

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. VARIEDADES.

Para el presente trabajo, se utilizaron granos de diez variedades de sorgo que son usados en la alimentación del ganado bovino de engorda.

Las variedades bajo estudio fueron las siguientes: Master Victoria, Master Te-y-75, Master Gold-R, Pronase RB-3030, Master 911R, Master Te-dinero, Master Te-y-101-R, Master Te-y-77, Master BI-83 y Master RB-3006. Los granos, cosechados en el estado de Tamaulipas, fueron proporcionados gentilmente por la empresa Agropecuaria Escobedo, S de P.R. de R.L.

4.2. ESTUDIO MORFOLOGICO.

La descripción morfológica del grano se hizo según el sistema implementado por el International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), consistente en los siguientes parámetros: color del grano, (blanco, amarillo, rojo, café y ante); textura del endospermo (completamente córneo, casi córneo, parcialmente córneo, casi córneo almidonado); color del endospermo (B, blanco; A, amarillo y S, sacarino); brillo del grano (B, brillante; N, no brillante) y forma de la semilla

(I, individual; D, doble).

El aspecto del endospermo se realizó a juicio personal.

4.3. MICROSCOPIO OPTICO.

Metodología y Técnicas utilizadas para el estudio de las estructuras del grano de sorgo en el Microscopio Optico:

Para las observaciones y cuantificaciones de las estructuras, se realizaron cortes transversales del grano a nivel medio del embrión, utilizándose inclusión en parafina (modificada por Alvarado, 1989), y tinción con azul de anilina; para cortes semifinos, se siguió la técnica modificada de inclusión en resina epóxica Durcupan, reportada por Lux (1981), y tificando con fucsina básica y azul de toluidina.

Para cada estructura, la determinación de sus medidas se hizo realizando cinco mediciones en cinco granos diferentes de la misma variedad y registrando los valores en micrómetros. De ésta manera, para cada estructura se obtuvo un total de 25 mediciones por variedad. Los parámetros considerados fueron: grosor del epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El grosor del pericarpio para los granos de cada variedad, se consideró como la sumatoria de las medias del grosor del epicarpio, mesocarpio y endocarpio, por lo cual, no se aplicó análisis de varianza a este dato; sólo se muestran los valores en el

CUADRO II y en la gráfica de la FIGURA 4. Del mesocarpio, también se midió el largo de las células. Del endospermo se tomaron el largo y ancho de las células, tanto de la aleurona como de las porciones periféricas, córneo y harinoso.

PREPARACION DE LOS CORTES USANDO INCLUSION EN PARAFINA Y TINCION CON AZUL DE ANILINA (modificado por Alvarado, 1989).

- 1.- Obtención del material: para este estudio se obtuvieron cinco granos de cada variedad.
- 2.- Fijación: la fijación se realizó en AFA durante 48 horas.
- 3.- Deshidratación: la deshidratación se realizó en alcohol etílico. Se utilizaron las siguientes concentraciones: alcohol 70%, 75%, 80%, 90%, 95% y 100% durante dos horas en cada uno de ellos.
- 4.- Clarificación: mezcla de alcohol-xilol (1:1) durante 12 hrs. mínimo.
- 5.- Inmersión en xilol puro por seis horas.
- 6.- Infiltración en parafina, durante un mínimo de 48 horas a 60°C.

- 7.- Inclusión de las piezas en parafina, orientándolas adecuadamente.
- 8.- Enfriar rápidamente en un baño de agua fría y guardar en refrigeración hasta el endurecimiento de la pieza.
- 9.- Retirar el bloque de parafina del molde y cortarlo en forma de una pirámide.
- 10.-Obtención de los cortes en el microtomo de parafina (Microtomo American Optical, Model 820, Serie 15903).
- 11.-Extender los cortes sobre la superficie de un Baño María.
- 12.-Montaje de los cortes en albúmina.
- 13.-Desparafinar en xilol puro por 12 horas.
- 14.-Inmersión en Xilol durante 5 minutos.
- 15.-Transferir en Alcohol absoluto, 96% y 80% durante 3 minutos en cada solución.
- 16.-Lavar en agua destilada durante 1 minuto.
- 17.-Teñir con azul de anilina durante 5 minutos.

18.-Deshidratar sucesivamente en alcohol 80%, 96% y absoluto (5 minutos en cada solución).

