

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**CARACTERIZACIÓN DE LA CALIDAD DE LOTES DE MAÍZ  
(*Zea mays* L.) PARA SU USO COMO SIMIENTE A TRAVÉS DE  
ENSAYOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**

**MIRIAM RAQUEL ARANGO PEREARNAU**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS**

**DIRECTOR: Ing. Agr. Dra. Adriana Rita Salinas**  
**CO- DIRECTOR: Ing. Agr. Ph. D Roque Mario Craviotto**

**AÑO 2018**

**CARACTERIZACIÓN DE LA CALIDAD DE LOTES DE MAÍZ  
(*Zea mays* L.) PARA SU USO COMO SIMIENTE A TRAVÉS DE  
ENSAYOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**

Miriam Raquel Arango Perearnau

Ingeniera Agrónoma, UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la EEA Oliveros del INTA en la provincia de Santa Fe de República Argentina, durante el período comprendido entre 2007 y 2016, bajo la dirección de la Dra. Adriana Rita Salinas y del Ph. D Roque Mario Craviotto.

Nombre y firma del Doctorando

Nombre y firma del Director

Nombre y firma del Co - Director

Defendida: .....de 20\_\_.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Adriana Salinas por su valiosa participación en la dirección, redacción, minuciosa corrección y apreciadas sugerencias.

Al Ing. Agr. Ph.D Roque Craviotto, colega y amigo, por su orientación, colaboración y apoyo en la ejecución de este trabajo y en toda una vida profesional.

A la Lic. Ivana Barbona por su valiosa participación en el asesoramiento estadístico.

Al Ing. Agr. Sergio Kats y a la empresa NIDERA por el aporte del material vegetal utilizados en la investigación.

Al Ing. Agr. Carlos Périgo por su valioso apoyo en la ejecución de los análisis químicos.

A las alumnas de grado de la Facultad de Ciencias Agrarias Judith Seguetti y Betiana Canavese por su apreciada colaboración en las pruebas de laboratorio y el armado de las bases de datos.

A mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros Teresa Insaurralde y Marcelo Fared por la colaboración y asistencia en todos mis pedidos.

A Marta Montero y Carina Gallo por la ayuda incondicional y sabio consejo durante todo el proceso.

A mi familia por la comprensión, la paciencia y el ánimo que me brindaron durante todo el tiempo que me insumió la realización de este proyecto.

*A las siguientes instituciones:*

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la República Argentina.

Al Centro Regional Santa Fe.

A la Estación Experimental Agropecuaria de Oliveros.

A la Facultad de Ciencias Agrarias.

A la Universidad Nacional de Rosario.

*Por el apoyo económico invertido en mi formación.*

## **Dedico este trabajo**

A las personas más importantes de mi vida:

mis padres *Armonía* y *Sebastián*.

mi esposo *Daniel* y mi hijo *Mauricio*.

Por el amor, la comprensión, la tolerancia y su constante apoyo.

## **Publicaciones y Presentaciones a Congresos**

### **CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE CARIOPSES DE DOS HÍBRIDOS DE MAÍZ LUEGO DEL ESTRÉS PROVOCADO EN DISTINTAS PRUEBAS DE VIGOR**

Arango, Miriam; Barbona, Ivana.; Craviotto, Roque; Salinas, Adriana.

XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal - XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, Argentina, del 21 al 24 de septiembre de 2014.

### **PRUEBA DE INMERSIÓN EN AGUA CORRIENTE COMO HERRAMIENTA PARA DISCRIMINAR CALIDAD EN LOTES DE MAÍZ (*Zea mays* L.)**

Arango, Miriam R.; Barbona, Ivana G.; Craviotto, Roque M.; Salinas, Adriana R.

XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Argentina, 4 y 5 de diciembre de 2014.

### **CARACTERIZACIÓN DE LA CALIDAD DE LOTES DE MAÍZ (*Zea mays* L.) PARA SU USO COMO SIMIENTE A TRAVÉS DE ENSAYOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**

Arango, Miriam R.; Barbona, Ivana G.; Craviotto, Roque M.; Salinas, Adriana R.

XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Argentina, 4 y 5 de diciembre de 2014.

# Índice

	<b>Pág.</b>
Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Presentaciones a Congresos.....	v
Índice.....	vi
Abreviaturas y Símbolos.....	x
Lista de figuras	xiii
Lista de tablas	xvii
Resumen	xxi
Abstracts	xxiii
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>DESCRIPCIÓN DE LA CALIDAD INICIAL DE SEMILLAS DE SEIS LOTES DE HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ</b>	<b>8</b>
<b>1.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 OBJETIVO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.1 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS LOTES DE MAÍZ.....</b>	<b>15</b>
1.3.1.1 Determinación del Contenido de humedad .....	15
1.3.1.2 Peso de 1000 cariopses.....	17
1.3.1.3 Identificación del nivel de daño mecánico .....	18
1.3.1.4 Pruebas de germinación .....	20
1.3.1.5 Prueba topográfica por tetrazolio.....	25
1.3.1.6 Prueba de tetrazolio de aleurona .....	32
1.3.1.7 Prueba de conductividad eléctrica.....	36
<b>1.3.2 PRUEBAS DE EMERGENCIA A CAMPO .....</b>	<b>38</b>

	<b>Pág.</b>
<b>1.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b> .....	39
<b>1.4 RESULTADOS</b> .....	40
<b>1.4.1 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS LOTES</b> .....	40
1.4.1.1 Determinación del Contenido de humedad .....	40
1.4.1.2 Peso de 1000 cariopses.....	40
1.4.1.3 Identificación del nivel de daño mecánico.....	41
1.4.1.4 Pruebas de germinación .....	43
1.4.1.5 Prueba topográfica por tetrazolio.....	45
1.4.1.6 Prueba de tetrazolio de aleurona .....	49
1.4.1.7 Prueba de conductividad eléctrica .....	54
<b>1.4.2 PRUEBAS DE EMERGENCIA A CAMPO</b> .....	55
<b>1.4.3 CORRELACIONES ENTRE PRUEBAS DE LABORATORIO Y LA EMERGENCIA A CAMPO</b> .....	58
<b>1.5 DISCUSIÓN</b> .....	59
<b>1.6 CONCLUSIONES</b> .....	70
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>EVALUACIÓN DE DISTINTAS PRUEBAS DE LABORATORIO PARA ESTIMAR EL VIGOR EN SEIS LOTES DE HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ</b>	
	71
<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	71
<b>2.2 OBJETIVO</b> .....	77
<b>2.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	77
<b>2.3.1 PRUEBAS DE VIGOR</b> .....	78
2.3.1.1 Prueba de germinación en frío .....	78
2.3.1.2 Prueba de inmersión en agua .....	80
2.3.1.3 Prueba de envejecimiento acelerado .....	82
2.3.1.4 Prueba de frío modificada .....	84
2.3.1.5 Prueba de frío saturada .....	87
<b>2.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	90
<b>2.4 RESULTADOS</b> .....	93
2.4.1 Prueba de germinación en frío.....	93
2.4.2 Prueba de inmersión en agua .....	95

	<b>Pág.</b>
2.4.2.1 Prueba de inmersión en agua a 23 °C .....	96
2.4.2.2 Prueba de inmersión en agua a 10 °C .....	99
2.4.2.3 Prueba de inmersión en agua a 7,5 °C .....	101
2.4.3 Prueba de envejecimiento acelerado .....	104
2.4.3.1 Prueba de envejecimiento acelerado 41 °C durante 72 horas.....	104
2.4.3.2 Prueba de envejecimiento acelerado 45 °C durante 72 horas.....	106
2.4.3 Prueba de frío modificada .....	108
2.4.3.1 Prueba de frío modificada a 10°C .....	108
2.4.3.2 Prueba de frío modificada a 7,5 °C .....	110
2.4.3.3 Prueba de frío modificada a 5 °C .....	111
2.4.4 Prueba de frío saturada .....	113
<b>2.4.5 CORRELACIONES ENTRE LAS PRUEBAS DE VIGOR, LA EMERGENCIA A CAMPO Y PGE .....</b>	<b>115</b>
<b>2.4.6 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....</b>	<b>119</b>
<b>2.5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>137</b>
<b>2.6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>147</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE CARIOPSES DE DOS LOTES DE HÍBRIDOS DE MAÍZ LUEGO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR DISTINTAS PRUEBAS DE VIGOR .....</b>	<b>149</b>
<b>3.1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>149</b>
<b>3.2 OBJETIVO .....</b>	<b>152</b>
<b>3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>153</b>
<b>3.3.1 CONDUCCIÓN DE PRUEBAS DE VIGOR .....</b>	<b>153</b>
3.3.1.1 Prueba de envejecimiento acelerado .....	153
3.3.1.2 Prueba de inmersión en agua .....	154
3.3.1.3 Prueba de frío modificada .....	155
3.3.1.4 Prueba de frío saturada .....	156
<b>3.3.2 CONDUCCIÓN DE LOS ANÁLISIS QUÍMICOS.....</b>	<b>156</b>
3.3.2.1 Determinación de Materia seca y Humedad.....	157
3.3.2.2 Determinación de Cenizas totales.....	159
3.3.2.3. Determinación de Proteínas.....	160

	<b>Pág.</b>
3.3.2.4 Determinación de Fibras totales.....	162
3.3.2.5 Determinación de Lípidos.....	164
3.3.2.6 Determinación de Extractivos no nitrogenados.....	166
<b>3.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>166</b>
<b>3.4 RESULTADOS .....</b>	<b>168</b>
<b>3.5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>174</b>
<b>3.6 CONCLUSIÓN.....</b>	<b>178</b>
<b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>179</b>
<b>PROTOCOLOS</b>	
<b>PRUEBAS DE VIGOR .....</b>	<b>181</b>
Conductividad eléctrica de semillas individuales con el equipo SAD 9000-S.....	181
Inmersión en agua .....	183
Envejecimiento acelerado .....	185
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>188</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>210</b>
<b>ANEXO 1 Tabla Munsell digital.....</b>	<b>211</b>
<b>ANEXO 2: Datos climáticos.....</b>	<b>212</b>
<b>ANEXO 3: Análisis Estadísticos.....</b>	<b>214</b>
<b>ANEXO CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>214</b>
<b>ANEXO CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>225</b>
<b>ANEXO CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>241</b>

## Abreviaturas y Símbolos

%:	porcentaje
°C:	grados centígrados
CO <sub>2</sub> :	Dióxido de carbono
cm:	centímetros
g:	gramos
h:	hora
ha:	hectárea
H <sub>2</sub> O:	agua
He:	Helio
m:	metro
mg:	miligramo
ml:	mililitro
mPa:	mili Pascal
mm:	milímetro
N <sub>2</sub> :	Nitrógeno
O <sub>2</sub> :	Oxígeno
pH:	nivel de acidez o alcalinidad de solución acuosa
rpm:	revoluciones por minuto
μS.cm <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> :	Micro Siemens por centímetro por gramo
μS. cm <sup>-1</sup> :	Micro Siemens por centímetro
ρ :	Coefficiente de correlación de Pearson
ACP:	Análisis de componentes principales
ADN:	Ácido Desoxi ribonucleico
ANAVA:	Análisis de variancia
AOAC:	(Association of Official Analytical Chemists)
AOCS:	(American Oil Chemists Society)
AOSA:	(Association of Official Seed Analysts) Asociación Oficial de Analistas de Semillas
ARN:	Ácido Ribonucleico

ATP:	Adenosín Trifosfato
CA:	Conteo anticipado
CE:	Conductividad eléctrica
CESI:	Conductividad eléctrica de semillas individuales
CH:	Contenido de humedad
CHO:	Carbono-Hidrógeno-Oxígeno
CHON:	Carbono-Hidrógeno-Oxígeno-Nitrógeno
CIMMYT:	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
CP:	Componente principal
CT:	Cenizas totales
DM:	Daño mecánico
DML:	Daño mecánico leve
DMM:	Daño mecánico moderado
DMS:	Daño mecánico severo
EEA:	Estación Experimental Agropecuaria
EEUU:	Estados Unidos de Norte América
ENN:	Extractivos no nitrogenados
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético
FAO:	(Food and Agriculture Organization of the United Nations). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FC:	Factor de corrección
FDN:	Fibra de detergente neutro
FT:	Fibras totales
H:	Humedad
INASE:	Instituto Nacional de Semillas
INTA:	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISTA:	(International Seed Testing Association) Asociación Internacional de Análisis de Semillas
IVG:	Índice de velocidad de germinación
L:	Lípidos
MS:	Materia seca
NV:	No viables
P:	Proteína

PC:	Primer Conteo
PCE:	Prueba de conductividad eléctrica
PEA:	Prueba de envejecimiento acelerado
PF:	Prueba de frío
PFM:	Prueba de frío modificada
PFS:	Prueba de frío saturada
PGE:	Prueba de germinación estándar
PGF:	Prueba de germinación en frío
PIA:	Prueba de inmersión en agua
PTTZ:	Prueba topográfica por tetrazolio
PTZA:	Prueba de tetrazolio de aleurona
PVR:	Prueba de verde rápido
SAD 9000-S:	Analizador Automático de Semillas
SAGPyA:	Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación
TC:	Conductividad térmica
TMG:	Tiempo medio de germinación
TZ:	Tetrazolio
UNR:	Universidad Nacional de Rosario
VA:	Vigor alto
V1:	Estadio fenológico primera hoja desplegada
V2:	Estadio fenológico dos hojas plenamente desplegada
VB:	Vigor Bajo
VC:	Valor de corte
VDM:	Viables defectos moderados
VDS:	Viables defectos severos
VM:	Vigor medio
VSD:	Viables sin defectos
VT:	Vigor total

# Lista de figuras

		Pág.
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>DESCRIPCIÓN DE LA CALIDAD INICIAL DE SEMILLAS DE SEIS LOTES DE HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ</b>	
Figura 1.1.	Cariopses de los diferentes lotes en la cámara fría.....	14
Figura 1.2.	Vista del Divisor tipo Boerner.....	14
Figura 1.3.	Vista interna de las partes constituyentes del Divisor tipo Boerner.....	14
Figura 1.4.	Peso de 5 g de cariopses de los lotes de maíz de cada repetición.....	16
Figura 1.5.	Repeticiones de cada lote de maíz ya pesadas y listas para su ingreso a estufa.....	16
Figura 1.6	Repeticiones de cada lote de maíz en la estufa de secado.....	16
Figura 1.7.	Lavado de cariopses de maíz. a) Cariopses de maíz antes del lavado y b) luego del mismo.....	18
Figura 1.8.	Cariopses de maíz sumergidos en la solución de <i>Fast Green</i> . ....	19
Figura 1.9.	Cariopses de maíz luego de la Prueba del verde rápido.....	19
Figura 1.10.	Patrón de clasificación del Daño mecánico en cariopses de maíz. a) Daño leve; b) daño moderado y c) daño severo.....	20
Figura 1.11	Armado de los rollos de papel para la Prueba de germinación estándar...	21
Figura 1.12.	Plántulas normales de maíz obtenidas en la Prueba de germinación estándar.....	22
Figura 1.13.	Plántulas anormales de maíz. a) Hipocótilo hendido y hojas primarias dañadas; b) ausencia de parte aérea.....	23
Figura 1.14.	Esquema de daños en el coleóptilo de maíz descritos en las Reglas ISTA.....	24
Figura 1.15.	Esquema de daños de la primera hoja de maíz a tener en cuenta en la evaluación de plántulas con coleóptilos dañados .....	24
Figura 1.16.	Ejecución del corte longitudinal incompleto del embrión de un cariopse de maíz con bisturí en la Prueba topográfica por tetrazolio.....	26
Figura 1.17.	Cariopse de maíz cortado y teñido con la solución de Tetrazolio.....	27
Figura 1.18.	Esquema de las partes constituyentes del embrión de maíz y su correspondencia con una plántula.....	28
Figura 1.19.	Patrones de clasificación de cariopses de maíz en niveles de Viabilidad para la Prueba topográfica por tetrazolio.....	29
Figura 1.20.	Descripción de los Patrones de clases de Viabilidad en maíz para la Prueba topográfica por tetrazolio.....	30

	<b>Pag.</b>
Figura 1.21.	Planilla interna de trabajo para la Prueba topográfica por tetrazolio. Determinación de Viabilidad, Vigor y localización de daños observados.... 31
Figura 1.22.	Vista de cortes sobre el cariopse de maíz para la Prueba de tetrazolio de aleurona..... 34
Figura 1.23.	Recipientes con los cariopses en el Baño termostático durante la incubación..... 35
Figura 1.24.	Evaluación de los cariopses de maíz..... 35
Figura 1.25.	Equipo de conductividad eléctrica de semillas individuales SAD 9000-S... 36
Figura 1.26.	Ejecución de la siembra en el campo de la EEA Oliveros..... 39
Figura 1.27.	Evaluación de cariopses por la Prueba topográfica por tetrazolio..... 46
Figura 1.28.	Evaluación del vigor por la Prueba de tetrazolio de aleurona..... 49
Figura 1.29.	Evaluación de vigor por la Prueba de tetrazolio de aleurona..... 50
Figura 1.30.	Evaluación de cariopses del lote L6 por la Prueba de tetrazolio de aleurona..... 50
Figura 1.31.	Detalle de una plántula en el primer recuento..... 56
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>EVALUACIÓN DE DISTINTAS PRUEBAS DE LABORATORIO PARA ESTIMAR EL VIGOR EN SEIS LOTES DE HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ</b> 71
Figura 2.1.	Disposición del recipiente portarrollo en la cámara fría..... 79
Figura 2.2a.	Apertura de los rollos y observación del estado de los cariopses..... 79
Figura 2.2b.	Prueba de germinación en frío..... 80
Figura 2.3.	Preparación de las repeticiones para la Prueba de inmersión en agua.... 81
Figura 2.4.	Cariopses de maíz sumergidos en 200 ml de agua..... 81
Figura 2.5.	Incubación de los cariopses de maíz en cámara a baja temperatura de inmersión..... 81
Figura 2.6.	Eliminación del agua luego del estrés de inmersión a baja temperatura... 81
Figura 2.7.	Oreado de los cariopses de maíz luego del proceso de inmersión en agua..... 82
Figura 2.8.	Siembra de los cariopses de maíz en recipientes con arena luego del estrés de inmersión..... 82
Figura 2.9.	Mini cámara de Envejecimiento acelerado..... 83
Figura 2.10.	Vista lateral de la mini cámara cerrada..... 83

	<b>Pag.</b>
Figura 2.11.	Vista interna de la estufa de incubación con las mini cámaras dispuestas en su interior..... 84
Figura 2.12.	Bandejas con plántulas germinadas luego del estrés de Envejecimiento acelerado dentro de la cámara de germinación..... 84
Figura 2.13.	Ubicación de las cajas de siembra con la arena estéril húmeda en la cámara fría ..... 85
Figura 2.14.	Técnica de surcado de las cajas..... 86
Figura 2.15.	Siembra en arena estéril. .... 86
Figura 2.16.	Sistema artesanal para la Prueba de frío saturada. .... 88
Figura 2.17.	Preparación del sistema. .... 89
Figura 2.18.	Sistema con las cajas armadas en la cámara fría..... 90
Figura 2.19.	Caja sembrada con los embriones de los cariopses orientados hacia la arena..... 90
Figura 2.20.	Prueba de Germinación en frío, se observa germinación en algunos cariopses..... 93
Figura 2.21.	Detalle de cariopses con protrusión de raíz primaria..... 94
Figura 2.22.	Germinación estándar luego del Envejecimiento acelerado..... 104
Figura 2.23.	Cariopses de maíz no germinados luego de la Prueba de envejecimiento acelerado a 41 °C durante 72 h identificados como no viables por la Prueba topográfica por tetrazolio..... 106
Figura 2.24.	Cariopses de maíz no germinados luego de la Prueba de envejecimiento acelerado a 45 °C durante 72 h identificados como no viables por la Prueba topográfica por tetrazolio..... 108
Figura 2.25	Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 1 y Componente principal 2..... 131
Figura 2.26.	Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 1 y Componente principal 3..... 132
Figura 2.27.	Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 1 y Componente principal 4..... 133
Figura 2.28.	Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 2 y Componente principal 3..... 134

	<b>Pág.</b>
Figura 2.29.	Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 2 y Componente principal 4..... 135
Figura 2.30	Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 3 y Componente principal 4..... 136
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE CARIOPSES DE DOS HÍBRIDOS DE MAÍZ LUEGO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR DISTINTAS PRUEBAS DE VIGOR</b> 149
Figura 3.1.	Mini cámaras tapadas al ser retiradas de la estufa de incubación..... 154
Figura 3.2.	Cariopses de maíz oreándose en las cestas luego del Envejecimiento acelerado..... 154
Figura 3.3.	Lavado de cariopses de maíz con agua..... 155
Figura 3.4	Oreado de los cariopses de maíz luego del proceso de inmersión..... 155
Figura 3.5.	Desecadores con muestras de cariopses de maíz..... 157
Figura 3.6.	Molinillo y cajas de aluminio..... 157
Figura 3.7.	Mufla utilizada para la ejecución del análisis..... 160
Figura 3.8.	Pesado del material..... 160
Figura 3.9.	Equipo LECCO utilizado para la determinación de Proteínas..... 161
Figura 3.10.	Equipo Van Soest para la determinación de Fibras totales..... 163
Figura 3.11.	a) Equipo extractor Soxtec TM 2050 utilizado para determinar Lípidos. b) detalle de vasos de aluminio con los cartuchos de fibra vegetal en su interior..... 164

## Lista de tablas

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>DESCRIPCIÓN DE LA CALIDAD INICIAL DE SEMILLAS DE SEIS LOTES DE HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ</b>	<b>Pág.</b>
		<b>8</b>
Tabla 1.1.	Descripción de los lotes de híbridos de maíz utilizados en el experimento....	13
Tabla 1.2.	Contenido de humedad (%) de los lotes de maíz.....	40
Tabla 1.3.	Peso de 1000 cariopses (g) de los lotes de maíz.....	41
Tabla 1.4.	Comportamiento de los lotes de maíz frente al Daño mecánico (%) evaluado por la Prueba de verde rápido en función de las características del tipo y forma del grano.....	42
Tabla 1.5.	Plántulas normales (%) producidas en el Conteo anticipado, Primer conteo y en la Prueba de germinación estándar a los 3, 4 y 7 días de estadía respectivamente en cámara de germinación de los lotes de maíz.....	44
Tabla 1.6.	Plántulas normales (%), anormales (%) y semillas muertas (%) producidas en la Prueba de germinación estándar de los lotes de maíz.....	45
Tabla 1.7.	Viabilidad (%) y Vigor (%) por la Prueba topográfica por tetrazolio de los lotes de maíz.....	47
Tabla 1.8.	Viabilidad por la Prueba topográfica por tetrazolio de los lotes de maíz.....	48
Tabla 1.9.	Niveles de vigor por la Prueba topográfica por tetrazolio de los lotes de maíz.....	49
Tabla 1.10.	Superficie de capa de aleurona teñida y sin teñir (%) por la Prueba de tetrazolio de aleurona de los lotes de maíz.....	52
Tabla 1.11.	Color de la superficie de la capa de aleurona teñida y sin teñir (%) por la Prueba de tetrazolio de aleurona para los lotes de maíz.....	53
Tabla 1.12.	Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y Potencial de germinación y vigor (%) medidos con el SAD 9000-S en los lotes de maíz.....	55
Tabla 1.13.	Emergencia de plántulas a campo (%), en dos recuentos a los 7 y 9 días, en la primera fecha de siembra (9/11/09) de los lotes de maíz.....	56
Tabla 1.14.	Emergencia de plántulas a campo (%), en dos recuentos a los 25 y 29 días en la segunda fecha de siembra (20/09/10) de los lotes de maíz.....	57
Tabla 1.15.	Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Emergencia a campo en dos fechas de siembra y las pruebas de control de calidad: Contenido de humedad, Peso de 1000 cariopses, Prueba de verde rápido: Daño mecánico leve, Daño mecánico moderado, Daño mecánico severo, Prueba de germinación estándar, Conteo anticipado, Primer conteo, Viabilidad y vigor por tetrazolio, Semillas viables sin defectos por tetrazolio, Tetrazolio de la capa de aleurona > 75 %, 75-50 % y < 50 % teñido y Conductividad eléctrica de semillas individuales.....	59

	<b>Pág.</b>
<b>CAPÍTULO 2 EVALUACIÓN DE DISTINTAS PRUEBAS DE LABORATORIO PARA ESTIMAR EL VIGOR EN SEIS LOTES DE HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ</b>	<b>71</b>
Tabla 2.1. Índice de velocidad de germinación de los lotes de maíz .....	94
Tabla 2.2. Tiempo medio de germinación (días) de los lotes de maíz.....	95
Tabla 2.3. Prueba de inmersión en agua (%) a 23 °C ± 2 °C durante 24 h de los lotes de maíz.....	96
Tabla 2.4. Prueba de inmersión en agua (%) a 23 °C ± 2 °C durante 48 h de los lotes de maíz.....	97
Tabla 2.5. Prueba de inmersión en agua (%) a 23 °C ± 2 °C durante 72 h de los lotes de maíz.....	98
Tabla 2.6. Prueba de inmersión en agua (%) a 10 °C ± 2 °C durante 24 h de los lotes de maíz.....	99
Tabla 2.7. Prueba de inmersión en agua (%) a 10 °C ± 2 °C durante 48 h de los lotes de maíz.....	100
Tabla 2.8. Prueba de inmersión en agua (%) a 7,5 °C ± 2 °C durante 24 h de los lotes de maíz .....	101
Tabla 2.9. Prueba de inmersión en agua (%) a 7,5 °C ± 2 °C durante 48 h de los lotes de maíz.....	102
Tabla 2.10. Prueba de inmersión en agua (%) a 7,5 °C ± 2 °C durante 72 h de los lotes de maíz.....	103
Tabla 2.11. Prueba de envejecimiento acelerado (%) conducida a 41 °C ± 0,5 °C durante 72 h ± 15 minutos en los lotes de maíz y el testigo.....	105
Tabla 2.12. Prueba de envejecimiento acelerado (%) conducida a 45 °C ± 0,5 °C durante 72 h ± 15 minutos en los lotes de maíz y el testigo.....	107
Tabla 2.13. Prueba de frío modificada (%) a 10 °C ± 0,5 °C con recuentos a los 3 y 5 días y conducida en los lotes de maíz y el testigo.....	110
Tabla 2.14. Prueba de frío modificada (%) a 7,5 °C ± 0,5 °C con recuentos a los 3 y 5 días y conducida en los lotes de maíz y el testigo.....	111
Tabla 2.15. Prueba de frío modificada (%) a 5 °C ± 0,5 °C con recuentos a los 3 y 5 días y conducida en los lotes de y el testigo.....	112
Tabla 2.16. Prueba de frío saturada (%) a 7,5 °C ± 0,5 °C con recuento a los 4 días y conducida en los lotes de maíz y el testigo.....	114
Tabla 2.17. Prueba de frío saturada (%) a 7,5 °C ± 0,5 °C con recuento a los 7 días y conducida en los lotes de maíz y el testigo.....	115

	<b>Pág.</b>
Tabla 2.18. Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Prueba de inmersión en agua a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de inmersión, la Emergencia a campo en dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y la Prueba de Germinación estándar.....	116
Tabla 2.19. Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Prueba de envejecimiento acelerado a dos temperaturas de estrés, la Emergencia a campo en dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y la Prueba de Germinación estándar .....	117
Tabla 2.20. Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Prueba de frío modificada a diferentes condiciones de temperaturas y en dos recuentos, la Emergencia a campo en dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y la Prueba de Germinación estándar.....	118
Tabla 2.21. Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Prueba de frío saturada en dos recuentos, la Emergencia a campo en dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y la Prueba de germinación estándar.....	119
Tabla 2.22. Matriz de correlación entre las 11 variables de clasificación de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados en el trabajo de investigación.....	120
Tabla 2.23. Componentes principales (CP), variabilidad explicada (%) y variabilidad acumulada (%) obtenidas del análisis de las variables que describen las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados .....	121
Tabla 2.24. Matriz de correlaciones entre las 11 variables clasificatorias de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés y las cuatro componentes principales seleccionadas.....	122
Tabla 2.25. Valores de la Componente principal 1, ordenados de menor a mayor, para cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados .....	124
Tabla 2.26. Valores de la Componente principal 2, ordenados de menor a mayor, para cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados .....	126
Tabla 2.27. Valores de la Componente principal 3, ordenados de menor a mayor, para cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados .....	128
Tabla 2.28. Valores de la Componente principal 4, ordenados de menor a mayor, para cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados .....	130

	<b>Pág.</b>
<b>CAPÍTULO 3 CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE CARIOPSES DE DOS LOTES DE HÍBRIDOS DE MAÍZ LUEGO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR DISTINTAS PRUEBAS DE VIGOR</b>	<b>149</b>
Tabla 3.1. Contenido de Humedad (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado .....	169
Tabla 3.2. Contenido de Cenizas totales (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.....	170
Tabla 3.3. Contenido de Proteínas (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.....	171
Tabla 3.4. Contenido de Lípidos (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.....	172
Tabla 3.5. Contenido de Fibras totales (%) en lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.....	173
Tabla 3.6. Contenido de Extractivos no nitrogenados (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.....	174

## Resumen

La demanda mundial de maíz ha sufrido un incremento en los últimos años debido al crecimiento de las economías, los mercados de materias primas, la demanda de biocombustibles, el aumento de la población y los mejores niveles de vida, entre otros, que está superando la producción. Como consecuencia se estima que en Argentina el área sembrada para las próximas campañas seguirá en aumento y esto originará una mayor demanda de semillas de calidad para la siembra. La utilización de semillas de calidad es fundamental para la implantación y establecimiento del nuevo cultivo tendiente a lograr una producción sustentable. Es necesario determinar cuál es la calidad de la semilla a través de la medición de los distintos atributos que la describen. Entre los atributos se mencionan la viabilidad, germinación, vigor, nivel de daño mecánico, contenido de humedad y peso de mil cariopses, entre otros. El objetivo del trabajo de investigación fue desarrollar y evaluar ensayos de vigor de referencia en laboratorio que sean rápidos, sencillos y económicos y que permitan establecer niveles de calidad de los lotes de cariopses de maíz. El trabajo se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria Oliveros del INTA, ubicada en la Provincia de Santa Fe, a 32° 33´ Latitud Sur, 60° 51´ Longitud Oeste y a 27 metros sobre el nivel del mar. Se trabajó con seis lotes de híbridos comerciales de maíz de diferente ciclo, tipo y forma de grano aportados por la empresa Nidera. Los híbridos utilizados fueron AX 820; AX 882; AX 886; AX 892; AX 894 y AX 1013 que se denominaron de L1 a L6 respectivamente. Se realizó la caracterización de calidad inicial en base a la medición de los siguientes atributos: contenido de Humedad (CH), Peso de mil cariopses, Identificación de daños mecánicos por Verde rápido (PVR), Germinación estándar (PGE), Conteo anticipado (CA), Primer conteo (PC), Viabilidad por la Prueba Topográfica por tetrazolio (PTTZ), Tetrazolio de aleurona (PTZA), Conductividad eléctrica de semillas individuales (CESI) y Emergencia a campo (EC) en condiciones favorables y no favorables. Se determinó el vigor de los lotes a través de las pruebas de Germinación en frío (PGF), Inmersión en agua corriente (PIA), Envejecimiento acelerado (PEA), Frío modificada (PFM) y Frío saturada (PFS). Se analizó la utilización de diferentes combinaciones de temperaturas y tiempos de estrés como así también la realización de recuentos de plántulas anticipados. Se estudiaron los posibles cambios ocurridos en la composición química de los cariopses de maíz de los lotes de híbridos AX 886 y AX 882, luego de someterlos a estrés provocado por PEA, PIA, PFM y PFS. Se realizaron los análisis químicos de determinación de Cenizas totales, Humedad, Materia seca, Proteínas, Lípidos, Fibras totales y Extractivos no nitrogenados. Los

datos se analizaron a través de ANAVA, correlación de Pearson y estudio de Componentes principales. La medición de los atributos de la calidad por las distintas pruebas ensayadas permitió describir y clasificar a los lotes según sus niveles de viabilidad, germinación y vigor. La prueba de CA resultó ser una herramienta útil para informar sobre la velocidad de germinación de los distintos lotes y adelantar resultados para su calificación. La PGE no mostró correlación significativa con la emergencia a campo en ambas condiciones de siembra. Las PTTZ y PTZA mostraron tener correlación significativa con la emergencia de campo en condiciones favorables y no favorables mientras que la CESI solo la tuvo en condiciones favorables. La realización de recuentos de plántulas anticipados en las pruebas de PEA, PFM y PFS resultó ser una alternativa para adelantar los resultados de las pruebas. La PIA a 23 °C por 48 h y la CESI separaron a los lotes de maíz en estudio en el mayor número de niveles de vigor (cinco y cuatro respectivamente), mientras que la PFS los separó en el menor número de niveles de vigor (dos). La PEA conducida a 45°C por 72 h logró una mejor expresión de la calidad fisiológica los que la PEA a 41 °C. La PFM a 5 °C fue más eficiente para identificar las diferencias en calidad de los lotes en estudio frente al estrés de frío. No fue posible seleccionar una sola prueba que reúna todas las características favorables de rapidez, sencillez, economía, objetividad de resultados y la separación en la mayor cantidad de niveles de calidad. Por el contrario, un conjunto de pruebas surgieron como las mejores, se enumeran la CESI, la PIA a 23 °C por 48 h, la PGE, el CA, el PC y la PEA. Entre ellas las PIAs y la CESI mostraron ser promisorias nuevas herramientas para la evaluación de calidad fisiológica de maíz. El estrés provocado por las pruebas de vigor PEA, PFM, PFS y PIA sobre los cariopses de los lotes de híbridos de maíz AX 886 y AX 882, produjo cambios significativos en algunos componentes evaluados por el análisis químico proximal. No obstante ello, se requiere futuras investigaciones que avalen la real incidencia del estrés sobre los componentes del análisis sumario.

## **Abstract:**

CHARACTERIZATION OF THE QUALITY OF BATCHES OF CORN (*Zea mays* L.) FOR USE AS SEED THROUGH PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL TESTS.

The world corn demand has suffered an increase during last years as a consequence of economies, commodities market, biodiesel demand, population growth and better life standard, among others, and all these are overcoming corn production. As a result of these factors it is estimated that in Argentina the growing area will be greater and the demand for quality seeds for sowing will increase. The use of quality seeds is of fundamental importance for crop establishment in order to achieved a sustainable production. It is necessary to detemine the seed quality through the assessment of the different atributes that is composed. Within that atributes are mentioned its viability, germination, vigour, level of mechanical damage, humidity content and 1000 seed weight among others.

The objective was to develop and evaluate trials of vigor of reference in laboratory that are quick, simple and economical and that allow to establish levels of quality of the batches of corn caryopsis. The work was carried out at the EEA Oliveros of INTA, Santa Fe, 32° 33' South Latitude, 60° 51' West Longitude and 27 meters over the sea level. Argentina. We used six commercial hybrids seed lots of Nidera. The employed hybrids were: AX 820; AX 882; AX 886; AX 892; AX 894 and AX 1013 and were named L1 to L6 respectively. The initial quality characterization was done over the following attributes : Humidity content (CH), Weight of 1000 caryopsis, Identification of mechanical damage by Fast green (PVR), Standard germination (PGE), Early count (CA), First count (PC), Viability by topographic tetrazolium test (PTTZ), Tetrazolium aleurone (PTZA), Electrical conductivity of individual seeds (CESI) and Field emergency (EC) in favorable and unfavorable conditions. The vigor was determined by Cold germination (PGF), Water immersion (PIA), Accelerated aging (PEA), Cold modified test (PFM) and Cold saturated test (PFS). Combinations of temperatures and times of stress were used and advance seedlings counts were performed also. We studied the changes in the chemical composition of the hybrids lots AX886 and AX 882, after subjecting them to stress caused by PEA, PIA, PFM, and PFS. There were determined the Total ash, Moisture, Dry matter, Protein, Lipids, Total fibers and Not nitrogen extractives. We used a DCA, analysis of ANOVA and Pearson correlation study of main components. Various tests employed allowed to describe and classified hybrids lots according to their level of viability, germination and vigor. CA was useful to

inform about the speed of germination **of hybrids lots** and to advance results. The PGE did not correlate significantly with the field emergence in both sowing conditions. The PTTZ, PTZA showed a significant correlation with the field emergence in favorable and unfavorable conditions while the CESI gives correlation in favourable conditions only. Advance seedlings counts in PEA, PFM and PFS were an interesting option for anticipate tests results. The PIA at 23°C-48 h and the CESI separated the corn hybrids lots in study in greater number of levels of vigor (five and four respectively), while the PFS separated them in the fewer levels of vigor (two). The PEA led to 45°C-72 h achieved a better expression of the physiological quality than the PEA at 41°C. The PFM at 5°C was more efficient to identify differences in quality of the hybrids lots in study of cold stress. It was not possible to select an only one test with the characteristic of speed, ease to perform, cheap, objective and useful to separate the higher number of quality levels. On the other hand tests of CESI, PIA 23°C-48 h, PGE, AC, PC and PEA showed to be the best. Among them, the PIAs and CESI showed to be promissory as new tools for the physiological quality assessment of corn seed. The stress caused by the PEA, PFM, PFS and PIA on the caryopsis of AX 886 and AX 882 corn hybrids, produced significant changes in some components of the summary chemical analysis. However, this requires specific research on the relationship of certain components of the summary analysis and its real impact on quality control tests.

# **CARACTERIZACIÓN DE LA CALIDAD DE LOTES DE MAÍZ (*Zea mays* L.) PARA SU USO COMO SIMIENTE A TRAVÉS DE ENSAYOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**

## **INTRODUCCIÓN**

Haciendo un poco de historia, el maíz es uno de los cereales más utilizados por el hombre desde épocas remotas y una de las especies vegetales más productivas. Se considera que es una de las primeras plantas cultivadas por los agricultores hace unos 7.000 a 10.000 años (Paliwal *et al.*, 2001). Este es el cereal de los pueblos y culturas del continente americano y las más antiguas civilizaciones de América, los olmecas y teotihuacanos, hasta los incas y quechuas en la región andina de Sudamérica estuvieron acompañados por el maíz (Serratos Hernández, 2012). Si bien hay varias teorías y discrepancias sobre el origen del maíz, la más aceptada es que es originario de América. La evidencia más antigua del maíz como alimento proviene de lugares arqueológicos de México, donde algunas pequeñas mazorcas, encontradas en cuevas de habitantes primitivos, se estimaron en más de 5000 años de antigüedad (Paliwal *et al.*, 2001; Serratos Hernández, 2012). Es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen y ha sido utilizado como fuente de carbohidratos (Gear, 2006; Acosta, 2009). Se dice que es nativo de Meso América, que comprende una línea irregular desde la parte media de Veracruz en México hasta Nicaragua (Kato Yamakake *et al.*, 2009; Acosta, 2009).

El maíz cultivado es una planta completamente domesticada, el hombre y el maíz han vivido y evolucionado en forma conjunta desde tiempos remotos. No crece en forma salvaje y no puede vivir en la naturaleza sin los cuidados brindados por el hombre (Paliwal *et al.*, 2001). Pertenece a la familia de las *Poaceas* y a la tribu de las *Maydeas* y es la única especie cultivada de este género (Paliwal *et al.*, 2001; Acosta, 2009). El grano de maíz, desde el punto de vista botánico, es un fruto seco indehisciente con una sola semilla, donde el tegumento se encuentra fuertemente adherido al fruto, llamado cariopse. El fruto maduro consiste en tres partes: la pared o pericarpio, el embrión diploide y el endosperma triploide. En la parte más externa del endosperma, en contacto con la pared del fruto hay una capa de células especiales

denominadas capa de aleurona que cumplen una importante función durante la germinación. La estructura del endosperma es muy variable, le da al grano diferente apariencia y permite la clasificación en distintos tipos (Paliwal *et al.*, 2001; Satorre *et al.*, 2003-2004; Kato Yamakake *et al.*, 2009).

Todos los maíces pertenecen a la misma especie y los tipos o razas en que se los diferencian corresponden a una simple clasificación utilitaria, no botánica. Los distintos tipos presentan una multiplicidad de formas, tamaños, colores, texturas y adaptación a diferentes ambientes. Existen numerosas variedades primitivas o tradicionales que son actualmente cultivadas en comunidades indígenas especialmente para consumo familiar (Gear, 2006). Estas formas raciales constituyen una importante fuente de germoplasma, adaptado a condiciones particulares, que pueden utilizarse en el mejoramiento tanto hoy como en el futuro y constituyen una fuente de variabilidad genética muy valiosa.

Desde el punto de vista comercial se utilizan solo un reducido número de tipos de maíz y usualmente se clasifican de acuerdo a la dureza del grano en duros o flint, reventones o pisingallo, dentados, harinosos, semidentados y especiales (Paliwal, 2001; Gear, 2006; Ustarroz *et al.*, 2010). Estos tipos de maíces se caracterizan por sus diferencias en la constitución del grano, especialmente en el contenido y ubicación del almidón y las proteínas. La calidad de uso del maíz está determinada principalmente por la estructura y composición del grano. Estas diferencias dependen del cultivar, las condiciones ambientales de producción y de las prácticas de manejo. La dureza del endosperma contribuye a otorgarle resistencia mecánica, que es una propiedad deseable para mantener la integridad del grano durante las operaciones de cosecha y poscosecha (Robutti, 2004).

El maíz es el cereal que más importancia ha tenido en la economía a escala mundial durante el siglo XX y los inicios del siglo XXI. En los países industrializados se lo utiliza tanto para el consumo humano como el animal, como materia prima y más recientemente para la producción de etanol. Por el contrario, en países de América Latina y cada vez más en países de África se lo produce e importa para consumo humano. En este sentido, el maíz ha sido y sigue siendo un factor de supervivencia para campesinos e indígenas que habitan el continente Americano (Serratos Hernández, 2012). Según Eckhoff y Paulsen (1996) y Satorre *et al.* (2003-2004), alrededor del 65 %, se lo destina a la alimentación animal. El maíz es el único cereal que

puede ser utilizado como alimento en distintas etapas del desarrollo de la planta. Las espigas jóvenes, cosechadas antes de la floración, constituyen el denominado *maíz baby* que se consume como hortaliza; las mazorcas tiernas del maíz dulce son un manjar refinado y las mazorcas verdes del maíz común se comen asadas, hervidas o en estado de pasta blanda. Además, las plantas de maíz que están aún verdes se pueden utilizar como forraje luego de cosechadas las espigas *baby* o verdes (Paliwal *et al.*, 2001). Es un producto que ha evolucionado positivamente a lo largo de su historia ya que con el correr de los años, la cadena del maíz se ha desarrollado de manera progresiva y se ha transformado de un grano cuyo único destino era la alimentación humana a una materia prima esencial para múltiples procesos industriales (Gear, 2006; Izquierdo y Cirilo, 2013). Es además una importante fuente de materia prima para la producción de almidón y derivados como edulcorantes y aceite, entre otros. También se lo emplea para fabricación de pinturas y disolventes, productos cosméticos y de farmacia, polímeros biodegradables, entre otros (Izquierdo y Cirilo, 2013).

El maíz ha dejado de ocupar el segundo lugar en la producción mundial después del trigo y del arroz, para pasar a ocupar el primer lugar, con producciones que crecen anualmente, especialmente debido a los nuevos usos (CIC, 2018). El creciente uso del maíz para la fabricación de etanol ha sido la principal razón para el incremento de la demanda del cereal. EEUU encabeza la producción y consumo del maíz destinado a la elaboración de bioetanol, hay una tendencia a reemplazar el petróleo por combustible de origen renovable, disminuir la dependencia emergentica de combustibles fósiles y de proveedores inestables, además de un compromiso de bajar los niveles de gases emitidos a la atmósfera (Brieva y Costa, 2013).

Los países que más han incrementado su producción, en los últimos años 2013-2015, son EEUU, China y Brasil, además, desde 2016, muestran crecimientos importantes en la producción también Argentina y Ucrania entre otros (Bolsa Cereales de Buenos Aires, 2013; CIC, 2015; FIRA, 2016).

De los cultivos extensivos, el maíz es el grano que ofrece más posibilidades de industrialización y transformación en proteína animal. Este es un concepto muy importante para el agregado de valor del maíz en origen, que habilita a mejorar la competitividad de los pequeños y medianos productores y beneficia a las economías regionales (Ustarroz *et al.*, 2010). Cada día se descubren nuevos usos industriales del maíz, como es la elaboración de

papeles y plásticos biodegradables a partir del almidón, que son más ecológicos que los elaborados a partir del petróleo. Con estos plásticos se han elaborado telas de secado rápido para deportistas, discos compactos, computadoras, teléfonos celulares, frazadas, alfombras y envases de alimentos, entre otros. Se asegura que hay más de 4.000 usos diferentes para los subproductos del maíz (Gear, 2006).

El maíz presenta la ventaja de ser un recurso renovable y sus productos finales biodegradables no alteran el balance de anhídrido carbónico atmosférico. Además, constituye la materia prima básica de numerosas industrias. Entre estas, la producción de alimentos balanceados es cuantitativamente la más importante, le siguen la industria de la molienda húmeda y la de la molienda seca (Robutti, 2004).

La producción Argentina de maíz, que a comienzos de los años 90 totalizaba unos 8 millones de toneladas anuales, ha experimentado un constante crecimiento en las últimas décadas. Como consecuencia de ello, la producción total de granos de Argentina, pasó a ocupar un lugar relevante en la comercialización mundial, debido fundamentalmente a los niveles alcanzados por la producción de maíz. Las causas de este crecimiento fueron muchas, entre las que podemos mencionar el aumento de la superficie dedicada al cultivo, la existencia de nuevos híbridos de mayor potencial de rendimiento en el mercado, la resistencia a enfermedades y plagas, el uso de fertilizantes, el mejoramiento de los procesos de secado y almacenamiento, el aumento de la aplicación de la práctica de siembra directa, el uso de riego complementario, la incorporación de cosechadoras de última generación y de materiales transgénicos con resistencia a insectos y diversos herbicidas, la alternativa del cultivo de maíz de segunda , etc. (Gear, 2006; Rossi, 2007; SAGPyA, 2008; Brieva y Costa, 2013).

En Argentina se ha producido una disminución de la superficie cultivada con maíz, por la competencia con la soja, pero el rendimiento por hectárea se ha incrementado y como consecuencia, la producción se mantiene o aumenta ligeramente. En la campaña 2017/18 la superficie de maíz sembrada fue de 6,43 millones de ha, con una estimación de producción de 35 millones de toneladas. El rendimiento nacional promedio se ha estimado en de 6440 Kg/ha. (Hernández, 2018).

En la actualidad, debido al crecimiento de las economías mundiales, los mercados de materias primas, la demanda de biocombustibles, el aumento de la población y los mejores

niveles de vida, entre otros, se ha desencadenado una creciente demanda mundial de maíz que está superando la producción (Gear, 2007 a y b). Como consecuencia se estima que en Argentina el área sembrada para las próximas campañas aumentará y esto originará una mayor demanda de cariopses de maíz de calidad para la siembra.

La utilización de semillas de calidad es fundamental para la implantación y establecimiento del nuevo cultivo tendiente a lograr una producción sustentable. Surge la necesidad entonces de determinar cuál es la calidad de la semilla antes de la siembra y para ello se dispone de metodologías apropiadas para medir los distintos atributos que la describen. Entre estos atributos podemos mencionar a la viabilidad, germinación, vigor, nivel de daño mecánico, pureza genética, pureza físico botánica, contenido de humedad y aspecto y sanidad, entre otros (Arango y Craviotto, 2002; Craviotto, 2006; Elias, 2010).

El vigor es un atributo más de la calidad de los lotes de semillas, es de suma importancia a la hora de seleccionar lotes de semillas para la siembra en condiciones no favorables o de almacenar lotes para la próxima campaña como así también tomar decisiones sobre la venta de los mismos (Hampton y TeKrony, 1995; Marcos Filho, 1999a; Arango y Craviotto, 2002; Powell, 2010). Existen numerosos ensayos de laboratorio que permiten evaluarlo, alguno de ellos se caracterizan por someter a las semillas a diferentes tipos de estrés y luego evaluar la producción de plántulas normales, mientras que otros miden en condiciones favorables y controladas de laboratorio la velocidad de germinación. Existen pruebas bioquímicas con la Prueba topográfica por Tetrazolio que evalúa la presencia de tejidos vivos y muertos sobre el embrión, la de Conductividad eléctrica que mide la integridad de las membranas celulares, entre otras (Hampton y TeKrony, 1995; Arango *et al.*, 2001; Powell, 2010).

Un problema que se presenta en el diagnóstico de calidad de semillas, tanto en los ensayos de germinación como en las pruebas de vigor, es la referida a la interpretación de los resultados y de pretender comparar los valores “bis a bis” (uno contra otro en valores absolutos) entre diferentes pruebas y/o entre distintos laboratorios. Esto se agudiza aún más cuando se usan metodologías no estandarizadas. Por otro lado, los criaderos y semilleros en su actividad comercial y productiva se enfrentan con la necesidad de obtener resultados rápidos de la calidad de los distintos lotes de simiente. Es necesario lograr diagnósticos eficientes para la toma de decisiones rápidas y correctas, referentes al destino de los diferentes lotes. En este

sentido, es una tendencia general la necesidad de identificar unas pocas o preferentemente una única prueba rápida, sencilla, económica y confiable que les permita lograr ese diagnóstico. Una vez seleccionada y estandarizada una prueba de vigor, ésta se podría utilizar como una prueba de referencia en el control de calidad de cariopses de maíz.

