALIDACIÓN**

---

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.75
Error estándar en la estimación (SEP)(%)	0.39

---

Entre las longitudes de onda más características obtenidas en nuestra calibración de azúcares totales destacamos las de 1260 y 1788 nm que corresponden al segundo y primer sobretono de grupos CH respectivamente pertenecientes a la estructura de azúcares, coincidiendo con las citadas por Shenk et al (1992), Osborne et al (1993) y Murray (1993).

### • Análisis de la variación en la colección:

En la Tabla 25 podemos observar que el grupo kabuli se caracteriza por poseer valores medios más altos que el grupo desi, resultados que se repiten en los dos años coincidiendo nuestros resultados con los obtenidos por Jambunathan y Singh (1980). El valor medio citado por estos autores para ambos grupos (kabuli=6.1 desi=5.3) es algo superior al de nuestros resultados, posiblemente es debido a que el método analítico empleado por ellos, el cual no citan en su trabajo, sea diferente del nuestro. Nuestros límites de variación son más amplios que los encontrados por los autores anteriormente citados (4.8%-6.4%), lo que puede ser debido a que el número de poblaciones empleadas en este trabajo es más amplio que el empleado por ellos, que fue solamente de 15 poblaciones. Chavan et al (1986) en una revisión sobre este tema en garbanzo citan valores entre 4.8% y 9%, pero de nuevo no se dice nada sobre el método de análisis empleado en cada caso.

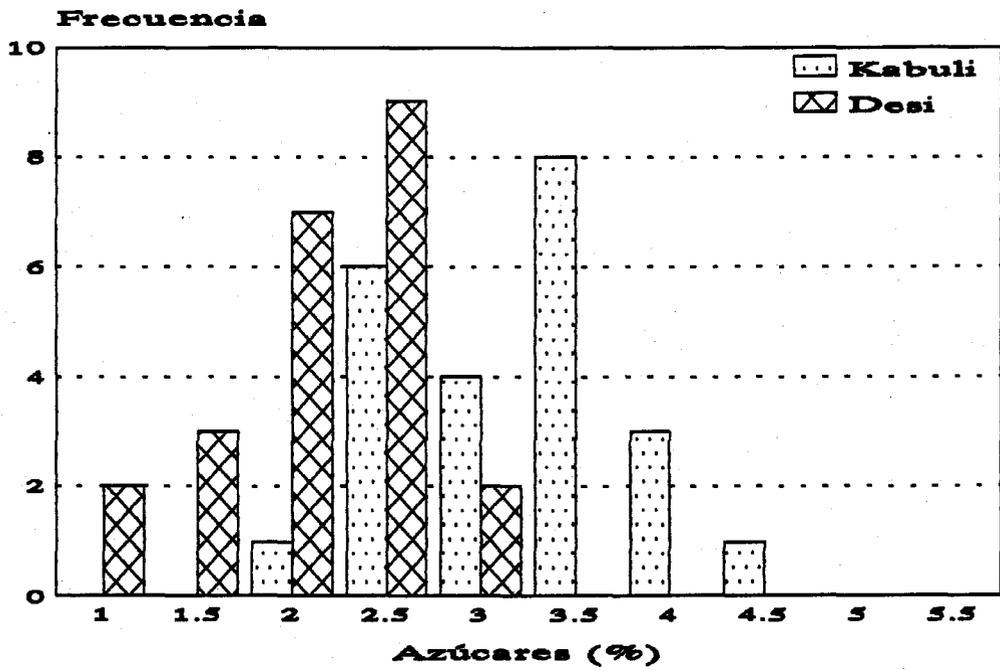
Singh et al (1982) sólo encontraron ligeras diferencias para el contenido en azúcares solubles entre desi y kabuli (4.47% y 5.06% respectivamente). Nuestras diferencias fueron más amplias y como se verá al analizar los resultados del análisis de la varianza éstas fueron significativas (Tabla 26). El coeficiente de variación para el total de la colección estudiada es alto. Como se puede ver en la Fig. 23 existe

solapamiento entre las distribuciones de los dos grupos.

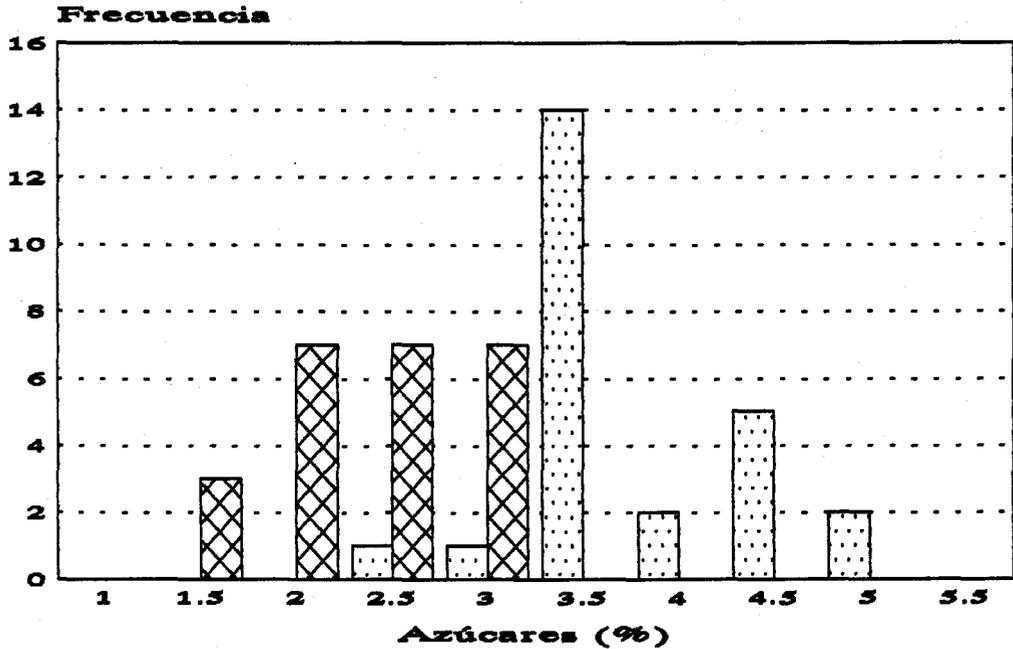
Tabla 25. Valores medios ( $\bar{X} \pm SD$ ), límites de variación y coeficiente de variación para el contenido de azúcares totales (% sobre materia seca) en una colección de líneas de garbanzos (26 kabuli + 24 desi) durante dos años.

Año*		$\bar{X} \pm SD$	CV(%)	Límites de variación	
				Mínimo	Máximo
1	T	2.8±0.11	25.8	1.4	4.5
	K	3.3±0.12	17.4	2.3	4.5
	D	2.3±0.10	19.8	1.4	3.2
2	T	3.4±0.12	24.5	1.6	5.1
	K	4.0±0.11	14.5	2.9	5.1
	D	2.7±0.10	18.5	1.6	3.5

\* La primera fila (T) corresponde al total de las líneas evaluadas, la segunda fila (K) al grupo de líneas Kabuli y la tercera (D) al grupo de líneas Desi.



a



b

Fig. 23. Distribución para el contenido de Azúcares (% sobre materia seca) en garbanzos Kabuli y Desi para el año I (a) y II (b).

Como se puede ver en la Tabla 26, la variación descrita entre genotipos fue altamente significativa, no siendo significativa la influencia del efecto año en el conjunto de la variación total de los dos años, ni los de éste sobre los genotipos o poblaciones (interacción línea x año).