19.- Introducir en xilol por 5 minutos.

20.-Montaje en resina sintética.

PREPARACION DE LOS CORTES SEMIFINOS USANDO INCLUSION EN RESINA EPOXICA DURCUPAN Y TINCION CON FUCSINA BASICA Y AZUL DE TOLENTINA (modificada por Lux, 1981)

1.-OBTENCION DE LA MUESTRA: se realiza un corte del grano a nivel del embrión, obteniéndose todo el diámetro y después se vuelve a cortar a la mitad. El volúmen de la muestra debe ser aproximadamente 1 mm^3 .

2.-FIJACION: la fijación se lleva a cabo en dos pasos, primero una fijación con glutaraldehído del 3-5% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.2 a una temperatura de 20°C de 3 a 5 horas. Después de ese tiempo, se lava con

amortiguador de fosfatos, cambiando la solución 10 veces con un tiempo de 1 - 2 horas (se puede quedar con amortiguador hasta otros días). Enseguida, se lleva a cabo una post-fijación con tetraóxido de osmio al 2% en el mismo amortiguador de fosfatos con un tiempo de 1 a 2 horas a temperatura de laboratorio. Concluido el tiempo, se procede a lavar con el amortiguador de fosfatos, cambiando la solución diez veces con un tiempo de 1 a 2 horas (se puede quedar la muestra en el amortiguador hasta el siguiente día).

3.-DESHIDRATACION:

en acetona al 30%, 15 minutos; acetona al 50%, 30 minutos ; acetona al 70%, 30 minutos; acetona al 90%, 30 minutos; acetona al 100%, 30 minutos.

4.-OXIDO DE PROPILENO:

dos cambios de 15 minutos.

5.-INCLUSION EN RESINA EPOXICA DURCUPAN:

A)Durcupan No. 1: Acetona absoluta (1:3), 1 hora a 20°C.

B)Durcupan No. 1: Acetona absoluta

. 1020091627

- (2:2), 1 hora a 20°C.
- C) Durcupan No. 1: Acetona absoluta
(3:1), 1 hr. a 20 °C
- D) Durcupan No. 1 puro, durante toda la noche a 20°C.
- E) Durcupan No. II, 20 minutos a 60°C.
- F) Durcupan No. II, incluir en cápsulas durante 48 horas a 70°C (polimerización).

6.-OBTENCION DE CORTES SEMIFINOS: se empleó un ultramicrotomo Sorvall MT-1 con acercamiento manual obteniéndose cortes con un grosor aproximado de 0.25 μ m, los cuales se depositan en la solapa de la cuchilla.

7.-Sobre una gota de agua colocada en un portaobjetos, se transfieren los cortes elegidos, empleando para ello un aro de alambre.

8.-Se deposita enseguida una gota de azul de toluidina y el portaobjetos se calienta colocándolo sobre una placa térmica a una temperatura aproximada de 60°C durante tres minutos.

9.-Se agrega una gota de agua y una gota de fucsina básica y repite la misma operación indicada para el azul de toluidina.

10.-La preparación se lava con una gota de agua destilada, y ésta se retira con un papel secante. Los portaobjetos se dejan secar a temperatura ambiente.

NOTA: La intensidad de la coloración se puede regular modificando la concentración del colorante, el tiempo de tinción y la temperatura aplicada.

11.-Los cortes preparados en esta forma se pueden observar directamente al microscopio o bien adicionar resina sintética y depositar un cubreobjetos para obtener una preparación permanente.

12.-Las fotomicrografías fueron obtenidas usando un fotomicroscopio marca Zeiss, utilizando los objetivos 6.3x y 16x y un ocular de 1.6x.

4.4 MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO.

Para su estudio al microscopio electrónico de barrido, los granos limpios fueron sometidos a la técnica de fractura.

El trozo se colocó sobre un portamuestras pegándose con pintura de plata y posteriormente se le da un baño de oro con el recubridor de capa fina (Jeol, JFC 1100), para su

observación al microscopio electrónico de barrido (Joel, JSM-35). Las observaciones se hicieron con un voltaje de aceleración de 12 - 15 Kv, con tiempos cortos de exposición al impacto de los electrones sobre la muestra. La fotografía se realizó usando película Kodak VP-120.