Por otro lado, en las semillas deterioradas y con bajo vigor, ocurren numerosos cambios bioquímicos: aberraciones cromosómicas y daños en el ADN; cambios en la síntesis de ARN y proteína; cambios en las enzimas y sustancias de reserva; alteraciones en la actividad respiratoria, en la producción de ATP y en las membranas citoplasmáticas (Abdul Baki y Anderson, 1972; McDonald y Nelson, 1986; Bewley y Black, 1994; Smith y Berjak, 1995; Basra, 1995). El conocimiento de la composición química de la simiente es importante para la Tecnología de semillas, pues influye tanto en el vigor como en su potencial de almacenamiento pudiendo además influenciar en mayor o menor vigor de las plántulas originadas (Carvalho y Nakagawa, 1988). Por otro lado, Hampton y Coolbear (1990); asociaron las diferencias en vigor junto con otras características de las semillas a su composición química principalmente a la cantidad de reservas y la eficiencia del metabolismo. Así mismo, Salinas (1996) concluyó que las determinaciones bioquímicas a nivel enzimático y de composición química son buenos indicadores de la disminución de la calidad fisiológica de semillas de soja durante su almacenamiento. Este hecho alimenta la presunción sobre la posibilidad que algunos cambios bioquímicos podrían llegar también a producirse luego del estrés empleado en la realización de pruebas o ensayos de vigor utilizados en la determinación de la calidad en laboratorio de semilla.

Estos cambios podrían ser identificados por técnicas de laboratorio al analizar la composición química de las semillas antes y luego de ser sometidas a distintas pruebas de vigor que utilicen algún tipo estrés en el método de análisis.

En base a estos antecedentes se plantea la siguiente **HIPÓTESIS:**

La identificación de la calidad fisiológica de lotes de cariopses híbridos de maíz puede ser optimizada mediante una mínima combinación de pruebas de laboratorio.

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar y evaluar ensayos de vigor de **referencia** en laboratorio que sean rápidos, sencillos y económicos y que permitan establecer niveles de calidad de los lotes de cariopses de maíz.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Como objetivos complementarios para responder a la hipótesis del trabajo se planteó:

- ✓ Verificar aquellas condiciones de estrés (alta temperatura y humedad relativa; baja temperatura; alto contenido de humedad en sustrato; hipoxia), utilizadas en ensayos de vigor de laboratorio, que permitan la expresión de diferentes condiciones fisiológicas de lotes de cariopses de maíz de germinación aceptable (90 %).
  
- ✓ Evaluar las alteraciones ocurridas en la composición química de los cariopses de maíz sometidos a diferentes condiciones de estrés y que conducirían a la pérdida del vigor en las diferentes pruebas de laboratorio.
  
- ✓ Protocolizar los procedimientos de la/s prueba/s que posibiliten la reproducción de los resultados dentro y entre laboratorios de semillas.

El presente trabajo de investigación se estructuró en 3 capítulos, cada uno de los cuales muestra una introducción, los objetivos, los materiales y métodos, los resultados, la discusión y las conclusiones.

# CAPÍTULO 1

## DESCRIPCIÓN DE LA CALIDAD INICIAL DE SEMILLAS DE SEIS LOTES DE HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ

### 1.1 INTRODUCCIÓN

El concepto de calidad aplicado a un lote de semillas implica en sí mismo la existencia de una serie de cualidades o atributos no siempre fáciles de medir. La cuantificación de estos atributos en forma aislada no basta para conocer el estado fisiológico real del lote de simiente, sino que es la consecuencia de las numerosas interacciones que ocurren entre los distintos factores que componen la calidad (Arango y Craviotto, 2002). Estos atributos son físicos, genéticos, fisiológicos y sanitarios y resultan de la interacción de las características que en conjunto determinan el valor de los lotes para la siembra (Marcos Filho, 1999 a; Carvalho y Nakagawa, 2000). El comercio de semillas, al igual que el proceso productivo, es exigente en cuanto a la necesidad de asegurar y/o reconocer la calidad con anterioridad al uso de la simiente de cualquier especie cultivada. Esto pone en evidencia la importancia de una disciplina científica, la Tecnología de Semillas, la cual se ha consolidado en las últimas décadas como consecuencia del reconocimiento de la importancia de evaluar científicamente la calidad comercial de lotes de semillas en el mercado internacional (Craviotto, 2006).

La determinación de la calidad de un lote de semillas involucra la conducción de ensayos de laboratorio tendientes a evaluar los atributos de calidad del mismo.

La Prueba de germinación estándar es la prueba de laboratorio que se utiliza en el mundo, en el comercio nacional e internacional, para el control de calidad, su objetivo es determinar el potencial de germinación de un lote de semillas (ISTA, 2015). La prueba se lleva a cabo en laboratorio en condiciones totalmente controladas y óptimas para la especie. Sin embargo, en el campo que es una “gran caja de germinación”, no se dan estas condiciones tan favorables y se generan interacciones entre el estado fisiológico de las semillas y el ambiente. Como consecuencia de ello, se originan diferencias entre los valores de la germinación en

laboratorio y los resultados de emergencia en el campo. Además, en la Prueba de germinación estándar se evalúa la producción en porcentaje de plántulas normales producidas y se clasifican como tales en base exclusiva a sus características morfológicas. Por otro lado, también se consideran como normales aquellas plántulas que presentan algunos defectos leves en su morfología, pero que se estima que no afectan a la producción de una planta en el campo. Además, en el momento de la evaluación, si el analista lo considera necesario, el recuento puede retrasarse o adelantarse unos días. En la Prueba de germinación estándar, al tomar en cuenta solamente aspectos morfológicos y además darle un determinado período de tiempo a las semillas para demostrar su potencial, se pierde cierta información importante para la implantación del cultivo. Estos elementos contribuyen a la aparición de diferencias entre los resultados obtenidos en el laboratorio y en la emergencia del lote a campo. Si bien durante la ejecución de la prueba de germinación se pueden hacer recuentos intermedios, como el Primer conteo, estos generalmente no se informan en el resultado final del ensayo salvo pedido expreso del solicitante. Sin embargo, el porcentaje de plántulas emergidas en este Primer conteo provee un valor que brinda información sobre la velocidad de germinación que posee el lote (Marcos Filho, 1999 a). También existe la posibilidad de realizar un Conteo anticipado de plántulas germinadas un día antes del Primer conteo con el objeto de lograr adelantar aún más los resultados y separar las calidades fisiológicas de los lotes de híbridos de maíz más rápidamente.

Con el objeto de subsanar la discrepancia entre los resultados de laboratorio y de emergencia a campo, los investigadores en semillas en el mundo han intentado desarrollar y estandarizar metodologías tendientes a evaluar otro atributo de la calidad denominado vigor. El objetivo de las pruebas de vigor es el de identificar las posibles diferencias en el potencial fisiológico de los lotes que presenten una germinación semejante (Marcos Filho *et al.*, 1987; França Neto, *et al.*, 1994; AOSA, 2009; Powell, 2010).

Son varios los ensayos que se conducen en laboratorio, generalmente conocidos como Pruebas de vigor y que se utilizan para obtener mayor información relativa a la calidad del lote de simiente de maíz. Los resultados de estos ensayos permiten al usuario de la semilla determinar o comparar el vigor de diferentes lotes antes de comercializarlos, ofreciendo además información valiosa para la siembra y recomendaciones de uso (McDonald, 1988).

Entre las pruebas de vigor podemos citar a la Prueba de envejecimiento acelerado y la de Prueba de conductividad eléctrica que tienen el carácter de “validadas” en las Reglas de la Asociación Internacional de Análisis de Semilla (ISTA, 2015), para las especies soja y arveja respectivamente y sus metodologías se encuentran perfectamente estandarizadas y descritas (Hibbard y Miller, 1928; Matthews y Bradnock, 1967; Byrd y Delouche, 1971; Delouche y Baskin, 1973; Bishnoi y Delouche, 1975; Steere *et al.*, 1981; Hepburn *et al.*, 1984; Wilson, *et al.*, 1992; Hampton *et al.*, 1992; Ibrahim *et al.*, 1994; Hampton y TeKrony, 1995; Vieira y Krzyzanowski, 1999; Marcos Filho, 1999 b).

No obstante ello, existen otras pruebas de vigor ampliamente usadas en el mundo por investigadores y tecnólogos y cuyas metodologías se encuentran descritas con el carácter de “recomendadas” en los Manuales de vigor de ISTA (Hampton y TeKrony, 1995) y de la Asociación Oficial de Analistas de Semillas (AOSA, 2002 y 2009).

Algunas de estas técnicas tienen la particularidad de ser rápidas y permiten obtener resultados en 24 horas o menos, como la Prueba topográfica por tetrazolio (PTTZ) que evalúa tanto la viabilidad como el vigor de semillas (Moore, 1985; Perry, 1987; Hampton y TeKrony, 1995; Craviotto, *et al.*, 1991; França Neto, *et al.*, 1998, França Neto, 1999) y la de Conductividad eléctrica (CE) masal e individual (Hampton y TeKrony, 1995; Arango, *et al.*, 1996; Craviotto, *et al.*, 1998; Salinas, *et al.*, 2001; Craviotto, *et al.*, 2001; Arango, *et al.*, 2001, Arango y Craviotto, 2002). La PTTZ es una prueba bioquímica que se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas (Copeland *et al.*, 1959; Bulat, 1961; Moore, 1973; AOSA, 2002) que catalizan las reacciones respiratorias en las mitocondrias, durante la glicolisis y el ciclo de Krebs. Los tejidos vivos de las células se tiñen de color rojo como consecuencia de la reacción química entre los protones de la respiración de los tejidos y la solución incolora de tetrazolio que se transforma en Formazan (Glennner, 1990). Para evaluar la viabilidad y el vigor de los cariopses se utilizan patrones de tinción específicos para las distintas especies como en el caso de soja (Craviotto *et al.*, 2008) y *Poaceas* en general (Craviotto y Arango, 2006).

Para el caso de la prueba de CE se utiliza la propiedad que tienen las membranas celulares de recuperar más o menos rápidamente la permeabilidad selectiva. Las semillas de óptima calidad liberan menos solutos o electrolitos al medio de imbibición y generan valores menores de CE. Este comportamiento de las membranas celulares permite realizar una

evaluación indirecta de su calidad fisiológica y se utiliza como prueba de vigor en distintas especies.

Por otra parte, Fiala (1981) indicó que si bien la Prueba de frío brinda una estimación precisa de la emergencia a campo, la Prueba por tetrazolio de la capa de aleurona, una variante para maíz de la Prueba topográfica por tetrazolio, es un valioso suplemento, pues revela daños causados por el procesamiento inadecuado de las semillas y el envejecimiento durante el almacenamiento. Trabajos más recientes han mostrado que esta prueba es eficiente en la diferenciación de lotes de semillas de maíz cosechados con humedades variables, diferentes métodos de cosecha y distintos tipos de almacenaje (Araújo, *et al.*, 2000). El embrión de los cereales como el maíz posee una capa delgada de células denominadas de aleurona que recubren el endosperma y no el embrión. Se ha establecido, por estudios histológicos, que puede ser simple o también multicapa (Galinat, 2005). Estas células están citológica y bioquímicamente muy diferenciadas y poseen una actividad muy importante en la germinación, cumplen principalmente una función de tejido digestivo (Becraft, *et al.*, 2002). El proceso de germinación del cariopse de maíz y el crecimiento inicial de la plántula se produce en respuesta a una acción coordinada entre el endosperma y el embrión. La acción consiste en la movilización de las reservas almacenadas en el endosperma almidonoso, que se lleva a cabo por enzimas específicas secretadas por la capa de células de aleurona y el escutelo. Las dos enzimas responsables de la hidrólisis del almidón son la  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa. La capa de aleurona es una de las estructuras responsables de sintetizar y secretar la  $\alpha$ -amilasa al endosperma para degradar el almidón (Fiala, 1987; Bewley y Black, 1994; Taiz y Zeiger, 2006).

Existen además, otras pruebas de vigor sencillas que no requieren de equipamiento costoso como las relacionadas con el crecimiento de plántulas, entre ellas se mencionan al Primer conteo, Conteo anticipado, Longitud de plántulas, Peso seco y Peso fresco de plántulas, Índice de velocidad de germinación e Índice de velocidad de emergencia a campo, entre otras (Hampton y TeKrony, 1995; Nakagawa, 1999; McDonald, *et al.*, 2001; Powell, 2010).

No obstante, hay técnicas que no están incluidas ni en las Reglas ni en los Manuales de vigor publicados por la Asociaciones ISTA y AOSA, que son extensamente usadas en el área de Tecnología de Semillas y en el Control de calidad. Entre ellas, podemos mencionar a la Prueba de verde rápido que brinda información sobre la presencia de daños mecánicos en las

semillas de maíz (Huelsen y Brown, 1952; Koehler, 1957; Gutormson, 1992; Arango y Craviotto, 2007; Elias, 2010). Esta técnica es económica, rápida, sencilla y útil a la hora de detectar daños mecánicos no visibles a simple vista que pueden interactuar con otros atributos de calidad.

## **1.2 OBJETIVO**

El objetivo de este capítulo fue caracterizar la calidad inicial de seis lotes de cariopses de maíz de diferentes híbridos, en base a la evaluación de distintos atributos, por medio de ensayos de laboratorio y de campo.

## **1.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria Oliveros del INTA, ubicada en la Provincia de Santa Fe, a 32° 33´ Latitud Sur, 60° 51´ Longitud Oeste y a 27 metros sobre el nivel del mar. Los ensayos de laboratorio se condujeron en el Laboratorio de Semillas y las siembras en el campo experimental de la citada estación. Se trabajó con seis lotes de cariopses de maíz pertenecientes a híbridos comerciales de diferente ciclo, tipo y forma de grano aportados por la empresa Nidera. Los híbridos utilizados en el experimento fueron AX 820, AX 882, AX 886, AX 892, AX 894 y AX 1013. Para los fines del trabajo los híbridos mencionados se denominaron como lote L1 a L6 respectivamente. En la Tabla 1.1 se presenta la descripción de sus características principales. Los materiales se recibieron, desde la empresa que los proveyó, ya tratados con fungicidas. Los lotes de híbridos se manipularon con un equipo apropiado de protección y seguridad, se utilizó guardapolvo, guantes, mascarillas y pinzas. Se trabajó siguiendo las Normas de Seguridad e Higiene a nivel nacional a las que adhiere el INTA en su política institucional (Ley 19587, 1972; Ley 24557, 1995).

Los lotes de cariopses de maíz se acondicionaron en recipientes herméticos y se mantuvieron en cámara fría a temperatura de 10 °C ± 2 °C, durante todo el período que duró el experimento, con el objeto de evitar alteraciones en la calidad de los mismos (Figura 1.1). Para la obtención de las submuestras de trabajo necesarias para los distintos ensayos realizados, se

procedió a la homogeneización y división de cada una de las muestras originales con un divisor tipo Boerner (Figura 1.2). Previo al uso del divisor, este se desarmó, limpió y calibró apropiadamente, de manera de lograr un correcto funcionamiento del mismo (Figura 1.3).

**Tabla 1.1.** Descripción de los lotes de híbridos de maíz utilizados en el experimento.

Descripción	Híbridos					
	AX 820	AX 882	AX 886	AX 892	AX 894	AX 1013
Tipo de híbrido	Simple	Simple	Simple	Simple	Simple	Simple
	Templado	Templado	Templado	Templado	Templado	Tropical
Tipo de grano	Semi-dentado	Semi-dentado	Duro-anaranjado	Duro-anaranjado	Semi-dentado	Flint
	CL <sup>(1)</sup> MG <sup>(2)</sup>	HCL <sup>(3)</sup> MG	MG	MG	CONV <sup>(4)</sup>	MG
	Redondo 2	Redondo 2	Chato 2	Chato 2	Redondo 2	Chato 2
ICR **	116	118	118	120	119	128
Ciclo	Corto	Intermedio corto	Intermedio corto	Intermedio largo	Intermedio largo	Largo
Número de hileras de granos	16	18	16-18	16-18	16-18	14
Peso de 1000 cariopses (g)	313	321	330	329	310	350
<b>Denominación</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>	<b>L6</b>

Referencias: CL <sup>(1)</sup>: Clearfield, resistente a IMIDAZOLINONA. MG <sup>(2)</sup>: BT. Tolerante (resistente a insectos lepidópteros). HCL <sup>(3)</sup>: incorpora la tecnología CL Homo para el control de malezas utilizando OnDuty®, herbicida de BASF en base a imidazolinonas con mayor poder de control en malezas difíciles. CONV <sup>(4)</sup>: Híbrido convencional no transgénico. \*\* ICR: Índice relativo a cosecha. Datos promedio en condiciones óptimas de cultivo.

Una vez obtenidas las submuestras de trabajo, se procedió a la preparación de las repeticiones en número o peso (g) de cariopses de los distintos lotes de maíz de acuerdo a las necesidades de cada ensayo. Para realizar la caracterización de la calidad inicial de los lotes,

se procedió a realizar una serie de ensayos de laboratorio y a evaluar la emergencia a campo de los lotes de cariopses utilizados en el experimento.



**Figura 1.1.** Cariopses de los diferentes lotes en la cámara fría.



**Figura 1.2.** Vista del Divisor tipo Boerner.



**Figura 1.3.** Vista interna de las partes constituyentes del Divisor tipo Boerner.

### **1.3.1 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS LOTES DE MAÍZ**

Las pruebas utilizadas fueron las siguientes:

1.3.1.1 Determinación del Contenido de humedad (CH)

1.3.1.2 Peso de 1000 cariopses

1.3.1.3 Identificación del nivel de daño mecánico (DM): Daño mecánico leve (DML), moderado (DMM) y severo (DMS)

1.3.1.4 Pruebas de germinación: Conteo anticipado (CA), Primer conteo (PC) y Germinación estándar (PGE)

1.3.1.5 Prueba topográfica por tetrazolio (PTTZ)

1.3.1.6 Prueba de tetrazolio de aleurona (PTZA)

1.3.1.7 Prueba de conductividad eléctrica (PCE)

### **1.3.2 PRUEBAS DE EMERGENCIA A CAMPO**

#### **1.3.1 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS LOTES DE MAÍZ**

##### **1.3.1.1 Determinación del Contenido de humedad**

Se determinó el CH inicial de los lotes de híbrido de maíz en estudio, de acuerdo a la metodología estandarizada en el Laboratorio de la EEA Oliveros del INTA. Se utilizó una estufa de secado (Dalvo, Argentina) que se encendió 24 horas antes de la ejecución del ensayo, se controló la fluctuación de la temperatura durante ese período y el momento en que entró en régimen. El ensayo se dio por comenzado una vez que se alcanzó la temperatura deseada.

Se utilizaron dos repeticiones para cada lote de híbrido de maíz. Se pesaron  $5\text{ g} \pm 0,25\text{ g}$  de cariopses para cada repetición, los mismos se colocaron en recipientes descartables de aluminio y se luego se introdujeron en la estufa a  $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 1\text{ h}$  (Figuras 1.4, 1.5 y 1.6). Trascurridas las 24 h de permanencia en la estufa a la temperatura de secado, los cariopses de maíz se dejaron enfriar por dos horas y se determinó el peso seco en gramos. Se realizó la determinación por diferencia de peso (g) antes y después de su estadía en la estufa. El CH se expresó como porcentaje en peso de la muestra original.



**Figura 1.4.** Peso de 5 g de cariopses de los **lotes** de maíz de cada repetición.



**Figura 1.5.** Repeticiones de cada **lote** de maíz ya pesadas y listas para su ingreso a estufa.



**Figura 1.6.** Repeticiones de cada **lote** de maíz en la estufa de secado.

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$H \% = M2 - M3 / M2 \times 100$$

Donde:

M2: peso (g) de la muestra húmeda, descontando el peso del recipiente.

M3: peso (g) de la muestra después del secado, descontado el peso del recipiente.

#### **1.3.1.2 Peso de 1000 cariopses**

Se determinó el Peso de 1000 cariopses de los lotes de los híbridos en estudio de acuerdo a la metodología recomendada por las Reglas Internacionales para Análisis de Semillas de la ISTA (2007). El peso de los cariopses de maíz es una variable que forma parte de los atributos de calidad y brinda información para caracterizar los materiales.

Se realizó el conteo de ocho repeticiones de 100 cariopses puros en forma manual. Para la identificación de los cariopses se tuvo en cuenta la definición de Semilla pura de maíz según metodología descrita por las Reglas ISTA (2007). Se consideró como semilla pura a los cariopses enteros y a la porción de cariopses de tamaño mayor a la mitad del tamaño original.

Las repeticiones se colocaron en recipientes individuales y se pesaron en gramos con dos cifras decimales en una balanza marca Ohaus. Posteriormente, se calculó el promedio de las ocho repeticiones, se multiplicó por diez y de esta manera se obtuvo el valor del Peso de los 1000 cariopses. Este es un atributo de medición rápido, de fácil ejecución y no requiere equipamiento costoso ni sofisticado. Los Laboratorios de análisis de calidad de semillas deben poseer este tipo de balanza para su Habilitación y/o Acreditación bajo Normas MERCOSUR de acuerdo a la Resolución GMC N° 60/97 (1997).

### 1.3.1.3 Identificación del nivel de daño mecánico

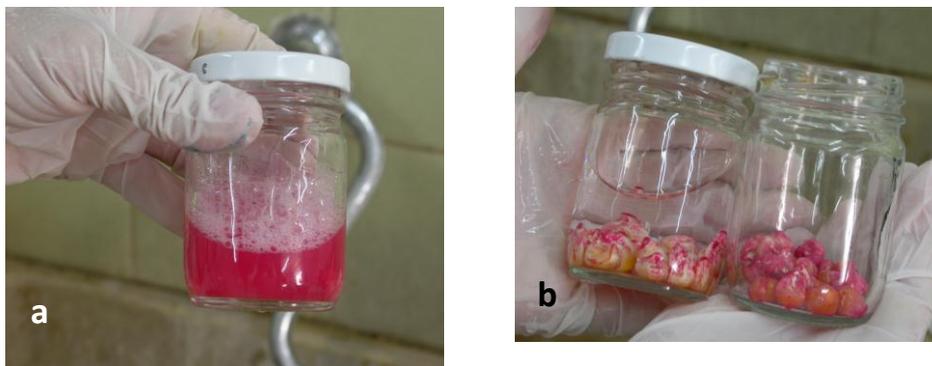
Para identificar el nivel de daño mecánico de los lotes de los híbridos de maíz se condujo la Prueba de verde rápido (PVR), también conocida como *Fast Green*.

Para la ejecución de la prueba se utilizó una solución de la droga *Fast Green* FCF ( $C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$ ) al 0,1 %. Se trabajó con cuatro repeticiones de 50 cariopses puros para cada lote en estudio. Este es un ensayo de coloración que se evalúa por la observación visual de la aparición de áreas de color verde sobre la superficie de los cariopses. Debido a que los lotes de los híbridos estaban tratados con fungicida en origen, se retiró la mayor cantidad posible del producto depositado sobre los mismos a través de una operación de lavado con agua corriente. Se trabajó utilizando guantes descartables, guardapolvo, barbijo y pinzas siguiendo las Normas de Seguridad e Higiene (Ley 19587, 1972; Ley 24557, 1995).

#### Lavado de los cariopses

Los materiales utilizados en la realización del lavado fueron los siguientes: recipientes de vidrio transparente con tapa y colador de plástico.

Los cariopses de maíz de cada repetición se colocaron en un recipiente de vidrio con abundante agua, se taparon y se procedió a realizar un agitado suave con movimientos circulares (Figura 1.7) para evitar la producción de cualquier tipo de lesiones que pudieran alterar los resultados de la prueba.



**Figura 1.7.** Lavado de cariopses de maíz. a) Cariopses de maíz antes del lavado y b) luego del mismo.

Se realizaron varios cambios del agua de lavado, por lo menos tres, hasta que la misma quedó transparente. En cada cambio se utilizó un colador para retener los cariopses y evitar pérdidas de los mismos. Los cariopses de maíz una vez que fueron lavados, se utilizaron para conducir la técnica propiamente dicha.

### **Técnica de verde rápido**

Los materiales necesarios para la realización de la técnica fueron los siguientes: erlenmeyer de 500 ml; colador de plástico; agua corriente; bandejas; papel absorbente y pinzas. Para el procedimiento, los cariopses de cada repetición se colocaron en un erlenmeyer de 500 ml y se sumergieron completamente en 200 ml de la solución al 0,1 % de *Fast Green* durante 60 segundos (Figura 1.8). En esta etapa, el erlenmeyer conteniendo los cariopses y la solución se agitó suavemente con movimientos circulares. Se dejó reposar por 60 segundos y luego se transvasó la solución de *Fast Green* a otro erlenmeyer reteniendo los cariopses en un colador. Luego, los cariopses se enjuagaron con abundante agua corriente y se los colocó en bandejas sobre una hoja de papel absorbente por 30 minutos para que se orearan.

Posteriormente, se realizó la evaluación a través de la observación visual de los cariopses individuales (Figura 1.9).



**Figura 1.8.** Cariopses de maíz sumergidos en la solución de *Fast Green*.



**Figura 1.9.** Cariopses de maíz luego de la Prueba del verde rápido.

En la evaluación (Figura 1.10), se observó el tamaño y la ubicación de las deposiciones de la solución de *Fast Green* en las distintas partes de los cariopses, se comparó con los patrones específicos de la técnica y se procedió a la clasificación de los mismos de acuerdo a la intensidad del daño en: Daño mecánico leve (DML), moderado (DMM) y severo (DMS) (Gutormson, 1992; Arango y Craviotto, 2007).



**Figura 1.10.** Patrón de clasificación del Daño mecánico en cariopses de maíz. a) Daño leve; b) daño moderado y c) daño severo.

#### 1.3.1.4. Pruebas de germinación

##### **Conteo anticipado, Primer conteo y Germinación estándar**

La Prueba de germinación estándar (PGE) se condujo siguiendo la metodología propuesta por las Reglas ISTA (2007). Se utilizaron cuatro repeticiones de 50 cariopses cada una, separados de la fracción de cariopses puros, sin lavado previo para cada uno de los lotes de los híbridos. Para la identificación de los cariopses puros se tuvo en cuenta la definición de Semilla Pura de maíz de las Reglas ISTA (2007). Se usó el método Entre papeles, con el armado de rollos y como sustrato papel toalla (soft, Kimberly Clark) humedecido a condición de saturación. Se determinó la capacidad de retención de agua del papel siguiendo la metodología propuesta por el INASE (comunicación institucional, 2009). Para ello, se cortó un trozo de papel de 4 x 4 cm, se pesó, se lo sumergió en agua durante dos minutos sosteniéndolo con una pinza, se lo dejó escurrir por 30 segundos, se lo pesó nuevamente y se calculó la capacidad de

retención por diferencia de peso. El papel utilizado en el experimento mostró poseer una capacidad de retención del 624,4 %. Los rollos se armaron con dos papeles abajo y uno arriba y los cariopses se sembraron con los embriones orientados con la radícula hacia abajo (Figura 1.11). Los cuatro rollos de cada lote se colocaron en bolsas de polietileno y se cerraron para evitar pérdidas de humedad. Se ubicaron en posición vertical en un recipiente de transporte y se enviaron a la cámara de germinación a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 7 días con luz continua. Para la evaluación de las plántulas se utilizó el criterio del Manual de Evaluación de Plántulas de ISTA (2003). Se evaluó el porcentaje de los mismos que produjeron plántulas normales en el Conteo anticipado (CA) y Primer conteo (PC) del total de cariopses sembrados a los 3 y 4 días respectivamente y plántulas normales, anormales y semillas no germinadas en la PGE a los 7 días de estadía en cámara de germinación. Los resultados se expresaron como porcentaje de plántulas normales producidas.



**Figura 1.11.** Armado de los rollos de papel para la Prueba de germinación estándar.

En la evaluación se consideró como **plántulas normales de maíz** a las siguientes tres categorías: a) **plántulas intactas:** fueron aquellas que presentaban todas sus estructuras esenciales bien desarrolladas, completas en proporción y sanas (Figura 1.12); b) **plántulas con defectos leves:** fueron aquellas que mostraron ciertos defectos leves en sus estructuras esenciales, pero por lo demás poseían un desarrollo balanceado y satisfactorio comparable con las plántulas intactas del mismo ensayo y c) **plántulas con infección secundaria:** fueron aquellas que por su aspecto podían considerarse como pertenecientes a cualquiera de las dos

categorías anteriores pero estaban infectadas por hongos o bacterias procedentes de otros cariopses (ISTA, 2007). Por otro lado, se consideraron **plántulas anormales** a aquellas que no mostraron el potencial para producir una plántula normal aun cuando crecieron en condiciones favorables.



**Figura 1.12.** Plántulas normales de maíz obtenidas en la Prueba de germinación estándar.

Se clasificaron como **plántulas anormales** a las tres categorías siguientes: a) **plántulas dañadas**: aquellas plántulas con alguna de sus estructura esenciales pérdidas o seria e irreparablemente dañadas, de manera que no se podría esperar de ella un desarrollo balanceado (Figura 1.13); b) **plántulas deformadas** o **desbalanceadas**: aquellas que mostraron débil desarrollo, disturbio fisiológico, estructuras esenciales deformadas o fuera de proporción y c) **plántulas podridas**: son las que mostraban alguna o todas sus estructuras esenciales podridas o deterioradas por una infección primaria producida por el propio cariopses (ISTA, 2007).

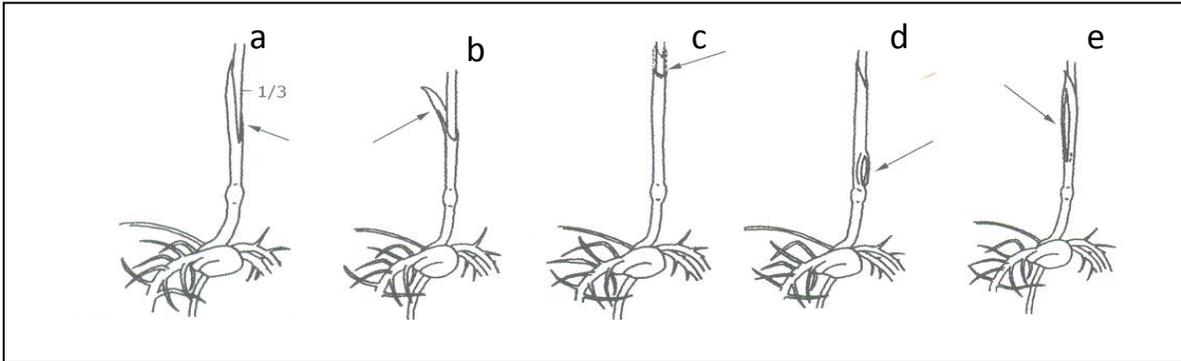
Se clasificaron como **semillas no germinadas** a aquellos cariopses que no mostraron ninguna evidencia de germinación al final del período de la prueba y se consideraron como **cariopses muertos**.



**Figura 1.13.** Plántulas anormales de maíz. a) Hipocotilo nendido y nojas primarias dañadas; b) ausencia de parte aérea.

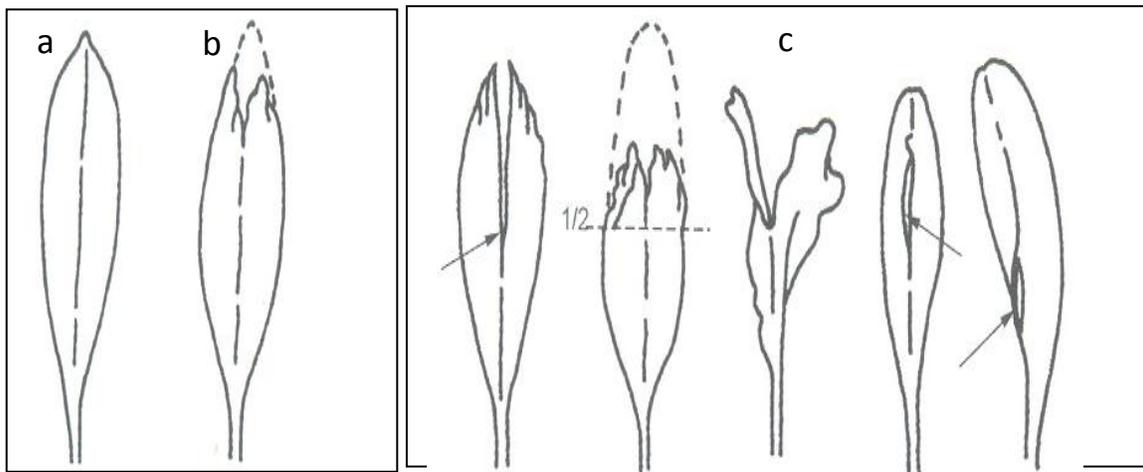
Para la evaluación de plántulas de maíz, ISTA (2007) brinda algunas directivas especiales referidas a daños que pueden ocurrir en el coleóptilo y en la primera hoja. Cuando se ha producido la emergencia de la primera hoja de la plántula de maíz a través del poro subapical del coleóptilo, en la evaluación de la plántula se debe considerar conjuntamente la presencia de daños en coleóptilo y en la hoja para su clasificación como normal o anormal. Si por el contrario, la primera hoja no ha emergido durante el ensayo al momento del recuento, esta no puede evaluarse y si el coleóptilo presenta daños, la plántula se considera anormal.

En la clasificación de las plántulas se prestó especial atención a un conjunto de defectos en el coleóptilo descritos como: a) hendido longitudinalmente en más de un tercio desde el ápice; b) curvado; c) ápice perdido; d) hendido en la base y e) hendido en el dorso (Figura 1.14).



**Figura 1.14.** Esquema de daños en el coleóptilo de maíz descritos en las Reglas ISTA. a) Hendido longitudinalmente en más de un tercio desde el ápice; b) curvado; c) ápice perdido; d) hendido en la base y e) hendido en el dorso. Fuente: ISTA (2007).

Cuando se presentaron algunos de estos defectos, se observó el estado de la primera hoja (Figura 1.15). Las plántulas que presentaron alguno de los daños descritos para el coleóptilo y además produjeron una primera hoja intacta o con daños ligeros, se clasificaron como normales y por el contrario, cuando la primera hoja mostró daños de mayor severidad, se clasificaron como anormales (ISTA, 2007).



**Figura 1.15.** Esquema de daños de la primera hoja de maíz a tener en cuenta en la evaluación de plántulas con coleóptilos dañados: a) intacta; b) ligeramente dañada; c) daños de diferente magnitud. Fuente: ISTA (2007).

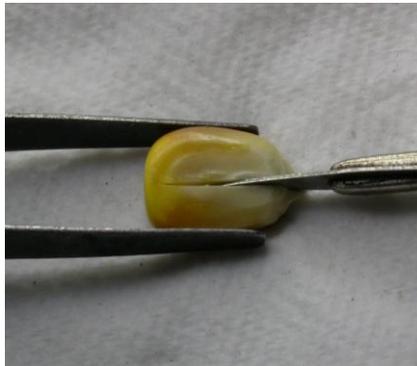
Con el objeto de obtener mayor información de la Prueba de germinación estándar se realizaron tres recuentos de plántulas normales durante el proceso de germinación. Para realizar el CA se procedió a retirar los rollos de la cámara de germinación a los tres días. Los rollos se manipularon con sumo cuidado, se realizó el recuento de las plántulas normales exclusivamente sin retirarlas del rollo y sin agregar agua adicional, posteriormente se los cerró y se los colocó nuevamente en la cámara. Las plántulas no se retiraron del sustrato para permitir los recuentos posteriores. En el CA, las plántulas de maíz mostraron un crecimiento apropiado para realizar una evaluación anticipada, la primera hoja estaba aún dentro del coleóptilo pero la transparencia de este permitió ver su tamaño en longitud. El resultado se expresó como porcentaje de plántulas producidas. Al cuarto día de estadía en la cámara de germinación se repitió la operación. Se abrieron los rollos con cuidado, se registraron nuevamente las plántulas normales sin retirarlas del sustrato y sin agregar agua adicional se volvieron a cerrar los rollos y se depositaron nuevamente en la cámara de germinación. Se obtuvo de esta manera, el porcentaje de plántulas normales del PC. Al séptimo día se realizó el recuento final de plántulas de la Germinación estándar se aplicó el criterio general de ISTA (2007). En este recuento se retiraron del sustrato todas las plántulas, se las clasificó y se registró el número total de plántulas normales, anormales y semillas no germinadas como muertas. El resultado de la prueba se informó como porcentaje de plántulas normales producidas y para evaluar las diferencias entre repeticiones se utilizaron las tablas de tolerancia de ISTA (2007).

#### **1.3.1.5 Prueba topográfica por tetrazolio**

La Prueba topográfica por Tetrazolio (PTTZ) es una de las pruebas más ampliamente usadas y útiles para evaluar la viabilidad de semillas e incluso puede ser aplicada en la determinación del vigor en diferentes especies. Es rápida y permite obtener el resultado en 24 o 48 h. Se basa en una reacción química de coloración que pone de manifiesto la actividad respiratoria de las mitocondrias indicando la viabilidad de las células y los tejidos. Los tejidos viables respiran produciendo protones Hidrógeno ( $H^+$ ) que reaccionan con el Tetrazolio y por lo tanto se tiñen, mientras que por el contrario los tejidos no viables no se tiñen o lo hacen en forma incompleta.

Para la ejecución de la prueba se utilizaron cuatro repeticiones de 50 cariopses cada una, tomadas de la fracción de cariopses puros, previo lavado para retirar el fungicida con el que fue tratado en la empresa. Esta operación tiene por objeto facilitar la observación de la tinción con la sal de Tetrazolio (TZ). La prueba se condujo siguiendo la metodología descrita en las Hojas de Trabajo de ISTA (2003) y en el Manual de Tetrazolio de AOSA (2000). Con posterioridad al lavado, los cariopses de maíz se sometieron a un acondicionamiento previo, sumergiéndolos en agua corriente durante toda la noche (16 a 18 horas) a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  para lograr la hidratación de los tejidos. Este acondicionamiento permitió facilitar el corte y la penetración de la solución de TZ. Sobre cada cariopses se realizó un corte longitudinal completo por la parte media del embrión y  $\frac{3}{4}$  del endosperma (Figura 1.16).

El corte se realizó con sumo cuidado, con bisturí y bajo lupa binocular, de manera que el embrión se seccionó totalmente quedando las dos mitades unidas por una pequeña porción de endosperma en la parte de la corona. Luego, en la evaluación se terminó de realizar el corte con bisturí y se observaron detenidamente las dos mitades del embrión.



**Figura 1.16.** Ejecución del corte longitudinal incompleto del embrión de un cariopse de maíz con bisturí en la Prueba topográfica por tetrazolio.

Se empleó una solución acuosa de la sal de Tetrazolio (Cloruro de 2,3,5 Trifenil Tetrazolio) a una concentración del 1 %. Para su preparación se disolvieron 10 g de la sal de TZ en 1000 ml de solución buffer, para mantener los requerimientos del pH de la solución entre 6,5 - 7,5. La solución buffer se preparó con 9,078 g de fosfato diácido de potasio en 1000 ml de agua deionizada (solución 1) y 11,876 g de fosfato monoácido de potasio en 1000 ml de agua

deionizada (solución 2) (ISTA 2007). La solución final de trabajo se conformó mezclando 400 ml de la solución 1 y 600 ml de la solución 2. Las soluciones se conservaron en frascos de vidrio color caramelo y en heladera, para evitar posibles alteraciones.

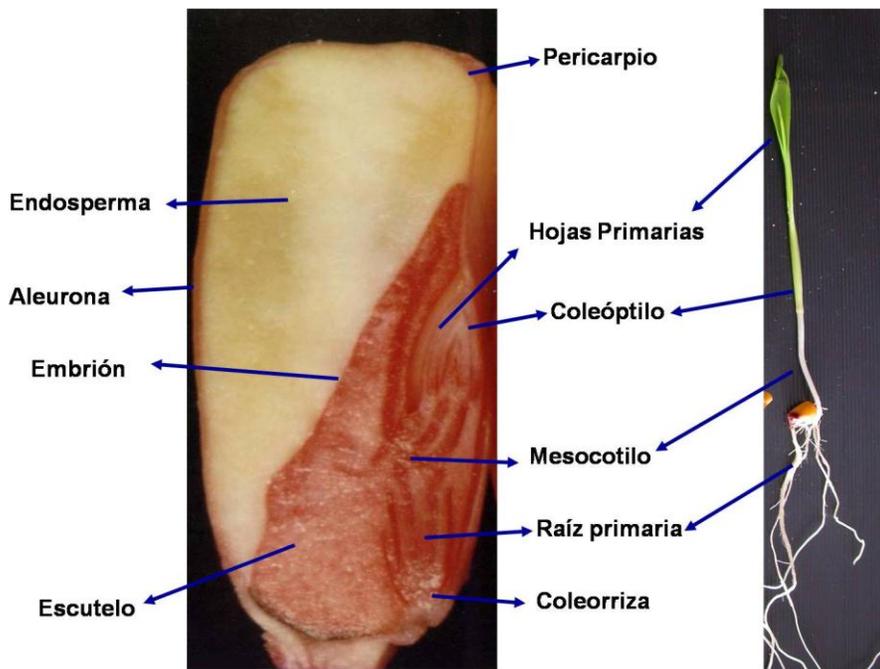
Para la tinción, los cariopses cortados se sumergieron totalmente en la solución de TZ en recipientes de vidrio con tapa y se incubaron en un baño termostático (Viking, modelo Masson, Bs, As. Argentina) a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 h y en oscuridad. Luego del período de incubación, se retiraron los recipientes del baño termostático y se eliminó la solución de TZ con ayuda de un colador para evitar pérdidas de cariopses. Se realizó un cuidadoso lavado con abundante agua corriente para eliminar restos de la solución de TZ. Los cariopses se mantuvieron sumergidos en agua durante todo el período de la evaluación. Esta operatoria evitó la deshidratación de los cariopses y facilitó la observación de las diferentes estructuras del embrión.

En la evaluación se analizó cada cariopse individualmente. Para ello se sujetó a cada cariopse con una pinza, se completó el corte total en la parte de la corona con bisturí y de esta manera, se logró la apertura del cariopse en dos mitades y se observó la coloración que presentó cada una de las distintas estructuras en cada mitad del embrión bajo lupa binocular (Figura 1.17).



**Figura 1.17.** Cariopse de maíz cortado y teñido con la solución de tetrazolio.

Durante la evaluación de cada cariopse se observó el desarrollo del color sobre el embrión, la localización de áreas teñidas y no teñidas, la turgencia de los tejidos y se identificaron y consignaron la localización de los daños específicos en caso de estar presentes. En base a estas observaciones y el conocimiento en detalle de las partes constituyentes del embrión de maíz y su correspondencia con una plántula normal (Figura 1.18), se realizó la categorización de cada uno de los cariopse en diferentes niveles de Viabilidad. En la evaluación de la PTTZ se tomaron en cuenta los patrones establecidos por el Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros del INTA (Craviotto y Arango, 2006) para la especie maíz, que realiza la clasificación de los cariopse en: Viables sin defectos, Viables con defectos moderados, Viables con defectos severos y No viables (Figura 1.19 y 1.20).



**Figura 1.18.** Esquema de las partes constituyentes del embrión de maíz y su correspondencia con una plántula.



**Figura 1.19.** Patrones de clasificación de cariopses de maíz en niveles de Viabilidad para la Prueba topográfica por tetrazolio.

<i>Clases de Viabilidad</i>	<i>Referencias</i>	
1- <i>Viables Sin Defectos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Tinción de color rojo en "todas" las estructuras embrionarias</li> <li>▶ Uniforme distribución de coloración</li> <li>▶ Turgencia buena</li> </ul>	
2- <i>Viables Defectos Moderados</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Defectos menores a los incluidos en la clase de Viabilidad 3</li> </ul>	▶ <i>Límite de Vigor</i>
3- <i>Viables Defectos Severos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Falta de tinción en algunas áreas de estructuras embrionarias</li> <li>▶ Uniformidad de coloración en áreas críticas</li> <li>▶ Turgencia buena en áreas críticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ <i>Defectos Mutuamente Excluyentes</i></li> <li>▶ <i>Límite de Viabilidad</i></li> </ul>
4- <i>No Viables</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Sin tinción en áreas críticas</li> <li>▶ Desuniformidad de coloración en áreas críticas</li> <li>▶ Turgencia perdida en áreas críticas</li> </ul>	

**Figura 1.20.** Descripción de los Patrones de clases de Viabilidad en maíz para la Prueba topográfica por tetrazolio.

Los patrones de Viabilidad y Vigor se utilizaron para obtener mayor información de la PTTZ. Estos contemplan intervalos o niveles dentro de los cuales se pueden encontrar con mayor frecuencia los posibles daños que habitualmente se observaron en la especie maíz. En el Nivel 1, denominado Viables sin Defectos (VSD), se incluyeron aquellos cariopses que mostraron un estado perfectamente saludable y sin ningún tipo de daño. Esto último se manifestó por la tinción completa y uniforme del embrión de color rojo y se acompañó de una buena turgencia de los tejidos. En el Nivel 2, denominado Viables Defectos Moderados (VDM), se incluyeron aquellos cariopses que mostraron ciertos daños, pero que por su ubicación en el embrión o por su reducido tamaño permiten la producción de una plántula normal, aunque la misma presente defectos leves.

El Nivel 3 corresponde a Viables Defectos severos (VDS) y se incluyeron aquellos cariopses que mostraron ciertos daños, pero que por su ubicación en el embrión o por su tamaño permiten la producción de una plántula con defectos. No obstante ello, se los consideró como viables y representó el límite de la viabilidad. Los daños o defectos permitidos en este nivel son mutuamente excluyentes, esto significa que solo se permitió la presencia de uno de

los mencionados daños en el patrón. La aparición de más de uno de ellos determinó la clasificación del cariopse en una categoría inferior de viabilidad que corresponde al Nivel 4, es decir se incluyeron en no viables. Por último, aquellos cariopses que presentaron daños de diferente magnitud y de gran severidad se ubicaron directamente en el Nivel 4, definido como No viables (NV). En esta categoría se incluyeron cariopses con áreas sin tinción (blancas), necróticas, seriamente dañadas, podridas o ausentes sobre estructuras esenciales del embrión para la producción de una plántula normal. Los cariopses de esta categoría podrían dar origen a plántulas anormales o directamente no germinar. Para el registro de los datos se utilizó la planilla interna de trabajo para la PTTZ implementada por el Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros del INTA (Figura 1.21).

N° Interno:	Fecha Análisis:	Especie:	Analista:	N° de Semillas Evaluadas:	Repetición:			
1- Viables Sin Defectos			2- Viables Defectos Moderados					
3- Viables Defectos Severos			4- No Viables					
RESULTADOS								
VIABILIDAD POR TETRAZOLIO <sup>(1)</sup>	N° de Semillas	VIGOR POR TETRAZOLIO <sup>(2)</sup>	N° de Semillas	DAÑOS				
1- Viables Sin Defectos		A- Vigor Alto		Coleóptilo/Ptúmula	Radícula/Primordios seminales	Escutelo	Mesocótilo	Otros
2- Viables Defectos Moderados		B- Vigor Medio						
3- Viables Defectos Severos Limite Critico								
4- No Viables								
Semillas Viables (1+2+3)		Vigor (....+....)		Σ	Σ	Σ	Σ	Σ

Fuente: E.E.A. Oliveros - INTA (1) Resultado para reportar en el Certificado Oficial de Análisis de Semillas (2) Resultado para uso No Oficial (uso interno) exclusivamente.

**Figura 1.21.** Planilla interna de trabajo para la Prueba topográfica por tetrazolio. Determinación de Viabilidad, Vigor y localización de daños observados.

Estos patrones permitieron clasificar a los cariopses de maíz en diferentes niveles de viabilidad y obtener mayor información sobre la conformación del lote de simiente. El resultado

de la Viabilidad de la PTTZ se obtuvo sumando el número de cariopses incluidos en los Niveles 1, 2 y 3 y se expresó en porcentaje.

Además, de estos resultados se obtuvo el de Vigor de los lotes de los híbridos en estudio, clasificando directamente a los cariopses incluidos en el Nivel 1 de Viabilidad como de Vigor alto (VA) y los incluidos en el Nivel 2 como de Vigor medio (VM). Los cariopses que se clasificaron dentro del Nivel 3, fueron aquellos que presentaron defectos de tal magnitud que se consideraron como severos, conformaron un Límite crítico para la viabilidad y por lo tanto no se incluyó en el Vigor. El resultado de vigor de cada híbrido se informó como Vigor total (VT) y correspondió a la suma de los cariopses incluidos en VA y VM.

#### **1.3.1.6 Prueba de tetrazolio de aleurona**

La Prueba de tetrazolio de aleurona (PTZA) es un análisis que se basa en una observación visual, con identificación de los tejidos vivos y los no vivos sobre la superficie del cariopse de maíz, en base a la formación de una coloración rojiza de diferente intensidad en la capa de aleurona. En esta prueba se evaluó la viabilidad por la cuantificación de la superficie viva de la misma. El pericarpio del cariopse de maíz es transparente y permite visualizar claramente por debajo de él la capa de aleurona coloreada.