Fijandonos en el factor línea o genotipo vemos que una gran parte de la variación se debe a las diferencias entre grupos (57.7% del total), las cuales fueron altamente significativas, lo que indica que las diferencias entre kabuli y desi para este parámetro son genéticas. El resto de la variación es explicada por las diferencias dentro de cada grupo, siendo estas también significativas y mayores dentro del grupo desi (Tabla 26).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tabla 26. Análisis de la varianza para el porcentaje de Azúcares Totales.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>
<b>Año</b>	<b>1</b>	<b>0.00967</b>	<b>0.00967</b>	<b>8.6</b>
<b>Rep(Año)</b>	<b>2</b>	<b>0.00013</b>	<b>0.00006</b>	
<b>Línea</b>	<b>49</b>	<b>0.08576</b>	<b>0.00175 ***</b>	<b>76.8</b>
Desi	23	0.01982	0.00086 ***	(23.1)
Kabuli	25	0.01641	0.00065 ***	(19.1)
D vs K	1	0.04953	0.04953 ***	(57.7)
<b>Línea*Año</b>	<b>44</b>	<b>0.00541</b>	<b>0.00012</b>	<b>4.8</b>
<b>Error</b>	<b>82</b>	<b>0.00698</b>	<b>0.00008</b>	<b>6.2</b>
<b>Total</b>	<b>178</b>	<b>0.00055</b>		

<sup>a</sup> Entre paréntesis porcentaje de variación explicada por cada uno de los componentes de Genotipo y de la interacción.

\*,\*\*,\*\*\*: Nivel de significación para una probabilidad menor de 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

**IV.7.- CORRELACIONES:**

Debido a las altas diferencias significativas encontradas entre desi y kabuli para prácticamente la totalidad de los parámetros estudiados, hemos estimado los coeficientes de correlación fenotípica para cada grupo por separado. Las correlaciones se estimaron a partir de los valores medios de los dos años para cada línea, debido a la poca importancia que el efecto año ha tenido en todos los parámetros.

En la Tabla 27 aparecen los coeficientes de correlación fenotípicos, donde es de interés destacar la alta correlación negativa y significativa encontrada entre el porcentaje de proteína y el de grasa, tanto en kabuli como en desi. Esta correlación es bastante lógica de explicar, ya que la energía que se invierte en grasa no se podrá invertir en proteína, siendo algo bastante común entre las leguminosas (De Haro et al, 1980, 1985b; De Haro y Moreno, 1992 en habas, altramuza y garbanzo respectivamente). Desde el punto de vista de la mejora genética, cuando queramos elevar el porcentaje de grasa o de proteína habrá que tener en cuenta esta correlación negativa entre ellas, la cual será más acentuada cuanto mayor sea la selección hacia un extremo u otro. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por De Haro y Moreno (1992) para los caracteres de proteína y grasa.

El contenido en proteína también tuvo una moderada correlación significativa y negativa con el de azúcares en desi y en kabuli, estando estos últimos correlacionados positivamente con grasa en ambos grupos.

El contenido en oleico y en linoleico estuvieron alta y negativamente correlacionados entre ellos ( $r > 0.90$ ), teniendo el ácido oleico una correlación altamente significativa y positiva con grasa, mientras que entre linoleico y grasa es negativa. En ambos casos para desi es ligeramente superior. Como se puede ver en la Fig. 24 el ácido linoleico se forma por desaturación del ácido oleico con la intervención de la enzima oleoyl-PC desaturasa, lo cual puede explicar la alta correlación negativa entre ellos.

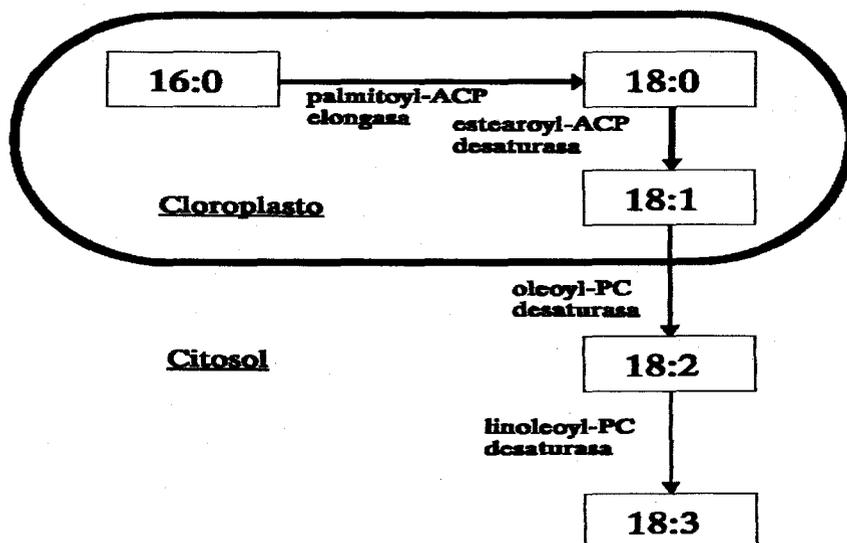


Fig. 24. Ruta biosintética de desaturación a partir del ácido oleico (Adaptado de Pleines y Friedt, 1988).

A la vista de nuestros resultados podemos suponer que en los garbanzos tipo kabuli la enzima antes citada es menos activa que en los desi, esto podría explicar un mayor contenido en oleico en los garbanzos tipo kabuli y que podría estar dando lugar a un mayor contenido en grasa.

También existe una correlación significativa entre estos dos ácidos grasos y el contenido en azúcares, lo cual es lógico si tenemos en cuenta la correlación entre azúcares y grasa citada anteriormente.

Tanto la fibra ácido detergente como la neutro detergente están correlacionadas entre si positivamente, mostrando los desi un valor de correlación y significación más alto. Parecidos resultados pero con signo negativo observamos al correlacionar ambas fibras con azúcares, aunque es más importante por su valor y nivel de significación la correlación negativa entre NDF y azúcares. Estos resultados pueden ser debidos a que en la biosíntesis de ambos compiten por el mismo substrato, la glucosa.

La ADF también posee una correlación altamente significativa y negativa con grasa en desi. En cambio no se ha detectado correlación significativa entre grasa y ADF en kabuli, probablemente debido a la escasa variabilidad del contenido de ADF en kabuli. Como es lógico NDF ha mostrado también una

correlación negativa y significativa en ambos grupos con grasa. A la vez tanto ADF como NDF se han encontrado positivamente correlacionadas con proteína. Una explicación a estos resultados fue dada por Gil et al (1996) quienes analizaron mediante el análisis de sendero, ADF, proteína, grasa, tamaño de la semilla y grosor de la cascara encontraron que el contenido en ADF se debía principalmente al tamaño de la semilla y el grosor de la cascara, siendo la importancia del contenido en proteína y grasa nula sobre ADF, a pesar de estar correlacionados con estos dos parámetros, y que la correlación se explicaba principalmente por la correlación entre proteína y grasa con tamaño de la semilla.

Tabla 27. Coeficientes de correlación simple de Pearson<sup>f</sup>.

Carácter <sup>#</sup>	ADF	Azúcares	Grasa	Linoleico	NDF	Oleico
Azúcares	-0.43 *					
	-0.58 **					
Grasa	-0.26	0.53 **				
	-0.66 ***	0.70***				
Linoleico	-0.01	-0.50 *	-0.80 ***			
	0.59 **	-0.67***	-0.86 **			
NDF	0.62 **	-0.55 **	-0.81 ***	0.65***		
	0.90 ***	-0.66***	-0.75 ***	0.66***		
Oleico	0.14	0.46 *	0.68 ***	-0.92***	-0.48 *	
	-0.54 **	0.62 **	0.90 ***	-0.95***	-0.61 **	
Proteína	0.14	-0.44 *	-0.79 ***	0.48 *	0.58 **	-0.36
	0.58 **	-0.67***	-0.74 ***	0.62 **	0.50 *	-0.60 **

<sup>#</sup> Para cada carácter la primera fila corresponde a Kabuli y la segunda a Desi. Para Kabuli n=26 y para Desi n=24.

<sup>\*</sup> Para cada línea y parámetro se utilizó el valor medio de los dos años.