Las estructuras fotografiadas para posteriores mediciones fueron: granos de almidón del mesocarpio, granos de almidón y cuerpos de proteína de los endospermos periférico, córneo y harinoso. El número de mediciones realizadas para cada estructura fué de 25.

4.5 ANALISIS QUIMICO NUTRICIONAL.

El análisis químico proximal de las muestras, consistió en la determinación de: humedad, cenizas, extracto etéreo, fibra cruda, proteína cruda y extracto libre de nitrógeno. Para ello se siguieron los métodos recomendados por la A.O.A.C. (Association Official Agricultural Chemist, 1975).

El análisis nutricional consistió de las siguientes pruebas: digestibilidad *in vitro* de la proteína con pepsina, digestibilidad de proteína en el rúmen de un animal fistulado durante 24 horas, digestibilidad del almidón en el rúmen de un animal fistulado durante 24 horas, contenido de almidón, contenido de taninos como equivalentes de catequina en mg/g y calorías totales. Las primeras cuatro fueron realizadas en

la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y los datos nos fueron proporcionados gentilmente por la Agropecuaria Escobedo. El contenido de taninos, fué analizado por el método del ácido clorhídrico-vanillina modificado y reportado por Robert E. Burns (1971), el cual se describe enseguida:

- 1.-La técnica se realizó por duplicado.
- 2.-Se utiliza un gramo de grano de sorgo molido a 20 mesh o más fino.
- 3.-La muestra se deposita en un matraz Erlenmeyer de 250ml y se agregan 25 ml de HCl al 1% en metanol.
- 4.-La mezcla se mantiene en agitación durante 24 horas.
- 5.-Después de un breve reposo, se toma el sobrenadante y se centrifuga a 1,500 r.p.m. durante siete minutos.
- 6.-Se toman 2 ml del sobrenadante y se depositan en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm, se le agregan 4 ml de Vanillina-HCl, dejándose reposar durante 20 minutos.
- 7.-La intensidad del color desarrollado se lee en el espectrofotómetro Beckman DV-20 a una longitud de

onda de 500 nm.

Las calorías totales derivadas de proteína, grasa y carbohidratos, se determinaron mediante la aplicación de factores específicos a partir de los datos de Atwater (Energy Value of Foods. U.S.D.A. Agriculture Handbook No. 74.

4.6 ANALISIS ESTADISTICO.

Para el análisis químico y nutricional de las diez variedades de sorgo, se utilizó el análisis de varianza con la modificación de arco seno para los datos, por presentarse en porcentajes (Daniels, 1984); a excepción de los siguientes: contenido de taninos por estar los datos en mg/g; calorías totales en Kcal. A los anteriores se les aplicó un análisis de varianza normal. Al contenido de cenizas, cuyos datos se determinaron en porcentajes, no se le pudo aplicar el análisis de varianza con la modificación de arco seno, por ser muy pequeños los valores (uno y fracción), lo cual se convierte en cero al aplicar esta prueba. Sólo se presentan los datos en la CUADRO III y la gráfica del contenido de cenizas para los granos de las diez variedades. FIGURA 52.

En los casos donde hubo diferencias, la comparación entre medias se realizó mediante la prueba de Tukey empleando el paquete SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), el

cual fué empleado también para el análisis de varianza así como para la correlación múltiple de Pearson entre las doce variedades de lo químico y nutricional a un nivel de significancia de 0.5.

Para las variables anatómicas de grosor del epicarpio, mesocarpio y endocarpio; tamaño de las células del mesocarpio; tamaño de los gránulos de almidón del mesocarpio; largo y ancho de las células del endospermo periférico, córneo y harinoso; tamaño de los gránulos de almidón y proteína del endospermo periférico, córneo y harinoso; se realizó primeramente un análisis de varianza y en los casos en que hubo diferencias, la prueba de Tukey determinó qué porción de variables eran diferentes; así como los subgrupos de homogenidad y similitud entre las diez variedades. Todo esto se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 3.1 y en un nivel de significancia de 0.5.

Posteriormente, y utilizando el paquete señalado se realizó una correlación múltiple de Pearson, entre las diecinueve variables, a un nivel de significancia de 0.5. Por último se realizó una correlación de Pearson con el mismo paquete (SPSS) en los parámetros químico-nutricionales y entre los parámetros anatómicos y químico-nutricionales.