La coloración rojiza se genera como consecuencia de la reacción de óxido reducción de la solución incolora de la sal de Cloruro de 2,3,5 Trifenil Tetrazolio, en respuesta a la actividad respiratoria de las mitocondrias de las células de los tejidos vivos. Por el contrario, las células y los tejidos no vivos no reaccionan con la solución de TZ y por ende no se tiñen. En función del tamaño de la superficie coloreada y no coloreada de la capa de aleurona se determina su viabilidad.

La metodología de esta técnica se encuentra descrita en los Manuales de Vigor de ISTA (1981; Hampton y TeKrony, 1995), pero en ambos casos se menciona a dos coloraciones: roja y blanca, para identificar las categorías de tejidos viables y no viables. Esto no alcanza a describir con precisión lo que ocurre en realidad con el color de la capa de aleurona luego de la incubación, ya que según Craviotto (2006) generalmente aparece una gradación de colores que

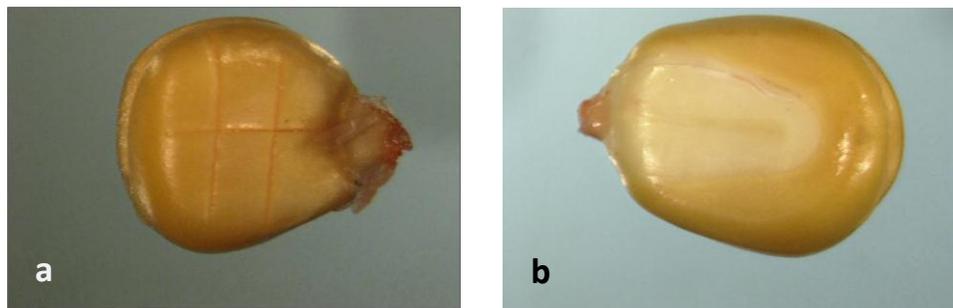
va desde una coloración anaranjada a roja. Craviotto (2006) puso de manifiesto la aparición de diferentes tonalidades dentro del espectro del rojo con distintos niveles de intensidad y relacionados con diferentes niveles de actividad respiratoria. Las distintas tonalidades asociadas a la viabilidad de la capa de aleurona fueron descritas utilizando la Tabla Munsell (1975) como: naranja pálido (10YR8/6), naranja (10YR8/8), naranja intenso (10YR7/8), rojo (10R5/8), rojo intenso (10R4/8) y rojo oscuro (10R4/6) (Anexo 1). El uso de esta gradación de colores permitió cuantificar de una mejor manera la variabilidad de la viabilidad de la capa de aleurona y relacionarlo con el diferente comportamiento de los cariopses en condiciones adversas. Por otro lado, el autor menciona la importancia de utilizar en el ensayo una muestra o repetición testigo, para confirmar la presencia o ausencia de color en lotes que muestren una tinción con tonalidades muy pálidas.

Esta prueba se condujo de acuerdo a la metodología recomendada por los Manuales de Vigor de ISTA (1981; Hampton y TeKrony, 1995) y Craviotto (2006). Los cariopses se clasifican en dos categorías de acuerdo al área de capa de aleurona teñida: **Vigoroso:** más de un 75 % de superficie de aleurona teñida y **No vigoroso:** menos de 75 % de superficie de aleurona teñida. Craviotto (2006) describió la evaluación en tres niveles de área teñida que incluyó: mayor al 75 % de la superficie de capa de aleurona se consideró de vigor alto; entre 75-50 % se consideró de vigor medio y menor del 50 % se consideró de vigor bajo.

Se utilizaron cuatro repeticiones de 50 cariopses de la fracción de cariopses puros de la muestra de cada lote de híbrido en estudio. Se realizó el lavado de los cariopses para retirar el fungicida que poseían como se describió en la PVR. El lavado se realizó para evitar interferencias con el color desarrollado por la PTZA. Con posterioridad, los cariopses se sometieron a un pre acondicionamiento sumergiéndolos totalmente en agua corriente durante toda la noche (16 a 18 horas) a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en recipientes de vidrio con tapa. La incubación se realizó en baño termostático (Viking, modelo Masson, Bs, As. Argentina). Luego de la imbibición, los cariopses se prepararon para la tinción, para ello se realizaron los cortes recomendados en los Manuales de vigor de ISTA anteriormente citados. Con el auxilio de un bisturí se realizaron incisiones, uno en forma de "H" sobre la cara opuesta al embrión y otro longitudinal frontal, especialmente en los granos chatos (Figura 1.22). En los lotes de los híbridos con cariopses clasificados como redondos, que en realidad mostraron una forma de prisma irregular, se dificultó la ejecución de los cortes. No obstante, se realizaron ambos, la

incisión en forma de “H” en la cara que ofreció la mayor superficie y siempre cuidando de no dañar el embrión. Los cortes mencionados se realizaron con la suficiente profundidad para cortar solamente el pericarpio y facilitar la penetración uniforme de la solución de TZ para teñir las células de la capa de aleurona.

Debido a que se trata de una prueba de coloración donde se realiza una evaluación a simple vista y teniendo en cuenta que los distintos lotes de los híbridos de maíz presentaron coloración propia, en todos los lotes se utilizó una muestra testigo que se incubó sin solución de TZ. Esto permitió asegurar, por comparación, la existencia o no de tinción en la capa de aleurona de los lotes de híbridos aun cuando la coloración desarrollada fue muy pálida. Se empleó una solución acuosa de Cloruro de 2,3,5 Trifenil Tetrazolio al 1 %.



**Figura 1.22.** Vista de cortes sobre el cariopse de maíz para la Prueba de tetrazolio de aleurona. a) Corte en “H” sobre la cara opuesta al embrión y longitudinal frontal y b) cara del embrión sin corte.

Los cariopses ya cortados de cada repetición se colocaron en recipientes de vidrio, se agregó la solución de TZ hasta cubrirlos totalmente y se incubaron en baño termostático en oscuridad a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un período de cuatro días (Figura 1.23). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiraron del baño, se enjuagaron con abundante agua corriente y se dejaron sumergidos en agua durante el período de la evaluación para evitar la deshidratación.



**Figura 1.23.** Recipientes con los cariopses en el Baño termostático durante la incubación.

La evaluación de cada cariopses se realizó a simple vista, bajo lupa plato (4X) (Figura 1.24). Los cariopses de los lotes en estudio se observaron en ambas caras y se clasificaron en grupos de acuerdo al porcentaje de la superficie de capa de aleurona teñida. Los resultados se expresaron en porcentaje de cariopses teñidos para cada una de las categorías.

Los cariopses de lotes de los híbridos en estudio también se clasificaron de acuerdo al color que presentaron en la superficie de la capa de aleurona: naranja pálido, naranja, naranja intenso, rojo, rojo intenso y rojo oscuro. El resultado se expresó en porcentaje.



**Figura 1.24.** Evaluación de los cariopses de maíz.

### 1.3.1.7 Prueba de conductividad eléctrica

La Prueba de conductividad eléctrica (PCE) evalúa indirectamente la integridad de las membranas celulares. La misma mide la conductividad eléctrica generada por la liberación de solutos (iones) desde el interior de los cariopses sumergidos en un medio de imbibición.

Se utilizó como medio de imbibición agua deionizada con una conductividad eléctrica (CE) menor a 2 micro Siemens por centímetro ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Hampton y TeKrony, 1995).

Se realizó la medición de la Conductividad eléctrica de semillas individuales (CESI) del líquido de imbibición de cariopses individuales de maíz por medio de un equipo especial, el Analizador Automático de Semillas SAD 9000-S (Consultar S.H., Rosario) (Figura 1.25). El equipo consta de una serie de componentes específicos para realizar la medición: a) un cabezal múltiple de medición con 100 pares de electrodos, b) bandejas multicelda con 100 celdas individuales, c) una bandeja de lavado del cabezal, d) un dosificador múltiple de llenado con 10 picos, e) una bomba que comanda el dosificador múltiple para el llenado de las celdas y la circulación de agua de la bandeja de lavado del cabezal, f) una comunicación a una computadora personal y g) un programa específico de medición y manipuleo de datos. El programa realiza las mediciones de cada celda individual de la bandeja, registra los valores, los archiva automáticamente, realiza cálculos y obtiene los resultados en 5 minutos. Brinda informes por pantalla e impresos y expresa los resultados de conductividad media del lote en promedio de los 100 cariopses en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Además de estos resultados, por medio del uso de Valores de corte (VC), previamente incorporados al equipo para la especie en estudio, se pueden calcular los valores de Potencial de germinación y de vigor estimados.



**Figura 1.25.** Equipo de conductividad eléctrica de semillas individuales SAD 9000-S.

Para la realización de la prueba se contaron 100 cariopses puros de cada lote de los híbridos en estudio, se pesaron para incorporar este valor al programa de medición y obtener el valor de CESI por gramo. Los cariopses se lavaron previamente como se describió en la PVR, para retirar el fungicida original que poseían lotes de los híbridos y evitar interferencias en los resultados. Antes de iniciar la operación de llenado de cada bandeja multicelda de incubación se las lavó con agua deionizada a presión para que no quedaran residuos que pudieran afectar o alterar la medición. Luego del lavado de las bandejas, se procedió al llenado de las celdas con el dosificador que permite colocar un volumen calibrado y medido de 8 ml de agua deionizada en cada una. Posteriormente, se colocó un cariopses de maíz en cada celda de la bandeja multicelda y se taparon con bolsas de polietileno para evitar evaporación y/o contaminación. Se prepararon las bandejas multicelda con un intervalo de 10 minutos entre cada una para permitir un tiempo suficiente para el manipuleo de las mismas desde la cámara de incubación hasta el lugar de medición, el lavado del cabezal y la ejecución de la medición propiamente dicha. Las bandejas multicelda se ubicaron en una cámara de incubación a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 15\text{ minutos}$ . Transcurrido este período, se procedió a retirar las bandejas multicelda de la cámara en el orden de ingreso y a realizar la medición. Después de cada medición, el cabezal se depositó en la bandeja lavadora con circulación forzada de agua deionizada durante 2 minutos aproximadamente. Luego del lavado, el mismo se colocó sobre una placa de secado durante 30 segundos para retirar el exceso de agua que puede quedar en los electrodos.

El programa del equipo brinda los resultados por pantalla y un detallado informe impreso donde se observan los datos de la muestra, los valores de CE de cada uno de los 100 cariopses, los VC establecidos para la especie, el peso promedio de los 100 cariopses, la CE media en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , el desvío estándar, la temperatura ambiente y los valores estimados de Potencial de germinación y de vigor, entre otros. El programa también brinda los resultados de cada medición en cuatro repeticiones de 25 cariopses para cada lote de híbrido. Los valores de Potencial de germinación y de vigor se obtuvieron como información adicional y fueron estimados por el software del equipo a partir de VC para la especie. En este estudio, se utilizó como VC para la estimación del Potencial de germinación  $120\text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  y para vigor  $100\text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . De tal manera, que aquellos cariopses que exhibieron un valor de CE del lixiviado en un rango de  $0\text{-}120\text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  se computaron dentro del valor de Potencial de germinación y los cariopses

de maíz que lixiviaron en un rango de 0-100  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  se computaron para el valor de vigor del lote.

### **1.3.2 PRUEBAS DE EMERGENCIA A CAMPO**

Se realizaron en el campo experimental de la EEA Oliveros dos siembras de los seis lotes de los híbridos en estudio, una se realizó el 9/11/09 y otra el 20/09/10, con el objeto de obtener diferentes condiciones ambientales. Ambas siembras se realizaron en un suelo caracterizado como *argiudol típico* serie Maciel (Hein *et al.*, 1980). Durante el mes de noviembre del 2009 se registraron temperaturas medias de 23 °C, precipitaciones totales de 92,6 mm y la temperatura de suelo medida a nivel de 5 cm para el día de la siembra fue de 18 °C. Durante el mes de setiembre de 2010 se registraron temperaturas medias de 15 °C, precipitaciones totales de 45,3 mm y la temperatura de suelo medida a nivel de 5 cm para el día de la siembra fue de 14,5 °C (Estación Meteorológica convencional EEA Oliveros, 2009 y 2010) (Anexo 2).

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) con 3 repeticiones con surcos de 10 m de longitud cada uno. En cada repetición se sembraron los seis lotes de los híbridos distribuidos al azar, con una distancia de 70 cm entre surcos, se utilizó una distancia de 20 cm entre golpe y una profundidad de siembra de 5 cm. En la primera fecha se realizó un riego a los dos días de la siembra, por las escasas precipitaciones ocurridas durante el mes de noviembre hasta el momento de la siembra (8,5 mm). En la segunda fecha no se realizó riego alguno. Las siembras se realizaron a mano, con ayuda de un sembrador manual denominado comúnmente “gaviota” o “escopeta”, asegurándose colocar un solo cariopse por golpe y en cada surco se distribuyeron los 50 cariopses (Figura 1.26). Se realizaron dos recuentos de plántulas emergidas.

El primer recuento se realizó en el estadio fenológico V1 de la escala de Ritchie y Hanway (1982) cuando se comprobó que la primera hoja se había desarrollado en la mayoría de las plántulas del surco, es decir la primera hoja había emergido y atravesado el poro sub apical del coleóptilo. El segundo recuento se realizó en estadio fenológico V2 de la escala mencionada (Ritchie y Hanway, 1982) cuando los lotes de los híbridos mostraron dos hojas plenamente desplegadas.



**Figura 1.26.** Ejecución de la siembra en el campo de la EEA Oliveros. a) Uso de la “gaviota” y b) vista de los bloques ya sembrados.

### 1.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para estudiar e identificar la existencia de posibles diferencias en promedio entre los seis lotes de los híbridos de maíz en estudio con respecto a un conjunto variables de calidad inicial se aplicó un DCA y la técnica de Análisis de la Variancia (ANAVA). Luego se aplicó un test de comparaciones múltiples de Tukey para estudiar cuáles de los lotes de los híbridos considerados en el análisis diferían entre sí y poder clasificarlos por su respuesta a la variable. Se analizó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de variancias requeridos para la aplicación del ANAVA mediante la aplicación del Test de Kolmogorov y Levene respectivamente (Montgomery, 2004). En los casos para los cuales no se cumplió la normalidad del ANAVA y/o no se contó con la cantidad de observaciones suficientes se aplicó el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis y en el caso del no cumplimiento del supuesto de homogeneidad de variancias se realizaron transformaciones sobre la variable (Montgomery, 2004). En el análisis de la variable Potencial de germinación dentro de CE se aplicó la transformación arco seno raíz cuadrada de  $x$  para corregir la falta de homogeneidad de la varianza. Se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) para estudiar la relación entre las pruebas de calidad utilizadas y la emergencia de campo en las dos fechas de siembra.

Para la ejecución de los análisis se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

## 1.4 RESULTADOS

### 1.4.1 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS LOTES DE MAÍZ

#### 1.4.1.1 Determinación del Contenido de humedad

Se estudiaron las posibles diferencias en la variable CH por medio de aplicación del test no paramétrico de Kruskal-Wallis. La Tabla 1.2 muestra el promedio del CH, expresado en porcentaje, de cada uno de los lotes de los híbridos de maíz en estudio, ordenados de mayor a menor. No se encontraron diferencias significativas entre los híbridos para la variable CH ( $p=0,062$ ).

**Tabla 1.2.** Contenido de humedad (%) de los lotes de maíz.

Lotes	Contenido de humedad (%)
L5	15,32 ns
L1	15,25 ns
L3	14,83 ns
L2	13,59 ns
L4	13,13 ns
L6	12,69 ns

ns: no significativo

#### 1.4.1.2 Peso de 1000 cariopses

Para la variable Peso de 1000 cariopses, el test de comparaciones múltiples de Tukey mostró que hubo diferencias significativas entre los lotes en estudio.

En la Tabla 1.3 se muestran los valores obtenidos en la determinación del Peso de 1000 cariopses ordenados de mayor a menor. Los lotes de los híbridos se clasificaron en seis niveles de calidad. Se observaron diferencias en los valores de la variable Peso de 1000 cariopses obtenidos en este trabajo y los informados por la empresa Nidera en la descripción de sus híbridos comerciales (Tabla 1.1).

**Tabla 1.3.** Peso de 1000 cariopses (g) de los lotes de maíz.

Lotes	Peso de 1000 Cariopses (g)	
L2	364,10	a *
L1	343,93	b
L4	316,70	c
L3	303,15	d
L6	255,51	e
L5	241,20	f

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

#### 1.4.1.3 Identificación del nivel de daño mecánico

La Tabla 1.4 muestra el promedio de DML, DMM y DMS identificados por la PVR expresado en porcentaje de los lotes de los híbridos de maíz en estudio. En el análisis de la variable DM se observaron diferencias significativas entre los lotes de los híbridos para todos los niveles de daño evaluados. Los resultados del test de comparaciones múltiples de Tukey para el nivel DML permitió la separación de los lotes de los híbridos en tres niveles. Los lotes que presentaron mayor DML fueron los lotes L2 y el L1, mientras que el menor valor lo presentó L3. Los restantes fueron intermedios. El análisis del DMM permitió la separación de los lotes en dos niveles, el L3 mostró el mayor valor y difirió significativamente del resto de los lotes. Al considerar el DMS se observó también la separación de los lotes en dos niveles. El L6 presentó el mayor DMS, mientras que L4, L1 y L2 los menores valores.

Los seis lotes utilizados en el estudio presentaron diferentes características referidas al tipo y forma del grano que pueden influir en la respuesta al DM. En la Tabla 1.4 además se muestran los datos comparativos de las características del tipo y forma del grano para cada uno de los lotes de los híbridos estudiados y los niveles de DM. Los lotes L1 y L2, de tipo de grano semidentado y redondo, fueron los que mostraron el mayor DML, L3 duro anaranjado y chato el menor DML y los restantes fueron intermedios. Para el DMM el L3 de tipo duro anaranjado y chato se diferenció significativamente del resto mostrando los mayores porcentajes. Con relación al DMS, el L6 de tipo de maíz Flint y con forma de cariopse chato, presentó el mayor valor; L4 de tipo duro anaranjado y chato, L1 y L2 semidentados y redondos presentaron los menores porcentajes y los restantes mostraron comportamiento intermedio.

**Tabla 1.4.** Comportamiento de los lotes de maíz frente al Daño mecánico (%) evaluado por la Prueba de verde rápido en función de las características del tipo y forma del grano.

Lotes	Características de grano		Daño mecánico (%)		
	Tipo	Forma	Daño leve	Daño moderado	Daño severo
L6	Flint	Chato	32 b c	10 b	58 a *
L3	Duro Anaranjado	Chato	9 c	58 a	33 a b
L4	Duro Anaranjado	Chato	57 a b	13 b	30 b
L5	Semidentado	redondo	54 a b	13 b	33 a b
L1	Semidentado	redondo	73 a	11 b	16 b
L2	Semidentado	redondo	80 a	6 b	14 b

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

#### **1.4.1.4 Pruebas de germinación**

##### **Conteo anticipado, Primer conteo y Germinación estándar**

La Tabla 1.5 muestra el porcentaje de plántulas normales, ordenados de mayor a menor, producidas en un CA realizado a los tres días de estadía en la cámara de germinación, en un PC a los cuatro días y en la PGE a los siete días de los lotes de híbridos de maíz en estudio. En el CA se observaron diferencias significativas entre los lotes. Los resultados del test de Tukey para esta variable mostraron que los lotes L3 y L4 presentaron los mayores porcentajes de plántulas germinadas, el L2 el menor valor y los demás lotes valores intermedios. Esta prueba permitió clasificar a los lotes en tres niveles de germinación en respuesta a la producción de plántulas normales de maíz.

En la evaluación del PC realizado a los cuatro días, se observaron también diferencias significativas entre los lotes. A través del test de Tukey se observó nuevamente que los lotes L3 y L4 mostraron los mayores valores de plántulas germinadas y los lotes L1 y L2 mostraron los menores valores. Los restantes lotes tuvieron un comportamiento intermedio. En el PC se mantuvo el mismo ordenamiento de los lotes que en el CA. En este recuento se logró clasificar a los lotes de híbridos, en base a la producción de plántulas normales, en dos niveles de germinación.

En el conteo final de la evaluación de la PGE, también se observaron diferencias significativas entre los lotes de híbridos. En el análisis de comparación de medias de Tukey se observó que los lotes L3, L4 mostraron los mayores porcentajes de plántulas normales, el L1 mostró el menor valor y los restantes lotes tuvieron un comportamiento intermedio. Se logró un ordenamiento similar de los lotes entre CA, PC y PGE. En este último recuento se logró clasificar a los lotes, en base a la producción de plántulas normales, en tres niveles de germinación.

**Tabla 1.5.** Plántulas normales (%) producidas en el Conteo anticipado, Primer conteo y en la Prueba de germinación estándar a los 3, 4 y 7 días de estadía respectivamente en cámara de germinación de los lotes de maíz.

<b>Lotes</b>	<b>Plántulas normales (%) 3 días CA</b>	
L3	87	a *
L4	82	a
L5	70	a b
L6	65	a b
L1	55	b c
L2	33	c

<b>Lotes</b>	<b>Plántulas normales (%) 4 días PC</b>	
L3	97	a
L4	87	a
L5	79	a b
L6	75	a b
L1	61	b
L2	60	b

<b>Lotes</b>	<b>Plántulas normales (%) 7 días PGE</b>	
L3	98	a
L4	95	a
L5	88	a b
L6	86	a b
L2	76	b c
L1	65	c

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 1.6 se muestran, ordenados de mayor a menor, los resultados obtenidos de la evaluación de plántulas en la PGE de los lotes en estudio. En el conteo final de la PGE las

plántulas normales mostraron un abundante desarrollo radical. Los lotes L3 y L4 fueron los de mejor calidad y expresaron los mayores porcentajes también en el CA y en el PC. Estos dos lotes fueron los únicos que superaron en la PGE el valor denominado “germinación aceptable” de 90 %. Los lotes L1 y L2 fueron los que tuvieron la menor germinación y los restantes híbridos mostraron un comportamiento intermedio. Por otra parte, el L1 y el L2 mostraron los mayores valores de semillas muertas. Las anomalías que se presentaron con mayor frecuencia fueron ausencia y atrofia de raíz primaria.

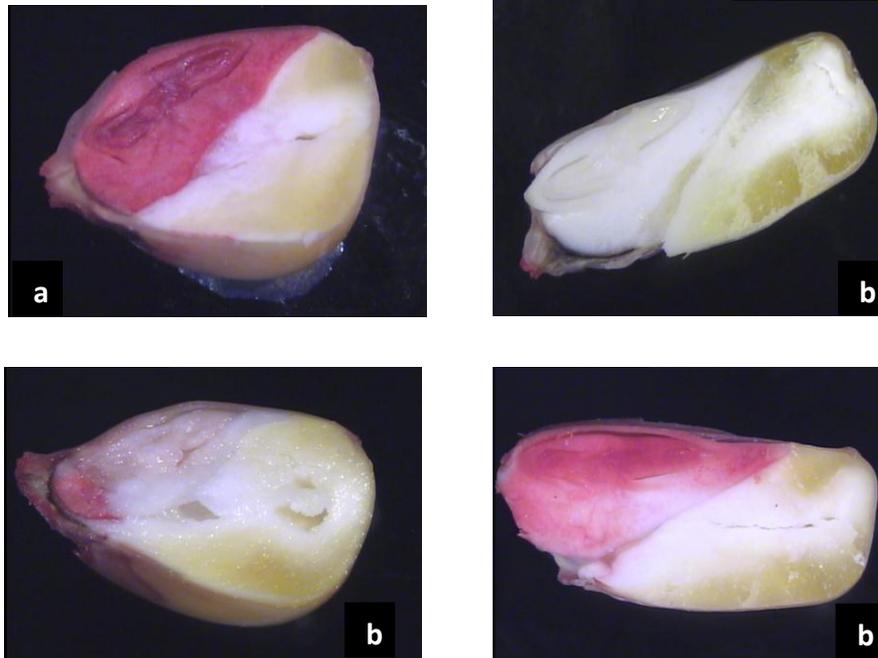
**Tabla 1.6.** Plántulas normales (%), anormales (%) y semillas muertas (%) producidas en la Prueba de germinación estándar de los lotes de maíz.

Lotes	Germinación estándar (%)		
	Plántulas normales	Plántulas anormales	Semillas muertas
L3	98 a *	0	2
L4	95 a	2	3
L5	88 a b	4	8
L6	86 a b	5	9
L2	76 b c	4	20
L1	65 c	3	32

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

#### 1.4.1.5 Prueba topográfica por tetrazolio

En la Figura 1.27 se observan cariopses de maíz clasificados como viables y no viables luego de la PTTZ. Los embriones completamente teñidos se clasificaron como viables y vigorosos, aquellos completamente sin teñir se clasificaron como no viables y los que mostraron embriones con áreas de diferente tamaño sin teñir se clasificaron como no vigorosos o no viables según la magnitud y localización del daño que presentaron.



**Figura 1.27.** Evaluación de cariopses por la Prueba topográfica por tetrazolio. a) Cariopse viable y vigoroso y b) cariopses no viables.

La Tabla 1.7 muestra los valores de Viabilidad y Vigor obtenidos por PTTZ, ordenados de mayor a menor y expresados en porcentaje para los lotes de híbridos en estudio. En ambas variables, viabilidad y vigor, hubo diferencias significativas entre los lotes. Los resultados de la prueba permitieron separar a los lotes en dos niveles para viabilidad y tres para vigor. En la evaluación de la viabilidad, el lote L1 difirió significativamente del resto y mostró el menor porcentaje. Los cinco lotes restantes mostraron valores altos, superiores al 95 %. Por otro lado, en la evaluación del vigor se observaron diferencias significativas entre los lotes, donde el L4 presentó el mayor valor porcentual, L1 el menor y los restantes tuvieron un comportamiento intermedio.

**Tabla 1.7.** Viabilidad (%) y Vigor (%) por la Prueba topográfica por tetrazolio de los lotes de maíz.

Lotes	Prueba topográfica por tetrazolio			
	Viabilidad (%)		Vigor (%)	
L4	100	a	100	a *
L3	98	a	98	a b
L5	96	a	96	a b
L6	98	a	94	b
L2	96	a	94	b
L1	26	b	22	c

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 1.8 se muestra el comportamiento de los lotes según los distintos Niveles de viabilidad de acuerdo a la metodología de INTA Oliveros (Craviotto y Arango, 2006). Cuando se analizó la variable VSD se observó la existencia de diferencias significativas entre los lotes. El análisis de Tukey permitió separar a los lotes en tres niveles de viabilidad, siendo los lotes L4, L6, L3 y L2 los que mostraron los mayores porcentajes, L1 el menor y L5 tuvo un comportamiento intermedio. Para la VDS los lotes no difirieron entre sí. Al considerar la sumatoria de los distintos niveles de viabilidad, solamente el lote L1 difirió del resto y mostró la menor viabilidad con el consecuente mayor porcentaje de semillas no viables. La separación de los cariopses viables de los seis lotes en estudio en los niveles de VSD, VDM, VDS en base a la ausencia y la presencia de daños sobre el embrión permitió una mejor descripción del estado fisiológico de los cariopses. Aquellos clasificados como VDM y VDS mostraron la presencia de daños en la raíz primaria y el escutelo.

**Tabla 1.8.** Viabilidad por la Prueba topográfica por tetrazolio de los lotes de maíz.

Lotes	Viabilidad (%)						
	Viables					No Viables	
	Sin defectos (1)	Defectos moderados (2)	Defectos severos (3)	sumatoria (1+2+3)	Total		
L4	86	a	14	0	100	a *	0
L6	94	a	0	4	98	a	2
L3	96	a	2	0	98	a	2
L2	92	a	2	2	96	a	4
L5	66	b	30	0	96	a	4
L1	14	c	8	4	26	b	74

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En los lotes L3, L6 y L2 su valor de viabilidad (sumatoria de 1+2+3) estuvo conformado por una mayor cantidad de cariopses sin defectos indicando de esta manera una mayor calidad. El lote L4 se encontró en una posición intermedia con participación de defectos moderados. Mientras que el lote L5 presentó un elevado porcentaje de DM y L1 presentó una gran cantidad de cariopses NV.

En la Tabla 1.9 se muestra el comportamiento de los lotes según los distintos Niveles de vigor. Cuando se analizó la variable VA se observó la existencia de diferencias significativas entre los lotes. El análisis de Tukey permitió separar a los lotes en tres niveles de vigor, donde los lotes L4, L6, L3 y L2 mostraron los mayores porcentajes de vigor, L1 el menor y L5 tuvo un comportamiento intermedio. Este último lote mostró el mayor porcentaje de cariopses clasificados como de VM. El análisis de la variable VT separó a los lotes en tres niveles de vigor, donde el L4 mostró el mayor valor porcentual y el L1 el menor. Los restantes lotes tuvieron un comportamiento intermedio.

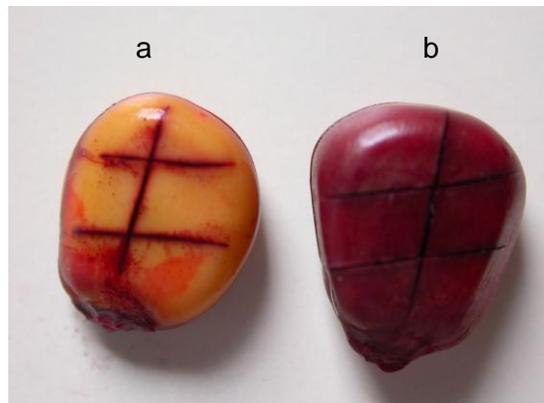
**Tabla 1.9.** Niveles de vigor por la Prueba topográfica por tetrazolio de los lotes de maíz.

Lotes	Vigor (%)		
	Vigor alto (A)	Vigor medio (B)	Vigor total (A+B)
L4	86 a	14	100 a *
L6	94 a	0	94 b
L3	96 a	2	98 a b
L2	92 a	2	94 b
L5	66 b	30	96 a b
L1	14 c	8	22 c

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

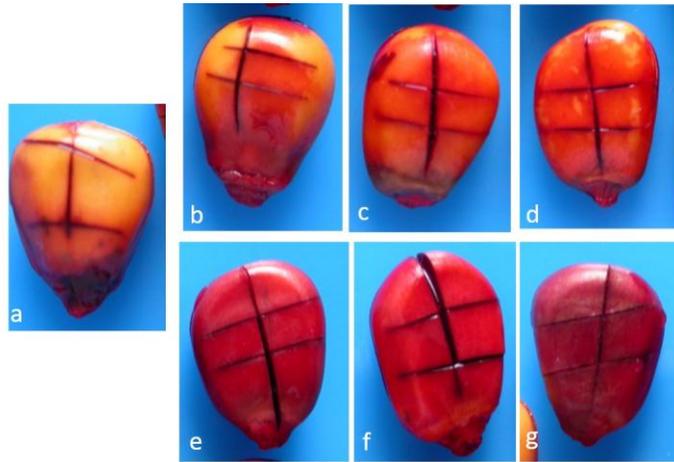
#### 1.4.1.6 Prueba de tetrazolio de aleurona

En la evaluación de la PTZA se evaluaron los cariopses de maíz en función del área sin teñir y teñida de la capa de aleurona. En la Figura 1.28 se observa la evaluación del vigor a través de la clasificación de dos cariopses de maíz luego de la PTZA en función de la superficie de aleurona sin teñir y teñida.



**Figura 1.28.** Evaluación del vigor por la Prueba de tetrazolio de aleurona. a) Cariopses de maíz con menos del 75 % de la superficie teñida: no viable, b) cariopses con más del 75 % de la superficie teñida: viable y vigoroso.

En una segunda etapa de la evaluación, se observó el desarrollo de colores de la capa de aleurona desde un naranja pálido hasta un rojo oscuro en los cariopses de los distintos lotes de híbridos (Figura 1.29).



**Figura 1.29.** Evaluación de vigor por la Prueba de tetrazolio de aleurona. a) Cariopse sin teñir, b) naranja pálido; c) naranja, d) naranja intenso, e) rojo; f) rojo intenso y g) rojo oscuro.

En los cariopses, para lograr una segura identificación del color desarrollado por la capa de aleurona se comparó con una muestra testigo incubada con agua (Figura 1.30).



**Figura 1.30.** Evaluación de cariopses del lote L6 por la Prueba de tetrazolio de aleurona. a) Cariopses testigo sin teñir, b) cariopses teñidos con capa de aleurona no viable y c) con capa de aleurona viable.

Cuando se analizó la viabilidad de la capa de aleurona de los lotes de los híbridos en estudio teniendo en cuenta solo el porcentaje de superficie de la capa de aleurona teñida con la solución de TZ, se encontraron diferencias significativas para todas las superficies de cariopses consideradas. Los resultados del test de Tukey para esta variable permitieron clasificar a los lotes en distintos niveles de vigor. Los lotes que mostraron una superficie de capa de aleurona teñida mayor al 75 % se consideraron como de VA, los que mostraron una superficie teñida de 75-50 % se catalogaron como de VM, los de una superficie menor del 50 % de VB y los que mostraron la superficie completa sin teñir se clasificaron como NV.

En la Tabla 1.10 se muestra la clasificación de los lotes en función de la superficie de la capa de aleurona teñida en distintas proporciones y sin teñir por la PTZA. Para una superficie teñida mayor al 75 % los lotes se separaron en cuatro niveles de vigor. Para una superficie teñida comprendida entre 75-50 %, menor del 50 % y sin teñir los lotes se separaron en tres niveles de vigor. El mayor nivel de separación de los lotes se logró con una superficie teñida superior al 75 %. Los lotes L6 y L4 mostraron la mayor cantidad de cariopses con más de un 75 % de la superficie de la capa de aleurona teñida y viable. Desde el punto de vista del vigor, estos dos lotes se pueden considerar como de VA. Los lotes L1 y L5 mostraron los menores porcentajes de cariopses con superficie teñida superior al 75 % y los restantes tuvieron un comportamiento intermedio.

Para la categoría con superficie de capa de aleurona teñida entre 75-50 %, correspondiente al VM, el lote L5 presentó el mayor valor porcentual, los lotes L6, L4 y L1 mostraron los valores menores y los restantes tuvieron un comportamiento intermedio. Para la categoría de menor del 50 % de la superficie de aleurona teñida, considerada como de VB, el lote L1 mostró el mayor valor, el L6 el menor y los restantes lotes de híbridos tuvieron un comportamiento intermedio. Con relación a la capa de aleurona sin teñir, el lote L1 también presentó el mayor porcentaje de cariopses NV.

**Tabla 1.10.** Superficie de capa de aleurona teñida y sin teñir (%) por la Prueba de tetrazolio de aleurona de los lotes de maíz.

Lotes	Superficie de capa de aleurona (%)							
	Teñida						Sin teñir	
	> 75 %		75 - 50 %		< 50 %			
	Vigor alto		Vigor medio		Vigor bajo		No viable	
L6	100	a	0	c	0	c	0	b *
L4	96	a	2	c	2	b c	0	b
L3	68	b	24	b	8	b c	0	b
L2	35	c	35	b	27	b	3	a b
L1	8	d	8	c	68	a	16	a
L5	4	d	72	a	24	b c	0	b

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 1.11 se muestran los valores porcentuales de las distintas categorías de coloraciones que presentaron los cariopses de los diferentes lotes de híbridos de maíz en estudio. En ella se puede apreciar que los lotes mostraron variabilidad en la producción de colores desde el naranja pálido hasta el rojo oscuro y se observaron diferencias significativas entre los mismos para los diferentes colores. Los resultados del test de Tukey para esta variable permitieron clasificar a los lotes en distintos niveles de vigor según el color observado en la capa de aleurona. Para el color naranja pálido, que representó el VB, los lotes se separaron en dos niveles, donde L1, L2 y L5 mostraron los mayores valores porcentuales y L3, L4 y L6 los menores. Para el color naranja, que representó el VM, se separaron en tres niveles, donde el lote L3 presentó el mayor valor porcentual de tinción, L1 no mostró tinción y los restantes tuvieron un comportamiento intermedio. El color naranja intenso, que representó el VM, también separó en tres niveles a los lotes, el mayor valor correspondió a L6, los menores valores correspondieron a los L2 y L3 y los restantes fueron intermedios. Para el color rojo, que representó el VA, los lotes L3 y L4 mostraron los mayores porcentajes y difirieron significativamente del resto. El color rojo de la capa de aleurona es indicativo de la mayor

actividad respiratoria y de mayor viabilidad y vigor de estos dos lotes. Con respecto al color rojo intenso, el lote L6 fue el único que se diferenció significativamente del resto y presentó el mayor porcentaje de cariopses con esa tinción, es decir el mayor vigor. Para el color rojo oscuro los lotes no mostraron diferencias estadísticas, siendo L6 el único lote que presentó algunos cariopses en esta tinción y en un porcentaje muy bajo. Tomando en cuenta la observación de los colores de la capa de aleurona presentados por los lotes y no solamente el porcentaje de la superficie teñida y sin teñir, se conforma una descripción más detallada de la condición fisiológica a través de la viabilidad y el vigor que poseen los lotes de híbridos de maíz en estudio.

**Tabla 1.11.** Color de la superficie de la capa de aleurona teñida y sin teñir (%) por la Prueba de tetrazolio de aleurona para los lotes de maíz.

Lotes	Color de la superficie de la capa de aleurona (%)							
	No vigoroso		Vigor bajo		Vigor medio		Vigor alto	
	Sin teñir	Naranja pálido	Naranja	Naranja intenso	Rojo	Rojo intenso	Rojo oscuro	
L1	16 a **	72 a **	0 c*	12 b c *	0 b **	0 b **	0 a	
L2	3 b	61 a	36 a b	0 c	0 b	0 b	0 a	
L3	0 b	3 b	43 a	0 c	55 a	0 b	0 a	
L4	0 b	3 b	5 b c	34 a b	56 a	3 b	0 a	
L5	0 b	51 a	20 a b c	19 a b c	9 b	2 b	0 a	
L6	0 b	5 b	0 c	47 a	1 b	42 a	5 a	

\* Significativo 0,05; \*\* significativo 0,01. Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas.

#### **1.4.1.7 Prueba de conductividad eléctrica**

Los resultados obtenidos de la medición de la CE de cariopses individuales (CESI) con el equipo SAD 9000-S se muestran en la Tabla 1.12. En ella se observan los valores promedio del Peso (g) de 100 cariopses, la CE en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  y los valores estimados del Potencial de germinación y vigor. La interpretación de los resultados de la prueba CESI se hizo a través de los valores promedios de CE expresados en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  y con los valores estimados de Potencial de germinación y vigor. A menores valores de CE mejor es la integridad de las membranas celulares y de manera indirecta es mejor la calidad del lote. Se encontraron diferencias significativas entre los lotes de híbridos de maíz y el test de comparación de medias de Tukey permitió separar a los lotes en cuatro niveles de vigor para la CE media por gramo. Los lotes L5 y L4 mostraron los menores valores promedio de CESI ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ), indicando un excelente estado de sus membranas celulares y por lo tanto, un mayor vigor. El lote L1 mostró un alto valor de pérdida de electrolitos significando de esta manera el menor vigor. Los restantes lotes tuvieron comportamiento intermedio. La evaluación de las variables estimadas por el equipo de Potencial de germinación y vigor permitieron separar a los lotes en dos niveles de vigor. Se observó que el lote L1 mostró los menores valores de Potencial de germinación y vigor difiriendo estadísticamente del resto de los lotes. La medición de la CE expresada en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  permitió una mejor separación de los lotes que las variables Potencial de germinación y vigor estimadas por el equipo.

**Tabla 1.12.** Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y Potencial de germinación y vigor (%) medidos con el SAD 9000-S en los lotes de maíz.

Lotes	Peso promedio de 100 (g)	CE ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Potencial de germinación estimado (%)	Potencial de vigor estimado (%)
L1	0,3453	399,73 a	37 b	17 b *
L3	0,3013	250,97 b	96 a	87 a
L2	0,3645	225,21 b c	92 a	80 a
L6	0,2537	198,58 b c	100 a	100 a
L4	0,3164	170,00 c d	99 a	97 a
L5	0,2394	131,16 d	98 a	98 a

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

#### 1.4.2 PRUEBAS DE EMERGENCIA A CAMPO

En la Tabla 1.13 se muestran los valores de plántulas emergidas en el campo, expresados en porcentaje y ordenados de mayor a menor, para la fecha de siembra del 09/11/09 de los lotes de híbridos en estudio. Se realizaron recuentos de plántulas a los siete y nueve días desde la siembra. En el recuento a los siete días se observó claramente la emergencia de las plántulas en la línea del surco en casi todos los lotes de híbridos. En la mayoría de las plántulas se observó la emergencia de la primera hoja desplegada (estadio V1 de la escala de Ritchie y Hanway, 1982). Por el contrario, el coleóptilo de las plántulas se mantuvo debajo del suelo. Se desenterraron plántulas para observar su morfología y se corroboró que las mismas poseían mesocótilos largos y sanos, coleóptilos sanos con la aparición de la primera hoja a través del poro subapical y la presencia de un sistema radical abundante (Figura 1.31). En el segundo recuento a los nueve días, se comprobó que las plántulas de cada lote de híbrido, presentaron dos hojas plenamente desplegadas (estadio V2). A excepción del lote L1 que mostró fallas de emergencia, los demás lotes de híbridos tuvieron valores de emergencia a campo superiores a 90% en los recuentos a los siete y nueve días. Se encontraron diferencias significativas entre los lotes de híbridos en los dos recuentos y el test de

comparación de medias de Tukey permitió separar a los lotes en dos niveles de calidad de acuerdo a la emergencia de plántulas.



**Figura 1.31.** Detalle de una plántula en el primer recuento. Mesocótilo largo, coleóptilo, primera hoja desplegada y buen sistema radical.

**Tabla 1.13.** Emergencia de plántulas a campo (%), en dos recuentos a los 7 y 9 días, en la primera fecha de siembra (9/11/09) de los lotes de maíz.

Lotes	Plántulas emergidas (%)			
	7 días		9 días	
L6	98	a	99	a *
L4	96	a	99	a
L3	95	a	98	a
L2	93	a	98	a
L5	91	a	93	a
L1	1	b	1	b

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 1.14 se muestran los valores de las plántulas emergidas en el campo ordenadas de mayor a menor para la fecha de siembra del 20/09/10 de los lotes de híbridos en estudio. Se realizaron recuentos de plántulas en V1 y V2 a los 25 y 29 días desde la siembra respectivamente. En esta segunda siembra, más temprana que la anterior, todos los lotes emergieron más lentamente como consecuencia de las bajas temperaturas y la menor disponibilidad de agua. En el primer recuento, en la mayoría de las plántulas del surco había una hoja totalmente desplegada. En el segundo recuento, los lotes mostraron dos hojas plenamente desplegadas excepto en el lote L1. Este último mostró fallas de emergencia en los recuentos. Se encontraron diferencias significativas entre los lotes en los dos recuentos. A los 25 y 29 días de la siembra, los lotes L6, L4 y L2 mostraron el mejor comportamiento, evidenciado por los altos valores de emergencia logrados superando el 95 %. Por otro lado, el lote L1 presentó los menores valores de emergencia y los restantes tuvieron un comportamiento intermedio. El test de comparación de medias de Tukey permitió separar a los híbridos en tres niveles de calidad de acuerdo a la emergencia de plántulas en el primer y segundo recuento.

**Tabla 1.14.** Emergencia de plántulas a campo (%), en los recuentos a los 25 y 29 días en la segunda fecha de siembra (20/09/10) de los lotes de maíz.

Lotes	Plántulas emergidas (%)			
	25 días		29 días	
L6	97	a	100	a *
L4	97	a	98	a
L2	87	a	95	a
L3	52	b	71	a b
L5	47	b	54	b
L1	1	c	1	c

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

### **1.4.3 CORRELACIONES ENTRE PRUEBAS DE LABORATORIO Y LA EMERGENCIA A CAMPO**

En la Tabla 1.15 se observan los coeficientes de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre los valores promedio de plántulas obtenidos en la emergencia a campo en el segundo recuento para las dos siembras y las distintas pruebas de control de calidad utilizadas en el experimento.

Las pruebas de CA, PC, DML, DMM, DMS y Peso de 1000 cariopses mostraron valores bajos y no significativos de correlación con la emergencia a campo. El CH solo mostró una correlación negativa significativa para la segunda fecha de siembra. Las determinaciones de Viabilidad y Vigor por PTTZ, mostraron valores de correlación positiva y altamente significativa para la primera fecha de siembra y significativa para la segunda. Por otra parte, las determinaciones de cariopses clasificados como VSD evaluados por la PTTZ fueron altamente significativas para ambas fechas de siembra. La prueba de CESI mostró una correlación negativa para ambas fechas de siembra pero solamente significativa para la primera fecha. En la PTZA, para una superficie de la capa de aleurona teñida menor al 50 % del cariopse, se observó una correlación negativa significativa con la emergencia a campo en las dos fechas de siembra. La PGE mostró correlaciones no significativas de 0,79 y 0,62 en ambas fechas de siembra.

**Tabla 1.15.** Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Emergencia a campo en dos fechas de siembra y las pruebas de control de calidad: Contenido de humedad, Peso de 1000 cariopses, Prueba de verde rápido: Daño mecánico leve, Daño mecánico moderado, Daño mecánico severo, Prueba de germinación estándar, Conteo anticipado, Primer conteo, Viabilidad y vigor por tetrazolio, Semillas viables sin defectos por tetrazolio, Tetrazolio de la capa de aleurona >75 %, 75-50 % y <50 % teñido y Conductividad eléctrica de semillas individuales.

Prueba de control de calidad	Emergencia a campo 1° siembra	Emergencia a campo 2° siembra
CH	-0,53 ns	-0,84 *
Peso de 1000	-0,38 ns	-0,15 ns
PVR - DML	-0,43 ns	-0,26 ns
PVR - DMM	0,20 ns	-0,02 ns
PVR - DMS	0,46 ns	0,45 ns
PGE	0,79 ns	0,62 ns
CA	0,25 ns	0,09 ns
PC	0,53 ns	0,34 ns
PTTZ Viabilidad	1 **	0,90 *
PTTZ Vigor	1 **	0,88 *
PTTZ VSD	0,96 **	0,94 **
PTZA >75 %	0,54 ns	0,75 ns
PTZA 75-50 %	0,23 ns	-0,14 ns
PTZA <50 %	-0,90 *	-0,89 *
CESI	-0,87 *	-0,72 ns

\* Significativo al 5%; \*\* significativo 1%; ns: no significativo.

## 1.5 DISCUSIÓN

El CH de los cariopses de maíz constituye un atributo de calidad de suma importancia en la conservación a largo y mediano plazo. Los factores sobre los que se puede actuar y prolongar la vida de la semilla son la temperatura y el CH durante el almacenamiento. A este respecto, son conocidas las Reglas de Harrington (1972), en las cuales se destaca la importancia de estos factores en la velocidad del deterioro. En estas se indica que por cada 1 %

de disminución del contenido de humedad se duplica la vida de la semilla y por cada 5 °C de disminución de la temperatura la semilla duplica su vida, siempre dentro de un rango particular de temperatura (0-50 °C) y humedad (5-14%) (Justice y Bass, 1978).

El CH de los lotes de maíz en estudio se encontró dentro del rango 12-15 % y coincidió con el valor de 15,5 % recomendados por FAO (1993) para la comercialización de la especie. Estos valores se encuentran dentro del rango de CH considerados como de conservación segura. A este respecto Casini (2003), informó que con un CH por encima de 16 % aumenta el riesgo de deterioro en maíz, trigo y soja. Por otra parte, Christensen y Kaufmann (1969) informaron que con CH entre 16 y 20 % se favorece el crecimiento de hongos. Si bien no se encontraron diferencias significativas en el CH para los seis lotes de híbridos en estudio, sí se observaron diferencias en los valores absolutos que podrían influir en la longevidad de los cariopses de maíz de acuerdo a las reglas de Harrington mencionadas

Las diferencias en el Peso de 1000 cariopses de los lotes de híbridos entre sí observadas en este estudio podrían deberse a variaciones ambientales en el momento de la producción. Por otro lado, las diferencias entre los resultados obtenidos en el experimento y los informados por la empresa Nidera podrían deberse a diferencias en la metodología aplicada en su determinación. El ambiente de producción está compuesto por elementos bióticos y abióticos que influyen de manera considerable sobre el llenado del fruto, el cual se pone de manifiesto a través del Peso de 1000 cariopses de maíz entre otras características de calidad. Los resultados del experimento coinciden con lo informado por Muñoz (2007) y Zepeda (2010) quienes encontraron diferencias en el Peso de 1000 cariopses para un mismo material genético de maíz en sus trabajos (HS-2) y las atribuyeron a diferencias en el ambiente de producción. Por otro lado, Terrazas (2007) informó que otro factor importante que influye en el Peso de 1000 cariopses es la fecha de cosecha. En su trabajo con maíces criollos e híbridos encontró que la interacción fecha de cosecha x genotipo mostró diferencias altamente significativas. Este último elemento también puede ser responsable de las diferencias encontradas entre los lotes en este estudio.