\*,\*\*,\*\*\*: Nivel de significación para una probabilidad menor de 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

IV.8.- HEREDABILIDAD:

Los valores obtenidos para la heredabilidad en sentido amplio y el coeficiente de variación genético para el total de los parámetros estudiados en cada uno de los dos grupos (kabuli y desi), se muestran en la Tabla 28.

En general la heredabilidad en el grupo desi ha sido mayor que en el grupo kabuli, lo cual es lógico si tenemos en cuenta por los resultados anteriores que el grupo desi ha presentado mayor variabilidad para la mayoría de los caracteres que el grupo kabuli. Hay que recordar que la heredabilidad de un carácter depende tanto de la influencia del ambiente sobre él como de la variabilidad que presente.

El carácter menos heredable en ambos grupos fue proteína, posiblemente debido a la fuerte interacción genotipo x año que fue detectada (Tabla 7). La menor heredabilidad de este componente de la semilla respecto a otros caracteres ha sido citada también por otros autores (Kharrat et al, 1990; Nadal, 1994). Hay que destacar el fuerte contraste entre la heredabilidad para desi y kabuli para fibra ácido detergente (ADF). Una explicación de este resultado sería la ausencia de variación para este carácter dentro del grupo de poblaciones tipo kabuli, ya que como se puede ver en la Tabla 21 este grupo, no

mostró variación significativa.

Tabla 28. Heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ), Coeficientes de variación Genético ( $CV_e$ ) en garbanzos tipo Kabuli y tipo Desi.

Carácter*		$H^2$	$CV_e$
Proteína	K	0.15	1.39
	D	0.27	2.20
Grasa	K	0.38	2.68
	D	0.58	5.45
ADF	K	0.13	2.85
	D	0.82	6.13
NDF	K	0.42	7.13
	D	0.79	6.53
Azúcares	K	0.45	6.14
	D	0.73	9.01
Oleico	K	0.48	5.80
	D	0.74	7.65
Linoleico	K	0.64	3.96
	D	0.62	3.25

\* Para cada carácter la primera fila (K) corresponde a Kabuli y la segunda (D) a Desi.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

**V.- DISCUSIÓN GENERAL:**

Entre los objetivos de la tesis se incluía el estudio de las posibilidades de la técnica NIRS para el análisis de los componentes de la calidad nutritiva del garbanzo. Los resultados obtenidos en esta tesis han puesto de manifiesto que es posible desarrollar ecuaciones de calibración NIRS para el análisis simultáneo del contenido en proteína, grasa, ácido oleico, ácido linoleico, fibra ácido detergente, fibra neutro detergente y azúcares solubles totales. A lo largo de las distintas calibraciones realizadas se ha puesto en evidencia la importancia de las distintas etapas del proceso de calibración: una adecuada selección de las muestras de calibración (con la mayor variabilidad posible), seguido por un análisis de las mismas con los métodos analíticos de referencia, y por un estudio de los espectros de reflectancia y de las longitudes de onda implicadas para cada parámetro en cuestión.

Hay que destacar las calibraciones de ADF tanto en garbanzos desi como en kabuli, en los que los coeficientes de determinación de la validación han sido superiores a los del coeficiente de determinación de la calibración (0.92 frente a 0.90 para kabuli, 0.81 frente a 0.79 para desi). Por otro lado, interesa destacar también los buenos resultados obtenidos con la calibración de la NDF (con valores de  $R^2$  y  $r^2$  superiores a 0.90) a pesar de la dificultad del análisis de este parámetro en

laboratorio, debido al alto contenido en almidón de la semilla del garbanzo.

No nos consta la existencia de trabajos previos al nuestro en lo que se refiere al análisis mediante NIRS del contenido en ácidos grasos y en azúcares en garbanzo. Los resultados obtenidos en nuestras calibraciones y validaciones confirman la validez de esta técnica para el análisis en garbanzo de los parámetros antes citados. Así para los ácido oleico y linoleico se han conseguido  $R^2$  y  $r^2$  iguales o superiores a los obtenidos en especies oleaginosas, siendo el reducido intervalo de contenido en azúcares el principal factor limitante en la calibración de azúcares totales.

Una vez puesta a punto la técnica NIRS en garbanzo, hemos podido estudiar la variación de todos los componentes de la calidad calibrados en nuestra colección de garbanzos, cultivada durante dos años, lo que hubiera sido prácticamente imposible, y muy costoso, si los análisis de cada componente se hubieran realizado según las técnicas clásicas de laboratorio.

Por otro lado, es importante destacar el aspecto dinámico que debe caracterizar el empleo de la técnica NIRS: las ecuaciones de calibración desarrolladas en nuestro trabajo serán empleadas para el análisis de muestras de garbanzo en futuros trabajos de investigación sobre la calidad nutritiva de esta

especie. Posteriormente estas ecuaciones de calibración serán mejoradas con la incorporación de nuevas muestras analizadas que amplíen los rangos de variación para los distintos parámetros calibrados.

El contenido en proteína es un parámetro muy importante desde el punto de vista nutritivo. En garbanzos éste es algo más bajo que en otras leguminosas grano aunque su valor biológico es superior. Según los resultados obtenidos, la variación que existe parece ser suficientemente amplia como para encontrar líneas o poblaciones con alto contenido proteico tanto dentro de kabuli como de desi. En nuestro estudio el valor más alto fue de 27.2% en el segundo año. No obstante la fuerte influencia detectada del ambiente, en nuestro caso el efecto año, sobre la variación de este parámetro, así como la dependencia ambiente-genotipo son factores a tener en cuenta en los programas de mejora, ya que será necesario no solo seleccionar hacia un mayor contenido proteico sino también hacia una mayor estabilidad. Como hemos visto en nuestro caso es posible seleccionar líneas tanto kabuli como desi con alto y estable contenido proteico en ambos años.

Es importante resaltar los valores obtenidos en nuestro material para NNP (de 0.22 a 0.38% sobre materia seca) los cuales si los multiplicamos por el factor 6.25, para poder comparar con la proteína bruta total, obtendremos un intervalo de 1.4 a 2.4 que habría que restar a la concentración de proteína bruta

obtenida. Por lo tanto este es un parámetro que habría que considerar cuando se quiera seleccionar líneas con alto contenido en proteína real. En nuestro material se ha observado una relación positiva entre contenido en proteína y NNP, no obstante dentro de las líneas de menor contenido de NNP (<0.28%), se aprecia una mayor variación para contenido proteico. Esta variabilidad nos permite seleccionar líneas con un moderado a alto contenido en proteína bruta (aprox. de 25 a 26%) y bajo en NNP.

Como ya citamos en la introducción, la semilla de garbanzo posee un contenido en grasa superior al de otras leguminosas grano. En nuestro estudio este contenido ha variado entre 2.8 y 4.8% en el grupo desi y entre 4.3 y 5.9% en kabuli, siendo significativas tanto las variaciones dentro de cada grupo como las diferencias entre estos dos grupos. Nuestros resultados indican que los garbanzos tipo kabuli usados para consumo humano en el area mediterranea, poseen mayor valor energético que los desi, existiendo variación genotípica dentro de cada grupo lo que permitirá poder obtener variedades con mayor o menor contenido en grasa según lo que se desee. Esta grasa es de alta calidad para consumo humano con un alto contenido en ácidos oleico y linoleico (más del 80% del total). Según nuestros resultados, al igual que ocurriera para grasa, se han obtenido diferencias significativas entre desi y kabuli para los dos ácidos grasos, siendo también significativa la variación dentro de cada grupo.

Los garbanzos tipo kabuli se caracterizan por poseer mayor contenido en ácido oleico (de 25.9 a 42.6%) y menor en ácido linoleico (de 43.8 a 60%) que los desi (de 19.2 a 37% para oleico; de 50 a 64.5% para linoleico). Posiblemente la desaturasa encargada de catalizar el paso de oleico a linoleico sea más eficiente en los garbanzos tipo desi.

Respecto a ADF y NDF, en nuestro estudio hemos encontrado diferencias significativas entre desi y kabuli, siendo mayor el contenido en desi que en kabuli. Estos resultados están de acuerdo con lo obtenido por otros autores los cuales habían señalado ausencia de solapamiento para estos componentes entre ambos grupos (Singh, 1984; Kharrat et al, 1990), lo que es explicable si consideramos que el 80% del contenido en estos dos tipos de fibras se encuentran en la cubierta de la semilla y los garbanzos desi poseen mayor grosor que los kabuli, estando este carácter controlado principalmente por un gen (Gil y Cubero, 1993). Nuestros resultados no sólo confirman todo lo anterior sino también la validez de la técnica del análisis de la varianza para detectar diferencias genéticas o genotípicas entre ambos grupos, como lo demuestra la gran importancia que tuvo en dicho análisis las diferencias entre desi y kabuli. El análisis de la varianza nos ha permitido también detectar mayor variación genotípica en desi que en kabuli para ambos componentes, no existiendo variación significativa para ADF en kabuli. Teniendo en cuenta que la diferencia entre NDF y ADF es la hemicelulosa

(NDF-ADF=hemicelulosa), podríamos decir de acuerdo con los resultados obtenidos en kabuli (variación significativa sólo para NDF), que la variación detectada en este grupo se debe principalmente a la hemicelulosa. Estos resultados obtenidos en kabuli se podrían explicar pensando que en nuestra área mediterránea donde los garbanzos kabuli se consumen como grano entero, el hombre inconscientemente al seleccionar para grano más tierno ha reducido la variabilidad que pudiera existir para ADF (celulosa + lignina) ya que los componentes de esta fibra podrían dar más dureza al grano. Celulosa y lignina son los principales constituyentes de la cubierta o cáscara de la semilla (Singh, 1984).

En el caso de los azúcares solubles totales, según los resultados obtenidos en nuestro estudio existen diferencias significativas entre los dos grupos desi y kabuli. En desi varió entre el 1.4% y el 3.5% y en kabuli entre el 2.3% y el 5.1% resultando significativa la variación dentro de cada grupo lo que indica que existe variación genética dentro de ellos para este carácter. Jambunathan y Singh (1980) encontraron ligeras diferencias entre desi y kabuli sin indicar si estas diferencias fueron significativas o no y por tanto si eran reales o puramente ambientales. En nuestro estudio se confirma que estas diferencias son genotípicas y que existe variación genética dentro de cada grupo. Los garbanzos tipo kabuli, que son los más importantes en nuestra zona, poseen un mayor contenido en azúcares solubles pero

como hemos visto en nuestro estudio preliminar, la calidad de estos azúcares no es muy buena debido a la alta presencia de azúcares no reductores, los cuales son los causantes de la producción de flatulencias. En este caso sería interesante buscar o seleccionar líneas para menor contenido en azúcares solubles totales, aunque habría que comprobar si existe correlación entre éstos y los azúcares responsables de las flatulencias.

De forma general, si consideramos los resultados obtenidos para los distintos componentes nutritivos estudiados, podemos decir que la variación observada ha sido principalmente genotípica, y explicada en un alto porcentaje por la presencia de dos grupos (kabuli y desi), siendo esta explicación máxima en el caso de ADF y NDF. Estos resultados estarían de acuerdo con la idea de considerar ambos grupos como dos fondos génicos distintos y de que los garbanzos tipo kabuli, más evolucionados, se originaron a partir de los desi, más primitivos (Moreno y Cubero, 1978; Salimath et al, 1984; Gil y Cubero, 1993).

Desde el punto de vista de la Mejora es muy importante conocer que parte de la variación de un carácter o parámetro es genética o ambiental, ya que esto condicionaría la respuesta a la selección y el método de mejora a emplear. El objetivo de la mejora es obtener una variedad que posea unas características estables que satisfagan las demandas del mercado. Para la mayoría de los parámetros químicos de la semilla evaluados en este

estudio la influencia ambiental o la dependencia genotipo-ambiente ha sido muy poco importante, lo que nos hace pensar que será fácil caracterizar variedades de garbanzo para estos compuestos químicos de acuerdo a las necesidades del mercado o de la industria. En el caso de proteína, como ya hemos comentado anteriormente, no será fácil esta caracterización, ya que según nuestros resultados esta puede variar significativamente de un año a otro, además de la interacción genotipo-año detectada.

El éxito en la búsqueda de líneas o variedades donde, se combinen caracteres deseados dependerá de la relación que exista entre ellos. Así por ejemplo, según nuestros resultados la obtención de líneas con alto contenido en oleico y linoleico a la vez resultaría imposible ya que aunque la correlación es alta y significativa, su sentido es diferente al que deseáramos. En este caso tendríamos que decidir en incrementar uno o el otro, sin perder de vista que la decisión que tomemos va a influir también en el contenido en grasa total. En los garbanzos tipo kabuli, según los resultados obtenidos en nuestro estudio sería fácil encontrar líneas con alto contenido en grasa y ácido oleico y bajo en fibra, estos podrían ser caracteres deseables desde el punto de vista de la calidad de la semilla, ya que el contenido en grasa aportaría cierto valor energético y posiblemente estuviese relacionado con una mejor palatabilidad de la semilla, así mismo el menor contenido de fibra podría constituir una semilla más tierna y con menor tiempo de cocción. Respecto al

contenido de azúcares solubles sería también fácil combinar los caracteres o parámetros anteriores, con un mayor contenido en estos, aunque sería necesario conocer la composición cualitativa de estos azúcares por el problema de las flatulencias, lo que sería motivo de nuevos estudios en este material. Siguiendo en esta línea, el contenido en proteína no se vería favorecido, ya que según nuestros resultados éste se encuentra correlacionado negativamente con grasa y azúcares, y positivamente con fibra. Sin embargo habría que tener en cuenta, en primer lugar, que la influencia ambiental ha sido muy fuerte en este carácter y que parte de esas correlaciones pueden ser puramente ambientales, y en segundo lugar, que un contenido en proteína alrededor de la media (22.7% a 23.8%) puede ser fácil de conseguir y podría ser un valor también aceptable desde el punto de vista nutritivo.

## **CONCLUSIONES**

**VI.- CONCLUSIONES:**

1.- La técnica de espectroscopia de la reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) puede utilizarse para el análisis simultáneo, rápido y fiable de múltiples componentes de la calidad nutritiva del garbanzo.

2.- Se han desarrollado ecuaciones de calibración para el análisis, mediante NIRS, de los siguientes componentes de la harina del garbanzo: proteína, grasa, ácido oleico, ácido linoleico, fibra ácido detergente, fibra neutro detergente y azúcares solubles totales. El análisis de todos estos componentes se realiza en menos de 1.5 minutos, sin destrucción de la muestra utilizada.

3.- La bondad de las ecuaciones de calibración obtenidas para cada uno de los parámetros dependió fundamentalmente del método de referencia utilizado y de la variabilidad existente en las muestras empleadas para la calibración.

4.- El análisis por reflectancia en el infrarrojo cercano puede ser considerado como una técnica óptima para el estudio de la calidad de la semilla del garbanzo en los programas de mejora genética y en todos aquellos procesos en que sea

necesario analizar en poco tiempo un elevado número de componentes en un elevado número de muestras.

5.- El contenido en proteína ha oscilado entre 17.5% y 27.2%. Nuestros resultados indican una fuerte influencia ambiental, pero a pesar de ello es posible seleccionar líneas estables de alto contenido en proteína, aunque habría que tener en cuenta que el valor de nitrógeno no proteico sea bajo.

6.- Los límites de variación para grasa encontrados en el total de nuestra colección son de 2.8%-5.9%. La variación encontrada para este caracter resultó altamente significativa, lo que indica que hay variación genotípica. La influencia del factor año sobre la variación total del contenido en grasa no fue significativa. En cambio resultaron significativas las diferencias entre desi y kabuli, y la variación genotípica dentro de cada grupo.