Según Carvalho y Nakagawa (2000) los cariopses de maíz de mayor tamaño o de mayor densidad poseen, normalmente, embriones bien formados y con mayor cantidad de reservas, presentando un potencial germinativo superior. En virtud de esto último, es esperable que los

lotes con mayor Peso de 1000 cariopses posean mejores valores de Viabilidad y Vigor expresados por altos porcentajes en las PGE y PTTZ. Sin embargo, Shieh y McDonald (1982) encontraron una correlación negativa entre el tamaño de los cariopses, el vigor de las plántulas y el rendimiento de grano. En este sentido, Moreira y Nakagawa (1979), indicaron que la plántula proveniente de una semilla pequeña que inicia su desarrollo retrasado, al paso del tiempo se recuperará y acabará por tener un crecimiento normal. Comparando los resultados del Peso de 1000 cariopses como una medida del tamaño de los mismos y los valores porcentuales de plántulas normales obtenidos en la PGE, los lotes que mostraron los mayores valores de Peso de 1000 cariopses fueron los que presentaron los menores porcentajes de germinación. Por otro lado, los lotes que poseían un Peso de 1000 cariopses intermedio fueron los que presentaron los mayores valores de germinación. Los resultados obtenidos en esta investigación se oponen con los informados por Carvalho y Nakagawa (2000) pero coincidirían con lo informado por Shieh y McDonald (1982). No obstante ello, se considera a la medición del Peso de 1000 cariopses como una variable valiosa, que brinda información sobre el contenido de las reservas disponibles para la germinación, pero que no debe ser considerada como única o determinante de la calidad, ya que existen otras variables fisiológicas involucradas y que interactúan de diferentes manera sobre el potencial de germinación. Entre ellas, podemos mencionar la presencia de daños mecánicos de diferente magnitud, el CH, la integridad de las membranas celulares, la acumulación de daños celulares, el envejecimiento natural, etc. Del análisis conjunto de los atributos evaluados para los distintos lotes debería surgir una caracterización más precisa que permita realizar un diagnóstico integrador de la calidad de los lotes de híbridos de maíz en estudio.

Los resultados de la identificación de la presencia de DM por la Prueba de verde rápido y caracterizados como DML, DMM y DMS mostraron que todos los lotes fueron capaces de soportar el proceso de la trilla con una desgranadora estática, manipuleo de poscosecha, procesamiento y curado y acumularon daños mecánicos no visibles a simple vista de diferente magnitud. El cariopse de maíz puede sufrir DM de distinta naturaleza y severidad durante el proceso de producción que afectan de diferente manera a la calidad fisiológica (Desai *et al.*, 1997). La cosecha de híbridos comerciales de maíz se realiza en espiga para reducir el efecto de DM provocados por la cosechadora tradicional. Con posterioridad, se realizan procesos adicionales como el deschalado, desgranado, secado, clasificación, separación por tamaños,

acondicionamiento y por último el curado. Durante todas estas etapas del proceso de producción se pueden generar daños al cariopse de maíz. La operación de desgranado se realiza en máquinas estáticas especiales que poseen elementos duros que golpean con severidad a las espigas para separar los cariopses del raquis. En esta etapa, se pueden provocar daños mecánicos de mayor o menor gravedad que se suman a los daños de las demás etapas. Según Hope (1953) el daño a las cubiertas de los cariopses, si bien ocurre durante todo el proceso, la mayoría se produce en el desgrane. Según Granados (2001) el desgrane es una operación delicada que si no se realiza correctamente puede dañar el cariopse y romper el endosperma. Este riesgo de dañar los granos aumenta cuando las máquinas no están correctamente ajustadas a una velocidad del cilindro de 300-500 rpm. Además, es recomendable que los cilindros desgranadores estén recubiertos con bandas de goma para minimizar los daños. Los tipos de DM se han identificado como daños por abrasión, que provocan rupturas del pericarpio y daños por impacto, que además del efecto anterior, dañan los tejidos internos, como el endosperma y el embrión (Peterson *et al.*, 1995). Estos daños pueden afectar la viabilidad y el vigor durante el período de almacenamiento, que en el caso de maíz puede ser prolongado como consecuencia del almacenamiento de un año para otro o *carry over*. Además, pueden ocasionar las fracturas o fisuras, no siempre visibles a simple vista, que favorecen la penetración de microorganismos y el deterioro. Estos daños tienen efecto a largo plazo y pueden conducir a fallas en la germinación.

El efecto del DM depende de varios factores, entre ellos el contenido de humedad, el grado de madurez, el tamaño y la forma del cariopse, la estructura y la posición del embrión, entre otros (Basra, 1995). Mancera Rico *et al.* (2007) indicaron que la ubicación del cariopse en la espiga juega un rol importante en la respuesta al daño mecánico y que los cariopses del estrato apical presentan menor resistencia al daño por impacto. Además, varias investigaciones reportaron que los cariopses de maíz redondo y pequeño tienen menor resistencia al daño mecánico que los chatos (Moes y Vyn, 1988; Menezes *et al.*, 1991; Martinelli-Seneme *et al.*, 2000; Carneiro *et al.*, 2003). Algunos autores han puesto de manifiesto que los genotipos que poseen endosperma córneo presentan en general mayor vigor (Pérez de la Cerda *et al.*, 2007). Por otra parte, Blancas (2007) informó que las variedades con predominancia de endosperma blando se quiebran con mayor facilidad. Esto último es importante porque la dureza del

endosperma y la cantidad del mismo, podría ser un factor que aporta resistencia al daño por impacto.

Los resultados obtenidos en el experimento coinciden con lo expuesto por la bibliografía precedente. Se observó que en los lotes L6 y L3 caracterizados como duros y chatos mostraron valores altos de DMS y valores intermedios para el DMM, respectivamente. Por el contrario, los lotes con tipo de grano semidentado y redondo L2 y L1 mostraron mayores valores en el DML. Los lotes de los híbridos que poseen cariopses con forma chata y con mayor dureza del endosperma, denominados Flint y duro, que son capaces de soportar mejor el proceso de trilla con la desgranadora estática y el manipuleo poscosecha, acumulan y muestran los DM por la PVR. Por el contrario, los cariopses de los lotes de híbridos semidentados, que poseen un endosperma más blando y frágil se rompen con más facilidad a causa de los DM que soportan en el proceso de desgranado y poscosecha, por lo que deben ser eliminados durante la clasificación. En este experimento, estos lotes mostraron alto valor de DML a causa de las raspaduras recibidas por la desgranadora y favorecidas por su forma redondeada.

Por otro lado, el DM se relaciona con el CH de las semillas y se podría decir que en general, los cariopses de maíz con mayor contenido de humedad serían capaces de soportar mejor el DM por ser más plásticos y por otro lado, los cariopses con menor CH se dañarían más fácilmente por la fricción contra los elementos duros. En este trabajo, el lote de híbrido de tipo Flint y chato L6 que mostró el menor CH, también evidenció valores altos de DMS e intermedios de DMM y DML.

Es valioso también relacionar la aparición y la magnitud del DM en cariopses de maíz con la viabilidad, la germinación y el vigor. En tal sentido, Borba *et al.* (1994) evaluaron el efecto del desgranado mecánico con la utilización de distintas velocidades del cilindro desgranador de la cosechadora sobre la calidad del cariopses de maíz. Los autores observaron que a menor velocidad del cilindro desgranador hubo menor cantidad de DM y que la germinación no fue afectada por los DM, debido probablemente a que más del 94 % de los daños observados fueron superficiales en todos los casos. Por otro lado, en el mismo trabajo, el vigor evaluado por la técnica de Envejecimiento acelerado les permitió detectar diferencias significativas con respecto a la producción de DM por las mayores velocidades de trabajo del cilindro desgranador.

George *et al.* (2003), informaron que aunque el DM fue más intenso en los cariopses de maíz de mayor tamaño el porcentaje de germinación de estos fue mayor. Estas investigaciones estarían indicando que la sola presencia de DM sobre los cariopses de maíz no es causal directa e instantánea de la pérdida de germinación, sino que existirían otros factores involucrados que juegan un rol importante, como el CH del grano, la profundidad del DM y la interacción del DM con las condiciones del ambiente de almacenamiento y la duración del mismo.

Cuando se compararon los resultados de la PVR con los de la PGE se observó que los lotes de híbridos con menores porcentajes de germinación fueron los del tipo semidentado y redondo y muestran niveles altos de DML y mayor peso de 1000 cariopses. Esto podría deberse a que los cariopses redondos y grandes sufren mayor DM durante el desgranado, al quedar retenidos entre las barras desgranadoras y/o sufrir mayor fricción con los elementos metálicos duros que conforman la parte activa de la máquina. Por el contrario, los lotes de híbridos caracterizados como duros y chatos presentaron los mayores valores porcentuales de germinación en la PGE aunque mostraron DM pero de magnitud intermedia. El lote L6 del híbrido Flint a pesar de ser duro y chato, mostró un menor valor de plántulas normales en la PGE que los anteriores, posiblemente en respuesta al valor de DMS de 58 % que se evidenció en la PVR.

Entre las consecuencias del DML y DMM sobre la germinación se puede mencionar la producción de una mayor cantidad de plántulas con defectos leves. Esto significa que si bien estas plántulas presentan algún defecto o daño, los mismos no son de magnitud y se suman a las plántulas normales intacta de manera no afectan al valor final de germinación obtenido por la PGE. Por el contrario, cuando hay DMS se pueden originar daños sobre las plántulas que hace que se las clasifique como anormales e incluso cariopses no germinados, categorías que no forman parte del principal componente del resultado de la PGE que son las plántulas normales.

La PVR permitió identificar sobre el cariopses de maíz DM no visibles a simple vista y clasificarlos según su severidad. Estos daños pueden ser superficiales, pero a pesar de presentarse sobre una extensión importante del cariopse e incluso sobre el embrión, pueden tener un efecto menor sobre el resultado de la PGE. La información aportada por esta prueba

es una valiosa herramienta de diagnóstico para compararla con las otras pruebas de calidad, especialmente de vigor y utilizarla en el momento de interpretar los resultados.

Con respecto a los diferentes conteos que se realizaron en la PGE, el CA, permitió generar una clasificación de lotes de los híbridos en función de la germinación en tres niveles: alto, medio y bajo. Si bien los valores de plántulas normales fueron relativamente bajos comparados con el conteo final de la PGE, estos ponen de manifiesto aquellos lotes de híbridos que tienen el mejor comportamiento e informan también sobre la velocidad de germinación de los mismos. Con el CA se logró la formación del mismo número de niveles de calidad y un ordenamiento similar de los lotes que con la PGE. Las plántulas a los tres días presentaron un crecimiento suficiente de sus estructuras esenciales, que permitió llevar a cabo la evaluación de las mismas siguiendo los criterios descritos por ISTA (2003). La evaluación del CA y del PC no son de uso rutinario en los Laboratorios de Análisis de Semillas, no obstante brindan una información anticipada sobre el comportamiento de los lotes. Esto es de gran utilidad para acelerar los tiempos dentro del control y diagnóstico de la calidad de lotes y permiten generar una clasificación temprana de los mismos por su calidad fisiológica.

Los valores de viabilidad obtenidos por PTTZ superiores al 95 % en cinco de los seis lotes de semilla de los híbridos estudiados y la proximidad con los valores de vigor, son claros indicativos de lotes de maíz de muy buena calidad. Estos resultados coinciden con los informados por Dias y Barros (1999) quienes indicaron la existencia de buenos resultados de la PTTZ cuando se la utilizó para la identificación de lotes de semillas de maíz con diferente calidad fisiológica, comparándola con otros ensayos y también con la emergencia de campo.

En la PTTZ tradicional al informar solamente el porcentaje de los cariopses viables y los no viables del lote se pierde información valiosa para hacer un diagnóstico sobre la calidad de los mismos, de manera semejante a lo que ocurre con las plántulas intactas y con defectos leves en la PGE. Por el contrario, la PTTZ realizada según la metodología del Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros, permite una clasificación de los cariopses viables en varias categorías o niveles según la magnitud de los daños observados sobre los embriones. Cuando se analizó el porcentaje de Semillas viables sin defectos, que son aquellas que deberían dar lugar a plántulas normales intactas, se logró un mayor nivel de separación de los lotes de híbridos. La utilización de patrones específicos de Viabilidad y Vigor para maíz permitiría

obtener una mayor información con respecto a las características fisiológicas de los cariopses y brindar la posibilidad de clasificar a los lotes de híbridos de maíz en función de la respuesta a esta prueba rápida.

Germ y Keitreiber (1953, 1954) demostraron en sus estudios la existencia de una relación entre la viabilidad de la capa de aleurona en cariopses de maíz y la emergencia de plántulas en condiciones ambientales subóptimas y desarrollaron la Prueba de tetrazolio de aleurona (Keitreiber, 1975). Fiala (1981) citado en los Manuales de Vigor de ISTA (1981, 1987; Hampton y Tekrony, 1995) consideró que esta prueba proveía de información adecuada para una siembra temprana bajo condiciones adversas, suelo frío y húmedo, como así también de la capacidad de almacenamiento. Indica además que la prueba revela daños provocados por condiciones adversas como heladas, daños mecánicos y por calor durante el almacenamiento y el procesamiento de semillas.

La presencia y la intensidad del color que mostraron los cariopses de los lotes de híbridos estudiados, se utilizó como una medida de expresión de diferentes niveles de condición fisiológica, aunque todas las coloraciones que van desde el naranja pálido al rojo intenso, se consideraron como viables. La observación de contraste con cada una de las muestras testigos, que evidenció generación de color por parte de las células de la capa de aleurona, por más pálido que fuera, se consideró como proveniente de la actividad respiratoria de los tejidos y de las células vivas. No obstante, la mayor intensidad del color desarrollado en dichas células, especialmente el rojo, se relacionó con una mayor funcionalidad de las mitocondrias y del vigor de los cariopses. Por otra parte, solo a la ausencia de color de la capa de aleurona, indicada como sin tinción, corresponde considerarla como superficie de capa de aleurona no viable.

Las células de la capa de aleurona de los cereales cumplen un papel fisiológico importante en el metabolismo de la germinación y cabría esperar que a baja superficie viable y a menor superficie de colores rojizos en la capa de aleurona, habría una menor germinación. En la observación de los resultados de PTZA y PGE en este experimento, a pesar de las diferencias marcadas en la viabilidad de la capa de aleurona, todos los lotes de híbridos germinaron y produjeron plántulas normales, incluso el lote L1. Este último lote fue el que presentó el mayor área de capa de aleurona sin teñir o muerta y el mayor porcentaje de cariopses teñidos de color naranja pálido, siendo esto último indicativo de una menor capacidad

fisiológica de la capa de aleurona. La germinación producida por estos cariopses podría explicarse, como describen Salisbury y Ross (1994), por la activa participación del escutelo en la secreción de enzimas digestivas. La porción de escutelo que da hacia el endosperma está compuesta por una capa de células columnares ricas en retículo endoplasmático y dictiosomas, lo cual es típico de células secretoras. Esta actividad secretora del escutelo parece ser importante durante los dos primeros días del proceso germinativo cuando se detecta poca actividad de la capa de aleurona. Con posterioridad, la capa de aleurona comenzaría a tornarse funcional y contribuiría a la degradación de las sustancias de reserva de manera sustancial (Salisbury y Ross, 1994).

El lote L6 mostró el mejor comportamiento en la PTZA al mostrar la mayor superficie de capa de aleurona teñida y de color rojo intenso. Estas dos características son indicativas de un lote de vigor alto. Sin embargo, en la PGE este lote mostró un comportamiento intermedio probablemente debido al alto valor de DMS, que podría haber tenido un efecto directo en la disminución de la producción de plántulas normales en la PGE.

Los lotes que mostraron altos porcentajes de superficie de aleurona teñida y también altos porcentajes de los colores rojo, naranja intenso y naranja y con DMS intermedios evidenciaron un buen comportamiento en las pruebas de germinación.

La PTZA de los cariopses de maíz mostró ser una herramienta útil en la evaluación del vigor de los lotes de híbridos utilizados en este estudio en la medida que brinda una información más detallada del estado fisiológico de la capa de células de aleurona. Estos resultados coinciden con los trabajos de Araújo *et al.* (2000), quienes mostraron que la PTZA fue eficiente para diferenciar la calidad lotes de maíz dañados mecánicamente durante la cosecha y envejecidos naturalmente durante el almacenamiento. Además, coinciden con Craviotto (2006) quien comprobó la influencia de la calidad, en términos de la superficie viva de la capa de aleurona, afectando aspectos relacionados con el potencial de germinación y el vigor de cariopses de maíz. Este último autor observó diferentes tinciones asociadas a distintos grados de viabilidad. Los lotes de maíz de alta calidad generaron tinciones rojo oscuro, mientras que los lotes de calidades inferiores generaron tonalidades naranja.

Si bien esta prueba no forma parte de la rutina de análisis de calidad de los laboratorios, sería interesante incluirla entre las utilizadas para completar el diagnóstico de calidad. Esta

prueba es útil para realizar una caracterización más precisa de los lotes de maíz, tendiente a dilucidar la viabilidad de los tejidos y generar una clasificación según la viabilidad y el vigor que posean los lotes en estudio, tendiente a generar información valiosa para el mejoramiento o brindar sugerencias sobre el destino de la simiente. Por otro lado, las pruebas de vigor basadas en el uso de la técnica de Tetrazolio para determinar viabilidad, vigor y la viabilidad de capa de aleurona mostraron los más altos valores de correlación con la emergencia a campo en ambas siembras, evidenciado de esta manera la potencialidad de la técnica como herramienta en el control de calidad.

Según Bewley y Black (1994), los lotes de cariopses de maíz que muestran menores valores de CE son aquellos que poseen el mejor estado fisiológico. En este experimento, el lote de maíz que presentó el mayor valor en CE mostró un pobre comportamiento a campo, en coincidencia con los hallazgos de Powell (1988), quien expresó que cuando un lote de semillas posee baja germinación libera grandes cantidades de electrolitos al medio de imbibición, su vigor es bajo y la emergencia deficiente. La expresión de la CE por gramo demostró ser una herramienta altamente calificada para establecer diferentes niveles de vigor entre los lotes de híbridos de maíz estudiados, ya que permitió separar a los lotes en el mayor número de niveles de calidad. Estos resultados coinciden con los trabajos de Alizaga *et al.* (1992); Vilorio y Méndez Natera (2011) y Coimbra *et al.* (2009) quienes evaluaron la eficiencia de diferentes pruebas de vigor en la determinación de la calidad fisiológica de maíz y concluyeron que la medición de la CE fue una prueba satisfactoria para clasificar lotes.

Los valores altos de correlación obtenidos en el presente estudio entre la CESI y la emergencia de campo permitirían confirmar la importancia de la medición de los lixiviados de los cariopses como una expresión indicadora del potencial de emergencia de los lotes de maíz. Estos resultados coinciden con trabajos de Torres (1998) quien evaluó la eficiencia comparativa de diferentes pruebas de vigor para determinar la calidad fisiológica de cariopses de maíz y encontró altas correlaciones negativas y significativas entre CE y emergencia a campo. Por otro lado, Peres (2010) también comparó diferentes pruebas de vigor para evaluar la calidad en maíz y encontró una alta y significativa correlación de la prueba de CE con la emergencia en campo. El autor informó que la prueba de CE sería una de las mejores opciones para la empresa productora de semilla, tanto por la sensibilidad en la previsión del desempeño a campo de los lotes, como por su rápida ejecución.

La prueba de CE se caracteriza por la rapidez de obtención de resultados, en 24 horas o menos, no requiere la conducción posterior de una prueba de germinación, esto hace que sea objetiva ya que se elimina la participación del hombre en la evaluación y clasificación de plántulas. Solo se necesita disponer de un conductivímetro para medir la CE del líquido de imbibición, el mismo puede ser de medición masal o individual y conducir la prueba con los cuidados pertinentes de calibración, manipuleo del equipo y del material vegetal. Por otro lado, esta prueba se encuentra validada e incorporada a las Reglas Internacionales ISTA (2015), para utilizarla como prueba de vigor en la especie *Pisum sativum* L., *Phaseolus vulgaris* L. y *Glycine max* L. Merr. Si bien esta prueba no está estandarizada aún para maíz, los resultados de la misma constituyen una herramienta valiosa para evaluar el vigor en esta y muchas otras especies de semillas/frutos.

Con respecto a la emergencia a campo se observó que las condiciones ambientales de la primera fecha de siembra fueron favorables para la expresión de la calidad fisiológica de cinco de los seis lotes en estudio, quienes mostraron una emergencia superior al 90 %. En la emergencia a campo se evidenció la menor calidad del lote L1, en coincidencia con los resultados obtenidos en las distintas pruebas de laboratorio empleadas. Por otra parte, la segunda fecha de siembra presentó condiciones climáticas desfavorables, puestas de manifiesto por las menores temperaturas medias y a nivel de suelo y menor disponibilidad de agua. Esto les exigió a los lotes de híbridos en estudio manifestar su verdadera condición de vigor. Los lotes respondieron retrasando la emergencia y el crecimiento de plántulas.

El mayor valor de correlación (0,79) lo obtuvo la PGE en la primera siembra en coincidencia con las mejores condiciones ambientales. En la segunda fecha donde el ambiente no fue tan favorable la PGE mostro una correlación menor (0,62). No obstante, estos resultados de correlación de la PGE y la emergencia a campo evaluada en este experimento coincidieron con los informados por Shah *et al.* (2002), quienes compararon el comportamiento de varias pruebas de vigor de cultivares subtropicales de maíz y encontraron que la PGE mostró una alta correlación (0,75) significativa con la emergencia a campo.

## 1.6 CONCLUSIONES

Las pruebas de laboratorio y de emergencia a campo utilizadas en el estudio permitieron caracterizar, clasificar y realizar un ranking de calidad de los seis lotes de híbridos de maíz según sus niveles de viabilidad, germinación y vigor.

La Prueba de peso de 1000 cariopses indica que los lotes de híbridos que presentan el mayor peso no siempre muestran los mayores valores de germinación ni de emergencia a campo.

La Prueba de verde rápido, para los lotes evaluados, permite identificar más niveles de calidad cuando se toma al DML como indicador de daño.

Las pruebas de CA, PC, PGE, son muy buenas herramientas de evaluación de la calidad fisiológica, brindando cada una de ellas información complementaria. El CA demuestra ser una técnica de utilidad para anticipar resultados y realizar un ranking de los lotes de híbridos de maíz.

Las PTTZ, PTZA y CESI muestran valores de correlación significativa con la emergencia en el campo.

El uso de Patrones de viabilidad y vigor específicos para la especie maíz en la PTTZ permite obtener una mayor información sobre las características fisiológicas de los cariopses y son útiles para realizar una clasificación rápida de los lotes de híbridos de maíz.

La prueba de CESI muestra ser una herramienta de gran utilidad en la evaluación de la calidad y la clasificación de los lotes en estudio, en base a sus características de objetividad y rapidez de obtención de los resultados.

Cada una de las pruebas utilizadas brinda una información parcial que contribuye a la descripción o caracterización de la calidad de los lotes de maíz. La integración de los resultados de las pruebas permite la realización de un diagnóstico y lograr una mejor interpretación de la calidad de los cariopses de maíz.

## **CAPÍTULO 2**

### **EVALUACIÓN DE DISTINTAS PRUEBAS DE LABORATORIO PARA ESTIMAR EL VIGOR EN SEIS LOTES DE HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ**

#### **2.1 INTRODUCCIÓN**

El vigor de las semillas ha sido definido por ISTA en su Manual de Vigor (Hampton y TeKrony, 1995) como “la suma total de aquellas propiedades de las semillas que determinan el nivel de actividad y el comportamiento de las mismas o de un lote durante la germinación y la emergencia de plántulas”. Las semillas que presentan un buen comportamiento se consideran de vigor alto y las que presentan un pobre comportamiento son llamadas de vigor bajo.

Las empresas productoras de semillas han utilizado desde siempre las pruebas de vigor, inclusive con distintos niveles de exigencia y con modificaciones particulares, como una herramienta interna (*in house*) para obtener información que les permita clasificar los distintos lotes y decidir los destinos de la producción tanto para la siembra como para la conservación. Además, su conocimiento permite brindar recomendaciones para la siembra según las regiones, las condiciones climáticas imperantes y el tipo de suelo, para los distintos lotes de semilla en base a su calidad fisiológica.

Las pruebas de vigor evalúan directa o indirectamente la condición fisiológica del lote de semillas. Existen distintos tipos de pruebas, algunas miden la velocidad de emergencia en condiciones de campo y otras lo hacen en el laboratorio en condiciones controladas pero sin estrés como la velocidad de germinación. Por otra parte, otras técnicas evalúan aspectos bioquímicos como la Prueba de tetrazolio, la integridad de las membranas celulares como la de Conductividad eléctrica y otros métodos que imponen distintos tipos de estrés como de alta o

baja temperatura, anaerobiosis, inmersión en agua a altas y bajas temperaturas, germinación en sustrato compactado, etc. (Hampton y TeKrony, 1995).

Las pruebas de vigor permiten también detectar el grado de deterioro que presentan los lotes de semillas. El mismo se puede resumir como un conjunto de factores que producen distintos tipos de alteraciones de origen físico, fisiológico y bioquímico, que tienen lugar durante toda la vida de la semilla dependiendo de las condiciones adversas a las que estuvo expuesta. El deterioro es un fenómeno inexorable, gradual y generalmente irreversible, que se inicia con la alteración de las membranas celulares afectando la semipermeabilidad de las mismas y desencadenando una serie de eventos deletéreos como reducción de la actividad respiratoria y de biosíntesis, menor velocidad de germinación, menor tasa y uniformidad de crecimiento, menor tolerancia a condiciones ambientales adversas que conducen a la incapacidad de la semilla de producir una planta normal y finalmente termina con la muerte de la misma (Delouche y Baskin, 1973; Salinas, *et al.*, 1998; Salinas, *et al.*, 2001).

La Prueba de frío es una de las pruebas de vigor más antigua (Isely, 1950; Hoppe, 1956 citados en Hampton y TeKrony, 1995) y continúa siendo en la actualidad la más utilizada en la industria de semillas de maíz para casi todos los lotes de semillas vendidos en América del Norte y Europa (Hampton y TeKrony, 1995). En Argentina, los criaderos de maíz también la utilizan masivamente como herramienta de diagnóstico de calidad. Esta prueba se desarrolló para simular condiciones de campo adversas y medir la capacidad de las semillas para emerger en un suelo húmedo, frío y con patógenos (Hampton y TeKrony, 1995). Desde la década de los años 50 y hasta la actualidad, han sido numerosas las variantes que se han practicado en esta técnica de laboratorio, pero a pesar de ello no hay un acuerdo generalizado que permita hacer comparables los resultados y que sirva de herramienta para posibles reclamos de calidad (Burriss y Navrati, 1979; Craviotto, *et al.*, 1992; Gutormson, 1995; Nijenstein, 1995; Caseiro y Marcos Filho, 2000; Caseiro y Marcos Filho, 2002; Lovato y Balboni, 2003; Nafziger, 2003; Lovato *et al.*, 2005).

Si bien la Prueba de frío es el ensayo de vigor por excelencia en maíz y la técnica que los laboratorios privados y oficiales utilizan rutinariamente, persisten serios problemas de estandarización. Esto se debe principalmente a que la prueba utiliza suelo proveniente de lotes donde se ha cultivado maíz y que posee patógenos del cultivo. Además, se utiliza el suelo con

un alto contenido de humedad y se lo somete a temperaturas por debajo de la óptima para la especie luego de la siembra. La ejecución de la prueba se complica por la necesidad de disponer y manejar grandes volúmenes de suelo de calidad similar (estructura, textura y materia orgánica). Por otra parte, se debe determinar el tipo de patógenos que están presentes, mantener su patogenicidad y asegurar su supervivencia durante el almacenamiento. Todos los elementos mencionados son factores que incorporan dificultad en la estandarización de la técnica.

La habilidad de la semilla para germinar y emerger en un medio de crecimiento con estas características, depende del genotipo, de la calidad física y fisiológica, la sanidad y de los tratamientos que tenga la misma. La prueba de frío evalúa la germinación de lotes de semillas de maíz frente al conjunto combinado de efectos antes mencionados, esto hace que se dificulte la interpretación de los resultados dentro de un mismo laboratorio y más aún entre laboratorios diferentes. Existe numerosa bibliografía contradictoria con respecto a la temperatura recomendada para esta prueba y al uso de suelo como medio de crecimiento. A este respecto, Burris y Navrati (1979) concluyeron que la respuesta al frío se debe más a la temperatura del estrés que a la presencia de suelo con patógenos en el ensayo. Por otro lado, Nijenstein (1995) indicó que entre 6 °C y 10 °C de temperatura, los microorganismos pueden disminuir su virulencia. En estudios más recientes, Lovato *et al.*, 2005 han demostrado que la conducción de la prueba a 10 °C no sería un estrés suficiente para todos los genotipos, debido al aumento de resistencia al frío lograda por mejoramiento genético. Los nuevos híbridos de siembra temprana son capaces de soportar temperaturas inferiores a las mencionadas en los Manuales de vigor de ISTA (Hampton y TeKrony, 1995) y AOSA (2009) para la prueba. Esto último, hace que el ensayo no sea una verdadera prueba de estrés y que se comporte casi como una PGE, de manera que no es eficiente para separar a los híbridos por sus características fisiológicas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se procedió a eliminar la tierra y a usar sólo arena estéril como medio de crecimiento, manteniendo las otras características de la prueba, es decir alta humedad de sustrato y baja temperatura. En virtud de los cambios metodológicos realizados a la Prueba de frío tradicional, se la denomina Prueba de frío modificada (PFM).

Para subsanar las discrepancias obtenidas en los resultados de la prueba de frío entre los ensayos de laboratorio y los de campo, surgieron otras pruebas de vigor como la Prueba de

frío saturada (PFS). Esta técnica es básicamente la prueba de frío a la cual se suma otro factor de estrés, que es la saturación por humedad del medio de crecimiento. Goodsell *et al.* (1955) describieron un procedimiento de PFS como una forma de seleccionar las líneas endocriadas y los híbridos de maíz. Esta prueba es más estresante que la de frío tradicional debido al alto grado de saturación de agua del medio de crecimiento, que ocasiona una menor disponibilidad de oxígeno para la semilla. Por otro lado, la PFS tiene gran eficacia para clasificar lotes de semilla híbrida en un rango de valores más amplios que la prueba de frío tradicional, permitiendo realizar un manejo más detallado de los mismos. Según AOSA (2002), los resultados de esta prueba podrían subestimar la emergencia a campo especialmente cuando las condiciones de humedad del suelo no son demasiado estresantes.

La PFS es una prueba de ejecución muy compleja ya que involucra de igual manera que la PFM una serie de pasos en su realización con controles de temperatura de las cámaras, del sustrato y del ambiente del laboratorio, saturación de agua del sustrato, necesita de distintos tipos de recipientes para el armado de un sistema de cajas apropiado para mantener el sustrato saturado durante todo el período que dura la prueba, la siembra de los embriones orientados hacia el sustrato, etc. No tiene elevados requerimientos en equipamiento ya que se utilizan dos cámaras frías y una cámara de germinación. No requiere del uso de productos químicos. Es también una prueba donde se evalúan plántulas. La interpretación de los resultados es compleja, como en toda prueba de vigor, ya que informa un valor de germinación que el lote podría expresar en el campo si se reproducen las condiciones de estrés de la prueba. En cuanto al personal, necesita capacitación en la evaluación de plántulas al igual que en la PGE. No es rápida, ya que demanda de un período de 14 días como máximo y podría reducirse a 12 o 13 días con la ejecución de recuentos anticipados.

Existen otras pruebas como la de Germinación en frío (PGF), que fue desarrollada inicialmente para evaluar el vigor en semillas de algodón, pero puede aplicarse a otras especies (AOSA, 2002). Las semillas de la mayoría de las especies germinan satisfactoriamente dentro de un rango óptimo de temperaturas, denominadas temperaturas cardinales y son propias de cada especie. No obstante ello, se vuelven más exigentes en las condiciones de germinación cuanto menor es el vigor del lote. Por lo tanto, las semillas de menor vigor muestran un peor desempeño en temperaturas de germinación inferiores a las óptimas y muestran también una

menor velocidad de emergencia. Las bajas temperaturas, a 18 °C, particularmente durante la etapa de imbibición, tienen efectos negativos en la germinación de plántulas de algodón (Christiansen y Thomas, 1969) y en la producción de plántulas normales, pudiendo producir daños en raíces y una menor tasa de elongación (Christiansen, 1964). La Prueba de germinación a baja temperatura fue descrita por Krzyzanowsky *et al.* (1991), juntamente con otras pruebas de vigor comúnmente utilizadas en Brasil y disponibles para los grandes cultivos. La prueba se fundamenta en la utilización de una temperatura por debajo de la óptima para la germinación de la especie en estudio y esto provoca un efecto detrimental en la germinación. Los lotes de semillas de la misma especie con germinación semejante, dependiendo de su condición fisiológica, muestran un desempeño diferente cuando son sometidos a una germinación a temperaturas inferiores a la óptima. Por ello, es que se considera a la PGF como una prueba de estrés.

La rapidez con que un lote de semillas germina, produce plántulas normales y se establecen en el lote de campo es una medida más de su calidad fisiológica. Este valor puede medirse por medio de distintos índices como es el caso de la Velocidad de germinación (IVG) o el Tiempo medio de germinación (TMG) (Silva y Nakagawa, 1995; Nakagawa, 1999). El primer índice se refiere al número de semillas germinadas por día relacionado al número de días que dura la evaluación y sus resultados se interpretan de manera que a mayor valor del índice es mayor la calidad fisiológica del lote. Por otro lado, el TMG indica el tiempo promedio necesario para lograr la máxima germinación del lote. La interpretación del resultado indica en este caso, que a menor valor del índice mejor es la calidad fisiológica del lote. Los híbridos que expresan mayor valor del IVG y menor de TMG son aquellos que poseen mejor calidad fisiológica.

La PGF es sencilla, barata pero no muy fácil de conducir, especialmente cuando se mide en ella el IVG y TMG, ya que se deben realizar recuentos diarios con manipuleo cuidadoso de los rollos y de los cariopses para que no se deterioren. Esta prueba utiliza solo un elemento de estrés que es la germinación a una temperatura inferior a la óptima, no utiliza productos químicos, tiene los mismos requisitos en equipos y controles que la PGE. Es una prueba en la que se realiza evaluación de plántulas por parte del analista y en la que influye el nivel de capacitación y criterio adquirido.

La Prueba de inmersión en agua (PIA) es una alternativa para simular condiciones de inundación y anaerobiosis para la semilla. La inundación del suelo provoca varios efectos perjudiciales en la germinación de las semillas y en la producción de plántulas (Kozłowski, 1999). Los cariopses sumergidos en el agua a diferentes temperaturas sufren daño por la rápida entrada de agua a las células. Esto se debe a la diferencia del potencial hídrico entre los cariopses secos y el medio en el cual se encuentran, pudiendo aumentar en la fase de imbibición de -400 MPa a -1 MPa y de esta manera, se produce una considerable entrada de agua y puede inducir un cambio del metabolismo aeróbico hacia el metabolismo fermentativo (Crawford, 1978; Castro *et al.*, 2004). De esta manera, las semillas/frutos que posean algún daño tendrán una menor disponibilidad de energía para el proceso de la germinación lo que resulta en un menor vigor (Richard *et al.*, 1991). Cuando hay exceso de agua en el medio, la disponibilidad de oxígeno para el embrión disminuye reduciendo o retrasando la germinación en varias especies (Kozłowski y Pallardy, 1997). Existen numerosos trabajos de investigación donde se ha utilizado este tipo de estrés (Popinigis, 1985; Dantas, *et al.*, 2000; Goggi, *et al.*, 2008). Además, en numerosos trabajos se ha estudiado el efecto de la inmersión en agua a diferentes temperaturas y tiempos de imbibición sobre la germinación y el vigor en distintas especies como en maíz (Dantas *et al.*, 2000; Méndez-Natera, *et al.*, 2007; Grzybowski, 2012); en poroto (Custódio *et al.*, 2002, 2009; Bertolin, 2010) y en soja (Arango *et al.*, 2010; Theodoro, 2013). Los mencionados autores indicaron que aquellos lotes que muestran una mayor producción de plántulas normales luego de la ejecución de la PIA tendrán mayor capacidad de soportar el estrés y por ende podrán clasificarse como de mayor vigor.

La Prueba de inmersión en agua (PIA) es un ensayo que reúne las características generales que se le pide a toda prueba de vigor, que son las de ser rápida, económica, sencilla y fácil de realizar. Esta prueba no requiere el uso de ningún tipo de producto químico ni equipos costosos. Solo se sumergen los cariopses de maíz en agua corriente a diferentes temperaturas y por un determinado período de tiempo. El fundamento de la prueba es someter a las semillas a un estrés de hipoxia y luego se conduce una PGE. Los lotes que logran producir un mayor porcentaje de plántulas normales, luego del estrés, presentan un mejor vigor.

Existen otras pruebas de vigor como la Prueba de envejecimiento acelerado (PEA) ampliamente utilizada en maíz y otras especies (Barros y Dias, 1992; Borba, *et al.*, 1994;

Marcos Filho, 1999 b). La prueba se la ha utilizado para predecir el período de vida de diferentes especies y sus resultados han sido correlacionados exitosamente con la emergencia de campo (Byrd y Delouche, 1971; Delouche y Baskin, 1973; Bishnoi y Delouche, 1975; Wilson, *et al.*, 1992; Hampton *et al.*, 1992; Ibrahim *et al.*, 1994; Hampton y TeKrony, 1995). La PEA es una prueba de vigor de complejidad de ejecución intermedia, requiere de equipos sencillos y disponibles en laboratorios de control de calidad, requiere personal entrenado en evaluación de plántulas como en la PGE. No utiliza productos químicos e involucra un estrés de temperatura, humedad y tiempo en una cámara de envejecimiento y luego un período en cámara de germinación. No es rápida, sino que demanda aproximadamente 10 días. Puede adelantarse a nueve si se realiza un recuento anticipado. En esta prueba se evalúan plántulas. La interpretación de los resultados es compleja, como en toda prueba de vigor, ya que informa un valor de germinación que el lote de cariopses podría expresar en el campo si se reproducen las mismas condiciones de estrés de la prueba (alta temperatura y humedad relativa).

## **2.2 OBJETIVO**

El objetivo de este capítulo fue identificar aquellas condiciones de estrés físico aplicadas al ambiente de los ensayos de vigor de laboratorio, que permitan la expresión de diferentes condiciones fisiológicas de lotes de cariopses de maíz de germinación aceptable (90 %).

## **2.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

Se trabajó con los seis lotes de híbridos comerciales de maíz, que fueron descritos y caracterizados en el Capítulo 1. Para cumplimentar los objetivos de este capítulo se condujeron una serie de pruebas de vigor. Los ensayos se condujeron en el Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros del INTA.

### **2.3.1 PRUEBAS DE VIGOR**

2.3.1.1 Prueba de germinación en frío (PGF).

2.3.1.2 Prueba de inmersión en agua (PIA).

2.3.1.3 Prueba de envejecimiento acelerado (PEA).

2.3.1.4 Prueba de frío modificada (PFM).

2.3.1.5 Prueba de frío saturada (PFS).

#### **2.3.1.1 Prueba de germinación en frío**

Para la ejecución de la PGF se utilizó una temperatura de germinación de  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , inferior a la temperatura óptima para la germinación ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de la especie maíz, tendiente a provocar un estrés y detectar niveles del estado fisiológico de los lotes de híbridos en estudio. Se utilizaron cuatro repeticiones de 50 cariopses puros para cada una, sin lavado previo. En virtud de ello, se tomaron las medidas pertinentes de seguridad y se trabajó con el empleo de guardapolvo, guantes descartables, mascarillas y pinzas.

Para la siembra se utilizó el método Entre papeles con el armado de rollos, se usó papel toalla (soft, Kimberly Clark) humedecidos a condición de saturación. Los cariopses de maíz se sembraron con los embriones orientados con la radícula hacia abajo y los rollos se armaron con tres papeles, dos abajo y uno arriba. Los mismos se introdujeron en bolsas de polietileno y se cerraron para mantener la humedad, se ubicaron en posición vertical en el recipiente portarrollos y se colocaron en una cámara fría durante todo el período del ensayo (Figura 2.1).

Se utilizó como cámara fría una heladera Minibisu Gafa, S.A, con el agregado de un controlador de temperatura CAREL S.p.A. La cámara fría se calibró previamente a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se controló y ajustó durante dos días, hasta lograr la mínima variación. Una vez corroborada la estabilización de la temperatura se procedió al inicio del ensayo. Durante la ejecución del

mismo, los rollos se abrieron cuidadosamente cada 24 h para observar la evolución de la germinación de los lotes a dicha temperatura (Figura 2.2a). Se prestó especial atención en la manipulación de los rollos, al abrirlos y cerrarlos, para no alterar la posición y la orientación de los embriones de los cariopses ni generar daños. La evaluación se focalizó solamente en la aparición y longitud de la raíz primaria. En cada lote en estudio, durante las evaluaciones se registró el número de cariopses que presentó protrusión de la raíz primaria. Se definió como protrusión cuando la raíz primaria superó los 2 mm de longitud. Los resultados se expresaron en porcentaje de cariopses con protrusión de raíces. Los resultados se analizaron a través de la aplicación de las fórmulas de los Índices de IVG de Kotowski (Ross y Moore, 1975) y TMG de Edmond y Drapala (1957).



**Figura 2.1.** Disposición del recipiente porta rollo en la cámara fría.



**Figura 2.2a.** Apertura de los rollos y observación del estado de los cariopses.

La Figura 2.2b muestra la ejecución de la evaluación y recuento de la PGF. El ensayo se concluyó a los 21 días cuando se comprobó la estabilización de la emergencia de plántulas en todos los lotes.



**Figura 2.2b.** Prueba de Germinación en agua, preparación de los caryopses y b) observación del estado de los caryopses y c) armado del rollo para su envío a la cámara fría nuevamente.

### 2.3.1.2 Prueba de inmersión en agua

Previo a la ejecución de la PIA se realizó la operación de lavado de los caryopses para eliminar el fungicida en origen que poseían los lotes de híbridos, como se describió en la PVR del Capítulo 1. Durante este procedimiento se trabajó con cuidado en el manipuleo de los caryopses de maíz para evitar producir lesiones. Se utilizaron equipos de protección personal como guardapolvo, guantes descartables, barbijo y pinzas.

Para la ejecución de la prueba se utilizaron cuatro repeticiones de 50 caryopses puros de cada uno de los lotes de híbridos en estudio (Figura 2.3). Se usaron recipientes plásticos con tapa, de 250 ml de capacidad. Los caryopses de maíz de cada repetición se sumergieron en un volumen de 200 ml de agua corriente a pH neutro (Martin *et al.*, 1991) (Figura 2.4). Durante la realización del ensayo se utilizaron tres temperaturas de incubación ( $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y tres períodos de tiempo de permanencia en la cámara de incubación y en cámara fría (24, 48 y 72 h  $\pm 15$  minutos). Se utilizó una cámara de germinación previamente calibrada a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y controlada durante todo el experimento y dos heladeras Minibisu Gafa, S.A, con el agregado de un controlador de temperatura CAREL S.p.A., que se calibraron a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 2.5).



**Figura 2.3.** Preparación de las repeticiones para la Prueba de inmersión en agua.



**Figura 2.4.** Cariopses de maíz sumergidos en 200 ml de agua.

Luego de cada período de estrés, los cariopses se retiraron del agua con ayuda de un colador y se dejaron orear sobre una rejilla durante  $1 \text{ h} \pm 15 \text{ minutos}$  (Figura 2.6 y 2.7).



**Figura 2.5.** Incubación de los cariopses en cámara a baja temperatura de inmersión.



**Figura 2.6.** Eliminación del agua luego del estrés de inmersión a baja temperatura.

Con posterioridad, se procedió a sembrar los cariopses en bandejas con sustrato arena para conducir una PGE tradicional, según el método recomendado por la ISTA (2007) (Figura 2.8). Trascurridos siete días en la cámara de germinación a  $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  se retiraron las bandejas, se realizó la evaluación del ensayo y la clasificación de plántulas en normales,

anormales y semillas muertas, siguiendo el criterio establecido en el Manual de Evaluación de Plántulas de la ISTA (2003). Los resultados se expresaron en porcentaje para cada categoría.



**Figura 2.7.** Oreado de los cariopses de maíz luego del proceso de inmersión en agua.



**Figura 2.8.** Siembra de los cariopses de maíz en recipientes con arena luego del estrés de inmersión.

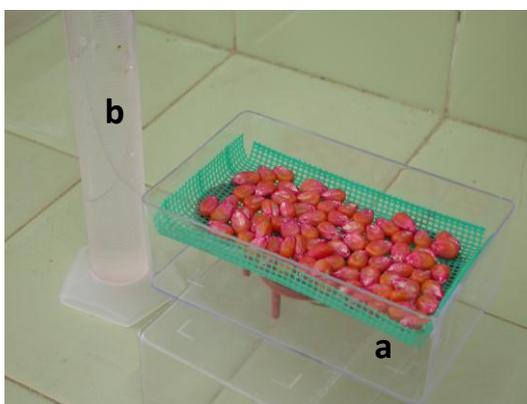
### 2.3.1.3 Prueba de envejecimiento acelerado

La PEA consiste en someter a los cariopses de maíz a alta temperatura y alta humedad relativa durante un determinado período de tiempo.

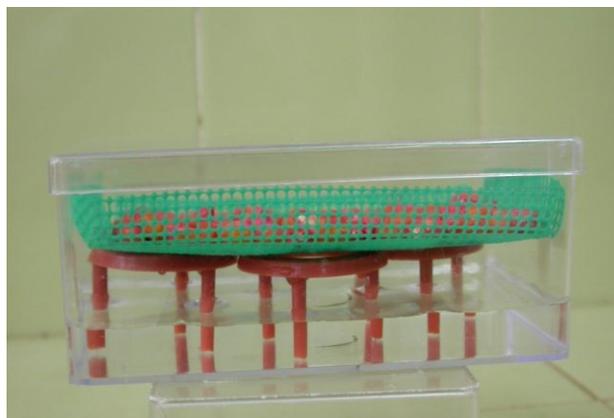
La prueba se condujo siguiendo la metodología detallada en las Reglas ISTA (ISTA, 2007) y el Manual de Vigor de ISTA (Hampton y TeKrony, 1995). Se utilizaron cuatro repeticiones de 50 cariopses puros para cada uno de los seis lotes de híbridos, sin lavado previo. El contenido de humedad de los lotes sometidos a la prueba se encontraba entre 12,5 % y 15 %. Los cariopses de maíz se sometieron a un estrés con una humedad relativa cercana al 100 % y dos temperaturas  $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $72\text{ h} \pm 15\text{ minutos}$ . Se utilizó el método de las mini cámaras (Figura 2.9). Además, se utilizaron dos estufas termo regulables, Científica Central, Jacobo Rapaport S.A., que se calibraron respectivamente, una  $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la otra a  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ambas estufas se controlaron por dos días y se inició el ensayo cuando alcanzaron cada una de ellas la temperatura deseada de la prueba sin variaciones. La temperatura en cada estufa se controló y registró durante todo el período del ensayo.

Las mini cámaras son cajas de acrílico transparente con tapa, de 8 cm de ancho x 12,5 cm de largo y 4 cm de alto, que llevan en su interior un volumen medido de agua de 100 ml (Figura 2.10). Este volumen de agua juntamente con la temperatura, son los factores que generan la atmósfera húmeda para provocar el deterioro. Las mini cámaras se complementaron con soportes que sostenían una bandeja cribada plástica o cesta en su interior. Sobre la cesta se colocaron los cariopses en una capa única y simple. Los soportes mantuvieron a la cesta con los cariopses suficientemente separados del volumen de agua interno, para que se hidrataran lentamente con el vapor de agua producido en el interior de la mini cámara. Las mini cámaras se colocaron en cada estufa en un mismo estante y separadas entre sí por un espacio de 2,5 cm que favoreció la circulación de aire caliente y evitó la formación de gradientes de temperatura (Figura 2.11).

Luego del estrés, los cariopses se retiraron de cada estufa y se condujo una PGE tradicional siguiendo la metodología de la ISTA (2007) (Figura 2.12). A los seis días se retiraron las bandejas de la cámara de germinación, se evaluaron las plántulas normales producidas y los resultados se expresaron en porcentaje. Los cariopses de maíz no germinados luego de la PGE se evaluaron por la PTTZ para determinar su viabilidad.



**Figura 2.9.** Mini cámara de Envejecimiento acelerado. a) Caja de acrílico con soporte y cesta con los cariopses. b) Probeta para medir el volumen de agua que se incorpora a la mini cámara.



**Figura 2.10.** Vista lateral de la mini cámara cerrada. Los soportes de plástico separan la cesta con los cariopses de maíz del agua en su interior.



**Figura 2.11.** Vista interna de la estufa de incubación con las mini cámaras dispuestas en su interior.



**Figura 2.12.** Bandejas con plántulas germinadas luego del estrés de Envejecimiento acelerado dentro de la cámara de germinación.