7.- Los ácidos grasos más importantes en las semillas del garbanzo fueron oleico y linoleico, siendo los contenidos medios de ácido oleico más altos en kabuli que en desi, y al contrario para el ácido linoleico.

8.- Las fibras ácido detergente (ADF) y neutro detergente (NDF) alcanzaron valores medios más elevados en desi que en kabuli, explicando estas diferencias casi el total de la

variación genotípica detectada en la colección. Para ADF no se encontró variación significativa dentro del grupo kabuli; por el contrario en el caso de NDF se encontró variación significativa tanto en desi como en kabuli, siendo mayor la detectada en desi.

9.- Para los azúcares solubles totales los valores más altos han correspondido a los garbanzos tipo kabuli, siendo el intervalo total en la colección de 1.4% a 5.1%. Las diferencias entre desi y kabuli fueron significativas y por tanto de tipo genético.

10.- En general, según nuestros resultados, la variación de componentes nutritivos del garbanzo ha sido principalmente genotípica y explicada en un alto porcentaje por la presencia de dos grupos (kabuli y desi). Esta variación ha sido superior en el grupo desi que en el grupo kabuli.

11.- Desde el punto de vista de la Mejora, es de esperar una buena respuesta a la selección de la mayoría de los parámetros estudiados, debido a la poca influencia que el ambiente tiene sobre ellos. Esto sugiere que estos parámetros pueden ser usados para caracterizar variedades comerciales. Las correlaciones obtenidas indican que será fácil combinar estos parámetros para mejorar la calidad de la semilla. No obstante son necesarios nuevos estudios para conocer las relaciones de los parámetros estudiados con la calidad culinaria de la semilla.

## **BIBLIOGRAFÍA**

VII.- BIBLIOGRAFÍA:

AL-AWAN (s. XII). *Libro de Agricultura*. Traducción de J. Banqueri, arreglada por Claudio Boutelou. Ed. Victoriano Suarez (1878), Sevilla y Madrid.

ALONSO DE HERRERA, G. 1513. *Obra de Agricultura*. Edición de 1970 por la Biblioteca de Autores Españoles. Madrid.

ALLARD, R. W. 1960. *Principles of Plant Breeding*. Eds. J., Wiley, y Sons, Inc. pp: 75-88.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMIST. 1978. *Approved Methods of the AACC 1978 Revisions: Methods 32-20*. Ed. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN.

ANDERSON, R.L., RACKIS, J.J. y TALLENT, W.H. 1979. Biologically active sustances in soy products. En: *Soy Protein and Human Nutrition*, Eds. H.L. Wilcke, D.T. Hopkins y D.H. Waggle, Academic Press, New York, pp: 209.

BAKER, D. y NORRIS, K.H. 1985. Near-Infrared Reflectance Measurement of Total Sugar Content of Breakfast Cereals. *Applied Spectroscopy*, 39: 618-621.

BELL, E.A. 1971. *Comparative Biochemistry of Non-Protein Amino*

- acids. En: *Chemotaxonomy of Leguminosae*, Eds. J.B. Harborne, D. Boulter y B.L. Turner. Academic Press, London y New York, pp: 179-206.
- BERARDO, N. 1992. Measuring Italian ryegrass quality by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). En: *Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy*, Ed. I. Murray y A. Cowe, U.K., pp: 272-276.
- BERGLUND-BRÜCHER, O. y BRUCHER, H. 1976. The South American wild bean (Phaseolus aborigineus Burk.) as ancestor of the common bean. *Econ. Bot.*, 30: 257-272.
- BHATTY, R.S., SOSULKI, F.W. y WU, K.K. 1973. Protein and non-protein nitrogen contents of some oilseeds and peas. *Can. J. Plant. Sci.*, 53: 651-657.
- BISTON, R., DARDENNE, P., CWIKOWSKI, M., WATHELET, J.-P. y SEVERIN, M. 1987. Analysis of quality parameters of whole rapeseed by NIRS. En: *Glucosinolates in Rapeseeds: Analytical Aspects*, Ed. J.P. Wathelet, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda, pp: 163-172.
- BISTON, R., DARDENNE, G., SINDIC, M., DARDENNE, P., WATHELET, B. y DE SOUSA, B. 1983. Near Infra-red spectroscopy as a rapid and accurate technique for estimating Lupinus seed protein and Vicia Faba seed amino acids and protein. En: *Perspectives for Peas and Lupins as Protein Crops*. Eds. R. Thompson y R. Casey, Martinus

Nihhoff Publishers, pp: 247-255.

BLANCO, M., COELLO, J., ITURRIAGA, H., MASPOCH, S., GONZALEZ, F. y POUS, R. 1992. Effect of the sample cell module and particle size on the NIRS determination of piracetam. En: *Near Infra-Red Spectroscopy Bridging the Gap between Data Analysis and NIR Applications*, Eds. K.I. Hildrum, T. Isaksson, T. Naes y A. Tandberg, U.K., pp: (64) 401-406.

CATÓN, M.P. S. II a.d.C.. *De Agricultura*. Edición Bilingüe de A.M. Perales (1976). Instituto de Historia del Derecho. Universidad de Granada.

CIURCZAK, E.W. 1992. NIR Analysis of Pharmaceuticals. En: *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Eds. D.A. Burns y E.W. Ciurczak, New York, pp: (20) 549-563.

CLARKE, G.C.S. y KUPICHA, F.K. 1976. The relationships of the genus *Cicer* L. (*Leguminosae*): the evidence from pollen morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 72: 35-44.

COLUMELA, L.J.M. S. I d.C. . *Los Doce Libros de Agricultura*, reimpresos por D. Vicente Tijanero, 348+328 pp. (1879), Madrid.

CUBERO, J.I. 1987. Morphology of chickpea. En: *The Chickpea*, Eds. M.C. Saxena y K.B. Singh, CAB International. ICARDA, pp: 35-66.

- CHANDRA, A. 1968. An estimation of protein ascorbic acid and mineral matter content in some indigenous and exotic varieties of gram (Cicer arietinum L.). *Current Science*, 37: 237-238.
- CHAVAN, J.K., KADAM, S.S. y SALUNKHE, D.K. 1986. Biochemistry and Technology of chickpea (Cicer arietinum L.) seeds. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25 (2): 107-158.
- CHOWDURY, K.A., SARASWAT, K.S., HASAM, S.N. y GAUR, R.G. 1971. 4.000-3.500 year-old barley, rice and pulses from Atranjikhera. *Science and Culture*, 37: 531-533.
- DARBY, W.J., GHALOUNGUI, P. y GRIVETTI, L. 1977. *Food: the gift of Osirus*. Academic Press, London, New York, San Francisco, pp: 685-687.
- DAUN, J.K., CLEAR, K.M. y WILLIAMS, P. 1994. Comparison of three whole seed near-infrared analyzers for measuring quality components of canola seed. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 71: 1063-1068.
- DE HARO, A. 1983. La calidad nutritiva de las leguminosas de grano y su control genético. En: *Leguminosas de grano*. Eds. J.I. Cubero y M.T. Moreno, Mundi-Prensa. Madrid. pp: 211-248
- DE HARO, A. 1984. Características de interés nutricional en Vicia Faba L. Posibilidad de mejora genética. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

DE HARO, A., MARTIN, A. y CUBERO, J.I. 1980. Studies on nutritional factors in Vicia Faba. En: *Vicia Faba Feeding Value, Processing and Viruses*, Ed. D.A. Bond, ECSC, EEC, EAEC, Bruselas, pp: 83-106.

DE HARO, A.; MARTIN, L.M.; LOPEZ, R. y MORENO, M.T. 1984. Variación de los componentes de la calidad en poblaciones de Lupinus albus L. autóctonos de la Península Ibérica. En: *Proceeding of the IIIrd International Lupin Conference*, La Rochelle (France), pp: 605-606.