#### **2.3.1.4 Prueba de frío modificada**

La siembra se realizó en cajas de plástico transparente de 21 x 13,5 x 4 cm con tapa. Este tamaño de caja se utilizó para un mejor aprovechamiento del equipamiento de frío disponible en el Laboratorio de Semillas la EEA Oliveros. Se utilizaron cuatro repeticiones de 50 cariopses puros, para cada lote de híbrido de maíz en estudio. Para la ejecución de la PFM se utilizó como medio de crecimiento arena estéril humedecida hasta el 75 % de su capacidad de retención de agua. Se probaron diferentes temperaturas para provocar estrés:  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

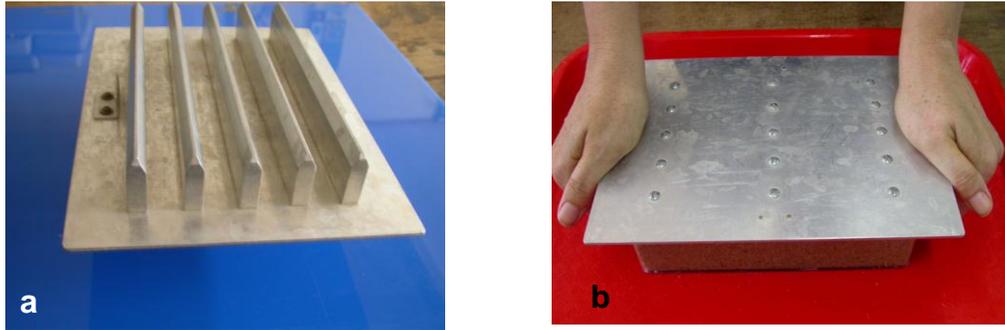
Para provocar el estrés que permitiera identificar el vigor de los lotes de maíz en la PFM, como primera medida los cariopses entraron en contacto con la baja temperatura desde el mismo momento de la siembra. Esto le confirió a la prueba uniformidad en la conducción, logró que los resultados fueran consistentes y posibles de estandarizar (Caseiro y Marcos Filho, 2002). En el laboratorio se organizó la realización del ensayo de manera de evitar demoras en la ejecución de los distintos pasos para evitar alterar la temperatura de la arena estéril en las bandejas donde se sembraron los cariopses de maíz. La operatoria de trabajo requirió el empleo de dos cámaras frías. Se utilizaron dos heladeras Minibisu Gafa, S.A, con el agregado de un controlador de temperatura CAREL S.p.A. Antes de iniciar el ensayo, cada cámara fría se

controló y calibró a la temperatura de la prueba y una vez que alcanzaron la temperatura del ensayo se dio comienzo al mismo. En ensayos preliminares se determinó que un período de permanencia de 24 h en la cámara fría fue suficiente para que el sustrato alcanzara la temperatura del estrés. En una de las cámaras fría se colocaron las cajas preparadas con el medio de crecimiento húmedo durante 24 h (Figura 2.13) y al día siguiente se retiraron las cajas de la cámara fría en grupos de a tres, se realizaron surcos con un surcador artesanal, se sembraron los cariopses y se colocaron en la otra cámara fría.

Para realizar los surcos en las cajas en forma rápida y uniforme se utilizó un surcador de aluminio diseñado en el laboratorio de semillas de la EEA Oliveros y fabricado a medida para las cajas plásticas utilizadas. El surcador es una placa rectangular de 25 x 18 cm que posee cinco costillas de 1 cm de espesor separadas entre sí por 2 cm, poseen una profundidad 3,5 cm y se ubica perfectamente dentro de la caja (Figura 2.14). Para realizar los surcos, se colocó el surcador en la caja conteniendo el medio de crecimiento húmedo y se realizó una presión sobre el mismo hasta que la placa de aluminio hizo tope con los bordes de la caja. En esta operación se marcaron cinco surcos en el medio de crecimiento con una profundidad apropiada para la siembra de los cariopses de maíz.

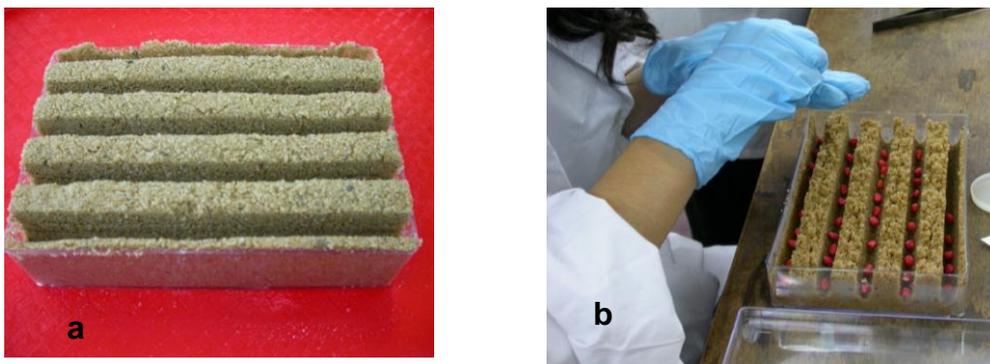


**Figura 2.13.** Ubicación de las cajas de siembra con la arena estéril húmeda en la cámara fría.



**Figura 2.14.** Técnica de surcado de las cajas. a) Surcador. b) Marcado de los surcos en la caja de siembra con arena estéril.

Luego del surcado del medio de crecimiento se procedió a colocar diez cariopses por surco en cada caja (Figura 2.15) y se realizó el derrumbe del borde de cada surco para que los cariopses de maíz quedaran cubiertos. Luego de la siembra se colocó la tapa en la caja y se la ubicó en la otra cámara fría. Una vez terminada la siembra de todos los lotes, las cajas permanecieron durante siete días en la cámara fría a cada una de las temperaturas de estrés. Luego del estrés de frío se retiraron las cajas de la cámara fría. Se sacó la tapa de cada caja, se las cubrió con una bolsa plástica para mantener el nivel de humedad del medio de crecimiento y se las llevó a la cámara de germinación a la temperatura de  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ISTA, 2007).



**Figura 2.15.** Siembra en arena estéril. a) Caja de siembra con los surcos marcados. b) Siembra de los cariopses en los surcos.

La metodología descrita en el Manual de Vigor ISTA (Hampton y TeKrony, 1995) sugiere la realización del recuento final y la evaluación de plántulas a los siete días de permanencia en la cámara de germinación. No obstante ello, se realizaron recuentos anticipados a los tres y cinco días, con el objetivo de identificar tempranamente las diferencias en la germinación entre los lotes de híbridos y para disminuir el tiempo de ejecución de la prueba.

En el recuento anticipado a los tres días de permanencia en la cámara de germinación solo se realizó la observación de la parte aérea de las plántulas sin extraerlas del sustrato. Se registró el número de plántulas que emergieron del medio de crecimiento y por el aspecto morfológico que exhibió su parte aérea se las clasificó como normales o anormales. En el segundo recuento a los cinco días, se retiraron las plántulas del sustrato, se realizó la observación completa de la raíz y la parte aérea de cada una de ellas y se las clasificó de acuerdo al criterio del Manual de Evaluación de Plántulas (ISTA, 2003). Los cariopses de maíz no germinados al finalizar el ensayo se lavaron para retirar la arena y se sometieron a una PTTZ para evaluar su viabilidad. Se utilizó la metodología de la PTTZ descrita en el Capítulo 1.

#### **2.3.1.5 Prueba de frío saturada**

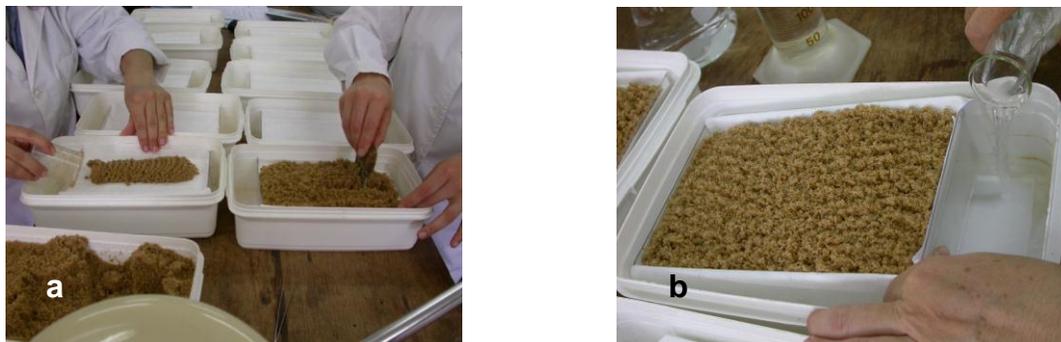
La PFS es básicamente una Prueba de frío con falta de oxígeno en el sustrato (Goodsell *et al.*, 1955). Los cariopses de maíz se someten a un doble estrés, hipoxia y frío. Para ello, se procedió a sembrar los cariopses de los lotes de híbridos de maíz en un medio de crecimiento de arena estéril fría y saturada de humedad. Para realizar la prueba se armó un sistema especial y artesanal para mantener la arena estéril saturada de agua durante todo el período que duró la prueba. El sistema mencionado se confeccionó con materiales comunes disponibles en el Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros. Se utilizaron tres cajas de plástico de distinto tamaño: una mayor de 28 x 19 x 15 cm, otra menor de 22 x 15 x 10 cm y una tercera caja playa de 21,5 x 14 x 1,5 cm. La caja mayor se utilizó para contener un volumen de agua de 500 ml y el resto de los elementos del sistema. La caja menor se colocó dentro de la caja mayor, invertida a manera de plataforma o soporte de la tercera caja playa. Esta última caja contenía

una hoja de papel toalla (soft, Kimberly Clark) y sobre él se colocó 1,5 cm de arena estéril. El papel toalla se cortó a la medida de la caja de acrílico playa y se dejó un sobrante que formó dos colas de 15 cm a cada lado. Estas dos colas funcionaron como una mecha que se introdujeron en el agua contenida en la caja mayor. Las mechas de papel se embebieron con agua y la condujeron desde la caja a la arena manteniéndola permanentemente saturada de humedad durante todo el ensayo (Figura 2.16).



**Figura 2.16.** Sistema artesanal para la Prueba de frío saturada. a) Caja mayor, b) caja menor transparente, c) caja playa y d) hoja de papel que se embebe con agua y satura el sustrato. e) batería de cajas armadas.

Se utilizaron como cámara fría dos heladeras Minibisu (Gafa, S.A), con el agregado de un controlador de temperatura CAREL S.p.A. El trabajo se planificó en una secuencia de pasos sucesivos, ordenados y con la participación de varios auxiliares de laboratorio, con el objeto de evitar demoras en la ejecución de los mismos para no modificar la temperatura del medio de crecimiento. Las dos cámaras frías se calibraron previamente a la temperatura de la prueba de  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se las controló y una vez que alcanzaron la temperatura del ensayo se comenzó el mismo. El sistema específico se armó previamente con todos sus componentes: las cajas, el papel toalla, la arena estéril y el agua (Figura 2.17).



**Figura 2.17.** Preparación del sistema. a) Distribución de la arena estéril. b) Agregado del agua en la caja mayor.

Las cajas preparadas para la realización de la prueba se taparon y se introdujeron en una cámara fría 24 h antes (Figura 2.18). Para realizar la siembra se retiraron las cajas conteniendo el sistema preparado de la cámara fría muy cuidadosamente de a una por vez. Se destapó la caja mayor y se procedió a sembrar los cariopses de maíz de cada lote de híbrido sobre la arena saturada de humedad. Se utilizaron cuatro repeticiones de 50 cariopses puros para cada lote en estudio. Para favorecer la anaerobiosis los cariopses se sembraron con los embriones orientados hacia la arena y se comprimieron levemente con ayuda de una placa de acrílico del tamaño de la caja playa. Esta última operación aseguró que todos los embriones quedaran en íntimo contacto con el sustrato frío y húmedo (Figura 2.19). Una vez realizada la siembra cada caja se tapó y cuidadosamente se colocó el sistema en la otra cámara fría a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante siete días. Transcurrido el período de estrés por frío las cajas se retiraron de la cámara fría, se sacó la tapa, se las cubrió con una bolsa plástica para mantener el nivel de humedad de la arena y se llevó el sistema completo a la cámara de germinación a la temperatura de  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ISTA, 2007). Se dejó el sistema completo en la cámara de germinación durante siete días. Se realizaron dos recuentos, un recuento y evaluación de plántulas temprano a los cuatro días y otro final a los siete días de permanencia en la cámara de germinación. En esta prueba los cariopses se sembraron sobre el sustrato de manera que se realizó una evaluación completa de las plántulas aún en forma temprana. Los cariopses no

germinados al finalizar el ensayo se lavaron para retirar la arena y se sometieron a una PTTZ para evaluar su viabilidad. Se utilizó la metodología descrita en el Capítulo 1.



**Figura 2.18.** Sistema con las cajas armadas en la cámara fría.



**Figura 2.19.** Caja sembrada con los embriones de los cariopses orientados hacia la arena.

### 2.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se estudió la existencia de posibles diferencias estadísticas entre los seis lotes de híbridos de maíz entre las pruebas de vigor ensayadas aplicando la técnica de Análisis de la Variancia (ANAVA). Para las variables en estudio se utilizó el diseño experimental Completamente aleatorizado con 4 repeticiones. Se aplicó el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \xi_{ij} \quad i=1,\dots,6 \quad j=1,\dots,4$$

Donde:

$Y_{ij}$ : es el valor de la variable prueba de vigor en estudio para la j-ésima repetición en el i-ésimo lote de híbrido

$\mu$ : es la media general para la variable prueba de vigor en estudio

$\alpha_i$ : es el efecto del i-ésimo lote de híbrido

$\xi_{ij}$ : es el error experimental

Luego, se aplicó el test de Tukey de comparación de medias para estudiar cuáles de los lotes considerados en el análisis difirieron entre sí para poder clasificarlos por su respuesta a cada prueba de vigor. Se comprobó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de variancias requeridos para la aplicación del ANAVA y del Test de Tukey mediante la aplicación del Test de Kolmogorov y Levene respectivamente (Montgomery, 2004). En los casos para los cuales no se cumplió la normalidad y en el caso del no cumplimiento del supuesto de homogeneidad de variancias se realizaron transformaciones de las variables. Se utilizó la transformación arco seno raíz cuadrada de x para el análisis de la respuesta de los lotes en estudio a las pruebas: PIA 23 °C 72 h, PIA 10 °C 24 h, PIA 7,5 °C 24 h, PIA 7,5 °C 72 h, PEA 41 °C 72 h, PFM 7,5° C con primer recuento a los tres días, PFM 7,5° C con segundo recuento a los cinco días y PFM 5° C con primer recuento a los tres días, Por otro lado, se utilizó la transformación logaritmo natural para las pruebas PIA 10 °C 48 h y PIA 7,5 °C 48 h.

Se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) para estudiar la relación entre los porcentajes de plántulas normales obtenidos en las pruebas de vigor utilizadas, la emergencia a campo en el recuento final para las dos fechas de siembra realizadas en 9/11/09 y 20/09/10 y el porcentaje de plántulas normales producidos en el conteo final de la PGE. Los análisis se realizaron mediante la aplicación del software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

Se realizó un análisis multivariado de componentes principales (ACP) con 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés de diferente intensidad aplicados a los lotes de híbridos estudiados en el trabajo de investigación. El objetivo de ello fue ordenar/ranear las pruebas o tipos de estrés ensayados que permitan identificar la calidad fisiológica de los lotes en estudio.

Para ello, se realizó la descripción de cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en estudio en base a 11 variables. Las pruebas y/o tipos de estrés ensayados fueron PGE, CA, PC, PVR, IVG, TMG, PTTZ Viabilidad, PTTZ Vigor, PTTZ VSD, PTZA, CE  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , CE Potencial de germinación estimado, CE Potencial de vigor estimado, EA a 41 °C y 45 °C, PIA 23 °C en 24 h, 48 h y 72 h, PIA 10 °C en 24 h y 48 h, PIA 7,5 °C en 24 h, 48 h y 72 h, PFM 10°C con recuentos a 3 y 5 días, PFM 7,5 °C con recuentos a 3 y 5 días, PFM 5°C con recuento a 3 y 5 días y PFS 7,5 °C con recuento a 4 y 7 días. Las variables que se emplearon para la descripción de cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés fueron: Cantidad de días que demandó la realización de la prueba (número); Requerimiento de equipos específico (muy bajo, bajo, medio, alto, muy alto); Requerimiento de capacitación del personal (muy bajo, bajo, medio, alto, muy alto); Complejidad en la ejecución (muy baja, baja, media, alta, muy alta); necesidad de Uso de productos químicos (si, no); Elementos necesarios (muy bajo, bajo, medio, alto, muy alto); tipo de Objeto que se analiza durante la evaluación (plántula, cariopses, embriones, valores); Interpretación de los resultados de la prueba (simple, compleja); Factores de estrés que están presentes en la prueba (ninguno, bajo, medio, alto, muy alto); Subjetividad en la evaluación (se refiere a si el resultado de la evaluación se obtiene por la acción decisoria de un operador humano o de un instrumento de laboratorio) (si, no) y la Cantidad de niveles de calidad en que se separaron los lotes por la prueba y/o estrés ensayados (número). Para cada una de estas variables se utilizó un criterio de clasificación numérico. Para el caso de Cantidad de días y Cantidad de niveles de calidad se utilizó directamente el número de los mismos, pero en el caso de las variables necesidad de Uso productos químicos y Subjetividad en la evaluación el criterio fue No: 0 y Sí: 1; para Interpretación de los resultados obtenidos de la prueba fue simple: 0 y compleja: 1; para el tipo de Objeto que se analizó durante la evaluación fue plántula: 0, cariopses: 1, embrión: 2, valores: 3 y para el resto se utilizó una escala de 0 a 4 siendo muy bajo o ninguno: 0 y muy alto: 4. Para evaluar cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés de diferente intensidad ensayados en el estudio se utilizaron los valores que tomó cada una de las pruebas de control de calidad para cada CP. Se analizaron las matrices de correlaciones y los gráficos de las CP.

## 2.4 RESULTADOS

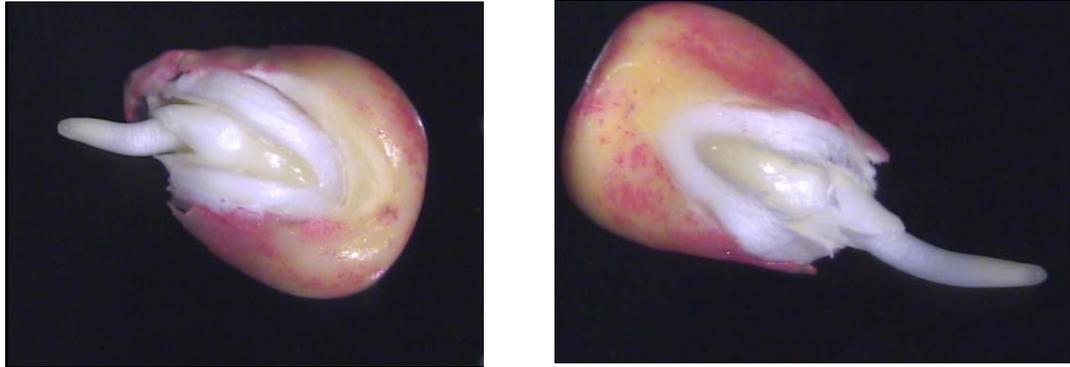
### 2.4.1 Prueba de germinación en frío

En la evaluación de la PGE luego que los cariopses de maíz fueron sometidos al estrés por frío, se observó un lento progreso de la germinación (Figura 2.20). Los cariopses se hidrataron lentamente, aumentaron su tamaño con el paso de los días pero recién al octavo día desde la siembra se comenzaron a evidenciar signos claros de germinación en todos los lotes de híbridos. La germinación se manifestó primeramente con la aparición de una rajadura en el pericarpio provocada por la coleorriza, que es la estructura embrionaria de protección de la raíz primaria. Esta prueba se basa en registrar la aparición y crecimiento de la raíz primaria y no se toma en cuenta el crecimiento del coleóptilo y las hojas primarias.



**Figura 2.20.** Prueba de germinación en frío, se observa germinación en algunos cariopses.

En la Figura 2.21 se muestra la protrusión de la raíz primaria en dos cariopses de maíz.



**Figura 2.21.** Detalle de cariopses de maíz con protrusión de la raíz primaria.

En la Tabla 2.1 se muestra el Índice de velocidad de germinación de los lotes de híbridos de maíz ordenados de mayor a menor. En el estudio de esta variable se encontraron diferencias significativas entre los lotes a través del test de comparación de medias de Tukey. Se observó que los lotes L3 y L4 tuvieron la mayor velocidad de germinación, el L1 mostró la menor y los lotes de híbridos restantes un comportamiento intermedio. El IVG permitió clasificar a los lotes de híbridos en cuatro niveles de vigor.

**Tabla 2.1.** Índice de velocidad de geminación de los lotes de maíz.

Lotes	Índice de velocidad de germinación	
L3	44,41	a *
L4	40,55	a
L5	25,37	b
L6	22,7	b c
L2	17,74	c
L1	2,03	d

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

El Tiempo medio de germinación se muestra en la Tabla 2.2, donde los valores están ordenados de mayor a menor para los lotes de híbridos de maíz en estudio.

**Tabla 2.2.** Tiempo medio de germinación (días) de los lotes de maíz.

Lotes	Tiempo medio de germinación (días)	
L1	43,48	a *
L2	5,71	b
L6	4,48	b
L5	3,95	b
L4	2,47	b
L3	2,26	b

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la variable Tiempo medio de germinación se encontraron diferencias significativas entre los lotes de híbridos en estudio. El test de Tukey mostró que el lote L1 fue el único en diferenciarse del resto, tuvo el mayor tiempo medio de germinación, es decir el peor comportamiento. Si bien los restantes lotes de híbridos no mostraron diferencias significativas, los lotes L3 y L4 mostraron los menores valores de Tiempo medio de germinación y los restantes tuvieron un comportamiento intermedio.

#### **2.4.2 Prueba de inmersión en agua**

Cuando se analizó la variable porcentaje de plántulas normales obtenidas por la PGE luego del estrés de la PIA, se encontraron diferencias significativas para todos los tiempos y temperaturas de inmersión ensayadas.

### 2.4.2.1 Prueba de inmersión en agua a 23 °C

La Tabla 2.3 muestra los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo sin inmersión y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes de híbridos luego de soportar un estrés de inmersión en agua a  $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  durante 24 h. El test de comparación de medias de Tukey mostró el comportamiento diferencial de los lotes. Los mayores porcentajes de plántulas normales fueron mostrados por los testigos de los lotes L3 y L4, el L1 el menor valor y los restantes mostraron un comportamiento intermedio. La PGE expresada en porcentaje de plántulas normales de los testigos, permitió separarlos en tres niveles de calidad fisiológica. Todos los lotes de híbridos luego del estrés de la PIA germinaron y produjeron plántulas clasificadas como normales con buen desarrollo. El estrés provocado por la inmersión de los cariopses en agua corriente durante 24 horas a  $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  permitió la clasificación de los seis lotes en dos niveles de vigor en base a la producción plántulas normales. Los lotes L3, L4, L5, L6 mostraron el mejor vigor y difirieron estadísticamente de los híbridos L2 y L1. Las plántulas clasificadas como anormales presentaron en su mayoría atrofia de la raíz primaria y ausencia de parte aérea. Los lotes L2 y L1 mostraron el mayor valor de cariopses no germinados sobre los cuales no se determinó su condición de viabilidad.

**Tabla 2.3.** Prueba de inmersión en agua (%) a  $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  durante 24 h de los lotes de maíz.

Lotes	Germinación estándar (%)			
	Testigo	PIA $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ 24 h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L3	99 a *	96 a *	1	3
L4	95 a	96 a	2	2
L5	88 a b	89 a	1	10
L6	87 a b	85 a	2	13
L2	76 b c	52 b	6	42
L1	65 c	33 b	1	66

Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

La Tabla 2.4 muestra los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo sin inmersión y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes luego de soportar un estrés de inmersión en agua a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. El test de comparación de medias de Tukey mostró que los lotes testigo L4 y L3 tuvieron el mejor comportamiento, L1 el menor valor y los restantes mostraron un comportamiento intermedio. La PGE expresada en porcentaje de plántulas normales de los híbridos no sometidos a estrés, los testigos, permitió separarlos en tres niveles de calidad fisiológica. El estrés provocado por la inmersión de los cariopses durante 48 horas a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  mostró diferencias estadísticas entre los lotes de híbridos de maíz, presentando L4 el mejor comportamiento, L1 el peor y los restantes un comportamiento intermedio. El estrés provocado por la inmersión durante 48 horas a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  permitió la clasificación de los seis lotes en cinco niveles de vigor en base a la producción de plántulas normales. Las anomalías que se presentaron luego del estrés fueron en su mayoría atrofia de raíz primaria y ausencia de parte aérea. El estrés fue tal que el lote L1 no produjo plántulas normales. Los lotes L2 y L1 presentaron el mayor porcentaje de cariopses no germinados, sobre los cuales no se determinó su condición de viabilidad.

**Tabla 2.4.** Prueba de inmersión en agua (%) a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h de los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)			
	Testigo	PIA $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 48 h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a *	84 a *	2	14
L3	98 a	73 b	0	27
L5	88 a b	59 b c	1	40
L6	86 a b	46 c	1	53
L2	76 b c	25 d	5	70
L1	65 c	0 e	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

La Tabla 2.5 muestra los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo sin inmersión y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes luego de soportar un estrés de inmersión en agua a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas y el testigo. Los lotes de híbridos testigo L4 y el L3 mostraron los mejores porcentajes de plántulas normales, L1 el peor y los otros tuvieron un comportamiento intermedio. El test de Tukey permitió clasificar a los seis lotes en tres niveles de calidad fisiológica. Los lotes sometidos al estrés de la PIA por 72 horas mostraron un comportamiento semejante a los testigos, pero L1 no produjo plántulas normales. Los lotes se pudieron clasificar en tres niveles de vigor. Las anomalías que se presentaron en las plántulas luego del estrés fueron en su mayoría atrofia de raíz primaria y ausencia de parte aérea. Todos los lotes estudiados mostraron un incremento en el porcentaje de cariopses no germinados, sobre los cuales no se determinó su condición de viabilidad.

**Tabla 2.5.** Prueba de inmersión en agua (%) a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 72 h de los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)			
	Testigo	PIA $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 72h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a *	50 a *	0	40
L3	98 a	49 a	0	51
L6	86 a b	28 a b	1	71
L5	88 a b	24 a b	0	76
L2	76 b c	13 b	3	84
L1	65 c	0 c	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

### 2.4.2.2 Prueba de inmersión en agua a 10 °C

La Tabla 2.6 muestra los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo sin inmersión y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes de híbridos luego de soportar un estrés de inmersión en agua durante 24 h en cámara a 10 °C ± 2 °C. El test de Tukey permitió separar a los lotes de híbridos testigo en tres niveles de calidad fisiológica, siendo L4 y L3 los que mostraron el mejor comportamiento, L1 el peor y los restantes fueron intermedios. La variable porcentaje de plántulas normales luego de la inmersión en agua mostró la separación de los lotes en cuatro niveles de vigor, donde los híbridos L4, L3 y L6 mostraron los mayores porcentajes de plántulas normales, L1 el peor y los restantes fueron intermedios. Las plántulas clasificadas como anormales se presentaron en muy bajos porcentajes solamente en los lotes L4 y L3 y en su mayoría mostraron el coleóptilo hendido con la hoja primaria dañada. Los lotes L5 y L1 presentaron los mayores porcentajes de cariopses no germinados, sobre los cuales no se determinó su condición de viabilidad.

**Tabla 2.6.** Prueba de inmersión en agua (%) a 10 °C ± 2 °C durante 24 h de los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)			
	Testigo	PIA 10 °C ± 2 °C 24 h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a *	96 a *	0	4
L3	98 a	91 a	1	9
L6	86 a b	91 a	1	8
L2	76 b c	68 b	0	32
L5	88 a b	12 c	0	88
L1	65 c	0 d	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

La Tabla 2.7 muestra los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo sin inmersión y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes luego de soportar un estrés de inmersión en agua a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. A través de la PGE los testigos separaron a los lotes de híbridos en tres niveles de calidad fisiológica. Los lotes L4 y L3 tuvieron el mejor comportamiento, L1 el peor los restantes mostraron un comportamiento intermedio. Por otro lado, el estrés afectó principalmente a los lotes L1 y L5 que mostraron el menor vigor. El resto de los lotes luego del estrés germinaron y produjeron plántulas clasificadas como normales con buen desarrollo, siendo L4, L3 y L6 los de mejor vigor, excepto L1 que no germinó y los restantes tuvieron un comportamiento intermedio. Los lotes de mayor vigor mostraron una mejor capacidad de soportar el estrés de inmersión y una mejor calidad fisiológica. El test de Tukey mostró la separación de los lotes sometidos a estrés en tres niveles de vigor. Las plántulas clasificadas como anormales presentaron mayoritariamente atrofia de raíz primaria, ausencia de parte aérea y coleóptilo hendido con la hoja primaria dañada. Los lotes L5 y L1 presentaron los mayores porcentajes de cariopses no germinados, sobre los cuales no se determinó su condición de viabilidad.

**Tabla 2.7.** Prueba de inmersión en agua (%) a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h de los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)			
	Testigo	PIA $10^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 48 h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a *	98 a *	0	2
L3	98 a	87 a	1	12
L6	86 a b	85 a	2	13
L2	76 b c	60 b	8	32
L5	88 a b	13 c	0	87
L1	65 c	0 c	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

### 2.4.2.3 Prueba de inmersión en agua a 7,5 °C

En la Tabla 2.8 se observan los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo sin inmersión y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes de híbridos luego de soportar un estrés de inmersión en agua durante 24 h a 7,5 °C  $\pm$  2 °C. En los testigos, los lotes L4 y L3 tuvieron el mejor comportamiento, L1 el peor y los restantes mostraron un comportamiento intermedio. La PGE de los lotes de híbridos sin inmersión permitió separarlos en tres niveles de calidad. Luego del estrés, los lotes L4, L3 y L6 mostraron el mejor vigor y germinaron y produjeron plántulas normales con buen desarrollo, mientras que el lote L1 no germinó luego del estrés, L5 mostró una muy baja germinación y el lote restante tuvo un comportamiento intermedio. El test de Tukey mostró la separación de los lotes en cuatro niveles de vigor. Las plántulas clasificadas como anormales presentaron mayoritariamente atrofia de raíz primaria y ausencia de la parte aérea. Los lotes L5 y L1 presentaron los mayores porcentajes de cariopses no germinados, sobre los cuales no se determinó su condición de viabilidad.

**Tabla 2.8.** Prueba de inmersión en agua (%) a 7,5 °C  $\pm$  2 °C durante 24 h de los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)			
	Testigo	PIA 7,5 °C $\pm$ 2 °C 24 h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a **	96 a **	1	3
L3	98 a	96 a	2	2
L6	86 a b	84 a	3	13
L2	76 b c	60 b	3	37
L5	88 a b	12 c	0	88
L1	65 c	0 d	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

La Tabla 2.9 muestra los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo sin inmersión y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes luego de soportar un estrés de inmersión en agua durante 48 h a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los lotes testigos L4 y L3 mostraron el mejor porcentaje de plántulas normales, L1 el menor y los restantes lotes tuvieron un comportamiento intermedio. La PGE de los lotes sin inmersión permitió separarlos en tres niveles de calidad. El estrés de inmersión afectó principalmente a los lotes L1 y L5, mostrando el primero de ellos fallas en la germinación y el segundo un vigor muy bajo. Por otra parte, los lotes L4, L3, L6 y L2 mostraron los mayores porcentajes de plántulas normales, separándose en tres niveles de vigor. Las plántulas clasificadas como anormales presentaron mayoritariamente atrofia de raíz primaria, ausencia de la parte aérea y coleótilo hendido con la hoja primaria dañada. Los lotes L5 y L1 presentaron los mayores porcentajes de cariopses no germinados, sobre los cuales no se determinó su condición de viabilidad.

**Tabla 2.9.** Prueba de inmersión en agua (%) a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h de los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)			
	Testigo	PIA $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 48 h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a *	99 a *	0	1
L3	98 a	89 a	0	11
L6	86 a b	88 a	1	11
L2	76 b c	65 a	4	31
L5	88 a b	9 b	0	91
L1	65 c	0 c	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

La Tabla 2.10 muestra los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo sin inmersión y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes de híbridos luego de soportar un estrés de inmersión en agua durante 72 h a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La PGE de los lotes sin inmersión permitió separarlos en tres niveles de calidad. El lote L4 mostró el mejor comportamiento, L1 el menor y los restantes uno intermedio. El estrés de inmersión afectó severamente a los lotes L1 y L5 los cuales no germinaron, mientras que L4 mostró el mejor vigor. El resto de los lotes produjeron plántulas clasificadas como normales con buen desarrollo y vigor intermedio. El test de Tukey mostró la separación de los lotes de híbridos en cuatro niveles de vigor. Las plántulas clasificadas como anormales presentaron en su mayoría atrofia de raíz y ausencia de la parte aérea. Los lotes L5 y L1 presentaron los mayores porcentajes de cariopses no germinados, sobre los cuales no se determinó su condición de viabilidad.

**Tabla 2.10.** Prueba de inmersión en agua (%) a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 72 h de los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)			
	Testigo	PIA $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 72 h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a**	93 a**	4	3
L6	86 a b	79 b	2	19
L3	98 a	51 c	3	46
L2	76 b c	44 c	10	46
L5	88 a b	0 d	0	100
L1	65 c	0 d	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

Cuando se incrementó el período de estrés de inmersión en agua corriente desde 0 a 72 h en todas las temperaturas, se produjo una disminución en la producción de plántulas normales en casi todos los lotes. L1, L2 y L5 mostraron las mayores disminuciones en producción de plántulas normales con respecto al testigo en las PIA ensayadas.

### 2.4.3 Prueba de envejecimiento acelerado

En cada uno de los períodos de estrés utilizados para la PEA no se evidenció la presencia de micelios o estructuras de fructificación de hongos sobre los cariopses de los lotes de híbridos estudiados. Se observó un buen crecimiento de las plántulas producidas en la PGE, luego de los períodos de estrés en todos los lotes.

#### 2.4.3.1 Prueba de envejecimiento acelerado 41 °C durante 72 horas

Luego de la ejecución de la PEA y la germinación en cámara, todos los lotes de híbridos produjeron plántulas con coleóptilo sano y fuerte. Se observaron diferencias marcadas entre los lotes en la producción de plántulas luego del estrés provocado por la PEA (Figura 2.22).



**Figura 2.22.** Germinación estándar luego del Envejecimiento acelerado. Diferencias entre los lotes. a) L4, b) L1 y c) L2.

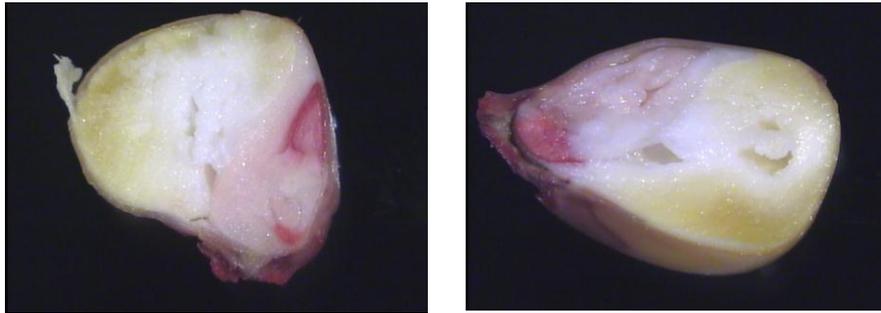
En la Tabla 2.11 se muestran los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes de híbridos luego de soportar el estrés provocado por la PEA a  $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $72\text{ h} \pm 15$  minutos para los lotes en estudio ordenados de mayor a menor según los porcentajes de germinación. Los lotes testigo L4 y L3 mostraron el mayor porcentaje de plántulas normales, L1 el peor y los lotes restantes tuvieron un comportamiento intermedio. El análisis para la variable plántulas normales obtenidas luego de la PEA mostró diferencias significativas entre los lotes de híbridos, el L4 tuvo el mejor comportamiento, L1 el peor y los restantes presentaron un vigor intermedio. El lote L1 mostró además, una muy baja producción de plántulas normales y el mayor porcentaje de cariopses no germinados. El test de Tukey permitió separar los lotes de híbridos en cuatro niveles de vigor para la variable plántulas normales producidas luego del estrés, mientras que el testigo los separó en tres niveles. Las anomalías más frecuentes fueron atrofia de raíz, ausencia de la parte aérea y coleóptilo hendido con hojas dañadas.

**Tabla 2.11.** Prueba de envejecimiento acelerado (%) conducida a  $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $72\text{ h} \pm 15$  minutos en los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Híbridos	Germinación estándar (%)			
	Testigo	EA $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 72 h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a *	99 a *	1	0
L3	98 a	98 a b	1	1
L6	86 a b	97 a b	1	2
L5	88 a b	92 b c	1	5
L2	76 b c	84 c	4	12
L1	65 c	9 d	4	87

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

Los cariopses de todos los lotes de híbridos identificados como no germinados luego de ser sometidos a la PTTZ para evaluar su viabilidad, se clasificaron como no viables ya que presentaron áreas de gran tamaño sin tinción en estructuras esenciales del embrión para la producción de una plántula normal. La Figura 2.23 muestra los cariopses de maíz no germinados luego de la PEA y de la PTTZ donde se observan áreas esenciales del embrión no teñidas.



**Figura 2.23.** Cariopses de maíz no germinados luego de la Prueba de envejecimiento acelerado a 41 °C durante 72 h identificados como no viables por la Prueba topográfica por tetrazolio.

#### **2.4.3.2 Prueba de envejecimiento acelerado 45 °C durante 72 horas**

En la Tabla 2.12 se muestran los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, para los lotes de híbridos luego de soportar el estrés provocado por la PEA a 45 °C  $\pm$  0,5 °C durante 72 h  $\pm$  15 minutos para los lotes de los híbridos en estudio ordenados de mayor a menor. El análisis para la variable plántulas normales obtenidas luego de la PEA mostró diferencias significativas entre los lotes. El test de Tukey permitió separar los lotes de híbridos testigo en tres niveles de calidad fisiológica. Por su parte, la PEA separó a los seis lotes de híbridos en tres niveles de vigor. Los lotes L3 y L4 mostraron el mejor comportamiento de producción de plántulas normales luego del estrés y esto es un indicativo de la mejor calidad fisiológica. Los lotes L1 y L2 difirieron significativamente del resto. En el lote L1 no se observó germinación y los restantes tuvieron un comportamiento intermedio

en producción de plántulas normales luego del estrés de la PEA. Las anomalías más frecuentes presentadas por las plántulas fueron atrofia de raíz, ausencia de la parte aérea y coleóptilo hendido con hojas dañadas. Se observó un incremento de cariopses no germinados en los lotes L5, L2 y L1 con respecto a la PEA a 41 °C.

**Tabla 2.12.** Prueba de envejecimiento acelerado (%) conducida a 45 °C ± 0,5 °C durante 72 h ± 15 minutos en los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Híbridos	Germinación (%)			
	Testigo	EA 45 °C ± 0,5 °C 72 h		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L3	98 a *	94 a *	4	2
L4	95 a	88 a	3	9
L6	86 a b	78 a b	6	16
L5	88 a b	64 b	1	35
L2	76 b c	20 c	6	74
L1	65 c	0 c	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

Las plántulas normales obtenidas luego de la PEA conducida a 45 °C ± 0,5 °C por 72 h, para todos los lotes de híbridos en estudio, mostraron un crecimiento semejante al producido con un estrés con la metodología de 41 °C ± 0,5 °C por 72 h. Al observar los resultados de ambas pruebas (Tabla 2.11 y 2.12) se observa que la PEA a 45 °C mostró un menor número de plántulas normales producidas, ligero aumento en anomalías y un incremento en la categoría denominada como cariopses no germinados en todos los lotes. La prueba de Tetrazolio realizada sobre los cariopses no germinados luego de la PEA permitió corroborar que los mismos fueron no viables ya que presentaron embriones completos no teñidos y áreas no teñidas en estructuras esenciales del embrión para la producción de una plántula normal (Figura 2.24).



**Figura 2.24.** Cariopses de maíz no germinados luego de la Prueba de envejecimiento acelerado a 45 °C durante 72 h identificados como no viables por la Prueba topográfica por tetrazolio.

### 2.4.3 Prueba de frío modificada

#### 2.4.3.1 Prueba de frío modificada a 10 °C

En la Tabla 2.13 se muestran los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo, un recuento anticipado de plántulas normales a los 3 días luego del periodo de estrés de la PFM a 10 °C  $\pm$  0,5 °C y un recuento final de las plántulas normales, anormales y caryopses no germinados a los 5 días de germinación luego del estrés de la PFM a 10 °C  $\pm$  0,5.

En los testigos, los lotes L4 y L3 tuvieron el mejor comportamiento, L1 el menor vigor y los restantes un comportamiento intermedio. El recuento de plántulas normales de la PGE de los testigos separó a los lotes en tres niveles de calidad fisiológica.

Se analizaron las plántulas normales producidas luego del estrés de frío y se encontraron diferencias significativas en ambos recuentos. En el segundo recuento, a los cinco días de permanencia en la cámara de germinación, se comprobó que todos los lotes de híbridos mostraban un excelente desarrollo de plántulas, lo que permitió realizar el recuento final completo de plántulas. El test de Tukey en la PFM mostró la separación de los lotes de híbridos

en cuatro niveles de vigor en ambos recuentos, donde los lotes L4, L3 y L6 mostraron los mayores porcentajes de producción de plántulas normales. Para el lote L1 el estrés provocado por la PFM fue severo y mostró nula producción de plántulas en ambos recuentos. Por otro lado, los lotes L2 y L5 tuvieron un comportamiento intermedio, mostrando este último muy poca producción de plántulas en ambos recuentos.

Las principales anomalías que presentaron los lotes en el segundo recuento fueron: coleóptilo hendido y hoja primaria dañada, parte aérea ausente y atrofia de raíz. La PTTZ conducida sobre los cariopses no germinados permitió corroborar que los mismos fueron no viables.

En los cariopses no germinados de los lotes de los híbridos se observó sobre el embrión la presencia de colores rojos, indicativos de tejidos vivos y además presentaron áreas de color blanco, indicativo de tejidos muertos en áreas críticas para la vida del cariopse. Se observó presencia de áreas muertas en coleóptilo, hojas primarias, mesocótilo, raíz, primordios de raíces y en el escutelo en una superficie mayor a 1/3 del mismo. Se observó también, en toda la superficie del embrión, la presencia de áreas de color rojo oscuro y de consistencia flácida que son indicativos de tejidos deteriorados. Como consecuencia de esta evaluación, todos los cariopses no germinados de estos lotes se clasificaron como no viables y se tipificaron como Semillas Muertas, de acuerdo a los criterios de evaluación de las Reglas ISTA (2007) y Manual de Evaluación de Plántulas ISTA (2003). Si bien entre ambos recuentos se observó un ligero incremento en el porcentaje de plántulas normales, se separó el mismo número de niveles de vigor.

**Tabla 2.13.** Prueba de frío modificada (%) a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  con recuentos a los 3 y 5 días y conducida en los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)				
	Testigo	Recuento			
		3 días		5 días	
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a*	95 a*	97 a*	1	2
L3	98 a	95 a	96 a	2	2
L6	86 a b	86 a	89 a	2	9
L2	76 b c	56 b	67 b	6	27
L5	88 a b	28 c	38 c	3	59
L1	65 c	0 d	0 d	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

#### 2.4.3.2 Prueba de frío modificada a $7,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

En la Tabla 2.14 se muestran los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo, un recuento anticipado de plántulas normales a los 3 días luego del periodo de estrés de la PFM a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y un recuento final de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados a los 5 días de germinación luego del estrés de la PFM a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En los testigos, los lotes L4 y L3 tuvieron el mejor comportamiento, L1 el menor vigor y los restantes un comportamiento intermedio. El recuento de plántulas normales de la PGE de los testigos separó a los lotes de híbridos en tres niveles de calidad fisiológica. Se analizaron las plántulas normales producidas luego del estrés de frío a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se encontraron diferencias significativas en ambos recuentos. En el test de Tukey se observó una separación de los lotes sometidos a estrés por frío en cuatro niveles de vigor en ambos recuentos. Los lotes L2 y L5 fueron intermedios, evidenciando este último una baja producción de plántulas normales. Para el lote L1 el estrés provocado por la PFM a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  fue severo y mostró nula producción de plántulas. Los lotes mostraron un comportamiento semejante en ambos recuentos. Las anomalías que se presentaron en todos los lotes fueron: atrofia de raíz, coleóptilo formando lazo, coleóptilo

hendido con hoja primaria dañada y ausencia de parte aérea. La PTTZ conducida sobre los cariopses no germinados permitió corroborar que los mismos fueron no viables. En los cariopses no germinados sobre el embrión se observó tanto la presencia de colores rojos, indicativos de tejidos vivos, como áreas de color blanco, indicativo de tejidos muertos. No obstante ello, hubo un predominio de aéreas muertas en zonas críticas del embrión necesarias para la producción de una plántula normal. Se observaron aéreas muertas en el coleóptilo, hojas primarias, mesocótilo, raíz, primordios de raíces y también en el escutelo en una superficie mayor a 1/3 del mismo. Además, se observó también la presencia de áreas de color rojo oscuro y de consistencia flácida que son indicativos de tejidos deteriorados.

**Tabla 2.14.** Prueba de frío modificada (%) a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  con recuentos a los 3 y 5 días y conducida en los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)				
	Testigo	Recuento			
		3 días		5 días	
		Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales
L4	95 a*	94 a*	98 a *	1	1
L3	98 a	90 a	95 a	1	4
L6	86 a b	86 a	93 a	1	6
L2	76 b c	55 b	65 b	6	29
L5	88 a b	18 c	35 c	6	59
L1	65 c	0 d	0 d	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

#### 2.4.3.3 Prueba de frío modificada a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$

En la Tabla 2.15 se muestran los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo, un recuento anticipado de plántulas normales a los 3 días luego del periodo de estrés de la PFM a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y un recuento final de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados a los 5 días de

germinación luego del estrés de la PFM a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En los testigos, los lotes L4 y L3 tuvieron el mejor comportamiento, L1 el menor y los restantes un comportamiento intermedio. El recuento de plántulas normales de la PGE de los testigos separó a los lotes en tres niveles de calidad fisiológica. En los lotes sometidos a estrés, se encontraron diferencias significativas para la variable producción de plántulas normales, el test de Tukey mostró la separación de los lotes de híbridos en cuatro niveles de vigor en ambos recuentos. El lote L4 mostró el mejor comportamiento frente al estrés de la PFM a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el lote L6 se ubicó en un segundo lugar y acusó el efecto del frío con una marcada reducción en el porcentaje de plántulas normales. Los lotes L5 y L1 fueron severamente afectados por el estrés de la PFM, que se tradujo en la falta de germinación y los restantes lotes tuvieron un comportamiento intermedio. Se observaron también ligeros incrementos en la producción de plántulas anormales y en la clasificación de cariopses no germinados. Las anomalías que se presentaron fueron principalmente atrofia de raíz, atrofia de parte aérea, coleóptilo hendido con hoja primaria dañada, mesocótilo y coleóptilo curvado en forma de lazo. La ejecución de la PTTZ sobre los cariopses no germinados corroboró la no viabilidad de los mismos.

**Tabla 2.15.** Prueba de frío modificada (%) a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  con recuentos a los 3 y 5 días y conducida en los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)				
	Testigo	Recuento			
		3 días		5 días	
		Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales
L4	95 a *	89 a *	92 a *	2	6
L6	86 a b	68 b	79 b	3	18
L3	98 a	46 c	48 c	10	42
L2	76 b c	42 c	46 c	7	47
L5	88 a b	0 d	0 d	0	100
L1	65 c	0 d	0 d	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

#### **2.4.4 Prueba de frío saturada**

La PFS incorpora a la PF un nuevo factor que es la anaerobiosis en el sustrato, esto la transforma en una prueba de mayor estrés para los lotes de híbridos de maíz. Por tal motivo, se utilizó una temperatura intermedia de  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se realizaron los recuentos a los cuatro y siete días de estadía en la cámara de germinación a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

En la Tabla 2.16 se muestran los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, en un recuento anticipado a los 4 días luego de soportar el estrés provocado por la PFS a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En general, los lotes produjeron plántulas con sus estructuras equilibradas de buen tamaño y con buen sistema radical, lo que permitió clasificarlas en base a su morfología de acuerdo a los criterios del Manual de Evaluación de plántulas (ISTA, 2003). En los testigos, los lotes L4 y L3 tuvieron el mejor comportamiento, L1 el menor y los restantes un comportamiento intermedio. El recuento de plántulas normales de la PGE de los testigos separó a los lotes de híbridos en tres niveles de calidad fisiológica. En los lotes sometidos a estrés el test Tukey mostró la separación de los mismos en dos niveles de vigor. Los lotes L4, L3 y L6 presentaron los mayores porcentajes de plántulas normales y no mostraron diferencias estadísticas entre sí. Para el lote L1 el estrés provocado por la PFS fue severo y mostró nula producción de plántulas y los lotes restantes tuvieron un comportamiento intermedio. Las plántulas anormales mostraron en su mayoría atrofia de raíz y de parte aérea.

**Tabla 2.16.** Prueba de frío saturada (%) a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  con recuento a los 4 días y conducida en los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación estándar (%)			
	Testigo		PFS	
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinados
L4	95 a *	72 a *	2	26
L3	98 a	63 a	2	35
L6	86 a b	53 a	2	45
L2	76 b c	15 b	1	84
L5	88 a b	2 b	0	98
L1	65 c	0 b	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 2.17 se muestran los resultados de la PGE expresados en porcentaje de plántulas normales producidas por los lotes de híbridos testigo y el porcentaje de las plántulas normales, anormales y cariopses no germinados, en un recuento final a los 7 días luego de soportar el estrés provocado por la PFS a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En los testigos, los lotes L4 y L3 tuvieron el mejor comportamiento, L1 el menor y los restantes un comportamiento intermedio. El recuento de plántulas normales de la PGE de los testigos separó a los lotes en tres niveles de calidad fisiológica. En los lotes de los híbridos de maíz sometidos a estrés el test Tukey mostró la separación de los mismos en dos niveles de vigor. Los lotes L4, L3 y L6 presentaron los mayores valores, no mostraron diferencias estadísticas entre sí y difirieron estadísticamente de los restantes. Para el lote L1 el estrés provocado por la PFS fue severo y mostró nula producción de plántulas. Las plántulas anormales mostraron en su mayoría atrofia de raíz y atrofia de parte aérea. Los lotes acusaron el efecto del estrés de frío y anaerobiosis con la producción de un menor porcentaje de plántulas normales.

Los cariopses de maíz no germinados luego del último recuento, cuando se sometieron a la PTTZ fueron clasificados como no viables de acuerdo a la presencia y tamaño de áreas de color rojo y blanco sobre estructuras esenciales del embrión. En su mayoría, los cariopses no

germinados presentaron áreas de tejido no viable, de color blanco en coleóptilo, hojas primarias, mesocótilo, raíz, primordios o superficie de escutelo superior a 1/3.

En los seis lotes de híbridos en estudio se logró el mismo ordenamiento, en relación a la evaluación del vigor por la PFS, tanto en el recuento anticipado a los 4 días como en el recuento final a los 7 días de estadía en la cámara de germinación, permitiendo adelantar los resultados de la prueba.

**Tabla 2.17.** Prueba de frío saturada (%) a  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  con recuento a los 7 días y conducida en los lotes de maíz L1, L2, L3, L4, L5, L6 y el testigo.

Lotes	Germinación (%)			
	Testigo	PFS		
	Plántulas normales	Plántulas normales	Plántulas anormales	Cariopses no germinadas
L4	95 a *	79 a *	8	13
L3	98 a	69 a	10	21
L6	86 a b	64 a	5	31
L2	76 b c	19 b	3	78
L5	88 a b	7 b	3	90
L1	65 c	0 b	0	100

\* Letras minúsculas distintas en la columna (Tukey) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

#### 2.4.5 CORRELACIONES ENTRE LAS PRUEBAS DE VIGOR, LA EMERGENCIA A CAMPO y PGE

En la Tabla 2.18 se observan los coeficientes de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre los porcentajes de plántulas normales obtenidos en la PIA a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de inmersión, la Emergencia a campo en el recuento final para las dos fechas de

siembra (9/11/09 y 20/09/10) y el porcentaje de plántulas normales producidos en el conteo final de la PGE. La PIA en todas las condiciones de estrés, temperatura y tiempo ensayadas mostró tener una correlación de 0,60 o superior con la emergencia a campo y la germinación en laboratorio.

Se observó una correlación significativa de la PIA a 10°C 24 h con la emergencia a campo en la segunda fecha de siembra. Además se encontró correlación significativa para las PIA a 7,5 °C en todos los tiempos de estrés ensayados. No obstante ello, la correlación con la PGE fue altamente significativa para las PIA a 23 °C en todos los tiempos de estrés ensayados.

**Tabla 2.18.** Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Prueba de inmersión en agua a diferentes condiciones de temperatura y de tiempo inmersión, la Emergencia a campo en dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y la Prueba de germinación estándar.

Prueba de vigor	Emergencia a campo		PGE
	1° siembra	2° siembra	
PIA 23 °C 24 h	0,78 ns	0,60 ns	0,98 **
PIA 23 °C 48 h	0,75 ns	0,60 ns	0,97 **
PIA 23 °C 72 h	0,69 ns	0,60 ns	0,96 **
PIA 10 °C 24 h	0,72 ns	0,86 *	0,68 ns
PIA 10 °C 48 h	0,72 ns	0,85 ns	0,72 ns
PIA 7,5 °C 24 h	0,71 ns	0,82 *	0,73 ns
PIA 7,5 °C 48 h	0,70 ns	0,85 *	0,68 ns
PIA 7,5 °C 72 h	0,60 ns	0,83 *	0,57 ns

\*Significativo al 5%; \*\* significativo 1%; ns: no significativo.

En la Tabla 2.19 se observan los coeficientes de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre los porcentajes de plántulas normales obtenidos en la PEA a diferentes temperaturas de estrés (41 °C y 45 °C), la Emergencia a campo en el recuento final para las dos fechas siembra (9/11/09 y

20/09/10) y el porcentaje de plántulas normales producidos en el conteo final de la PGE. La PEA a las dos temperaturas ensayadas, 41 y 45 °C mostró tener una correlación superior a 0,60 con la emergencia a campo y la germinación en laboratorio. La PEA a 41°C durante 72 h mostró los mayores valores de correlación (0,99 y 0,87), los cuales fueron altamente significativos con la emergencia a campo para la primera y segunda fecha de siembra respectivamente y significativos con la PGE. La PEA conducida a 45 °C mostró el mayor valor de correlación y altamente significativo con relación a la PGE.

**Tabla 2.19.** Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Prueba de envejecimiento acelerado a dos temperaturas de estrés, la Emergencia a campo en dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y la Prueba de germinación estándar.

Prueba de vigor	Emergencia a campo		PGE
	1° siembra	2° siembra	
PEA 41 °C 72 h	0,99 **	0,87 **	0,87 *
PEA 45 °C 72 h	0,73 ns	0,61 ns	0,97 **

\* Significativo al 5%; \*\*significativo 1%; ns: no significativo.

En la Tabla 2.20 se observan los coeficientes de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre los porcentajes de plántulas normales obtenidos en la PFM a diferentes condiciones de temperatura en dos recuentos, la Emergencia a campo en el recuento final para las dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y el porcentaje de plántulas normales producidos en el conteo final de la PGE. La PFM a las tres temperaturas de estrés ensayadas mostró tener una correlación superior a 0,60 con la emergencia a campo y superior a 0,55 para la germinación en laboratorio. La PFM para 10 y 7,5 °C y en el segundo recuento de plántulas mostró una correlación mayor y significativa con la emergencia de campo en las dos fechas de siembra ensayadas.

**Tabla 2.20.** Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Prueba de frío modificada a diferentes condiciones de temperatura y en dos recuentos, la Emergencia a campo en dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y la Prueba de germinación estándar.

Prueba de vigor	Emergencia a campo		PGE
	1° siembra	2° siembra	
PFM 10 °C 1° recuento	0,78 ns	0,84 *	0,82 *
PFM 10 °C 2° recuento	0,85 *	0,90 **	0,82 *
PFM 7,5 °C 1° recuento	0,73 ns	0,84 *	0,76 ns
PFM 7,5 °C 2° recuento	0,82 *	0,89 *	0,81 ns
PFM 5 °C 1° recuento	0,60 ns	0,83 *	0,57 ns
PFM 5 °C 2° recuento	0,60 ns	0,84 *	0,55 ns

\* Significativo al 5%; \*\*significativo 1%; ns: no significativo.

En la Tabla 2.21 se observan los coeficientes de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre los porcentajes de plántulas normales obtenidos en la PFS a 7,5 °C en dos recuentos, la Emergencia a campo en el recuento final para las dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y el porcentaje de plántulas normales producidos en el conteo final de la PGE. La PFS mostró tener una correlación superior a 0,56 con la emergencia a campo y la germinación en laboratorio. Se observaron correlaciones de la PFS ligeramente superiores en el segundo recuento y para la segunda fecha de siembra.

**Tabla 2.21.** Coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) entre la Prueba de frío saturada en dos recuentos, la Emergencia a campo en dos fechas de siembra (9/11/09 y 20/09/10) y la Prueba de germinación estándar.

Prueba de vigor	Emergencia a campo		PGE
	1° siembra	2° siembra	
PFS 7,5 °C 1° recuento	0,56 ns	0,66 ns	0,77 ns
PFS 7,5 °C 2° recuento	0,59 ns	0,69 ns	0,78 ns

ns: no significativo.

#### 2.4.6 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

A través del ACP se construyeron nuevas variables, que son combinaciones lineales de las variables originales. De esta manera, se resumió el conjunto de las variables originales tratando de perder la menor cantidad de información posible.

En la Tabla 2.22 se muestran los valores de la matriz de correlaciones entre las 11 variables de clasificación de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados. Se observa que las variables que muestran alta correlación lineal y positiva son: Elementos necesarios y Complejidad en la ejecución (0,807); Factores de estrés y Elementos necesarios (0,876) y Subjetividad en la evaluación y Capacitación del personal (0,644). Por otro lado, las variables Subjetividad en la evaluación y Requerimiento de equipos mostraron alta correlación negativa (-0,668).

**Tabla 2.22.** Matriz de correlación entre las 11 variables de clasificación de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados en el trabajo de investigación.

Variables	Cantidad de días	Requerimiento de equipos	Capacitación del personal	Complejidad en ejecución	Uso de productos químicos	Elementos necesarios	Objeto que se analiza	Interpretación de resultados	Factores de estrés	Subjetividad en la evaluación	Cantidad de niveles
Cantidad de días	1	-0,057	0,051	0,448	-0,509	0,422	-0,173	0,494	0,567	0,407	0,240
Requerimiento de equipos	-0,057	1	-0,134	0,320	-0,400	0,184	0,343	0,033	0,157	-0,668	0,058
Capacitación del personal	0,051	-0,134	1	0,505	0,518	0,100	-0,052	0,482	-0,227	0,644	0,140
Complejidad en ejecución	0,448	0,320	0,505	1	-0,030	0,807	0,059	0,509	0,564	0,196	0,040
Uso de productos químicos	-0,509	-0,400	0,518	-0,030	1	-0,340	0,426	-0,007	-0,556	0,144	-0,206
Elementos necesarios	0,422	0,184	0,100	<b>0,807</b>	-0,340	1	-0,343	0,354	0,876	0,150	0,055
Objeto que se analiza	-0,173	0,343	-0,052	0,059	0,426	-0,343	1	-0,144	-0,363	-0,584	-0,251
Interpretación de resultados	0,494	0,033	0,482	0,509	-0,007	0,354	-0,144	1	0,426	0,392	0,483
Factores de estrés	0,567	0,157	-0,227	0,564	-0,556	<b>0,876</b>	-0,363	0,426	1	0,025	0,150
Subjetividad en la evaluación	0,407	<b>-0,668</b>	<b>0,644</b>	0,196	0,144	0,150	-0,584	0,392	0,025	1	0,202
Cantidad de niveles	0,240	0,058	0,140	0,040	-0,206	0,055	-0,251	0,483	0,150	0,202	1

En la Tabla 2.23 se muestran la variabilidad explicada y la variabilidad acumulada en porcentaje para cada una de las 11 componentes principales generadas en el análisis. Se observa que la CP1 explicó un 34,54 % de la variabilidad total, la CP2 explicó un 23,12 %, la CP3 un 16,44, la CP4 un 10,82 % y las demás CP generadas explicaron porcentajes menores a siete. De las 11 CP formadas a partir las variables analizadas para las pruebas de calidad y/o tipos de estrés estudiados, se seleccionaron las cuatro primeras, ya que las mismas acumularon el 84,92 % de la variabilidad total. El criterio utilizado para decidir la cantidad de CP con las que se iba a trabajar fue referido al porcentaje de variabilidad explicada. A este respecto, se decidió retener aquellas CP que aportaran más a la variabilidad.

**Tabla 2.23.** Componentes principales (CP), variabilidad explicada (%) y variabilidad acumulada (%) obtenidas del análisis de las variables que describen las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados.

<b>CP</b>	<b>Variabilidad explicada (%)</b>	<b>Variabilidad acumulada (%)</b>
1	<b>34,544</b>	34,544
2	<b>23,118</b>	57,662
3	<b>16,443</b>	74,105
<b>4</b>	<b>10,818</b>	<b>84,923</b>
5	6,892	91,815
6	5,094	96,909
7	2,862	99,771
8	0,153	99,925
9	0,060	99,984
10	0,016	100,000
11	0,000	100,000

En la Tabla 2.24 se muestran las correlaciones entre las 11 variables clasificatorias de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados y las cuatro componentes principales seleccionadas. El estudio de las correlaciones de cada CP con las variables mostró que la CP1 posee una alta correlación positiva con las variables: Cantidad de elementos necesarios para realizar el ensayo (0,83), Factores de estrés que están presentes en la prueba (0,82), Cantidad de días que demanda la ejecución de la prueba (0,74), Complejidad en la ejecución de la prueba (0,74) e Interpretación de los resultados (0,70). La CP2 mostró una alta correlación positiva con las variables: Subjetividad en la evaluación (0,80), Capacitación del personal (0,77), Uso de productos químicos (0,66) y correlación alta y negativa con Requerimiento de equipos (-0,69). Por su parte, la CP3 mostró alta correlación positiva con el Objeto que se analiza (embriones, cariopses o plántulas) (0,71), con Complejidad de la ejecución (0,61), con Requerimiento de equipos (0,51), Uso de productos químicos (0,47), Capacitación del personal (0,47) aunque estas cuatro últimas ya están contenidas en las otras CP. Por último, la CP4 mostró alta correlación positiva con la Cantidad de niveles de calidad (0,81) en que separó a los lotes de híbridos.

**Tabla 2.24.** Matriz de correlaciones entre las 11 variables clasificatorias de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés y las cuatro componentes principales seleccionadas.

Variables	Componentes principales			
	CP1	CP2	CP3	CP4
Cantidad de días	<b>0,74479</b>	-0,04522	-0,14529	0,08203
Requerimiento de equipos	0,06874	<b>-0,68940</b>	0,50927	0,30916
Capacitación del personal	0,27894	<b>0,77325</b>	0,46574	0,04550
Complejidad en ejecución	<b>0,74047</b>	-0,00326	0,61481	-0,20975
Uso de productos químicos	-0,44213	<b>0,66474</b>	0,46969	-0,15322
Elementos necesarios	<b>0,82803</b>	-0,24227	0,15794	-0,37981
Objeto que se analiza	-0,46739	-0,18876	<b>0,70841</b>	0,11937
Interpretación de resultados	<b>0,69912</b>	0,29584	0,24306	0,39323
Factores estrés	<b>0,81966</b>	-0,42690	-0,08711	-0,20148
Subjetividad en la evaluación	0,45954	<b>0,80358</b>	-0,30035	-0,11349
Cantidad de niveles separados	0,37811	0,12662	-0,17045	<b>0,80718</b>

En la Tabla 2.25 se muestran las 31 pruebas de calidad y/o tipos de estrés según el valor que tomó la CP1 para cada una de ellas y ordenadas de menor a mayor. Esta CP tomó valores altos cuando la prueba y/o tipo de estrés involucra mayor cantidad de elementos y factores de estrés, requiere de mayor cantidad días para su ejecución, hay complejidad en su ejecución y en la interpretación de los resultados. En virtud de esta información, en el ordenamiento de las pruebas y/o tipos de estrés, sería más apropiado que esta CP1 tome valores bajos debido a que es deseable que toda prueba de calidad sea de sencilla ejecución (involucre pocos elementos y factores de estrés), sea rápida (demande pocos días en su ejecución), y de fácil interpretación de los resultados.

Del conjunto de las 31 pruebas de calidad y/o tipo de estrés ensayados se observó que la PVR mostró el menor valor para la CP1 y se ubicó en una mejor posición dentro de la tabla con respecto al resto de las pruebas analizadas. Por otra parte, las pruebas de CE (PG estimado y Vigor estimado), PC, CA, PGE, PTTZ, PTZA y PIA se ubicaron a continuación de la PVR en función del valor descendente de la CP1 y fueron las siguientes mejores ubicadas dentro de la tabla del conjunto total de las 31 pruebas y/o estrés. Es decir, reunieron las características deseadas de sencillez, rapidez y fácil interpretación de resultados. Por otro parte, la PFS mostró el valor más alto para esta CP1 y en virtud de ello se encontró en el otro extremo de la tabla, en la peor ubicación con respecto al resto de las pruebas, reuniendo de esta manera, las características opuestas a las enumeradas como deseadas. La PFS reúne varios factores de estrés, necesita muchos elementos, tiene compleja ejecución y demanda mayor cantidad de días (14). Por otro lado, las pruebas de IVG y TMG son de compleja ejecución e interpretación de resultados.

**Tabla 2.25.** Valores de la Componente principal 1, ordenados de menor a mayor, para cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados.

Nombre de la prueba	CP1
PVR	-5,0069
CE PG ESTIMADO	-3,1303
CE VIGOR ESTIMADO	-3,1303
PC	-1,9080
CE $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	-1,8158
CA	-1,7727
PGE	-1,4712
PTTZ VIABILIDAD	-1,3842
PTTZ VIGOR	-1,1735
PTTZ VIABLE SIN DEFECTOS	-1,1735
PTZA	-0,9285
PIA 23 °C 24 h	-0,2210
PIA 7,5 °C 48 h	0,0650
PEA 45 °C 72 h	0,0650
PIA 23 °C 72 h	0,1403
PIA 10 °C 24 h	0,2003
PIA 7,5 °C 24 h	0,2003
PIA 10 °C 48 h	0,2757
PEA 41 °C 72 h	0,2757
PIA 7,5 °C 72 h	0,3511
PIA 23 °C 48 h	0,4864
TMG	0,6779
IVG	1,0994
PFM 10°C 3 días	1,9994
PFM 7,5°C 3 días	1,9994
PFM 5°C 3días	1,9994
PFM 10°C 5 días	2,1502
PFM 7,5°C 5 días	2,1502
PFM 5°C 5 días	2,1502
PFS 7,5°C 4 días	3,3017
PFS 7,5°C 7 días	3,5279

En la Tabla 2.26 se muestran las pruebas de calidad y/o tipos de estrés ensayados según el valor de la CP2 para cada una de ellos y ordenadas de menor a mayor. Esta componente toma valores altos cuando la prueba tiene requerimientos bajos en equipos, alta capacitación del personal, utiliza productos químicos y posee Subjetividad en la evaluación. Para el ordenamiento de las pruebas y/o tipos de estrés ensayados sería deseable o más apropiado que esta componente tome valores bajos para que las pruebas y/o estrés reúnan características favorables como el poseer menor Subjetividad en la evaluación, con bajo requerimiento de equipos, no utilice productos químicos y que requiera menor capacitación del personal. La prueba que mostró el menor valor de la CP2 fue la de CE, ya sea en las estimaciones de Potencial de germinación y vigor o la medición de CE en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  y se separaron bien del resto de las pruebas dentro de la tabla. Es decir, que esta prueba reúne algunas de las características deseables de toda prueba de vigor de ser objetiva, sencilla y fácil ejecución ya que requiere menor capacitación del personal y no usa productos químicos. Por otra parte, las PFS y PFM les siguieron en orden dentro de la tabla en cuanto al valor de la CP2 y en último lugar, con el mayor valor para la CP2 se ubicaron las PTTZ y PTZA.

**Tabla 2.26.** Valores de la Componente principal 2, ordenados de menor a mayor, para cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados.

Nombre de la prueba	CP2
CE PG ESTIMADO	-4,0627
CE VIGOR ESTIMADO	-4,0627
CE $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	-3,4282
PFS 7,5°C 7 días	-0,9762
PFS 7,5°C 4 días	-0,9594
PFM 10°C 5 días	-0,2398
PFM 7,5°C 5 días	-0,2398
PFM 5°C 5 días	-0,2398
PFM 10°C 3 días	-0,2287
PFM 7,5°C 3 días	-0,2287
PFM 5°C 3 días	-0,2287
TMG	-0,1969
IVG	-0,0244
PC	0,0365
PGE	0,1060
CA	0,1284
PIA 23 °C 24 h	0,1625
PIA 23 °C 72 h	0,2376
PIA 7,5 °C 48 h	0,2432
PEA 45 °C 72 h	0,2432
PIA 7,5 °C 72 h	0,3239
PIA 10 °C 48 h	0,3295
PEA 41 °C 72 h	0,3295
PIA 10 °C 24 h	0,3351
PIA 7,5 °C 24 h	0,3351
PIA 23 °C 48 h	0,4157
PVR	2,1703
PTTZ VIABILIDAD	2,3714
PTZ ALEURONA	2,4324
PTTZ VIGOR	2,4577
PTTZ VIABLE SIN DEFECTOS	2,4577

En la Tabla 2.27 se muestran las 31 pruebas de calidad y/o tipos de estrés ensayados según el valor que tomó la CP3 para cada una de ellos y ordenadas de menor a mayor. La CP3 tomó valores altos cuando la evaluación de la prueba se hace sobre determinaciones en embriones, hay complejidad en la ejecución del ensayo, como el caso de PTZA y PFS, se utilizan productos químicos, se requiere capacitación del personal, requerimiento de equipos como en el caso de CE, valores e índices como en la prueba de IVG y TMG y tomó valores bajos cuando la prueba evalúa plántulas como en PGE, CA, PC, PIA, PEA, y cuando la ejecución del ensayo es más sencillo como en el caso de PVR. Para el ordenamiento de las pruebas y/o tipos de estrés sería deseable o más apropiado que esta componente tome valores bajos, ya que la evaluación de plántulas si bien requiere de capacitación o entrenamiento por parte del analista es más sencilla de interpretar que los resultados de una prueba en base a valores, índices o estimaciones. La prueba que mostró el menor valor en la CP3 fue la PVR. Le siguieron a continuación las pruebas de PGE, PIA, CA, PEA y PC. Por otra parte, las pruebas con mayor valor para esta CP3 fueron las de PTZA y PTTZ.

**Tabla 2.27.** Valores de la Componente principal 3, ordenados de menor a mayor, para cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados.

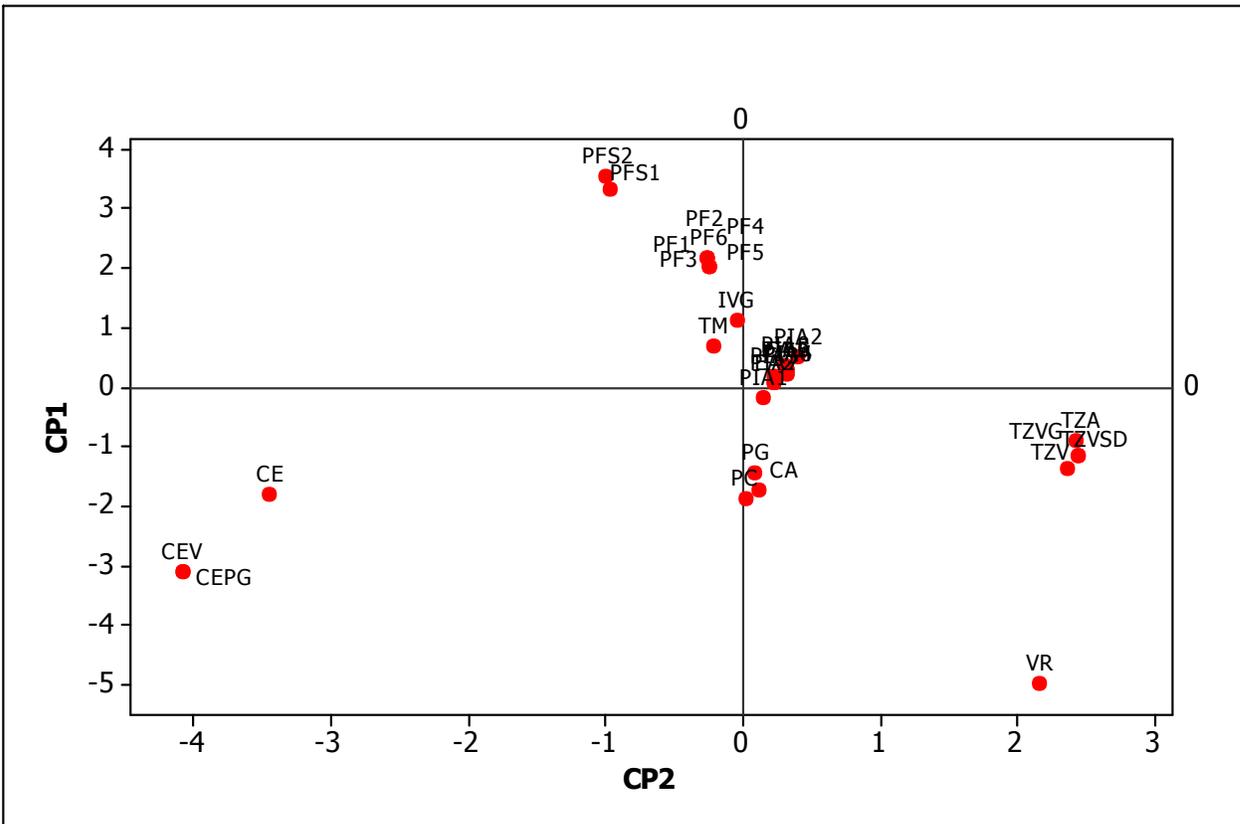
Nombre de la prueba	CP3
PVR	-3,1302
PGE	-1,1355
PIA 23 °C 48 h	-1,0793
CA	-1,0502
PIA 7,5 °C 72 h	-0,9630
PIA 10 °C 48 h	-0,9416
PEA 41 °C 72 h	-0,9416
PC	-0,9338
PIA 10 °C 24 h	-0,9203
PIA 7,5 °C 24 h	-0,9203
PIA 23 °C 72 h	-0,8253
PIA 7,5 °C 48 h	-0,8040
PEA 45 °C 72 h	-0,8040
PIA 23 °C 24 h	-0,6450
PFM 10°C 5 días	-0,30321
PFM 7,5°C 5 días	-0,3032
PFM 5°C 5 días	-0,3032
PFM 10°C 3 días	-0,2605
PFM 7,5°C 3 días	-0,2605
PFM 5°C 3 días	-0,2605
PFS 7,5°C 7 días	0,6319
IVG	0,6627
PFS 7,5°C 4 días	0,6959
TMG	0,9381
CE PG ESTIMADO	1,1557
CE VIGOR ESTIMADO	1,1557
CE $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	1,3304
PTTZ VIGOR	2,4644
PTTZ VIABLE SIN DEFECTOS	2,4644
PTTZ VIABILIDAD	2,6021
PTZA	2,6843

En la Tabla 2.28 se muestran las 31 pruebas de calidad y/o tipo de estrés ensayados según el valor que tomó la CP4 para cada una de ellos y ordenadas de menor a mayor. Esta CP4 tomó valores altos cuando la prueba y/o tipo de estrés ensayado separó a los lotes de híbridos en mayor cantidad de niveles de calidad. Para el ordenamiento de las pruebas y/o tipos de estrés sería deseable o más apropiado que esta CP4 tome valores altos, es decir que separe a los lotes de híbridos de maíz en mayor cantidad de niveles de calidad. La prueba de CE expresada en valores promedio en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  fue la que mostró el mayor valor para la CP4. Le siguió en orden de descendente la PIA 23 °C 48 h y luego IVG, PEA y PTZA. Por otro lado, la PFS fue la que mostró el menor valor de la CP4, es decir que esta prueba separó a los lotes de híbridos de maíz estudiados en el menor número de niveles de vigor.

**Tabla 2.28.** Valores de la Componente principal 4, ordenados de menor a mayor, para cada una de las pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados.

Nombre de la prueba	CP4
PFS 7,5°C 4 días	-2,5653
PFS 7,5°C 7 días	-2,5208
PVR	-1,8799
PC	-1,3332
PTTZ VIABILIDAD	-0,8355
PIA 23 °C 24 h	-0,5926
CA	-0,5442
PGE	-0,4848
CE PG ESTIMADO	-0,4630
CE VIGOR ESTIMADO	-0,4630
TMG	-0,3875
PTTZ VIGOR	-0,0317
PTTZ VIABLE SIN DEFECTOS	-0,0317
PFM 10°C 3 días	0,0361
PFM 7,5°C 3 días	0,0361
PFM 5°C 3 días	0,0361
PFM 10°C 5 días	0,0657
PFM 7,5°C 5 días	0,0657
PFM 5°C 5 días	0,0657
PIA 7,5 °C 48 h	0,2260
PEA 45 °C 72 h	0,2260
PIA 23 °C 72 h	0,2408
PTZA	0,9042
PIA 10 °C 24 h	1,0150
PIA 7,5 °C 24 h	1,0150
PIA 10 °C 48 h	1,0299
PEA 41 °C 72 h	1,0299
PIA 7,5 °C 72 h	1,0447
IVG	1,220
PIA 23 °C 48 h	1,8337
CE $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	2,0422

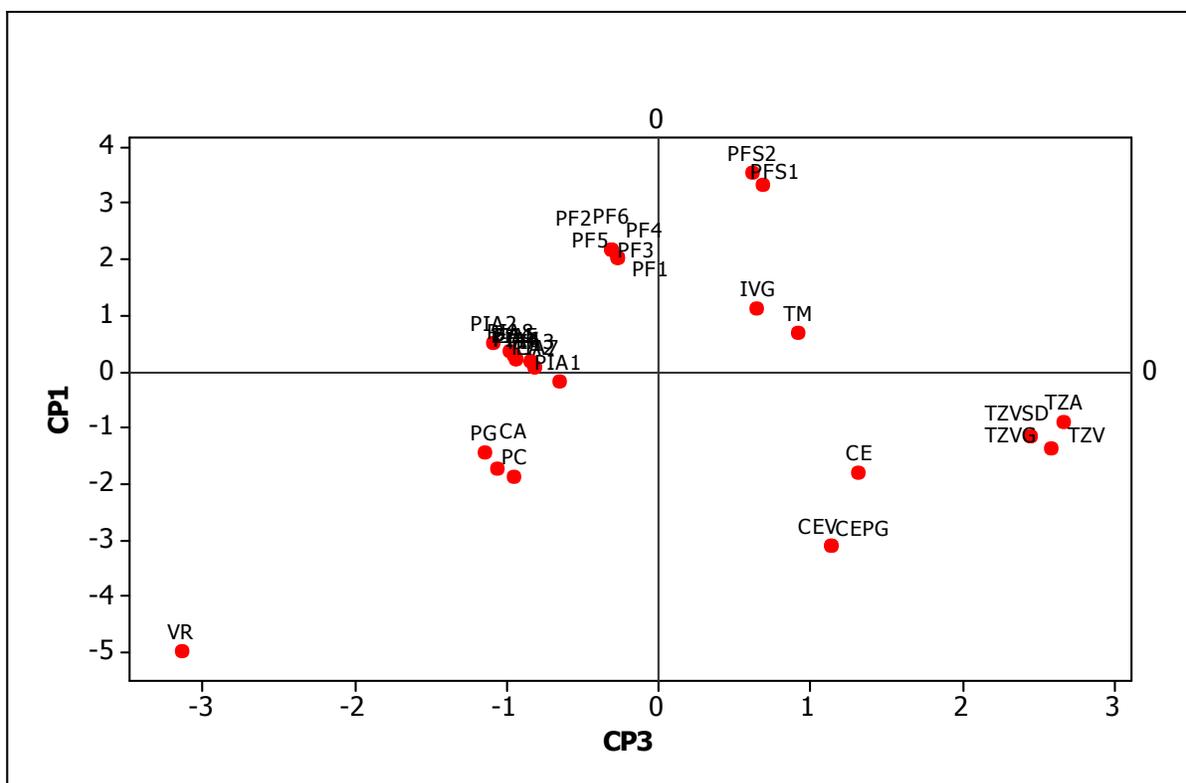
En la Figura 2.25 se observa la representación gráfica de la ubicación espacial de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés ensayados en el experimento en función de la CP1 y CP2. Las pruebas ubicadas en el cuadrante inferior izquierdo de la figura son las que reúnen las mejores características de ambas componentes (rapidez, sencillez, fácil interpretación de resultados y objetividad). En la figura se observa que las pruebas de CE ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , Potencial de germinación y vigor estimado) se separaron del resto y fueron las que expresaron los menores valores para ambas CP al mismo tiempo.



Referencias: PG (germinación estándar), CA (conteo anticipado), PC (primer conteo), VR (verde rápido), TZV (Tetrazolio viabilidad), TZVG (Tetrazolio vigor), TZVSD (Tetrazolio viables sin defectos), TZA (Tetrazolio de aleurona), CE (Conductividad eléctrica  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ), CEPG (Conductividad eléctrica PG estimado), CEV (Conductividad eléctrica vigor estimado), IVG (Índice velocidad de germinación), TM (Tiempo medio de germinación), PIA1 (PIA 23 °C 24 h), PIA2 (PIA 23 °C 48 h), PIA3 (PIA 23 °C 72 h), PIA4 (PIA 10 °C 24 h), PIA5 (PIA 10 °C 48 h), PIA6 (PIA 7,5 °C 24 h), PIA7 (PIA 7,5 °C 48 h), PIA8 (PIA 7,5 °C 72 h), EA1 (EA 41 °C 72 h), EA2 (EA 45 °C 72 h), PF1 (PFM 10°C 3 días), PF2 (PFM 10°C 5 días), PF3 (PFM 7,5°C 3 días), PF4 (PFM 7,5°C 5 días), PF5 (PFM 5°C 3 días), PF6 (PFM 5°C 5 días), PFS1 (PFS 7,5°C 4 días), PFS2 (PFS 7,5°C 7 días).

**Figura 2.25.** Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 1 y Componente principal 2.

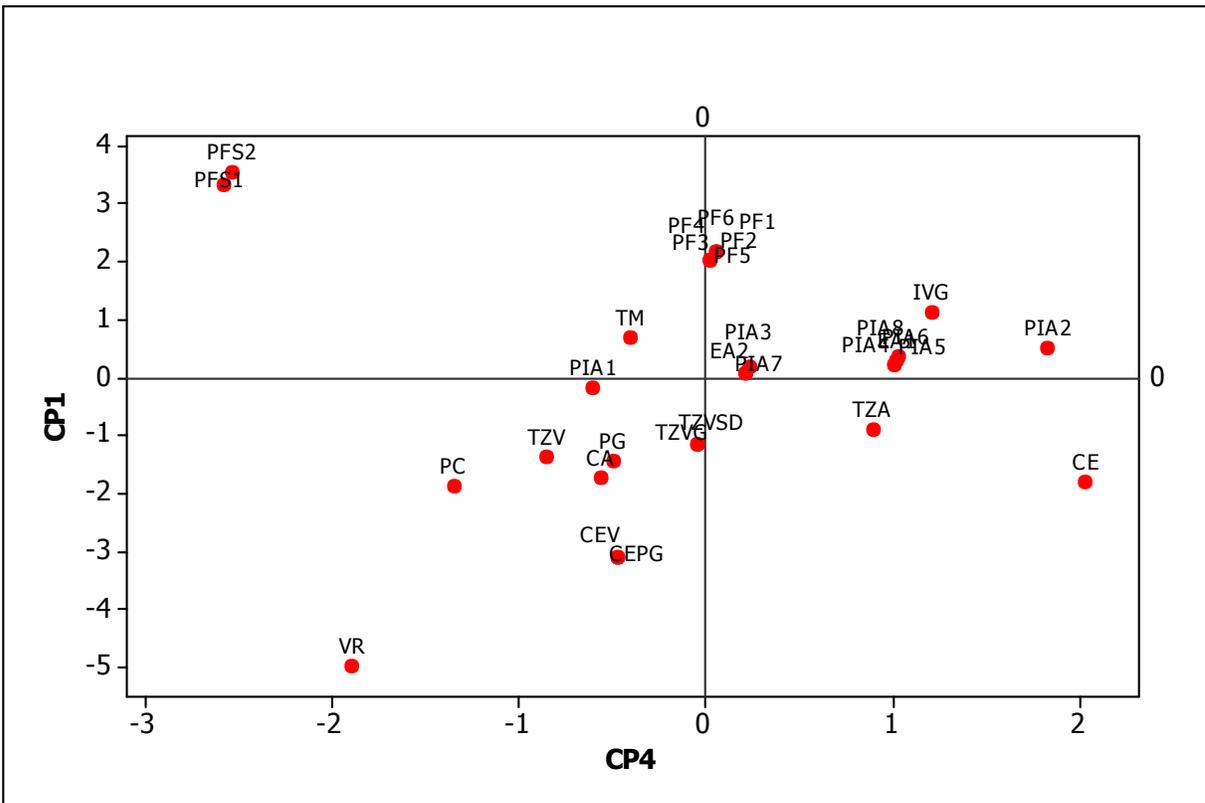
En la Figura 2.26 se observa la representación gráfica de la ubicación espacial de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés utilizadas en función de la CP1 y CP3. Las pruebas ubicadas en el cuadrante inferior izquierdo de la figura son las que reúnen las mejores características de ambas componentes (rapidez, sencillez, fácil interpretación de los resultados y fácil evaluación). En la figura se observa que la prueba de VR se separó del resto. No obstante ello, en segundo lugar se ubicaron las PGE, PC y CA que expresaron los menores valores para ambas CP.



Referencias: PG (germinación estándar), CA (conteo anticipado), PC (primer conteo), VR (verde rápido), TZV (Tetrazolio viabilidad), TZVG (Tetrazolio vigor), TZVSD (Tetrazolio viables sin defectos), TZA (Tetrazolio de aleurona), CE (Conductividad eléctrica  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ), CEPG (Conductividad eléctrica PG estimado), CEV (Conductividad eléctrica vigor estimado), IVG (Índice velocidad de germinación), TM (Tiempo medio de germinación), PIA1 (PIA 23 °C 24 h), PIA2 (PIA 23 °C 48 h), PIA3 (PIA 23 °C 72 h), PIA4 (PIA 10 °C 24 h), PIA5 (PIA 10 °C 48 h), PIA6 (PIA 7,5 °C 24 h), PIA7 (PIA 7,5 °C 48 h), PIA8 (PIA 7,5 °C 72 h), EA1 (EA 41 °C 72 h), EA2 (EA 45 °C 72 h), PF1 (PFM 10°C 3 días), PF2 (PFM 10°C 5 días), PF3 (PFM 7,5°C 3 días), PF4 (PFM 7,5°C 5 días), PF5 (PFM 5°C 3 días), PF6 (PFM 5°C 5 días), PFS1 (PFS 7,5°C 4 días), PFS2 (PFS 7,5°C 7 días).

**Figura 2. 26.** Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 1 y Componente principal 3.

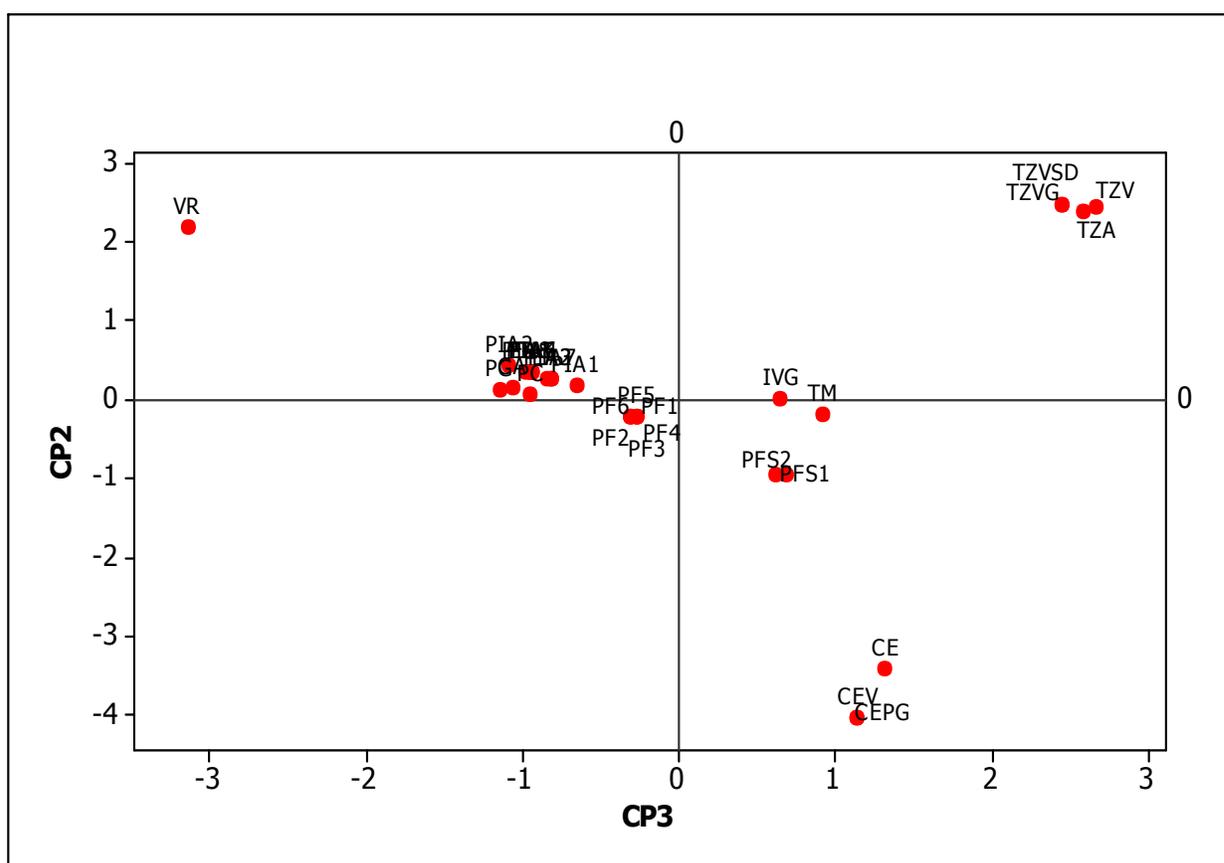
En la Figura 2.27 se observa la representación gráfica de la ubicación espacial de las 31 pruebas de control de calidad o y/o tipos de estrés utilizadas en función de la CP1 y CP4. Las pruebas ubicadas en el cuadrante inferior derecho de la figura son las que reúnen las mejores características de ambas componentes (rapidez, sencillez, fácil interpretación de resultados y mayor cantidad de niveles de calidad). En la figura se observa que la prueba de CE medida en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  mostró la mejor posición para estas dos CP. No obstante ello, se observa también a la PIA 23 °C 48 h aunque en otro cuadrante de la figura pero mostrando un valor alto para CP4.



Referencias: PG (germinación estándar), CA (conteo anticipado), PC (primer conteo), VR (verde rápido), TZV (Tetrazolio viabilidad), TZVG (Tetrazolio vigor), TZVSD (Tetrazolio viables sin defectos), TZA (Tetrazolio de aleurona), CE (Conductividad eléctrica  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ), CEPG (Conductividad eléctrica PG estimado), CEV (Conductividad eléctrica vigor estimado), IVG (Índice velocidad de germinación), TM (Tiempo medio de germinación), PIA1 (PIA 23 °C 24 h), PIA2 (PIA 23 °C 48 h), PIA3 (PIA 23 °C 72 h), PIA4 (PIA 10 °C 24 h), PIA5 (PIA 10 °C 48 h), PIA6 (PIA 7,5 °C 24 h), PIA7 (PIA 7,5 °C 48 h), PIA8 (PIA 7,5 °C 72 h), EA1 (EA 41 °C 72 h), EA2 (EA 45 °C 72 h), PF1 (PFM 10°C 3 días), PF2 (PFM 10°C 5 días), PF3 (PFM 7,5°C 3 días), PF4 (PFM 7,5°C 5 días), PF5 (PFM 5°C 3 días), PF6 (PFM 5°C 5 días, PFS1 (PFS 7,5°C 4 días), PFS2 (PFS 7,5°C 7 días).

**Figura 2.27.** Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 1 y Componente principal 4.

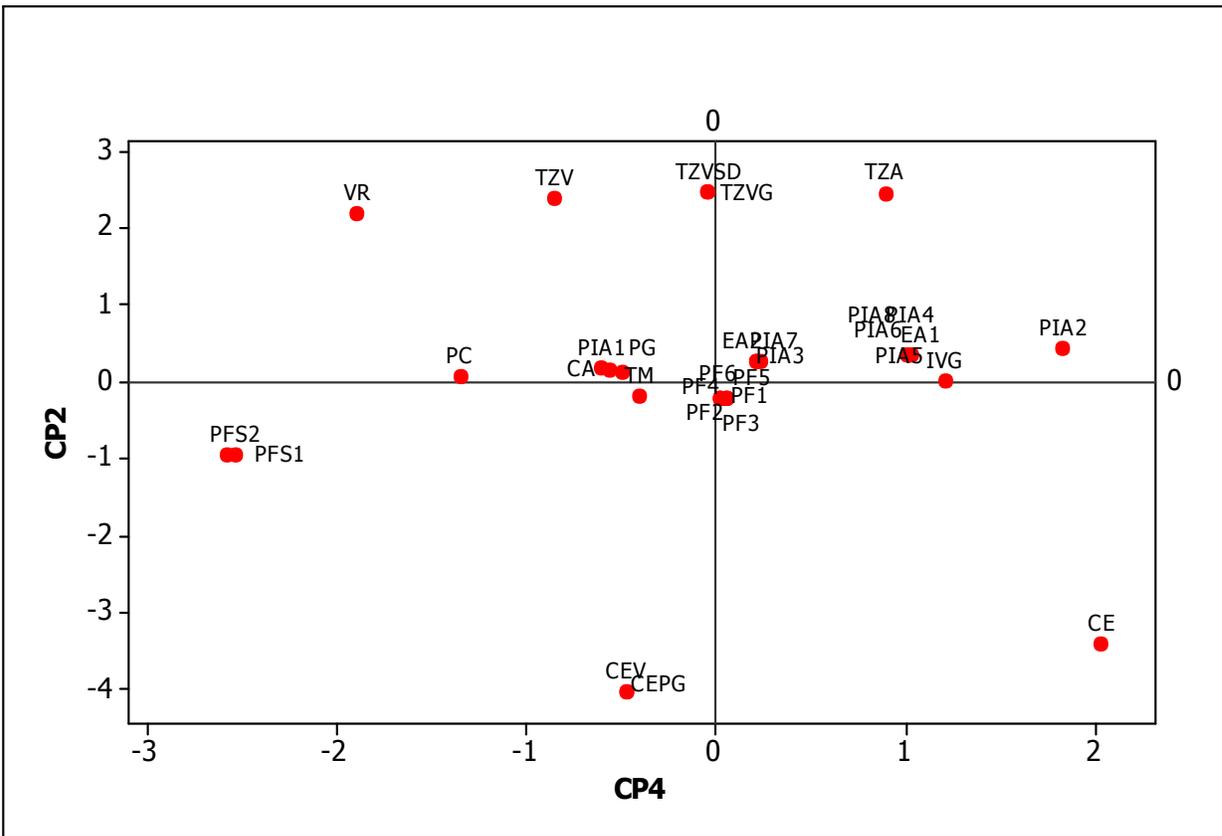
En la Figura 2.28 se observa la representación gráfica de la ubicación espacial de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés utilizadas en función de la CP2 y CP3 (objetividad y fácil evaluación). Las pruebas ubicadas en los cuadrantes inferiores de la figura son las que reúnen las mejores características de ambas componentes. En la figura se observa que la prueba de CE mostró la mejor posición con respecto al resto de las pruebas, para estas dos CP.



Referencias: PG (germinación estándar), CA (conteo anticipado), PC (primer conteo), VR (verde rápido), TZV (Tetrazolio viabilidad), TZVG (Tetrazolio vigor), TZVSD (Tetrazolio viables sin defectos), TZA (Tetrazolio de aleurona), CE (Conductividad eléctrica  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ), CEPG (Conductividad eléctrica PG estimado), CEV (Conductividad eléctrica vigor estimado), IVG (Índice velocidad de germinación), TM (Tiempo medio de germinación), PIA1 (PIA 23 °C 24 h), PIA2 (PIA 23 °C 48 h), PIA3 (PIA 23 °C 72 h), PIA4 (PIA 10 °C 24 h), PIA5 (PIA 10 °C 48 h), PIA6 (PIA 7,5 °C 24 h), PIA7 (PIA 7,5 °C 48 h), PIA8 (PIA 7,5 °C 72 h), EA1 (EA 41 °C 72 h), EA2 (EA 45 °C 72 h), PF1 (PFM 10°C 3 días), PF2 (PFM 10°C 5 días), PF3 (PFM 7,5°C 3 días), PF4 (PFM 7,5°C 5 días), PF5 (PFM 5°C 3 días), PF6 (PFM 5°C 5 días), PFS1 (PFS 7,5°C 4 días), PFS2 (PFS 7,5°C 7 días).

**Figura 2.28.** Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 2 y Componente principal 3.

En la Figura 2.29 se observa la representación gráfica de la ubicación espacial de las 31 pruebas de control de calidad utilizadas en función de la CP2 y CP4. Las pruebas ubicadas en los cuadrantes inferiores de la figura son las que reúnen las mejores características de ambas componentes (objetividad y mayor cantidad de niveles de calidad). En la figura se observa que la prueba de CE mostró la mejor posición en la figura con respecto a las otras pruebas para estas dos CP. En segundo lugar, se muestra a la PIA 23 °C 48 h que mostró alto valor para la CP4.