DE HARO, A., JIMENEZ, D. y CUBERO, J.I. 1985a. Methodological aspects in quality breeding in legumes. En: *Proceeding of the Sixth Meeting of the Eucarpia Section Oil and Protein Crops*, Córdoba (Spain), pp: 63-82.

DE HARO, A., MARTIN, L.M., JIMENEZ, D. y MORENO, M.T. 1985b. Quality components in Lupinus Albus. En: *Proceedings of the Sixth Meeting of the Eucarpia Section Oil and Protein Crops*. Córdoba (Spain), pp: 141-152.

DE HARO, A. y MORENO, M.T. 1992. Variability of Nutritional Quality Components in Chickpea (Cicer arietinum L.) En: *Proceeding of the 1ª Conferencia Europeenne Sur les Proteagineux*, Angers (France), pp: 95-96.

DE SIMONE, F., MORRICA, P., RAMUNDO, E., SENATORE, F. y TACCONE,

- W. 1983. Free Amino acids from different cultivars of Vicia faba. *J. Agric. Food Chem.*, 31: 836-838.
- DIACHUK, V.R., HAMILTON, E., SAVCHUK, N. y JACKEL, S.S. 1981. Bakery flour control using Near Infrared Reflectance analysis. *Bakers Digest.*, 5: 55.
- DIXON, D.M. 1969. A note on cereals in ancient Egypt. En: *The Domestication of Plants and Animals*. Eds. P.J. Ucko y G.W. Dimbleby, Gerald Duckworth y Co. London.
- ELLISON, R., RENFREW, J., BROTHWELL, D. y SEELEY, N. 1978. Some Food Offerings from Ur, excavated by Sir Leonard Woolley, and previously unpublished. *Journal of Archeological Science*, 5: 167-177.
- EVANS, E.J., BILSBORROW, P., GRANT, A., KWIATKOWSKA, C.A., SPINKS, E.A., HEANEY, R.K. y FENWICK, G.R. 1989. A comparison of rapid X-Ray Fluorescence, Near Infrared Reflectance and glucose-release methods for the determination of the glucosinolate content of oilseed rape (Brassica oleracea). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49: 297-305.
- F.A.O. 1994. Anuario de Producción.
- FOWDEN, L. 1970. The Non-Protein Amino acids of plants. En: *Progress in Phytochemistry*, Ed. L. Reinhold y P. Liwshitz.

Interscience Publishers. London, pp: (2) 203-266.

GAPOCHKA, G.P. 1975. The pollen morphology of representative of the tribe Vicieae from the family Fabaceae. *PBA* 45 (1) Abs. 738.

GARCÉS, R. y MANCHA, M. 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh tissues. *Analytical Biochemistry*, 211: 139-143.

GHIRADI, P., MARZO, A y FERRARI, G. 1974. Lipids Classes and Total Fatty Acids Pattern of Cicer arietinum L.. *Phytochemistry*, 13: 755-756.

GIL, J. y CUBERO, J.I. 1993. Inheritance of seed coat thickness in chickpea (Cicer arietinum L.) and its evolutionary implications. *Plant Breeding*, 111: 257-560.

GIL, J., NADAL, S., LUNA, D., MORENO, M.T. y DE HARO, A. 1996. Variability of some physico-chemical characters in desi and kabuli chickpea types. *J. Sci. Food Agric.*, 71: 179-184.

GOWDA, C.L.L. 1981. Natural outcrossing in chickpea. *International Chickpea Newsletter*, 5: 6.

GROSS, R., HATZOLD, T., ELMADFA, I. y RUIZ, O. 1983. Genetically and environmentally dependent variability of protein and fat content in the seeds of Lupinus mutabilis of Peruvian origin.

Z. *Planzenzüchtg*, 90: 324-330.

HADSELL, D.L. y SOMMERFELDT, J.L. 1988. Chickpea as a Protein and Energy Supplement for High Producing Dairy Cows. *Journal Dairy Science*, 71: 762-772.

HAWTIN, G.C. y SINGH, K.B. 1980. Kabuli - desi introgression problems and prospects. En: *International Workshop on Chickpea Improvement*. ICRISAT, 1979, Hyderabad, India, pp: 51-60.

HELBAEK, H. 1970. The plant husbandry at Hacilar. En: *Excavation at Hacilar*. Ed. J. Mellaart, Edinburgh University Press, pp: 189-244.

HRUSCHKA, W.R. 1987. Data analysis: wavelength selection methods. En: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. Eds. P. Williams y K. Norris. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, EE.UU., pp. 35-56.

JAMBUNATHAN, R. y SINGH, U. 1980. Studies on Desi and Kabuli Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars I. Chemical Composition. En: *Proceeding of the International Workshop on Chickpea*, ICRISAT, Hyderabad, India. pp: 61-66.

JOSLYN, A. 1970. Extraction methods and separation processes. En: *Food Science Thechnology. A Series of Monographs*. Ed. A. Maynard. Joslyn. pp: 141-181.

- KAPLAN, L. 1965. Archeology and domestication in American Phaseolus. *Econ. Bot.*, 19: 358-368.
- KHANVILKAR, S.G. y DESAI, B.B. 1981. Genotypic variations in protein quality and nutritional composition of chickpea (Cicer arietinum L.). *Journal of Maharashtra Agricultural University*, 6: 226-228.
- KHARRAT, M. 1988. Genetique de caracteres lies au rendement et a la qualite dans le Cicer arietinum L. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- KHARRAT, M., JIMENEZ, M.D., GIL, J. y CUBERO, J.I. 1990. Genetics of some quality components in a desi kabuli cross. *ICN*, 22: 16-18.
- KOESTER, S. y PAUL, C. 1986. Establishing NIR calibrations for oil and protein content in rapeseed on the Pacific Scientific Scanning Monochromator 6250. *IV International NIR User Conference*.
- KOESTER, S. y PAUL, C. 1989. Application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) in breeding rapeseed for improved quality. En: *Book of Poster Abstracts, XII Eucarpia Congress*, Göttingen, Alemania, pp: (2) 31-4.
- KROBER, O.A. 1970. Effects of variety and location on the protein

content of pulses. *Indian J. Agric.*, 40: 1025-1030.

KUPICHA, F.K. 1977. The delimitation of the tribe Vicieae (leguminosae) and the relationships with Cicer L. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 74: 131-162.

LADIZINSKY, G. 1975. A new Cicer from Turkey. *Notes The Royal Botanic Garden. Edinburg*, pp: (34) 201-202.

LADIZINSKY, G. y ADLER, A. 1975. The origin of chickpea as indicated by seed protein electrophoresis. *Indian Journal of Botany.*, 24: 183-189.

LING, L.Y. y ROBINSON, R.J. 1976. Extracting and fractionating lipids from chickpea. *Cereal Foods World*, 21: 424.

LITTLE, T.M. y HILLS, F.J. 1976. *Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura*. Ed. Trillas, S.A., México.

M.A.P.A. 1994. Anuario de Estadística Agraria. pp: 88-104.

MALHOTRA, R.S. y SINGH, K.B. 1986. Natural cross pollination in chickpea. *International Chickpea Newsletter*, 14: 4-5.

MASCARENHAS FERREIRA, A., KERSTENS, J. y GAST, C.H. 1983. The study of several modifications of the neutral detergent fibre procedure. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 9: 19-28.