Referencias: PG (germinación estándar), CA (conteo anticipado), PC (primer conteo), VR (verde rápido), TZV (Tetrazolio viabilidad), TZVG (Tetrazolio vigor) , TZVSD (Tetrazolio viables sin defectos), TZA (Tetrazolio de aleurona), CE (Conductividad eléctrica  $\text{uS}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{gr}^{-1}$ ) , CEPG (Conductividad eléctrica PG estimado), CEV (Conductividad eléctrica vigor estimado), IVG (Índice velocidad de germinación), TM (Tiempo medio de germinación) , PIA1 (PIA 23 °C 24 h), PIA2 (PIA 23 °C 48 h), PIA3 (PIA 23 °C 72 h), PIA4 (PIA 10 °C 24 h), PIA5 (PIA 10 °C 48 h), PIA6 (PIA 7,5 °C 24 h), PIA7 (PIA 7,5 °C 48 h), PIA8 (PIA 7,5 °C 72 h), EA1 (EA 41 °C 72 h), EA2 (EA 45 °C 72 h) , PF1 (PFM 10°C 3 días), PF2 (PFM 10°C 5 días), PF3 (PFM 7,5°C 3 días), PF4 (PFM 7,5°C 5 días), PF5 (PFM 5°C 3 días), PF6 (PFM 5°C 5 días, PFS1 (PFS 7,5°C 4 días), PFS2 (PFS 7,5°C 7 días).

**Figura 2.29.** Representación gráfica de las 31 pruebas de control de calidad y/o tipos de estrés en función de la Componente principal 2 y Componente principal 4.



## 2.5 DISCUSIÓN

Resulta prioritario en la producción de toda especie lograr un adecuado establecimiento de plántulas a campo lo más pronto posible. Una rápida implantación del cultivo permite un mejor aprovechamiento de los recursos disponibles como agua, nutrientes, luz y que los mismos sean en beneficio de una producción sustentable. La implantación del cultivo depende de varios factores, uno de los más importantes es la calidad de la simiente y el resto está relacionado a las condiciones del ambiente de producción y al manejo que le brinda el hombre al sistema de producción.

Las distintas pruebas de vigor se utilizan tanto en investigación como en el sector comercial, con el objetivo fundamental de la determinación de la calidad fisiológica de un lote. Los distintos métodos de vigor no fueron desarrollados para predecir un número exacto de semillas que germinarán en el campo sobre variadas condiciones ambientales, sino por el contrario se utilizan para identificar calidades fisiológicas y especialmente poner de manifiesto las debilidades del lote. Esto es así, porque cada una de las distintas pruebas de vigor enfrenta al lote de semillas a condiciones distintas o a algún tipo de estrés particular, pero no siempre ese estrés se reproduce con exactitud en el campo. El objetivo de las pruebas de vigor es disponer de un dato que puede tener distintas denominaciones como por ejemplo porcentaje de germinación, valor de conductividad eléctrica, número de semillas, índices, etc., que permitan comparar entre sí a un grupo lotes de semillas de la misma especie, que poseen altos valores de PGE y generar una clasificación en base a esos datos. Es decir que se toma en cuenta solo el valor del dato de cada prueba para hacer un ranking de lotes de semillas que presentan germinación superior al valor mínimo de PGE requerido para su comercialización. Este valor para el caso de la especie maíz es de 90 % y es lo que comúnmente se denomina “germinación aceptable”. Además, el valor del dato se toma también como indicativo de una cualidad o deficiencia con relación al dato específico que evalúa la prueba de vigor en cuestión y se debería comparar con el valor de germinación del lote en condiciones óptimas, o sea el resultado de la PGE. Es importante la correcta interpretación de los resultados de las todas las pruebas de vigor empleadas porque en base a ellos es que se deberá hacer un diagnóstico del lote de semillas y se decidirá el destino del mismo. Un valor de 80 % de germinación en una prueba de vigor que provoca un estrés cualquiera, no significa que el 80 % de las semillas van a

sobrevivir en el campo. La interpretación se hace en base a probabilidades, esto significa que el 80 % de las semillas del lote tienen mayor probabilidad de germinar y producir plántulas normales en condiciones similares a las del estrés que se aplicó en la prueba. Además, cada prueba de vigor evalúa diferentes aspectos fisiológicos de las semillas/frutos que brindan información valiosa para la toma de decisiones.

La germinación de la mayoría de las especies ocurre bajo rangos amplios de temperaturas y los valores extremos dependen de las características genéticas y de la calidad fisiológica de las semillas. Las temperaturas cardinales para la germinación del maíz son una mínima de 9° C, una óptima de 32-35 °C y una máxima de 44 °C (Borba *et al.*, 1995). En condiciones de temperaturas bajas la reorganización de las membranas celulares y la imbibición se ve dificultada tornando al proceso más lento (Burriss y Navrati, 1979). En el presente trabajo se comprobó que los lotes de híbridos de maíz ensayados mostraron diferente respuesta a la germinación a una temperatura inferior a la recomendada para la germinación de la especie. Los lotes de semilla más vigorosos fueron capaces de soportar mejor el estrés de germinar en una temperatura sub óptima que los lotes de menor vigor. La baja temperatura de germinación pudo producir una lenta germinación en todos los lotes pero aquellos que poseían mejores condiciones fisiológicas estuvieron en ventaja, soportaron las condiciones adversas, pasaron las etapas de la germinación más rápidamente y lograron la protrusión total de la raíz primaria antes y en un mayor número de cariopses que los de menor condición fisiológica.

La PGF es una prueba eficiente para medir el comportamiento de los lotes de semilla frente a una temperatura de germinación de 10 °C, inferior a la óptima, ya que permitió realizar una muy buena separación de los lotes de híbridos ensayados en función de su comportamiento frente al estrés provocado por la baja temperatura. Se logró un ordenamiento de los lotes semejante a la obtenida por las pruebas de germinación CP, PC y PGE. Además, la prueba permitió identificar al lote L3 como de mejor comportamiento ante la baja temperatura de germinación ya que exhibió los mejores valores en los índices de IVG y TMG. Nuestros resultados coinciden con los de Ilbi *et al.* (2009) quienes trabajando con maíz verificaron que la realización de la PGF a 18 °C fue una alternativa para evaluar diferencias de vigor en diferentes lotes. Por otro parte, Grzybowski (2012) trabajó con diferentes pruebas de vigor en dos híbridos

de maíz y comprobó una alta correlación (0,95 y 0,82) entre PGF a 16 y 18 °C y la emergencia de campo.

Con relación a la PIA, el diferente comportamiento de los lotes de híbridos ensayados con respecto a la producción de plántulas normales luego del estrés provocado por la misma a diferentes temperaturas y tiempos de inmersión coincidió con los resultados informados por Martin *et al.* (1991), quienes verificaron que la tolerancia del maíz a las condiciones de inundación o inmersión varía de acuerdo con el genotipo y la temperatura de inmersión.

En la PIA el período de 72 horas de inmersión fue el más crítico. El lote L1 no soportó ningún período de inmersión a 10° y 7,5° ± 2 °C y L5 se vio severamente afectado en estas mismas condiciones de estrés. No obstante, la disminución de la germinación observada para los demás lotes también fue menor que la producida por el estrés de la PIA a 23 °C ± 2 °C. Estos resultados coincidieron con los de Dantas *et al.* (2000), quienes en su investigación sobre la prueba de inmersión en agua con cariopses de maíz observaron una disminución tanto de la germinación como del vigor después de períodos crecientes de inmersión desde 0 a 7 días y a temperaturas crecientes de 5 a 30 °C. Estos investigadores observaron una disminución del 40 % de la germinación total luego del segundo día a dichas temperas. Con respecto a las temperaturas que provocaron el estrés, los autores comprobaron que 20 y 25 °C, para tiempos de inmersión descriptos, fueron las que menos afectaron la germinación y el vigor.

De todas las versiones de PIA ensayadas la conducida a 23 °C por 48 h mostró ser una herramienta de utilidad para evaluar el vigor en maíz ya que logró separar a los lotes de híbridos en estudio en el mayor número de niveles de vigor. Estas condiciones de estrés son fáciles de lograr en el laboratorio ya que coincide con la temperatura a la que se conduce la PGE en maíz y esto permitiría utilizar la cámara de germinación de cualquier laboratorio de control de calidad de semillas. Además, se trata de una prueba muy sencilla en su ejecución, barata, no requiere de instrumental complejo y no utiliza productos químicos. Esta prueba tiene los mismos requerimientos que la PGE en lo referente a infraestructura, equipamientos, controles, instrumental y capacitación del personal, el mismo debe estar entrenado en la evaluación de plántulas de la especie. Por otra parte, no es una prueba rápida, ya que demanda para su ejecución aproximadamente 9 días (2 días de estrés y 7 de germinación). Como esta

prueba requiere de la evaluación de plántulas, el nivel de capacitación y el criterio del analista juegan un rol importante. Como en toda prueba de vigor la interpretación de su resultado final es de naturaleza compleja, ya que informa el porcentaje de plántulas que el lote de cariopses podría expresar en el campo si se replicaran las condiciones de estrés de la prueba, en este caso de inundación.

La PEA es una de las técnicas de laboratorio utilizadas para determinar el vigor de lotes de semillas de maíz. Es una técnica que se encuentra sugerida por la ISTA en su Manual de Vigor (Hampton y Tekrony, 1995) para esta especie. Existen factores que pueden afectar la interpretación de los resultados y entre ellos surgieron una serie de combinaciones de temperaturas y períodos de exposición a las mismas entre los que se mencionan a 42 °C por 96 h (Krzyzanowski y França-Neto, 1991; Barros y Dias, 1992; Marcos Filho, 1999 b; AOSA, 2002); 45 °C por 96 h (Tekrony, 1993); 42 °C por 72 h (Dias y Barros, 1995) y 45 °C por 72 horas (Hampton y Tekrony, 1995). Trabajos más recientes como los de Fessel *et al.* (2000) donde se probaron temperaturas de estrés de 42 y 45 °C por 72 y 96 h concluyeron que la temperatura de 45 °C por 72 h mostró ser adecuada para la evaluación del vigor de cariopses de maíz híbrido. Por su parte, AOSA (2009) recomendó para maíz conducir la prueba a 42 °C por 72 h. Por otra parte, los trabajos de Venancio *et al.* (2012) concluyeron que la combinación de 43 °C y 48 h fue eficiente para evaluar la calidad fisiológica de maíz.

Otro factor a tener en cuenta es la duración de la prueba y si bien las Reglas internacionales ISTA recomiendan realizar el recuento de plántulas para la especie maíz a los siete días desde la siembra, el analista en función del crecimiento alcanzado por las plántulas y su conocimiento de la especie en estudio, puede anticipar la evaluación. Esto es muy interesante por la posibilidad de obtener los resultados de la prueba con un día de anticipación.

En los ensayos donde se probaron las dos temperaturas de estrés 41 y 45 °C durante 72 h y se realizó un recuento anticipado a los seis días se comprobó que la técnica del EA fue apropiada para separar los lotes de híbridos maíz evaluados en distintos niveles de vigor. La disminución en la producción de plántulas normales con respecto al testigo sin envejecer con el aumento de la temperatura coincidió con los resultados de los trabajos de Venancio *et al.* (2012). En el ensayo a 41 °C los porcentajes de plántulas normales fueron semejantes al testigo y estos resultados estarían indicando que el estrés no fue suficiente como para reducir la

germinación. Por otro lado, en el ensayo conducido a 45 °C se logró poner de manifiesto el diferente vigor de los lotes de híbridos. Los mismos mostraron similar ordenamiento en función de su calidad fisiológica, que en las pruebas de germinación (CA, PC, PGE).

El incremento en 4°C en la temperatura de estrés de la PEA realizada a 41 °C causó un mayor deterioro en los lotes, evidenciado por una menor producción de plántulas normales. Los resultados obtenidos en este estudio coincidieron con los obtenidos por Fessel *et al.* (2000) y Dutra y Vieira (2004) quienes informaron que la conducción de la PEA a 45 °C durante 72 h fue eficiente para la separación de lotes de maíz por su vigor.

La PF es la más utilizada para evaluar la calidad fisiológica del maíz en el mundo, especialmente porque reproduce en el laboratorio las condiciones de campo en siembras tempranas donde generalmente hay suelos fríos, húmedos y cargados de patógenos. La PF se considera como una prueba de resistencia, ya que los lotes de semilla que mejor soporten las condiciones adversas se los considera como de mayor potencial fisiológico. De manera tal, que si los resultados de la PF se aproximan a los de la PGE hay altas posibilidades de que el lote presente alta capacidad de germinar en condiciones de alta humedad y baja temperatura en el suelo (Cícero y Vieira, 1994). La PFM utilizada en este experimento y realizada a temperaturas de estrés de 10 °C y 7,5 °C fue eficiente ya que permitió separar a los lotes de híbridos de maíz utilizados en el experimento en distintos niveles de vigor. Además, la realización de un recuento precoz a los tres días de estadía en la cámara de germinación permitiría adelantar los resultados de la PFM y disminuir los días que demanda la ejecución de la prueba. Esto es muy valioso para lograr el diagnóstico de calidad de los lotes más rápidamente. Por otro lado, las plántulas normales obtenidas luego de la PFM permitieron una mejor separación de los lotes de híbridos por su vigor que los testigos. No obstante ello, los altos porcentajes de plántulas normales producidas por los lotes L4, L3 y L6 tanto en la PFM como en la PGE indican que la PFM a 10 °C y 7,5 °C no constituyó un estrés suficiente para diferenciar los lotes de híbridos entre sí.

La PFM a 5 °C permitió realizar una buena separación de los lotes de híbridos de maíz utilizados, en ambos recuentos, por lo que la realización de un recuento anticipado a los tres días de estadía en la cámara permitiría adelantar los resultados de la PFM. El estrés de PFM a

5°C permitió separar estadísticamente en distintos niveles de vigor a los lotes de híbridos que habían evidenciado un comportamiento semejante en PGE y en PFM a 10 °C y 7,5 °C. Si bien se formaron la misma cantidad de grupos de diferente calidad que en las pruebas anteriores, el estrés por frío de 5 °C fue suficiente para poner en evidencia las deficiencias en la calidad fisiológica de algunos lotes de híbridos de maíz en estudio. Estos resultados coinciden con lo informado por Molina *et al.* (1987), quienes trabajando con pruebas de frío a distintas temperaturas, tiempo y sustrato, concluyeron que la PF con condiciones más drásticas de temperatura permitió una mejor diferenciación entre lotes. También Lovato *et al.* (2005) concluyeron que en las variedades tolerantes al frío para detectar diferencias de vigor, sería necesario utilizar temperaturas inferiores a 10 °C.

La PFM tradicional requiere de 14 días para su ejecución, pero la realización de recuentos anticipados de plántulas a los tres y cinco días permitió adelantar la evaluación y la obtención de los resultados a 10 y 12 días respectivamente. La PFM es de ejecución compleja ya que involucra una serie de pasos en su realización con controles de temperaturas de las cámaras, del sustrato, del ambiente de laboratorio, requiere el uso de recipientes especiales, elevar el contenido de humedad del sustrato a 75 % de capacidad de retención de agua, etc. No tiene elevados requerimientos en equipamiento ya que se utilizan dos cámaras frías y una cámara de germinación. No usa químicos y se realiza la evaluación de las plántulas producidas. La interpretación de los resultados es compleja como en toda prueba de vigor, ya que informa un valor de germinación que el lote podría expresar si se cumplieran las condiciones de estrés de la prueba. No es rápida, ya que demanda de un período de 14 días como máximo y puede reducirse a 10 o 12 con recuentos anticipados y permite una buena separación de los lotes de maíz según su vigor.

La PFS es una prueba de frío a la cual se le incorpora un nuevo factor de estrés que es la saturación de humedad del medio de crecimiento. Goodsell *et al.* (1955) describieron el procedimiento de PFS como una forma de seleccionar las líneas endocriadas en los híbridos de maíz. Es una prueba que se utiliza con buenos resultados en el mejoramiento vegetal para estudiar la calidad de los cariopses en la elección de líneas de maíz (Goggi *et al.*, 2007; Goggi *et al.*, 2008) y también para cuantificar el daño por heladas (DeVries, et al., 2007). DeVries *et al.* (2007) utilizando un conjunto de pruebas de calidad, obtuvieron las mejores predicciones de

emergencia a campo de lotes dañados por heladas por la PFS y PIA. La PFS es más drástica que la de frío tradicional debido al alto grado de saturación de agua del medio de crecimiento, que ocasiona una menor disponibilidad de oxígeno para la semilla. Según AOSA (2002) los resultados de esta prueba podrían subestimar la emergencia a campo, especialmente cuando las condiciones de humedad del suelo no son demasiado estresantes. Por otro lado, la PFS tiene gran eficacia para clasificar los lotes de semilla híbrida en un rango de valores más amplios que la prueba de frío tradicional, permitiendo realizar un manejo más fino de los mismos. La incorporación de un factor de hipoxia a la PF transformó al ensayo en una herramienta más severa para clasificar a los híbridos de maíz por su vigor.

En este estudio, el estrés de la PFS fue suficiente para causar la disminución en la germinación en todos los lotes de híbridos ensayados y permitió clasificarlos en base a su respuesta al estrés de frío y de hipoxia. En el primer recuento de plántulas a los seis días todos los lotes mostraron menores valores de plántulas normales con respecto al testigo y estas tendencias se mantuvieron en el recuento final a los siete días. De esta manera, el recuento anticipado de un día se considera una alternativa posible para adelantar la obtención de los resultados de la prueba. Esta prueba es de gran utilidad para obtener información sobre el comportamiento de los lotes de híbridos de maíz a un estrés severo en laboratorio. Como consecuencia que los valores de germinación pueden ser muy bajos, estos deben utilizarse como indicativos de la capacidad de respuesta del lote híbrido al severo estrés soportado.

Las PIA a 10°C 24 h y 7,5 °C 24, 48 y 72 h presentaron una correlación significativa con la emergencia a campo cuando se presentó una baja temperatura en el suelo, igual situación se registró para la PFM en todas sus variantes. La PEA 41 °C presentó correlaciones altamente significativas en ambas fechas de siembra. Las condiciones de campo de la segunda fecha de siembra si bien no fueron favorables no fueron suficientemente estresantes (alta humedad en el suelo y bajas temperaturas) como para producir una disminución significativa de la emergencia de plántulas en los lotes en base a su calidad fisiológica. Por esta causa, entre la emergencia a campo y las pruebas de vigor que provocaron un menor estrés se registró una correlación significativa.

Para realizar un ordenamiento del conjunto de las 31 pruebas de calidad y/o tipos de estrés utilizados en el experimento y en base a la calificación de cada una de ellas con 11 nuevas variables, se arribó a la construcción de cuatro CP. La CP1 está mayoritariamente influenciada por elementos que hacen a la metodología, la CP2 por la subjetividad en la evaluación de la prueba, la CP3 por el objeto que se analiza y la complejidad de ejecución de la prueba y la CP4 por la cantidad de niveles de calidad en que separó a los lotes de híbridos en estudio. Si bien esta última CP4 es la que menos contribuye a la variabilidad total se tuvo en cuenta el aporte a la separación en mayor cantidad de niveles de calidad, que constituye una información valiosa y de utilidad para la caracterización de los lotes y la posibilidad de formación de un ranking de calidad entre lotes de germinación aceptable. En la relación de la CP1 y CP2 donde se observó la participación de factores como la rapidez, facilidad en la ejecución y la Subjetividad en la evaluación surgió claramente que la prueba de CE reúne estas características. En el estudio de la relación de la CP2 y CP3 donde se observaron mayoritariamente la relación entre la Subjetividad en la evaluación y el objeto analizado en la prueba surgiendo nuevamente la prueba de CE como la mejor posicionada con respecto al resto de las pruebas. Si bien esta prueba fue conducida con un equipamiento específico y costoso, el SAD 9000-S que permitió evaluar la CESI, los factores asociados de rapidez, sencillez y objetividad de los resultados son determinantes en su posicionamiento. Estos resultados coinciden con los trabajos de Alizaga *et al.* (1992); Coimbra *et al.*, (2009); Vilorio y Méndez Natera (2011) quienes evaluaron la eficiencia de diferentes pruebas de vigor en la evaluación de la calidad fisiológica de cariopses de maíz y concluyeron que la medición de la CE fue una prueba eficiente para separar híbridos según clases de vigor y con alta correlación con la emergencia a campo (Peres, 2010).

En la relación de la CP1 y CP3 donde se observó la relación entre la rapidez, facilidad en la ejecución y la facilidad en la evaluación e interpretación del resultado del análisis, surge en este caso la PVR que sin duda reúne todas las características mencionadas. No obstante ello, en un segundo lugar se selecciona a la PGE, CA y PC. Si bien las pruebas de germinación no son tan rápidas como CE, PTTZ o PVR, reúnen las características relacionadas a que es más fácil de entender el resultado de un análisis en base a porcentaje de plántulas normales que el de valores, índices o colores. Estos resultados coinciden con el hecho que la PGE es la

prueba de control de calidad que se utiliza para la comercialización de semillas en el mundo (ISTA, 2015).

En la relación de la CP1 y CP4 donde se observaron la rapidez, facilidad en ejecución y la mayor separación de niveles de calidad, y la relación de la CP2 y CP4 donde se observó mayoritariamente la influencia de la subjetividad en la evaluación y la mayor separación de niveles de calidad surgió nuevamente la prueba de CE y en un segundo lugar la PIA 23 °C 48 h. Si bien la PIA no es tan rápida como la prueba de CE, reúne el resto de las características deseables en lo referente a la facilidad, sencillez en la ejecución y la de permitir separar los lotes de híbridos en mayor número de niveles de vigor. Estos resultados coinciden con los de Grzybowski (2012) quien trabajó con diferentes pruebas de vigor en dos híbridos de maíz y concluyó que la PIA a 25 °C 48 h fue la más promisoría para la evaluación de vigor en esta especie.

Cada prueba de vigor posee un conjunto de características propias con respecto a la complejidad, la rapidez en la obtención de los resultados, la subjetividad en la evaluación, la facilidad en la ejecución, la necesidad de equipos especiales y el estado de estandarización entre otros que llevan a su mayor o menor aplicabilidad en los laboratorios de control de calidad de semillas.

La priorización en el empleo de las pruebas de control de calidad en el Sistema de Aseguramiento de Calidad propio de la empresa resulta de la integración del objetivo, el momento, la necesidad y el destino del diagnóstico requerido.

Es necesario definir tanto el objetivo como el momento del análisis del o los lotes de simiente antes de determinar las pruebas de vigor a utilizar. En etapas tempranas durante el proceso de selección de líneas y el mejoramiento genético, se podrían utilizar pruebas de vigor que generen un estrés severo que permitan identificar las respuestas fisiológicas al estrés utilizado y clasificar los materiales en base a ello, más que a la rapidez, la economía o la sencillez de la prueba. Sin embargo, en etapas de cosecha, poscosecha o comercial se pueden utilizar pruebas más sencillas, rápidas y económicas en virtud de trabajar con materiales genéticos ya estables y bien conocidos por la empresa.

De acuerdo al destino que se le dará al diagnóstico de calidad, como así también a la necesidad de la rapidez en la obtención de la información es que se deberá definir la prueba. Además, a la hora de elegir una u otra prueba se deberá evaluar también la relación costos / beneficios, ya que existen ensayos muy baratos y otros que demandan de la adquisición de equipos más costosos como el caso de la prueba de la CESI pero que a su vez es de gran objetividad y rapidez en la obtención de resultados.

Otro factor muy importante es el referido al estado de estandarización internacional que posee la prueba en uso, ya que es beneficioso utilizar una metodología ya estandarizada. No obstante ello, existen muchas pruebas no estandarizadas aún y que reúnen características excelentes para su uso en maíz. En estos casos, se debe buscar una estandarización interna en el laboratorio, cumplir el protocolo al pie de la letra, utilizar muestras control y siempre se debe comparar con alguna otra metodología validada para la especie.

En la evaluación de la calidad de un lote de semillas de maíz, la utilización de una sola prueba resulta una alternativa muy simplista para un problema de naturaleza compleja, sería más adecuado elegir un conjunto de pruebas lo más reducido posible en número, consideradas como confiables, reproducibles y que sean en lo posible sencillas, económicas y rápidas.

En el ordenamiento de las pruebas de calidad y/o estrés ensayados en el experimento, por medio del estudio de las CP no surgió una sola prueba mejor posicionada, sino que por el contrario aparecieron un conjunto de ellas como la CE, PIA, PGE, PC, CA, PVR, PEA, IVG, etc. Las cuales reúnen algunas de las características definidas como favorables para su utilización en el Aseguramiento de Calidad como la rapidez, economía, sencillez, objetividad, etc., pero no todas. De manera que resulta necesario utilizar más de una prueba para diagnosticar calidad fisiológica y establecer niveles de vigor entre lotes de simiente de germinación aceptable.

La PGE es la prueba validada por las Asociaciones Internacionales ISTA y AOSA. Además, es una prueba de referencia que debe utilizarse para comparar los valores obtenidos en las demás pruebas ensayadas. Por otro lado, las pruebas de CA y PC son parte de la PGE, por lo tanto comparten con ella una metodología validada, son rápidas, sencillas y baratas. Evalúan la velocidad de germinación sin necesidad de elaborar un índice, lo que hace de las mismas una herramienta muy valiosa.

En el sistema de producción de semilla de maíz de calidad se debe plantear el Proceso de gestión de calidad del producto que involucra la evaluación de la calidad en las distintas etapas de la empresa semillera. En cada una de las etapas se podrían definir un conjunto de pruebas de vigor entre las estudiadas en el presente trabajo, las que se pueden utilizar en función del objetivo particular de la etapa y la necesidad de rapidez en obtención de los resultados. De esta manera, la definición de las pruebas de calidad a utilizar sería una tarea específica para elaborar por parte de la empresa y debería estar basada en las particularidades del plan de Aseguramiento de calidad de la misma.

## **2.6 CONCLUSIONES**

Todas las pruebas de vigor con sus correspondientes condiciones de estrés utilizadas en los experimentos separan a los lotes de híbridos de maíz en estudio en diferentes niveles de vigor.

Cada una de las pruebas de vigor brinda una información distinta, valiosa y parcial que conjuntamente forman parte de la descripción de la calidad fisiológica del lote de semilla híbrida. La integración de los resultados de las distintas pruebas permite la ejecución de un diagnóstico conjunto y preciso.

La PIA a 23 °C por 48 h (cinco) y la CESI (cuatro) separan a los lotes de híbridos de maíz en estudio en el mayor número de niveles de vigor mientras que la PFS los separa en el menor número de niveles de vigor (dos).

La PIA a 23 °C por 48 h y la CESI muestran ser herramientas de control de calidad promisorias para la evaluación de la calidad fisiológica de maíz por su rapidez, sencillez y fácil ejecución.

La PEA conducida a 45°C por 72 h separa a los lotes de híbridos de maíz en estudio en distintos niveles de vigor y con un recuento a los seis días permite anticipar los resultados de la evaluación.

La PFM con una temperatura de estrés de 5 °C realiza un mejor ordenamiento o ranking de los lotes de híbridos en estudio en base a su calidad fisiológica. La realización de una evaluación anticipada a los tres días adelanta la obtención de los resultados de la prueba de 14 a 10 días.

Cada una de las pruebas de vigor utilizadas en la evaluación del control de calidad de lotes de semillas posee características propias y permite describir aspectos diferentes que hacen a la calidad fisiológica del lote.

La elección de la o las pruebas a utilizar depende fundamentalmente del objetivo del análisis, momento de ejecución y destino del resultado del mismo.

## **CAPÍTULO 3**

### **CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE CARIOSPES DE DOS LOTES DE HÍBRIDOS DE MAÍZ LUEGO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR DISTINTAS PRUEBAS DE VIGOR**

#### **3.1 INTRODUCCIÓN**

La identificación de la calidad de los lotes de cariopses de maíz es una práctica fundamental en las distintas etapas del proceso de producción. Desde el inicio mismo, la selección de las líneas que componen el híbrido durante las primeras etapas del mejoramiento hasta el momento de producción y almacenamiento de los materiales comerciales, es indispensable conocer cuál es el estado fisiológico del mismo y las causas que conducen al deterioro y la pérdida de los atributos de la calidad. El uso de técnicas de laboratorio que permitan identificar y cuantificar los distintos atributos de la calidad, como así también estudiar las causas y los efectos del deterioro, son herramientas sumamente necesarias en todo el proceso.

Es conocido que en las semillas envejecidas, deterioradas y con bajo vigor ocurren cambios bioquímicos de distinta índole, entre ellos se mencionan la producción de aberraciones cromosómicas y alteraciones en el ADN y el ARN que afectan la síntesis de las proteínas (Roberts, 1972 a y b; Villiers, 1974; Bewley y Black, 1982). Las fallas que ocurren en la síntesis de las enzimas afectan el correcto funcionamiento de la célula y pueden llevar a su muerte. Además, se producen cambios en la actividad respiratoria, en la producción de energía y en las funciones de las membranas citoplasmáticas (Abdul Baki y Anderson, 1972; McDonald y Nelson, 1986; Bewley y Black, 1994; Smith y Berjak, 1995; Basra, 1995). Por otra parte, estos cambios progresivos van a afectar directamente a la síntesis de lípidos, proteínas y toda clase de ácidos ribonucleicos (Osborne, 1982, 1983). De la misma manera las enzimas relacionadas

con la reparación del ADN son afectadas con el tiempo llevando a la producción de anomalías morfológicas y aberraciones cromosómicas (Elder *et al.*, 1993; Vazquez *et al.*, 1991)

Existe una gran cantidad de técnicas de laboratorio, algunas de ellas validadas por las Asociaciones Internacionales como ISTA y AOSA y otras técnicas aún con estatus de recomendadas que se utilizan en el mundo para evaluar la calidad fisiológica y el vigor de lotes de maíz. Muchas de estas técnicas también se emplean con distintos niveles de complejidad y severidad, en los laboratorios de control de calidad para el diagnóstico de calidad interno en las empresas productoras de semillas con el objetivo de decidir tanto el destino final de los lotes, como así también para establecer un ranking de calidad de los mismos y realizar recomendaciones para el almacenamiento, la distribución y el uso en distintas regiones.

Si bien hay numerosas pruebas de vigor, algunas de ellas se caracterizan por someter a los cariopses a un estrés y luego se los coloca a germinar en condiciones totalmente controladas y favorables para la especie (Hampton y TeKrony, 1995; Krzyzanowski *et al.*; 1999; Powel, 2010). No obstante ello, el estrés de la prueba de vigor puede ser más o menos agresivo y puede provocar cambios bioquímicos de diferente índole y magnitud sobre los cariopses (Abdul Baki y Anderson, 1972; Smith y Berjak, 1995)

Existe un número considerable de datos sobre la composición química del maíz y se han llevado a cabo múltiples estudios para tratar de comprender y evaluar las repercusiones de la estructura genética con relación a la composición química del elevado número de variedades e híbridos de maíz existentes, así como la influencia de los factores ambientales y las prácticas agronómicas sobre la composición química y el valor nutritivo del grano y sus partes anatómicas (FAO, 1993).

El cariopse de maíz promedio está constituido por un 70-75 % de almidón, 8-10 % de proteína y 4-5 % de aceite, contenidos en las estructuras morfológicas del embrión, endosperma y pericarpio que lo conforman (Alvarez, 2006). El embrión constituye el 10-12 % del peso seco del cariopse y contiene la mayor cantidad de los lípidos, alrededor del 83 %; por su parte el endosperma constituye el 80 % del peso seco y contiene el 98 % del almidón y el 74 % de la proteína. El pericarpio constituye el 5-6 % del peso seco e incluye todos los tejidos de

cobertura exterior con un 100 % de fibras vegetales (Alvarez, 2006). Por otra parte, Watson (1987) describió la composición química proximal o elemental del grano total de maíz en base seca de la siguiente manera: proteínas 9,91 %, extracto etéreo 4,78 %, fibra cruda 2,66 %, cenizas 1,42 %, almidón 71,5 % y azúcar 2,58 %.

En estudios más recientes sobre variedades de maíces criollos donde se realizó el análisis químico proximal se encontró que las variedades de maíces blancos presentaron valores de 9,3 % de proteína y 1,09 % de cenizas; los maíces amarillos mostraron valores menores de proteína, aproximadamente 6,9 % y los maíces rojos con bajo contenido de cenizas el 0,85 % (Güemes *et al.*, 2003). Por otra parte, en otro estudio realizado por Méndez-Montealvo *et al.* (2005) con 20 híbridos comerciales y variedades de maíz cultivadas en México, al estudiar la composición química de los mismos, reportaron datos de 8,5-11,4 % de humedad, 4-7 % de grasas, 8,3-11 % de proteína, 1,1-1,7 de cenizas y 7,1-13,1 % de fibra dietaria. En otro trabajo, Espinosa *et al.* (2004) analizaron grasas y proteínas en maíces poliembriónicos y los compararon con materiales provenientes del CIMMYT. Los autores encontraron niveles de proteína promedio de 9,3 a 11,7 % y grasas de 4,4 a 8,9 %. Además, se observaron altos niveles de grasas en algunas muestras al compararlas con maíces criollos (Espinosa *et al.*, 2004). Por otra parte, Ortiz Prudencio (2006) en su trabajo sobre determinación química de 43 variedades de maíces criollos de México, determinó que las mismas presentaron en promedio valores de humedad de 8,91-9,60 %, cenizas de 1,39-1,53 %, proteínas de 8,21-12 % y de extracto etéreo entre 4,71-6,18 %. Por otra parte, datos recopilados de una base internacional de muestras de maíces argentinos entre los años 1999 a 2001, muestran para nuestros híbridos rangos de valores de humedad de 12,9-13,15 %, proteínas entre 11,13-12,37 %, lípidos entre 5,35-6,48 % y almidón entre 70-71 % para los maíces tipo Flint. Además, para los maíces dentado y semidentado se observaron valores promedios de humedad 14-17%, proteína entre 10-12 %, lípidos entre 4-6 % y almidón entre 71-73 %. Por otro lado, en el mismo informe se observaron también valores de cenizas entre 1,22-1,53 % y para fibra cruda entre 2,13-2,82 % (ILSI Argentina, 2006).

El contenido de Humedad del grano de maíz es un elemento importante de su composición química aunque no se considera como un factor de la calidad de grano, pero influye en los cambios de la calidad durante el almacenamiento y la elaboración y repercute en

su valor económico. El maíz con humedad elevada, de textura blanda, se deteriora con facilidad durante el almacenamiento, mientras que el cereal se quiebra con niveles bajos de humedad (FAO, 1993). Con un contenido de Humedad inferior al 13 % los cereales se conservan mejor ya que son menos susceptibles al ataque de microorganismos (Ospina Machado, 2001). Si bien en un trabajo de la FAO (1993) se informa que el nivel de Humedad más aceptado para la comercialización del maíz es el 15,5 %, las normas de comercialización de la Argentina establecen un límite de H de 14,5 % (SAGPyA, 1997).

El componente químico principal del grano de maíz es básicamente el almidón y por ello es un grano que se destina principalmente a la extracción de harinas (Satorre, *et al.*, 2003-2004) y también como alimento animal por ser una fuente importante de energía (Ortíz Prudencio, 2006). Los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas del cariopse también son una fuente de energía y aminoácidos que deben estar disponibles y utilizables durante el proceso de la germinación. La alteración de alguno de estos componentes luego de un período de estrés de distinta naturaleza podría estar relacionado con los valores de germinación obtenidos en el ensayo, por lo que sería de utilidad identificarlos y cuantificarlos,

En base a estos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis:

El estrés provocado por las pruebas de vigor de Envejecimiento acelerado, Inmersión en agua, Frío modificada y Frío saturada produce cambios en la composición química de los lotes de híbridos de maíz y se pueden identificar por técnicas analíticas de laboratorio.

### **3.2 OBJETIVO**

El objetivo del trabajo fue identificar posibles cambios ocurridos en la composición química de los cariopses de maíz de dos lotes de híbridos comerciales, L3 y L2, luego de someterlos a distintos tipos de estrés por la utilización de las pruebas de vigor de PEA, PIA, PFM y PFS.

### **3.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron cariopses de dos lotes de híbridos comerciales de maíz, L3 y L2, por ser los lotes que poseían mayor disponibilidad de cariopses. El experimento se realizó en dos etapas: la primera correspondiente a la ejecución de las pruebas de vigor que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros del INTA y la segunda correspondiente a los análisis químicos analíticos de los cariopses que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis de Calidad de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR, Campo Experimental Villarino, Zavalla, Santa Fe.

#### **3.3.1 CONDUCCIÓN DE PRUEBAS DE VIGOR**

Una muestra representativa de cada uno de los lotes de híbridos de maíz se sometió a las siguientes pruebas de vigor: PEA, PIA, PFM y PFS. Cada una de las pruebas se realizó con una cantidad suficiente en peso (g) de cariopses para los lotes de maíz L3 y L2, de manera de disponer de suficiente material sometido a diferentes tipos de estrés para conducir posteriormente los análisis químicos programados.

##### **3.3.1.1 Prueba de envejecimiento acelerado**

Se condujo la PEA siguiendo la metodología detallada en el Manual de métodos de vigor de ISTA (Hampton y TeKrony, 1995). Los cariopses de maíz de los lotes L3 y L2 se sometieron a un estrés de temperatura de  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $72\text{ h} \pm 15\text{ minutos}$  y con una humedad relativa cercana al 100 %.

Luego del período de estrés, las mini cámaras se retiraron de la estufa, se sacaron las cestas de su interior y los cariopses se dejaron orear a temperatura ambiente de laboratorio por 48 h (Figura 3.1 y 3.2). Transcurrido el período de oreado se acondicionaron los cariopses de los dos lotes en bolsas de papel correctamente identificadas y se procedió a su envío al Laboratorio de Análisis de Calidad de Alimentos.



**Figura 3.1.** Mini cámaras tapadas al ser retiradas de la estufa de incubación.



**Figura 3.2.** Cariopses de maíz oreándose en las cestas luego del Envejecimiento acelerado.

### 3.3.1.2 Prueba de inmersión en agua

Se condujo la PIA a una temperatura de  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Antes de iniciar el proceso de inmersión en agua se procedió a retirar el producto fungicida original que poseían los cariopses de los híbridos (Figura. 3.3). Luego del lavado, se procedió a conducir la PIA propiamente dicha.

Luego de este período de estrés, los cariopses se retiraron del agua cuidadosamente con ayuda de un colador, se escurrieron bien y se dejaron orear a temperatura ambiente de laboratorio por 48 h (Figura. 3.4). Luego de finalizado el oreado las muestras de los dos lotes por separado se acondicionaron en sendas bolsas de papel perfectamente identificadas, para su envío al Laboratorio de Análisis de Calidad de Alimentos.



**Figura 3.3.** Lavado de cariopses de maíz con agua. Comparación de cariopses lavados (a) y sin lavar (b).



**Figura 3.4.** Oreado de los cariopses de maíz luego del proceso de inmersión.

### 3.3.1.3 Prueba de frío modificada

Para provocar el estrés en esta prueba de vigor, se sembró una cantidad suficiente de cariopses de cada lote de híbrido de maíz para luego conducir los análisis químicos. Se utilizó como medio de crecimiento arena estéril con un contenido de humedad de 75 % de su capacidad de retención. Las cajas conteniendo el sustrato húmedo y los cariopses sembrados se colocaron en una cámara fría a una temperatura de  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un período de tiempo de siete días. Para conducir la PFM se utilizó la metodología descrita en el capítulo 2.

Luego de transcurrido el período de estrés de siete días, las cajas se retiraron de la cámara fría. Se procedió a recuperar los cariopses de cada recipiente separándolos con cuidado de la arena con ayuda de un tamiz. Se lavaron con agua corriente para eliminar todo resto de arena. Los cariopses limpios se depositaron en cestas y se dejaron orear a temperatura ambiente de laboratorio por 48 h. Luego, los cariopses de los dos lotes de híbridos una vez secos se acondicionaron en bolsas de papel correctamente identificadas y se enviaron al Laboratorio de Análisis de Calidad de Alimentos para la realización de los análisis químicos.

#### **3.3.1.4 Prueba de frío saturada**

La PFS se condujo con medio de crecimiento arena estéril saturada de humedad. Se utilizó una temperatura de estrés de frío de  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  según la metodología descrita en el capítulo 2.

Una vez cumplido el período de siete días de estrés en la cámara fría, las cajas se retiraron de la cámara y los cariopses se sacaron muy cuidadosamente del medio de crecimiento. Los cariopses de cada lote de híbrido se lavaron con agua corriente sobre un colador para eliminar todo resto de arena. Los cariopses limpios se depositaron en cestas y se dejaron orear a temperatura ambiente de laboratorio por 48 h. Las muestras de los dos lotes de híbridos por separado se acondicionaron en bolsas de papel perfectamente identificadas para su envío al Laboratorio de Análisis de Calidad de Alimentos.

#### **3.3.2 CONDUCCIÓN DE LOS ANÁLISIS QUÍMICOS**

Se realizaron los análisis químicos analíticos de determinación de Cenizas totales (CT), Humedad (H), Materia seca (MS), Proteínas (P), Lípidos (L), Fibras totales (FT) y Extractivos no nitrogenados (ENN). En todos los análisis se realizaron tres repeticiones por cada uno de los tratamientos de vigor y un testigo. Las determinaciones químicas se realizaron en el siguiente orden:

### 3.3.2.1 Determinación de Materia seca y Humedad

Para la determinación de Materia seca (MS) y Humedad (H) se utilizó la Norma IRAM 15850-2 (IRAM, 2001).

En el Laboratorio de Análisis de Calidad de Alimentos se realizó la recepción de las muestras de cariopses de los tratamientos de los dos lotes de híbridos. Las muestras se colocaron en un desecador hasta el momento de inicio del procesamiento propiamente dicho, para que no se alterara el contenido de humedad de recepción (Figura 3.5). Luego se procedió a realizar la molienda de cada una de las muestras recibidas con un molinillo de cuchillas Decalab SRL. El mismo trituró los cariopses por impacto. El proceso de molido se realizó por unos 5-10 minutos hasta lograr una harina de granulometría uniforme (Figura 3.6). El material obtenido luego de la molienda se depositó en cajas de aluminio con tapa, perfectamente limpias. Las cajas de aluminio se identificaron con el mismo rótulo en su base y tapa y se registró su peso (tara) en una planilla. Para el secado del material se utilizó una estufa marca Dalvo. La estufa se calibró a una temperatura de 60 °C y una vez que se comprobó que alcanzó y mantuvo la temperatura deseada, se procedió al inicio del ensayo. Se distribuyeron aproximadamente 25 g de cariopses molidos en cada caja de aluminio por repetición y por tratamiento. Luego se colocaron las cajas de aluminio en la estufa a 60 °C por 48 h.



**Figura 3.5.** Desecadores con muestras de cariopses de maíz.



**Figura 3.6.** Molinillo y cajas de aluminio.

Transcurrido el período de secado, las cajas de aluminio se retiraron de la estufa con mucho cuidado y se colocaron a enfriar en un desecador durante 10 a 20 minutos. Cuando el

material molido se enfrió, se procedió a pesar cada una de las cajas tapadas en una balanza analítica (Sartorius) y se registró el dato de peso (g) de cada una de ellas en una planilla. Por último, se aplicó la siguiente fórmula y se determinó el porcentaje Materia Seca de la muestra.

$$\text{MS \%} = \text{PS} - \text{T} / \text{PH-T} \times 100$$

Donde:

PS: peso (g) de la caja con tapa y la materia seca.

T: Peso (g) de la caja de aluminio vacía con la tapa.

PH: Peso (g) de la caja con tapa y la materia húmeda.

Por diferencia, se obtuvo el porcentaje de Humedad de cada muestra.

$$\text{H \%} = 100 - \% \text{ de Materia Seca}$$

De cada una de las muestras molidas y secas, se extrajeron pequeñas fracciones para la ejecución del resto de las determinaciones químicas. Con el objetivo de evitar alteraciones en la MS remanente de los tratamientos, las muestras molidas se conservaron en un desecador hasta el final de la ejecución de todos los análisis.

### **3.3.2.2 Determinación de Cenizas totales**

La determinación de Cenizas totales (CT) se realizó por calcinación utilizando el Método ICC N°104-IRAM 15851 (IRAM, 2001). En el Análisis sumario el porcentaje de Cenizas corresponde a los minerales no volátiles, que se obtuvo por calcinación total del material a 500 o 700 °C durante varias horas para destruir toda la materia orgánica presente.

Para la determinación se utilizó una mufla (Dalvo, Argentina) (Figura 3.7). El valor de las cenizas se obtuvo por gravimetría. Para la determinación de las cenizas se utilizaron los crisoles de porcelana necesarios para cada una de las muestras, limpios e identificados. Se encendió la mufla para que alcanzara la temperatura de ejecución del análisis a 550 °C. Una vez que la mufla alcanzó y mantuvo la temperatura deseada se dio inicio al análisis. Se pesaron los crisoles vacíos para obtener su peso individual y se registró el dato en una planilla. Se procedió a pesar 5 g de la muestra molida para cada tratamiento y lote de híbrido y se lo colocó en cada crisol perfectamente identificado (Figura 3.8). Se realizó una combustión previa, para lo cual se acondicionó un sistema con mechero y soporte bajo una campana donde se colocaron los crisoles con el material molido en su interior. Este proceso tuvo como objetivo elevar lentamente la temperatura del material antes de su ingreso a la mufla. De esta manera, se evitaron posibles pérdidas de material que pueden ocurrir como consecuencia de la amplitud térmica entre el interior de la mufla y el exterior. Posteriormente, se ingresó el material a la mufla con mucho cuidado, se tomaron los crisoles de a uno con guantes y pinzas especiales. El material permaneció dentro de la mufla hasta la calcinación total, aproximadamente 8 h y se redujo a un residuo blanco. Pasadas 24 h los crisoles se retiraron de la mufla, se colocaron a enfriar en un desecador. Se realizó el pesado los crisoles con una balanza analítica (Sartorius) y se determinó el contenido de CT referido a materia seca que se expresó en porcentaje.

$$CT \% = B-T / A-T \times 100$$

Donde:

B: Peso (g) del crisol y la muestra ya calcinada.

T: Peso (g) del crisol vacío.

A: Peso (g) el crisol y la muestra original.



**Figura 3.7.** Mufla utilizada para la ejecución del análisis.



**Figura 3.8.** Pesado del material.

### 3.3.2.3 Determinación de Proteínas

La determinación de Proteínas (P) o Nitrógeno total se realizó por el Método Dumas y se utilizó el equipo LECCO® Corporation (Michigan USA) modelo FP- 528 C® (Figura 3.9).

Se determinó nitrógeno ( $N_2$ ) por combustión directa a 850 °C en una atmósfera de oxígeno puro. El equipo LECCO permitió realizar la combustión del material por medio de tres gases pro análisis: Helio ( $He$ ), Oxígeno ( $O_2$ ) y aire puro. El mismo se conectó a tres cilindros independientes donde se almacenaron los gases cromatográficos mencionados. Cada uno de estos gases tuvo una función diferente: el  $He$  actuó como *carrier* o transportador de la muestra, el  $O_2$  realizó la combustión propiamente dicha del material y el aire puro comandó la parte mecánica de funcionamiento del equipo.

El análisis de cada muestra fue rápido y el resultado se obtuvo en tres minutos. El equipo mostró en la pantalla del mismo el porcentaje de  $N_2$  de la muestra. Posee un programa interno que transformó el valor de porcentaje de  $N_2$  a porcentaje de P por la multiplicación del

porcentaje N<sub>2</sub> por un factor de corrección (FC). Hay diferentes valores de corrección para los distintos materiales y en este trabajo se usó el valor de FC= 6,25 de uso universal.



**Figura 3.9.** Equipo LECCO utilizado para la determinación de Proteínas.

Las proteínas están formadas por Carbono-Hidrógeno-Oxígeno-Nitrógeno (CHON) y cuando se lleva a cabo la combustión se produce dióxido de carbono, vapor de agua y óxidos de nitrógeno. Para medir el N<sub>2</sub> hay que separar el Carbono-Hidrógeno-Oxígeno (CHO). La separación se hace a través de columnas específicas que posee el equipo. La columna Lecosorb<sup>®</sup> es la que se encarga de remover el CO<sub>2</sub> y la columna Anhidrone permite retener el H<sub>2</sub>O. Además, el equipo posee una celda de conductividad térmica que detecta y mide el N<sub>2</sub>. Es un método de análisis primario aprobado por la AOAC (2002) (Association of Official Analytical Chemists) y por la AOCS (American Oil Chemists Society). No requiere calibraciones secundarias ni costosas y se calibra fácilmente con sustancias puras y de bajo costo (EDTA, glicina, etc.). Se utilizaron las normas de AOAC: 992.23 (AOAC, 2002). En el laboratorio se realizaron los siguientes pasos:

A) De cada muestra de materia seca de los distintos tratamientos, se pesaron 200 mg con una balanza analítica (Sartorius).

B) El Ciclo del análisis involucró varias etapas: encendido, preparación de la muestra, purga, combustión, análisis propiamente dicho y resultados.

Se realizó el encendido del equipo con suficiente anterioridad para que alcanzara la temperatura de 850 °C de ejecución del análisis. Una vez que el equipo entró en régimen se inició el proceso.

Para la preparación de la muestra se tomaron los 200 mg ya pesados de cada la muestra para cada repetición, por tratamiento y se colocaron en las cápsulas específicas de papel de estaño (Tin Foil). Cada cápsula con la muestra en su interior se cerró cuidadosamente haciendo un bollito y se colocó en el interior del equipo, en un receptáculo especial.