- MATHUR, K.S., WAHI, P.N. y SHARMA, R.D. 1963. Effect of Dietary Fats and Proteins on Serum Cholesterol and Lipid Phosphorus in Rats. *Journal of the Indian Medical Association*, 41: 379-383.
- MATHUR, K.S., SINGHAL, S.S. y SHARMA, R.D. 1964. Effect of Bengal Gram on Experimentally Induced High Levels of Cholesterol in Tissues and Serum in Albino Rats. *J. Nutrition*, 84: 201-204.
- MATHUR, K.S., KHAN, M.A. y SHARMA, R.D. 1968. Hypocholesterolaemic of Bengal Gram: a Long-term Study in Man. *Brit. Med. J.*, 1: 30-31.
- MCQUEEN, R.E. y NICHOLSON, J.W.G. 1979. Modification of the neutral detergent fibre procedure for cereale and vegetables by using  $\alpha$ -amylase. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62: 676-680.
- McCLURE, W.F. y HOY, R.M. 1990. Near-Infrared Instrumentation: Status, Trend, and Futuristic Concepts. En: *The 2nd International NIRS Conference*, Ed. M. Iwamoto y S. Kawano, National Food Research Institute, Japan. pp: 65-82.
- McCLURE, W.F. y WILLIAMSON, R.E. 1982. Rapid Spectrophotometric Analysis of the Chemical Composition of Tobacco. *Beitrag Zur Tabakforschung International*, 11: 219-227.
- MEANS, J.A. y MABRY, T.J. 1971. Alkaloids in the leguminosae. En: *Chemotaxonomy of Leguminosae*, Eds. J.B. Harborne, D. Boulter

- y B.L., Turner. Academic Press London y New York, pp: 73-178.
- MONFRE, S.L. y DETHOMAS, F.A. 1992. Non-destructive pharmaceutical tablet assay by near infrared spectroscopy. En: *Near Infra-Red Spectroscopy Bridging the Gap between Data Analysis and NIR Applications*, Eds. K.I. Hildrum, T. Isaksson, T. Naes y A. Tandberg, U.K., pp: (69) 435-440.
- MORENO, M.T. 1983. Las leguminosas de grano: una visión de conjunto. En: *Leguminosas de grano*. Eds. J.I. Cubero y M.T. Moreno, Mundi-Prensa, Madrid. pp: 15-33.
- MORENO, M.T. 1985. Variabilidad intraespecifica en Cicer arietinum L. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- MORENO, M.T. y CUBERO, J.I. 1978. Variation in Cicer arietinum L. *Euphytica*, 27: 465-468.
- MORREY, J.R. 1968. On determining spectral peak positions from composite spectra with a digital computer, *Anal. Chem.*, 40: 905-914.
- MOSSE, J. y PERNOLLET, J.C. 1983. Storage Proteins of Legume Seeds. En: *Chemistry and Biochemistry of Legumes*. Ed. S.K. Arora, pp: 111-193.
- MURRAY, I. 1993. *Forage analysis by Near Infra-Red Spectroscopy*,

*in Sward Measurement Handbook*, Eds. A. Davies, R.D. Baker, S.A. Grant y A.S. Laidlaw, The British Grassland Society, pp: 285-312.

NADAL, S. 1994. Variabilidad para parámetros de calidad en Cicer arietinum L. Proyecto fin de carrera, Córdoba, pp: 1-66.

NEWMAN, C.W., ROTH, N.J., NEWMAN, R.K. y LOCKERMAN, R.H. 1987. Protein Quality of Chickpea (Cicer arietinum L.). *Nutrition Reports International*, 36: 1-8.

Norma UNE 64-108-77, IRANOR, 1977.

NORRIS, K.H. 1964. Reports on desing and development of a new moisture meter. *Agric. Eng.*, 45: 370-372.

NORRIS, K.H. y HART, J.R. 1965. Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds. En: *Principles and methods of Measuring moisture in Liquid and Solids*. Ed. A. Wexler, Reinhold, New York, pp: (4) 19-25.

NORRIS, K.H. y WILLIANS, P.C. 1984. Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. Influence of particle size. *Cereal Chem.*, 61: 158-165.

NOZZOLILLO, C. 1985. Seedling morphology and anatomy of eight Cicer species and their taxonomic value. *Canadian Journal*

*of Botany.*, 63: 1-6.

OCAMPO, B. 1995. Estudio de las especies anuales del género *Cicer* L.: Aplicación a la mejora genética de *Cicer arietinum* L. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

OOTAKE, Y. 1992. Determination of individual sugar and acid contents in tomatoes in the fluid state by NIRS, and an improvement of calibration equations using manual selection of wave lengths. En: *Near Infrared Spectroscopy Bridging the Gap between Data Analysis and NIR Applications*, Eds. K.I. Hildrun, T. Isaksson, T. Naes y A. Tandberg, U.K., pp: 371-376.

OSBORNE, T.B. 1924. *The Vegetable Proteins*. 2nd edition. Longmans, Green Co., New York.

OSBORNE, D.R. y VOOGT, P. 1986. Proteínas y compuestos nitrogenados. En: *Análisis de los nutrientes de los alimentos*, Ed. Acribia S.A., Zaragoza, pp: 118-135.

OSBORNE, B.G., FEAR, T. y HINDLE, P.H. 1993. *Practical NIR Spectroscopy with applications in food and beverage analysis*, Ed: Longman Scientific y Technical, U.K. pp: 13-199.

PASSMORE, R., NICOL, B.M., NARAYAMA RAO, M., BEATON, G.H. y DEMAUYER, E.M. 1975. *Manual sobre necesidades nutricionales del hombre*, Ed. por FAO y OMS, Roma.

PLEINES, S. y FRIEDT, W. 1988. Breeding for improved C18-fatty acid composition in rapeseed (Brassica napus L.). *Fat Sci. Technol.*, 90: 167-171.

PUSHPAMMA, P. y GEERVANI, P. 1987. Utilization of Chickpea. En: *The Chickpea*, Eds. M.C. Saxena y K.B. Singh, CAB International. ICARDA. pp: 357-368.

REDDY, N.R., SALUNKLE, D.K. y SHARMA, R.P. 1980. Flatulence in rats following ingestion of cooked and germinated black gram and a fermented product of black gram and rice blends. *J. Food Sci.*, 45: 1161.

REINHARDT, T.C., PAUL, C. y ROBBELEN, G. 1992. Quantitative analysis of fatty acids in intact rapeseed by NIRS. En: *Making Light Work. Advances in Near Infrared Spectroscopy*, Eds. I. Murray y I., Cowe, VCH, Londres, Reino Unido, pp: 323-327.

REINHARDT, T.C. y ROBBELEN, G. 1991. Quantitative analysis of fatty acids in intact rapeseed by near infrared reflectance spectroscopy. En: *Proc. 8th Int. Rapeseed Conf.*, Saskatoon, Canadá, pp: 1380-1384.

RIBAILLIER, D. y MAVIEL, M.F., 1984. El análisis de los granos oleaginosos por espectroscopia de reflexión en el próximo Infrarrojo. *Informations Techniques CETIOM*, 4: 15-30.

ROBERTSON, J.B. y VAN SOEST, P.J. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. En: *The Analysis of Dietary Fiber in Food*, Ed. W.P.T. James y O. Theander. Dekker. New York, pp: 123-158.

ROJAS, E. 1983. La fibra en la alimentación humana. *El Medico*, 88.

RÖTTELE, J., BENDA, S. y RAU, B. 1995. Determination of residual moisture in lyophilized pharmaceutical products through intact glass vials: validation of the NIR-method. En: *Leaping Ahead with Near Infrared Spectroscopy*, Eds. G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Welsh y A.B., Blakeney, Australia, pp: 405-411.

SALIMATH, P.M., BAHL, P.N. y MEHRA, R.B. 1984. Genetic diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung*, 92 (1): 52-60.

SAN ISIDORO DE SEVILLA S. VI-VII. *Etimologias*. Edición de L.Cortés y Góngora (1951), Biblioteca de Autores Cristianos, Madrid.

SAS Institute. 1991. SAS user's guide. Version 6.03 ed. SAS Inst., Cary, NC.

SATO, T., TAKAHATA, Y., NODA, T., YANAGISAWA, T., MORISHITA, T. y SAKAI, S. 1995. Nondestructive Determination of Fatty Acid

Composition of Husked Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds by Near-Infrared Spectroscopy. *JAACS*, 72: 1177-1183.

SAXENA, M.C. 1980. Recent advances in chickpea agronomy. En: *Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvement*, Hyderabad, India. ICRISAT, Patancheru, India, 89-96.

SCHILLING, D., BOTTLANG, L. y DAMMERTZ, W. 1995. Near infrared transmission analysis of intact pharmaceutical tablets. En: *Leaping Ahead with Near Infrared Spectroscopy*, Eds. G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Welsh y A.B. Blakeney, Australia, pp: 442-445.

SCHMUETZ, W. 1983. Determination of quality components in *Vicia faba* and *Pisum sativum* by Near-Infrared-Spectroscopy. En: *Strategies in Breeding of Oil and Protein Crops, Fifth Meeting of the Eucarpia (Section Oil and Protein Crops)*, Ed. G. Robbelen, Wageningen, The Netherlands, pp: 58-64.

SHANDU, S.S., KEIM, W.F., HODGES, H.F. y NYQUIST, W.E. 1974. Inheritance of protein and sulfur content in seeds of chickpeas. *Crop Science*, 14: 649-652.

SHENK, J.S., WORKMAN JR, J.J. y WESTERHAUS, M.O. 1992. Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products. En: *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Ed. D.A. Burns, E.W. Ciurczak, New York,

pp: 383-431.

SHOBHANA, SANGAWAN, P.S., NAINAWATEE, H.S. y LAL, B.M. 1976. Chemical composition of some improved varieties of pulses. *Journal of Food Science and Technology*, 13: 49-51.

SINGH, U. 1984. Dietary fiber and its constituents in desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Nutrition Report International*, 29: 419-425.

SINGH, U. y JAMBUNATHAN, R. 1981. Relationship between non-protein nitrogen and total nitrogen in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29: 423-424.

SINGH, U., KUMAR, J., JAMBUNATHAN, R. y SMITHSON, J.B. 1980. Variability in the seed coat content of desi and kabuli chickpea cultivars. *International Chickpea Newsletter*, 3: 18.

SINGH, U., KHERDEKAR, M.S. JAMBUNATHAN, R. 1982. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. The level of amylase inhibitors, levels of oligosaccharides and in vitro starch digestibility. *Journal of Food Science*, 47: 510-513.

SINGH, U., KUMAR, J. y GOWDA, C.L.L. 1983. The content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown at different locations in India. *Qualitas Plantarum*, 32: 174-184.

SINGH, K.B., BEJIGA, G. y MALHOTRA. 1990. Associations of some characters with seed yield in chickpea collections. *Euphytica*, 49: 83-88.

SINGH, U., SUBRAHMANYAM, N. y KUMAR, J. 1991. Cooking Quality and Nutritional Attributes of Some Newly Developed Cultivars of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 55: 37-46.

SMARTH, J. 1976. *Tropical Pulses*. Pub. London, U.K., Songman Group Limited. pp: 348.

SOSULSKI, F.W. y GADAN, H.M. 1988. Variations in lipid composition among chickpea cultivars. *JAACS*, 65: 369-372.

STARR, C., SUTTLE, J., MORGAN, A.G. y SMITH, D.B. 1985. A comparison of sample preparation and calibration techniques for the estimation of nitrogen, oil and glucosinolate content of rapessed by near infrared spectroscopy. *J. Agric. Sci.*, 104: 317-323.

STATISTIX, 1994. Versión 4.1. Analytical Software.

STEEL, R.G.D. y TORRIE, J.H. 1985. *Bioestadística: Principios y procedimientos*, Ed. McGraw-Hills, Méjico.

TEOFRASTO S. IV a.d.C. 1970. *Historia de las plantas*, traducción de J.M. Díaz Regañón, Ed. Gredos (1988), Madrid.

TKACHUK, R. 1981. Oil and protein analysis of whole rapeseed kernels by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58: 819-822.

VALCÁRCEL, 1767. *Agricultura general y gobierno de la casa de campo*. Valencia.

VAN DER MAESEN, L.J.G. 1972. *Cicer L. A monograph of the genus whit special reference to the chickpea (Cicer arietinum L.) its ecology and cultivation*. Ed. H., Veeman y N.V., Zonen. Wageningen.

VAN SOEST, P.J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 46: 828-835.

VAN SOEST, P.J. y WINE, R.H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plants cell wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 50: 50-55.

VAN DER MAESEN, L.J.G. 1987. Origin, history and taxonomy of chickpea. En: *The Chickpea*, Eds. M.C. Saxena y K.B. Singh, CAB International. ICARDA. pp: 11-34.

VARRÓN, M.T. S. I a.d.C.. *De Re Rustica*, Ed. J. Henrgon y Ch. Guirand, Les Belles Lettres (1978-1985), Paris, Francia.

VELASCO, L. 1996. Utilización de mutagénesis química y análisis por reflectancia en el infrarrojo cercano para la mejora de la calidad de la mostaza etíope. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

VELASCO, L., MARTIN, L.M. y DE HARO, A. 1992. Determination of protein and oil contents in Lupinus albus by N.I.R.S.. En: *Near Infra-Red Spectroscopy bridging the gap between data analysis and NIR applications*, Eds. K.I. Hildrum, T. Isaksson, T. Naes y A. Tandberg, U.K., pp: 287-292.

VISHNU-MITRE, A. 1974. The beginnings of agriculture: Palaeobotanical evidence in India . En: *Evolutionary Studies in World Crops: Diversity and change in the Indian sub-continent*, Ed. Sir J.B., Hutchinson, Cambridge University Press., pp: 23-24.

WATHELET, J.-P., DARDENNE, P., MARLIER, M., SEVERIN, M., y BISTON, R. 1989. Fast analysis of quality of rapeseed by NIRS. En: *Book of Poster Abstracts*, XII Eucarpia Cong., Göttingen, Alemania, pp: (2) 31-3.

WEILER, H. y SARINAS, S. 1995. Non-destructive quality control of pharmaceutical tablets by near infrared reflectance spectroscopy. En: *Leaping Ahead with Near Infrared Spectroscopy*, Ed. G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Welsh y A.B. Blakeney, Australia, pp: 412-416.

WILLIAMS, P.C. 1973a. The application of the Neotec Grain Quality Analyzer to the analyses of cereal grains and oilseeds. I. Preliminary observations. (Abstr.). *Cereal Sci. Today*, 18: 272.

WILLIAMS, P.C. 1973b. The application of the Neotec Grain Quality Analyzer to the analyses of cereal grains and oilseeds. II. Technical aspects of operation. (Abstr). *Cereal Sci. Today*, 18: 272.

WILLIAMS, P. y NORRIS, K. 1987. Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. *American Association of Cereal Chemists Inc.*, 247-90.

WILLIAMS P.C. y SINGH U. 1987. Nutritional quality and the evaluation of quality in breeding programmes. En: *The chickpeas*, Ed. M.C. Saxena y K.B. Singh, pp: 329-356.

WILLIAMS, P.C. y SINGH, U. 1988. Quality screening and evaluation in pulse breeding. En: *World Crops: Cool Season Food Legumes. Conference on Pea , Lentil, Faba Bean and Chickpea*, Ed. R.J. Summerfield, pp: 445-457.

WINDHAM, W.R., MARTEN, D.R. y BARTON, F.E. 1989. Protocols for NIRS calibration: sample selection, equation development and validation. En: *Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of forage quality*, Eds. G.C. Marten, J.S. Shenk y F.E. Barton, Usdaars. Agricultural Handbook n° 643 pp: 96-103.

ZOHARY, D. y HOPF, H. 1973. Domestication of pulses in the old world. *Science*, 182: 887-894.

DIEGO JESUS LUNA MOYANO

"Evaluación de parámetros de calidad de la semilla en Cicer Arvelinum L."

Apto cum Laude

16

Diciembre

97

~~H. Cte~~

~~J. M. L.~~

~~Diego J. Luna Moyano~~

H. Cte

R. Guillén Sans

Diego J. Luna Moyano