Luego de colocada la muestra en el cabezal de carga se realizó la purga del equipo para la eliminación de cualquier gas atmosférico que pudiera haber ingresado en el proceso de preparación. Paralelamente, también se purgó el recipiente que colectó los gases de la combustión. Para la combustión, la muestra ingresó al horno calentado a 850 °C y se quemó en una atmósfera de gas de oxígeno puro. Los productos de la combustión son principalmente (dióxido de carbono, agua y óxidos de nitrógeno: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub>, N<sub>2</sub>). Estos gases atraviesan un filtro en el horno y un enfriador termoeléctrico, para quitar la humedad. Luego, son recolectados en un depósito especial denominado Ballast<sup>®</sup>. La muestra continúa su recorrido dentro del equipo pasando por la columna Lecosorb<sup>®</sup> para remover el CO<sub>2</sub> y por la columna Anhidrone para retener el H<sub>2</sub>O. El N<sub>2</sub> es entonces arrastrado por una corriente de gas He hacia una celda de Conductividad Térmica (TC) en donde se mide la concentración de N<sub>2</sub> presente en la muestra. El resultado final se expresó en porcentaje de N<sub>2</sub> y se mostró en la pantalla de la computadora. Por último, se calculó el valor de la P multiplicando el porcentaje de N<sub>2</sub> por el FC.

#### **3.3.2.4 Determinación de Fibras totales**

Para la determinación de Fibras totales (FT) se utilizó el Método de fibra de detergente neutro Van Soest. El objetivo del método fue separar las fibras totales por medio de un detergente que ataca a la muestra de material en estudio. En la Figura 3.10 se observa el equipo utilizado para realizar la determinación de FT.

La Fibra de detergente neutro (FDN) está compuesta por tres fracciones que son celulosa, hemicelulosa y lignina. El método de Van Soest utiliza un detergente neutro denominado FDN (lauril sulfato de sodio + H<sub>2</sub>O + EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) + fosfato mono ácido de sodio + tetraborato de sodio + etilén glicol).



**Figura 3.10.** Equipo Van Soest para la determinación de Fibras totales.

Para su determinación se pesaron 0,35 g de la fracción de MS de la muestra original para cada repetición de los distintos tratamientos. Se colocó cada repetición en un tubo de digestión y se agregó 35 ml de solución FDN en cada uno de ellos. Cada de los tubos de digestión se tapó para no perder material y se los calentó con un mechero. Cada tubo se colocó sobre una placa de calefacción de aluminio a la temperatura de ebullición del FDN a 80-90 °C durante 1 h. El líquido de cada repetición se transvasó a un crisol de placa porosa previamente pesado. Cada crisol se colocó en un sitio específico del equipo extractor propiamente dicho, denominado “chupete”. El equipo extractor consta de una batería de chupetes de goma de caucho conectados entre sí por medio de un sistema especial de mangueras a una bomba de vacío y un kitasato. La bomba de vacío se accionó y se procedió a realizar el filtrado. Luego del filtrado, en el fondo del crisol, quedó un depósito formado por las fibras. Luego se realizaron varios lavados con chorros pequeños de agua caliente y un último lavado con acetona para eliminar el resto del detergente FDN. Una vez terminado el lavado se apagó la bomba de vacío y se retiraron los crisoles del equipo. Los crisoles se llevaron a una estufa a 60 °C por 24 horas para su secado. Una vez secos, los crisoles se retiraron de la

estufa y se dejaron enfriar en un desecador. El % de fibra se obtuvo por diferencia de peso de los crisoles conteniendo el material antes y después de la extracción. Para obtener el resultado de FDN se aplicó la siguiente fórmula.

$$\text{FDN \%} = \text{A/B} \times 100$$

Donde:

A: Peso del crisol + muestra seca.

B: Peso de la muestra original.

### 3.3.2.5 Determinación de Lípidos

Para la determinación de Lípidos (L) o Extracto etéreo se utilizó un equipo extractor Soxtec TM 2050 (Figura 3.11). El método consistió en separar los lípidos de la muestra en estudio por medio de ciclos de extracción a una temperatura de 135 °C y con la utilización del solvente éter de petróleo a 40-60 °C, lavado de la muestra y recuperación de parte del solvente.



**Figura 3.11.** a) Equipo extractor Soxtec TM 2050 utilizado para determinar Lípidos. b) detalle de vasos de aluminio con los cartuchos de fibra vegetal en su interior.

El equipo consta de una batería de vasos de aluminio donde se recogió el aceite que se extrajo de la muestra contenida en cartuchos de fibra vegetal especial y permeable al pasaje del aceite y solvente. El equipo se programó en ciclos de trabajo, de manera que el solvente de extracción al atravesar la muestra fuera arrastrando el aceite al vaso de aluminio inferior. El sistema es refrigerado por agua y se puede recuperar parte del solvente ya utilizado en la parte inferior del aparato.

Para realizar la determinación se encendió el equipo durante algunos minutos de anticipación para que alcanzara la temperatura de 135 °C, necesaria para el proceso. Cada uno de los vasos de aluminio del equipo, limpio y seco, se pesaron previamente y se identificaron. Se pesaron 10 g de la fracción de MS de la muestra original para cada repetición y para cada uno de los tratamientos. Cada repetición se colocó en un cartucho especial de fibra vegetal permeable al pasaje del aceite y el solvente. Los cartuchos de fibra vegetal se colocaron en el equipo, coincidiendo con los vasos de aluminio inferiores ya identificados y pesados. El equipo posee un dispensador del solvente que inyecta 50 ml de éter de petróleo a cada cartucho independientemente. El equipo se programó para una rutina de trabajo de 70 minutos por ciclo. La primera etapa del proceso de extracción duró 20 minutos a una temperatura de 135 °C, luego hubo una segunda etapa de 40 minutos de lavado a la misma temperatura y por último una etapa de 10 minutos destinada a la recuperación del solvente. Una vez terminado el ciclo de extracción anterior los vasos de aluminio se colocaron en una estufa a baño María para evaporar el solvente restante. El aceite extraído de la muestra, quedó depositado en una capa en el fondo de cada vaso de aluminio. El % de aceite se obtuvo por diferencia de peso aplicando la siguiente fórmula:

$$L \% = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100$$

Donde:

$W_3$ : Peso del vaso de aluminio + muestra de aceite.

$W_2$ : Peso del vaso de aluminio.

$W_1$ : Peso muestra seca.

### 3.3.2.6 Determinación de Extractivos no nitrogenados

La determinación de Extractivos no nitrogenados (ENN) se realizó por diferencia de peso. La denominación de ENN corresponde a los azúcares solubles: monosacáridos (glucosa, fructosa), oligosacáridos (maltosa, sacarosa) y polisacáridos (almidón). Para la determinación se aplicó la siguiente fórmula:

$$100 = \text{Cenizas} + \text{Proteínas} + \text{Lípidos} + \text{Fibra} + \text{ENN}$$

$$\text{ENN} = 100 - (\text{Cenizas} + \text{Proteínas} + \text{Lípidos} + \text{Fibra})$$

### 3.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para evaluar el efecto del estrés provocado por las distintas pruebas de vigor sobre la composición química de cariopses de dos lotes de híbridos comerciales de maíz (L3 y L2), se utilizaron los datos obtenidos de los análisis químicos de los cariopses luego de cuatro tratamientos o pruebas de vigor y un testigo sin estrés. Los tratamientos se definieron de la siguiente manera:

- Testigo.
- Estrés provocado por la PEA 72 h a 45 °C.
- Estrés provocado por la PIA 48 h a 23 °C.
- Estrés provocado por la PFM.
- Estrés provocado por la PFS.

Las variables analizadas para cada lote fueron: H, CT, P, L, FT y ENN.

Para identificar posibles diferencias entre los tratamientos y la composición química de los cariopses de los dos lotes evaluados en el estudio, se ajustó un modelo lineal con interacción y se analizó mediante ANAVA. Para este análisis se comprobaron los supuestos requeridos para el ANAVA. Se estudió el cumplimiento del Supuesto de Normalidad de cada variable independientemente.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + E_{ijk} \quad i= 1,\dots,5 \quad j= 1, 2 \quad k=1,\dots,n_i$$

Donde:

$Y_{ijk}$  es el valor k-ésimo de la propiedad química correspondiente al j-ésimo híbrido y el i-ésimo tratamiento.

$\mu$  es la media general de la propiedad química

$\alpha_i$  efecto del i-ésimo tratamiento, cuando i varía de 1 a 5

$\beta_j$  efecto del j-ésimo híbrido, cuando j varía de 1 a 2

$\alpha\beta_{ij}$  es el efecto correspondiente a la interacción entre i-ésimo tratamiento y el j-ésimo híbrido

k son las repeticiones

$E_{ijk}$  es el error experimental

Para analizar el cumplimiento del Supuesto de Normalidad se evaluaron los residuos estandarizados correspondientes al modelo ajustado para cada variable. Este análisis se hace mediante un test de Normalidad (Kolmogorov-Smirnov) e inspección gráfica (Histograma y gráfico QQ). En el caso de algunas variables (Materia Seca, Fibra totales y Cenizas totales) no se cumplió el supuesto. No obstante y teniendo en cuenta lo que enuncian varios autores, como por ejemplo Montgomery (2004) en su libro *Diseño y Análisis de Experimentos*, que “las desviaciones moderadas de la Normalidad no tienen mucha importancia en el ANAVA de efectos fijos”, se decidió aplicar de todas maneras el ANAVA a dichas variables.

Para las variables Contenido de H, CT, P, L, FT y ENN los datos se sometieron a un análisis factorial 5 x 2 (5 tratamientos x 2 híbridos), se utilizó el diseño experimental completamente aleatorizado con 3 repeticiones. Luego del ANAVA, las medias de los tratamientos se compararon a través de la Prueba de Tukey al nivel del 5 % y 1 % de probabilidad y por el Test F al 1 %.

### **3.4 RESULTADOS**

En el ANAVA se observó la existencia de interacción significativa entre lotes y tratamientos para las variables H, P y ENN. Por otra parte, las variables CT, L y FT no mostraron interacción estadística significativa. Los análisis se muestran en el Anexo 3.

En la Tabla 3.1 se muestran los porcentajes de Contenido de H para los lotes de híbridos L3 y L2 y sus correspondientes medias en el testigo y luego de conducidas cada una de las pruebas de vigor. El análisis de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0,01$ ) mostró la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos. Para el lote L3 el testigo mostró el mayor porcentaje de H, en segundo lugar se ubicaron las PFS y PFM, le siguió el estrés de la PIA y el menor contenido de H lo mostró la PEA. Para el lote L2 el testigo mostró el mayor porcentaje de H, el estrés provocado por la PEA el menor contenido de H y las demás pruebas mostraron comportamiento intermedio.

**Tabla 3.1.** Contenido de Humedad (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.

Tratamientos	Humedad (%)						
	Lotes						
	L3		L2		Medias		
TESTIGO	10,96	a	B *	12,05	a	A	11,50
PFS	7,43	b	B	7,78	b	A	7,60
PFM	7,36	b	B	7,60	c	A	7,48
PIA	6,84	c	B	6,85	d	A	6,85
PEA	6,36	d	B	5,92	e	A	6,14
<b>Medias</b>	7,79			8,04			

\* Letras minúsculas distintas en la columna (comparación entre tratamientos) (Test de Tukey;  $\alpha=0,01$ ) y letras mayúsculas en la fila (comparación entre lotes) (Test F) muestran diferencias estadísticas altamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 3.2 se muestran los porcentajes de CT promedio para los lotes L3 y L2 y sus correspondientes medias en el testigo y luego de conducidas cada una de las pruebas de vigor. El Test F mostró la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los dos lotes en estudio. El lote L3 mostró poseer mayor contenido de CT. El análisis de comparación de medias de Tukey mostró la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El testigo mostró el mayor porcentaje para la variable en estudio y se diferenció estadísticamente sólo del tratamiento de la PFM que mostró el menor valor. Las otras pruebas de vigor tuvieron un comportamiento intermedio.

**Tabla 3.2.** Contenido de Cenizas totales (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.

Tratamientos	Cenizas totales (%)			
	lotes			
	L3	L2	Medias	
TESTIGO	1,37	1,22	1,29	a *
PFS	1,34	1,22	1,28	a b c
PFM	1,27	1,02	1,15	d
PIA	1,35	1,20	1,28	a b c d
PEA	1,37	1,21	1,29	a b
<b>Medias</b>	1,34	A	1,17	B

\* Letras minúsculas distintas en la columna (comparación entre tratamientos) (Test de Tukey;  $\alpha=0,01$ ) y letras mayúsculas en la fila (comparación entre lotes) (Test F) muestran diferencias estadísticas altamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 3.3 se muestran los porcentajes de P para los lotes L3 y L2 y sus correspondientes medias en el testigo y luego de conducidas cada una de las pruebas de vigor. Hubo diferencias estadísticas significativas entre los lotes según Prueba de F, mostrando el lote L3 los mayores valores. El análisis de comparación de medias de Tukey mostró la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos solamente en el lote L3. El testigo mostró el mayor valor para la variable y se diferenció estadísticamente solo del tratamiento de la PFS que mostró el menor valor.

**Tabla 3.3.** Contenido de Proteínas (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.

Tratamientos	Proteínas (%)						
	Lotes						Medias
	L3		L2				
TESTIGO	10,28	a	A *	8,18	a	B	9,23
PFS	9,43	b	A	8,24	a	B	8,84
PFM	9,84	a	A	8,26	a	B	9,05
PIA	9,63	a	A	8,28	a	B	8,95
PEA	9,55	a	A	8,95	a	B	9,25
<b>Medias</b>	9,74			8,36			

\* Letras minúsculas distintas en la columna (comparación entre tratamientos) (Test de Tukey;  $\alpha=0,01$ ) y letras mayúsculas en la fila (comparación entre lotes) (Test F) muestran diferencias estadísticas altamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 3.4 se muestran los porcentajes de L para los lotes L3 y L2 y sus correspondientes medias en el testigo y luego de conducidas cada una de las pruebas de vigor. El análisis mostró diferencias altamente significativas entre lotes pero no mostró diferencias entre tratamientos. El lote L2 presentó el mayor valor del contenido de L. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

**Tabla 3.4.** Contenido de Lípidos (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.

Tratamientos	Lípidos (%)			
	Lotes			Medias
	L3	L2	Medias	
TESTIGO	4,18	4,38	4,28	a *
PFS	4,27	4,38	4,32	a
PFM	4,25	4,37	4,31	a
PIA	4,17	4,37	4,27	a
PEA	4,15	4,39	4,27	a
<b>Medias</b>	4,20	B	4,38	A

\* Letras minúsculas distintas en la columna (comparación entre tratamientos) (Test de Tukey;  $\alpha=0,01$ ) y letras mayúsculas en la fila (comparación entre lotes) (Test F) muestran diferencias estadísticas altamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 3.5 se muestran los porcentajes de FT para los lotes L3 y L2 y sus correspondientes medias en el testigo y luego de conducidas cada una de las pruebas de vigor. No hubo diferencias estadísticas entre lotes. Sin embargo, el análisis de comparación de medias de Tukey mostró la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento de estrés de la PFM presentó el mayor valor para la variable estudiada y se diferenció estadísticamente solo de los tratamientos de estrés de la PFS y PIA que mostraron los menores porcentajes de FT.

**Tabla 3.5.** Contenido de Fibras totales (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.

Tratamientos	Fibras totales (%)			
	Lotes		Medias	
	L3	L2		
TESTIGO	2,41	2,25	2,33	a b *
PFS	2,07	2,16	2,12	c d
PFM	2,42	2,36	2,39	a
PIA	2,02	2,11	2,06	c d
PEA	2,27	2,25	2,26	a b c
<b>Medias</b>	2,24 A	2,23 A		

\* Letras minúsculas distintas en la columna (comparación entre tratamientos) (Test de Tukey;  $\alpha=0,01$ ) y letras mayúsculas en la fila (comparación entre lotes) (Test F) muestran diferencias estadísticas altamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

En la Tabla 3.6 se muestran los porcentajes de ENN para los lotes L3 y L2 y sus correspondientes medias en el testigo y luego de conducidas cada una de las pruebas de vigor. Hubo diferencias estadísticas en los lotes en estudio, mostrando L2 el mayor valor. El análisis de comparación de medias de Tukey mostró la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos solo para el lote L3. El testigo del L3 mostró el menor porcentaje para la variable en estudio y se diferenció estadísticamente solo del tratamiento de la PFS que mostró el mayor valor. Las otras pruebas de vigor mostraron comportamiento intermedio.

**Tabla 3.6.** Contenido de Extractivos no nitrogenados (%) en los lotes de maíz L3 y L2, en el testigo y luego de conducidas las pruebas de vigor de Frío saturada, Frío modificada, Inmersión en agua y Envejecimiento acelerado.

Tratamientos	Extractivos no nitrogenados (%)						
	Lotes						Medias
	L3			L2			
TESTIGO	81,75	b *	B	83,84	a	A	82,79
PFS	82,89	a	B	83,99	a	A	83,44
PFM	82,22	a b	B	83,98	a	A	83,10
PIA	82,84	a b	B	84,04	a	A	83,44
PEA	82,64	a b	B	82,22	a	A	82,43
<b>Medias</b>	<b>82,47</b>			<b>83,81</b>			

\* Letras minúsculas distintas en la columna (comparación entre tratamientos) (Test de Tukey;  $\alpha=0,01$ ) y letras mayúsculas en la fila (comparación entre lotes) (Test F) muestran diferencias estadísticas altamente significativas ( $\alpha=0,01$ ).

### 3.5 DISCUSIÓN

Los valores de H determinados en los testigos de ambos lotes de híbridos se encuentran dentro del rango de contenido de H informado en la bibliografía. A este respecto, los trabajos de Mendez-Montealvo *et al.* (2005) informaron rangos de H de 8,5-11,4 %. Por otro lado, ILSI Argentina (2006) informó rangos de valores de H diferentes para maíces argentinos del tipo Flint de 12,90-13,15 % y para dentados y semidentados de 13,70-17,78 %. Por otra parte, Ortíz Prudencio (2006) informó rangos de valores menores de H entre 8,90-9,69 %. Estas variaciones en el contenido de H de los lotes de híbridos de maíz estudiados por los investigadores mencionados, se podrían atribuir tanto a diferencias en la composición genética de los mismos como a variaciones en las condiciones de producción y conservación de los cariopses. Además, la diferencia en el contenido de H encontrada entre los testigos de los dos lotes en estudio se podría explicar por las distintas texturas que poseen los cariopses de maíz de los mismos. El lote L3 es del tipo duro y el L2 semidentado. Este último posee mayor cantidad de endosperma harinoso y esta fracción de hidrato de carbono fue capaz de retener mayor

cantidad de agua. En las diferentes pruebas de vigor la disminución del contenido de H de aproximadamente un 50% con respecto al testigo, se podría explicar por la metodología utilizada en el experimento, ya que los cariopses soportaron el proceso de hidratación durante los distintos tratamientos de estrés ensayados y luego se dejaron secar al aire en el laboratorio para su envío al Laboratorio de Análisis de Calidad de Alimentos para realizar las determinaciones químicas. Por otra parte, los valores de contenido de H que mostraron los lotes de los híbridos en estudio se encuentran por debajo del límite del valor de comercialización de la especie citado por la Norma XII (SAGPyA, 1997) y resultan apropiados para la conservación.

Los cambios relativos al contenido de H que presentaron ambos lotes de híbridos y para las distintas pruebas de vigor utilizadas no son relevantes como para asociar a esta variable con los efectos del estrés de las diferentes pruebas. El hecho que la PEA terminase con un contenido de H menor a las demás pruebas utilizadas se podría explicar por el método de estrés involucrado en cada una de las técnicas. Mientras que en la PEA el proceso de imbibición es lento y se realiza a través de vapor de agua, en las restantes pruebas el proceso de imbibición es a través de agua libre, abrupto y rápido en la PIA, mientras que la imbibición es rápida en el caso de la PFM y PFS.

De las partes que constituyen el cariopses de maíz le corresponde al embrión el mayor aporte en minerales o cenizas al análisis químico del grano. Los valores obtenidos en el experimento, correspondientes al contenido de CT tanto de los testigos como los resultantes luego de las pruebas de vigor en ambos lotes, coinciden con los rangos informados por Watson (1987) y Ortíz Prudencio (2006), quienes informaron en sus trabajos valores de CT de 1,40 % para híbridos de maíz. Por otra parte, Güemes *et al.* (2003) informaron valores de CT de 0,85-1,09 %, mientras que, Méndez-Montealvo *et al.* (2005) informaron valores de 1,10-1,70 % e ILSI Argentina (2006) informó valores promedios de 1,22-1,53 % para híbridos de maíz argentino. No obstante, el contenido de CT encontrado en los cariopses de maíz de ambos lotes luego de la realización de la PFM disminuyó significativamente con respecto a lo ocurrido con las otras pruebas de vigor ensayadas a excepción de la PIA. Esto daría lugar a una continuación de las investigaciones para abordar el tema puntualmente en busca de encontrar una posible relación estrecha entre las pruebas de vigor y cambios en el contenido de CT en lotes de híbridos de maíz.

Después del almidón, las P constituyen el segundo componente químico en importancia del maíz. En la mayoría de los maíces se informó que su contenido puede oscilar entre 8 a 12 % del peso del grano (Watson, 1987; FAO, 1993; Ortíz Prudencio, 2006). El contenido de P en este cereal es muy importante, ya que se lo destina en una gran proporción a la alimentación animal en el mundo. Los valores del contenido de P del testigo y en las pruebas de vigor de los dos lotes de híbridos en estudio en este trabajo, coinciden con los rangos informados por diferentes autores. White y Johnson (2003) establecen que el nivel de P oscila entre 8,10 y 11,50 %. Por otra parte, en un trabajo de Mestres *et al.* (1991) se reportó un rango de P de 7,50 a 12,30 % en variedades de maíz de diferentes orígenes cultivadas en países africanos. Fox *et al.* (1992) encontraron rangos de 7,90 a 9,60 %, mientras que Jennings *et al.* (2002) en un estudio con híbridos comerciales de maíz en diferentes grados de madurez encontraron valores de 6,80 a 9,50 %. Por otra parte, en el trabajo de ILSI Argentina (2006) se informaron contenidos de P de 11,13-12,37 % para maíces Flint y de 10,35-12,00 % para maíces dentados y semidentados argentinos. No obstante, la PFS fue la que presentó un valor de P significativamente diferente, pero solamente ocurrió para uno de los lotes en estudio, el L3. Este hecho, si bien podría interpretarse como consecuencia que la PFS es una prueba de vigor sumamente estresante, este mismo razonamiento no es aplicable al lote L2 cuyo contenido de P se mantuvo sin diferencias significativas para las diferentes pruebas. De igual manera que para el contenido de CT cabría la posibilidad de tomar los resultados de este estudio como un antecedente preliminar para continuar las investigaciones en un mayor número de lotes de híbridos de maíz.

El aceite del grano de maíz se encuentra fundamentalmente en el embrión y viene determinado genéticamente, con valores varían entre 3 y 18 % según un informe de FAO (1993). En su trabajo, Watson (1987) informó que el grano de maíz presenta entre 3 a 11 % de aceite y por su parte Alvarez (2006) mostró valores inferiores, con un rango de 4-5 %. El contenido de L determinado en este experimento para el lote L3 de tipo duro (4,18 %) es ligeramente inferior al informado por ILSI Argentina (2006) de 5,35-6,48 % para este tipo de maíz argentino, pero se encuentra dentro de los valores informados por otros autores (Espinosa, *et al.*, 2004; Mendez-Montevalvo, 2005; Ortíz Prudencio, 2006). Por otra parte, Fox *et al.* (1992) trabajando con híbridos comerciales encontraron valores de grasas de 2,80 y 4,00 % al igual que Jennings *et al.* (2002), quienes reportaron valores de 2,60 y 3,30 % en híbridos

comerciales cosechados con distintos grados de madurez. El valor de L determinado para el lote L2 de tipo semidentado (4,38 %) se encuentra dentro de los rangos informados por los diferentes autores citados. Las diferencias encontradas en el contenido de L entre los lotes estudiados, podrían deberse a que el contenido de aceite del grano de maíz presenta variaciones entre años. Estudios genéticos han revelado que las mismas pueden atribuirse a influencias genéticas, del medio ambiente y también a las prácticas agronómicas, las cuales pueden influir además en la composición de los ácidos grasos (Jellum y Marion, 1966; Leibovits y Ruckenstein, 1983), pero aún no se conocen con exactitud las causas de estas variaciones (Earle, 1977). Las distintas pruebas de vigor ensayadas en este estudio demostraron no producir alteraciones en el contenido de L de los cariopses de maíz de ambos lotes independientemente del estrés a que fueron sometidos. Al igual que para los demás componentes del análisis sumario no es posible, dentro del alcance del presente estudio, establecer una justificación contundente acerca de la influencia de los diferentes tipos de estrés producidos sobre las variables.

El pericarpio de cariopse de maíz se caracteriza por poseer un elevado contenido de FT, aproximadamente el 87 %, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67 %), celulosa (23 %) y lignina (0,1 %) (Burge y Duensing, 1989). Los valores de contenido de FT tanto en los testigos de los dos lotes en estudio como luego de los tratamientos de estrés de las distintas pruebas de vigor ensayadas, se encontraron dentro del rango promedio de 2,13-2,82 % informado por ILSI Argentina (2006) para los maíces argentinos. No obstante ello, el estrés provocado por las PFS y PIA mostraron los menores valores de FT para ambos lotes de híbridos en estudio. Estos resultados podrían explicarse como consecuencia de tratarse de pruebas que generan un estrés osmótico de mayor intensidad en relación con las otras pruebas de vigor utilizadas en el experimento.

El endosperma es el mayor constituyente del grano de maíz y contiene un nivel elevado de almidón de un 87 %, aproximadamente 8 % de proteínas y un contenido de grasas crudas relativamente bajo de un 0,8 % (Watson, 1987; Alvarez, 2006). El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. También hay otros hidratos de carbono que forman parte del grano de maíz que son azúcares solubles en forma de glucosa, sacarosa y fructosa, en cantidades que varían del 1 al 3 % del grano (FAO, 1993). El cariopse completo de

maíz contiene almidón en un rango de 70-75 % según Alvarez (2006) y en el trabajo de ILSI Argentina (2006) se informaron rangos de 71-73 % para híbridos dentados y semidentados y 70-71 % para híbridos Flint. Los tratamientos testigo de ambos lotes de híbridos y los promedios de los tratamientos en este experimento, mostraron un valor de ENN de 81,75 y 83,84 %, valores superiores a lo informado por los trabajos precedentes. Esto podría deberse principalmente a la metodología de determinación de ENN utilizada en este experimento la cual se realiza por diferencia entre 100 y (Cenizas + Proteínas + Lípidos + Fibra) e incluye en el valor informado al almidón, otros azúcares y ácidos orgánicos. El peso relativo de cada uno de los componentes de la suma afecta directamente el resultado final y esto podría explicar las diferencias encontradas para el lote L3, sin que ello signifique un efecto directo de la prueba para la variable ENN.

Si bien se han encontrado algunas variaciones entre los valores de los componentes químicos analizados, en su mayoría se encuentran dentro de los rangos informados por numerosos autores. Esas diferencias pueden explicarse por el empleo de distintos materiales genéticos, ya sean híbridos o variedades en los diferentes trabajos, como lo indican Mendez-Montealvo *et al.* (2005) quienes refieren que el contenido de proteína se ve influenciado por la constitución genética. Otra causa de las diferencias encontradas podría deberse a diferencias en las metodologías aplicadas en las determinaciones.

### **3.6 CONCLUSIÓN**

El estrés provocado por las pruebas de vigor PEA, PFM, PFS y PIA sobre los cariopses de los lotes de híbridos de maíz L3 y L2, produjo cambios significativos en algunos componentes evaluados por el análisis químico proximal o sumario. No obstante, si bien los componentes evaluados constituyen una referencia descriptiva de las alteraciones observadas por los estrés de diferente naturaleza ensayada, se necesitaría realizar estudios complementarios con mayor cantidad de lotes de híbridos de maíz para discernir si dichas alteraciones son realmente resultantes de los estrés producidos por las pruebas.

## CONCLUSIONES FINALES

Las pruebas de laboratorio y de emergencia a campo utilizadas en el estudio permitieron caracterizar, clasificar y realizar un ranking de calidad de los seis lotes de híbridos según sus niveles de viabilidad, germinación y vigor.

La prueba de CA es una herramienta útil para informar sobre la velocidad de germinación de los lotes de híbridos de maíz ensayados y adelantar resultados.

Las pruebas de PTTZ (Viabilidad, Semillas viables sin defectos y Vigor) y PTZA (menos del 50 % teñido) mostraron correlación significativa con la emergencia de en ambas fechas de siembra. La CESI muestra correlación significativa negativa con la emergencia a campo en condiciones favorables. Esto último, conjuntamente con la rapidez de obtención de resultados de estas tres pruebas las convierte en herramientas de gran utilidad en la evaluación de calidad de los lotes destinados a simiente.

La PIA a 23 °C por 48 h y la CESI separan a los lotes de híbridos de maíz en estudio en el mayor número de niveles de vigor (cinco y cuatro respectivamente). Estas pruebas demuestran ser herramientas de control de calidad promisorias para la evaluación de la calidad fisiológica de maíz por su rapidez, sencillez y fácil ejecución.

La PEA conducida a 45°C por 72 h separa a los lotes de híbridos de maíz en estudio en distintos niveles de vigor.

La PFM con una temperatura de estrés de 5 °C es la variante más eficiente para identificar las diferencias en calidad fisiológica de los lotes de híbridos de maíz en estudio frente al estrés de frío.

La realización de recuentos anticipados de plántulas en las PEA, PFM y PFS es una alternativa para obtener los resultados con mayor prontitud. En el comercio de simiente la posibilidad de adelantar resultados en dichos ensayos que demoran 9, 12 y 14 días respectivamente, permite acelerar la toma de decisiones con respecto al destino del lote.

De las pruebas de vigor utilizadas en el experimento la PIA, CESI y PEA (como pruebas de estrés) conjuntamente con el PTTZ y CA permiten realizar un buen diagnóstico.

Con la utilización de una sola prueba de control de calidad no es posible reunir toda la información necesaria para la clasificación de los lotes de cariopses de maíz utilizados en el experimento en base a su calidad fisiológica.

Los cambios cuantitativos de las variables químicas observados en este estudio dejan abierta la posibilidad de futuras investigaciones en que se identifique si posibles cambios en el análisis sumario de los cariopses de maíz son una consecuencia verdadera de los diferentes estrés soportados.

## **PROTOCOLOS**

### **PRUEBAS DE VIGOR**

#### **Conductividad eléctrica de semillas individuales con el equipo SAD 9000-S (CESI)**

##### **Metodología**

1. Disponer del equipamiento necesario para la conducción de la prueba (equipo SAD 9000-S, humidímetro, balanza, cámara de incubación, termómetros, etc.).
2. Controlar el correcto funcionamiento de los equipos antes de comenzar la preparación.
3. Disponer de suficiente volumen de agua deionizada de baja CE (hasta  $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (microsiemens por centímetro).
4. Controlar la CE del agua deionizada que se va a utilizar tanto en el lavado del equipo como en la medición (hasta  $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
5. Utilizar material de protección personal como guardapolvo, guantes descartables, barbijo y pinzas.
6. Determinar el contenido de humedad de cada una de las muestras de los lotes de cariopses de maíz a analizar antes de comenzar la prueba.
7. Acondicionar las muestras de cariopses, si fuera necesario, a la humedad recomendada por ISTA, en su Manual de Vigor, para la conducción de pruebas de vigor (Hampton y TeKrony, 1995).
8. Contar 100 cariopses puros de maíz para cada muestra a analizar.
9. Pesar los 100 cariopses de cada muestra de maíz para incorporar este valor al programa de medición del equipo y obtener el valor de conductividad eléctrica (CE) por gramo ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ).
10. Lavar los cariopses de maíz si están curados para retirar el producto y enjuagarlos con agua deionizada de baja CE (hasta  $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
11. Disponer de suficiente cantidad de bandejas multicelda para las muestras a evaluar.
12. Lavar las bandejas multiceldas y enjuagarlas con agua deionizada de baja CE.

13. Lavar el cabezal de medición, durante cinco minutos, en la bandeja de lavado con circulación forzada de agua deionizada de baja CE.
14. Llenar cada una de las celdas de la bandeja multicelda con el dosificador del equipo. Para la especie maíz se recomienda el uso de 8 ml de agua deionizada en cada celda.
15. Colocar con pinzas un solo cariopse de maíz en cada celda de la bandeja multicelda.
16. Identificar cada bandeja con el número de lote, peso de 100 cariopses, hora de ingreso y egreso a la cámara de incubación.
17. Tapar las bandejas ya preparadas con los cariopses en su interior con una bolsa de polietileno para evitar evaporación y/o contaminación del agua.
18. Preparar las bandejas con un intervalo de 10 minutos entre cada una para permitir un tiempo suficiente para el manipuleo de las bandejas desde la cámara de incubación hasta el lugar de medición, el lavado del cabezal, el ingreso de datos al programa y la ejecución de la medición propiamente dicha.
19. Calibrar la cámara a la temperatura de conducción del ensayo desde un día antes del inicio de la prueba y registrar el tiempo que demanda para alcanzar la temperatura de la prueba.
20. Incubar las bandejas en cámara a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante  $24\text{ h} \pm 15$  minutos.
21. Retirar las bandejas de la cámara a la hora establecida, de acuerdo con el orden de ingreso y realizar la medición.
22. Realizar el ingreso de los datos de identificación de cada muestra de maíz en el programa del equipo. Seleccionar el valor de corte (VC) para Potencial de Germinación y Vigor estimados por el equipo para la especie.
23. Para la medición propiamente dicha colocar el cabezal multielectrodo del equipo sobre la bandeja multicelda. Controlar el buen ajuste de ambos.
24. Realizar la medición automática de la muestra dando la orden al programa del equipo.
25. Retirar el cabezal de la bandeja multicelda una vez finalizada la medición de la muestra.
26. Colocar el cabezal multielectrodo de medición en la bandeja de lavado y lavar durante dos minutos con circulación de agua deionizada.
27. Depositar el cabezal multielectrodo de medición luego del lavado sobre la placa de secado durante 30 segundos para retirar el exceso de agua.
28. Reiniciar la operación para la próxima muestra desde el punto 21 del protocolo.

29. Observar e imprimir los resultados. El programa del equipo brinda los resultados por pantalla y un detallado informe impreso donde se observan los datos de la muestra, los valores de CE de cada semilla, los VC establecidos para la especie, el peso promedio de las 100 semillas, la CE media en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  y  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , el desvío estándar, la temperatura ambiente y los valores estimados de Potencial de germinación y de vigor.

## **Inmersión en agua (PIA)**

### **Metodología**

1. Disponer del equipamiento necesario para la conducción de la prueba (cámara de germinación, humidímetro, recipientes, probetas, coladores, bandejas, termómetros, etc.).
2. Disponer de sustrato de germinación seleccionado para la prueba (arena, papel)
3. Utilizar material de protección personal como guardapolvo, guantes descartables, barbijo y pinzas.
4. Contar 4 repeticiones de 100/50 cariopses puros de maíz de cada muestra a analizar.
5. Determinar el contenido de humedad de cada una de las muestras de cariopses de maíz a analizar antes de realizar la PIA.
6. Acondicionar las muestras de cariopses, si fuera necesario, a la humedad recomendada por ISTA, en su Manual de Vigor, para la conducción de pruebas de vigor (Hampton y TeKrony, 1995).
7. En caso de cariopses curados: lavar los cariopses de maíz para retirar el producto. Para ello:
  - a. Colocar los cariopses en recipientes de vidrio con abundante agua corriente, tapar y realizar agitado suave con movimientos circulares para evitar la producción de cualquier tipo de lesiones que pudieran alterar los resultados de la prueba.
  - b. Realizar varios cambios del agua de lavado, por lo menos tres, hasta que el agua de lavado quede transparente.

- c. Utilizar un colador para retener los cariopses durante la operación de lavado y evitar pérdidas de los mismos.
8. Disponer de una muestra de lote de híbrido de maíz de calidad alta y evaluada de 90, 95 o 99 % que se utilizará como muestra testigo o control. Esta muestra control sirve para corroborar que se produjo el estrés de la prueba.
9. Conducir con cada una de las muestras de cariopses de maíz a analizar una PGE de acuerdo a la metodología ISTA versión actualizada.
10. Calibrar la cámara a la temperatura de conducción del ensayo desde un día antes del inicio de la prueba y registrar el tiempo que demanda para alcanzar la temperatura de la prueba.
11. Una vez comprobada la estabilidad de la temperatura de  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  se podrá introducir las muestras.
12. Medir el pH del agua de inmersión.
13. Utilizar agua a pH neutro.
14. Utilizar recipientes limpios de plásticos con tapa, de 250 ml de capacidad.
15. Sumergir los cariopses de maíz de cada repetición en un volumen de 200 ml de agua corriente de canilla a pH neutro.
16. Incubar los cariopses de cada repetición con agua en los recipientes tapados en la cámara a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.
17. Retirar los recipientes de la cámara al transcurrir el periodo de estrés de 48 horas.
18. Retirar los cariopses del agua de inmersión con ayuda de un colador para evitar daños y pérdidas de material.
19. Dejar orear los cariopses sobre una rejilla durante  $1\text{ h} \pm 15$  minutos.
20. Preparar la arena/papel estéril, humedecida con agua a la capacidad de retención utilizada por el laboratorio para la especie maíz, para la PGE de acuerdo al tipo (granulometría) de arena y calidad del papel que se dispone.
21. Preparar las bandejas con arena/papel húmedo para la siembra de los cariopses previo a la salida de los recipientes de la cámara.
22. No demorar la siembra de los cariopses más de una hora luego de la salida de los recipientes de la cámara de incubación.

23. Realizar la siembra en las bandejas con arena/papel estéril húmedo, cubrir con bolsas de polietileno y colocarlas en la cámara de germinación a la temperatura recomendada para la especie.
24. Retirar las bandejas luego del período de siete días de permanencia en cámara de germinación y realizar el recuento final de plántulas.
25. Realizar la evaluación de las plántulas producidas de acuerdo con los criterios del Manual de Evaluación de Plántulas ISTA (versión actualizada).
26. Expresar los resultados de la prueba en porcentaje de plántulas normales.
27. Comparar los resultados de la PIA de los lotes analizados con los resultados de su correspondiente PGE.

## **Envejecimiento acelerado (PEA)**

### **Metodología**

1. Disponer del equipamiento necesario para la conducción de la prueba (cámara de EA de múltiples muestras o mini cámaras, estufa, probetas, cámara de germinación, bandejas, termómetro, etc.).
2. Utilizar material de protección personal como guardapolvo, guantes descartables, barbijo y pinzas.
3. Determinar el contenido de humedad de cada una de las muestras de cariopses de maíz a analizar antes de realizar la PEA.
4. Acondicionar las muestras de cariopses, si fuera necesario, a la humedad recomendada por ISTA, en su Manual de Vigor, para la conducción de pruebas de vigor (Hampton y TeKrony, 1995).
5. Disponer de una muestra de lote de híbrido de maíz de calidad alta y evaluada de 90, 95 o 99 % que se utilizará como muestra testigo o control. Esta muestra sirve para corroborar que se produjo el estrés de la PEA.
6. Conducir con cada una de las muestras de cariopses de maíz a analizar una PGE de acuerdo a la metodología ISTA versión actualizada.

7. Calibrar la cámara de múltiples muestras o estufa a la temperatura de conducción del ensayo desde un día antes del inicio de la prueba y registrar el tiempo que demanda alcanzar la temperatura del ensayo.
8. Una vez comprobada la estabilidad de la temperatura de  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  se podrá introducir las muestras.
9. Preparar las cuatro repeticiones de 100/50 cariopses puros para cada lote de híbrido en estudio.
10. En caso de disponer de cámara de EA para múltiple muestras: cuidar y controlar la limpieza de la cámara y las cestas antes de empezar el ensayo. Distribuir los cariopses de cada repetición en una única y simple capa sobre cada cesta. Introducir las cestas con las semillas todas juntas en el mismo momento, cerrar la cámara y no abrirla hasta que finalice el periodo de envejecimiento.
11. En caso de no disponer de cámara de EA para múltiples muestras se pueden utilizar el método de las mini cámaras.
12. Acondicionar las mini cámaras, con todos sus componentes perfectamente limpios y desinfectados.
13. Colocar dentro de cada mini cámara un volumen de 100 ml de agua.
14. Distribuir los cariopses sobre las cestas o canastas plásticas en una sola y uniforme capa, evitando superposiciones de los mismos para que todos ellos queden expuestos a las mismas condiciones de humedad y temperatura.
15. Colocar con cuidado las cestas sobre los soportes en el interior de las mini cámaras y taparlas.
16. Introducir en la estufa las mini cámaras con mucho cuidado para evitar mojado de los cariopses.
17. Registrar la hora en que la estufa alcanza nuevamente la temperatura de  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a partir de esa hora contar las 72 h que demanda la prueba.
18. No abrir la puerta de la estufa durante todo el período de permanencia de las mini cámaras en la estufa ya que esto afecta disminuyendo la temperatura de conducción de la prueba.
19. Retirar de la estufa las mini cámaras luego del período de estrés de  $72\text{ h} \pm 15$  minutos, destapar y conducir con los cariopses una la prueba de Germinación estándar

tradicional, siguiendo las metodologías descritas por las Reglas Internacionales ISTA (versión actualizada).

20. Preparar las bandejas donde se realizará la siembra de los cariopses previo a la salida de las mini cámaras de la estufa.
21. Preparar la arena estéril, humedecida con agua a la capacidad de retención utilizada por el laboratorio para la especie y para la PGE de acuerdo al tipo (granulometría) de arena que se dispone.
22. No demorar la siembra de los cariopses más de una hora luego de la salida de las mini cámara de la estufa (ISTA, 2015).
23. Realizar la siembra en las bandejas con la arena estéril húmeda, cubrir con bolsas de polietileno y colocarlas en la cámara de germinación a la temperatura recomendada para la especie.
24. Retirar las bandejas luego del período de seis días de permanencia en cámara de germinación y realizar el recuento final de plántulas.
25. Realizar la evaluaron de las plántulas producidas en la PGE de acuerdo con los criterios del Manual de Evaluación de Plántulas (ISTA, versión actualizada).
26. Expresar los resultados de la prueba en porciento de plántulas normales (ISTA, 2015).
27. Comparar los resultados de la PEA de los lotes de cariopses analizados con los resultados de su correspondiente PGE.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- ABDUL BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. 1972. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: Seed Biology, Volume II, Ed. Koslowski, T.T. New York: Academic Press. p. 283-315.
- ACOSTA, R. 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. Cultivos Tropicales. La Habana, 30 (2):130-120. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>
- ALIZAGA, R.; STERLING, F.; HERRERA, J. 1992. Evaluación del vigor en semillas de maíz y su relación con el comportamiento a campo. Agronomía Costarricense, 16(2):203-210.
- ALVAREZ, A. 2006. Aplicaciones del maíz en la tecnología alimentaria y otras industrias. En Maíz y Nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Recopilación de ILSI Argentina. II:9-13. Disponible en: <http://www.maizar.org.ar>
- AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. 17° Edition. Ed. Association of Official Analytical Chemists, International Gaithersburg, EUU. Disponible en: <http://www.worldcat.org>
- AOSA. ASSOCIATION OFFICIAL SEED ANALYSTS. 2000. Tetrazolium Testing Handbook. Contribution N° 29 To the Handbook On Seed Testing. Ed. The Tetrazolium Test Committee. 294 pp.
- AOSA. ASSOCIATION OFFICIAL SEED ANALYSTS. 2002. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution N° 32 To The Handbook On Seed Testing. Ed. The Seed Vigor Test Committee. 105 pp.
- AOSA. ASSOCIATION OFFICIAL SEED ANALYSTS. 2009. Seed Vigor Testing Handbook, Contribution N° 32. Editors Baalbaki, R.; Marcos- Filho, J.; Elias, S.; Mc Donald, M. To The Handbook On Seed Testing. 340 pp.
- ARANGO, M.R.; CRAVIOTTO, R.M.; BICOCA, B.; ANCA, V. 1996. Evaluación de la Metodología de Conductividad Eléctrica para la Predicción de la Germinación en semilla de Girasol

(*Helianthus annuus* L.). XV Seminario Panamericano de Semillas y Workshop sobre Marketing en Semillas y Mudas- Gramado Brasil. Actas del Seminario. p. 50.

ARANGO, M.R.; SALINAS, A.R.; CRAVIOTTO, R.M.; YOLDJIAN, A.M. 2001. Estimación de la germinación en soja a través de la conductividad eléctrica. XII Congreso Brasileño de Semillas. INFORMATIVO ABRATES. Asociación Brasileña de Tecnología de Semillas. 17 al 20 de setiembre 2001 Curitiba, Paraná. Brasil.

ARANGO, M.R.; CRAVIOTTO, R.M. 2002. Calidad de Semillas de soja. Revista IDIA XXI Oleaginosas, Año II. 3:24-28.

ARANGO PEREARNAU, M.R.; CRAVIOTTO, R.M. 2007. Determinación de Daño Mecánico en Maíz. Prueba de Verde Rápido (*Fast Green*). Análisis de Semillas. Tomo 1, 4 (4):51-52.

ARANGO PEREARNAU M.R.; GALLO, C.; CRAVIOTTO, R.M. 2010. Prueba de inmersión como indicador de vigor en semillas de soja. XXII Seminario Panamericano de Semillas. Asunción del Paraguay. En: Actas del congreso.

ARAÚJO, R.F.; ARAÚJO, E.F.; FERREIRA DA SILVA, R. 2000. O Teste de Tetrazólio em Camada de Aleurona na Avaliação da Qualidade de Sementes de Milho Danificadas Durante a Colheita e Durante o armazenamento. Revista Brasileira de Sementes, 22(1):104-109.

BARROS, A.S.R.; DIAS, M.C.L.L.1992. Aferição de testes de vigor para sementes de milho. Informativo ABRATES, 2(4):10-22.

BASRA, A. S. Ed. 1995. Seed Quality. Basic Mechanisms and Agricultural Implications. New York: Food Product Press. 388 pp.

BECRAFT, P.W.; LI, K.; DEY, N; ASUNCION-CRABB, Y. 2002. The maize *dek 1* gene functions in embryonic pattern formation and cell fate specification. Development, 129: 5217-5225.

BERTOLIN, D. C. 2010. Teste de alagamento, deterioração controlada e envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de sementes de feijão. Tese (doutorado) - Universidade

Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção. 112 pp.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination, vol. 2. Viability, dormancy and environmental control. Springer-Verlag, Berlin. 375 pp.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. 2º. Ed. Plenum Press, New York. 445 pp.

BISHNOI, U.R.; DELOUCHE, J.C. 1975. Cottonseed quality and its relation to performance in laboratory and field test. Agronomy Abstracts. 90 pp.

BLANCAS, M.B. 2007. Manejo de granos en almacenamiento, causas del deterioro y prevención. Arch. Latinoamericano. Prod. Animal, 15(1):180- 184. Disponible en: <http://www.bioline.org.br>

BOLSA DE CEREALES DE BUENOS AIRES. 2013. Número Estadístico 2012/13. 214 pp.

BORBA, C.S.; DE ANDRADE, R.V; DE AZEVEDO, J.T.; DE OLIVEIRA, A.C. 1994. Efeito da Debulha Mecânica na Qualidade de Sementes de Milho. Revista Brasileira de Sementes, 16(1):68-70.

BORBA, C.S.; DE ANDRADE, R.V; DE AZEVEDO, J.T.; ANDREOLI, C.; PURCINO, A.A.C. 1995. Germinação de sementes de diversos genótipos de milho tropical (*Zea mays* L.) em diferentes temperaturas. Revista Brasileira de Sementes, 17(2):141-144.

BRIEVA, S.; COSTA, A.M. 2013. Visión prospectiva de la cadena del maíz al 2030. En Serie de documentos de trabajo N° 19. Proyecto MINCYT-BIRF: Estudios del Sector Agroindustrial. 75 pp. <http://www.mincyt.gob.ar/adjuntos/archivos/000/036/0000036229.pdf>

BULAT, H. 1961. Reduction processes in living tissues, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. Proceedings of the International Seed Testing Association, Copenhagen, 26:686-696.

- BURGE, R.M.; DUENSING, W.J. 1989. Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. *Cereal Foods World*, 34:535-538.
- BURRIS, J.S.; NAVRATI, R.J. 1979. Relationship Between Laboratory Cold-Test Methods and Field Emergence in Maize Inbreds. *Agronomy Journal*, 71:985-988.
- BYRD, H.W.; DELOUCHE, J.C. 1971. Deterioration of Acceleration of Soybean Seed in Storage. *Proceedings of the Association of Official Seed Analysts*, 61:41-57.
- CARNEIRO, V.; ARAÚJO, E.F.; MIRANDA, G.V.; GALVÃO, J.C.C.; REIS, M.S.; DAVID, A.M.S.S. 2003. Efeito da debulha e da classificação sobre o tamanho e a qualidade de sementes de milho-pipoca. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 2(1):97-105.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. 1988. *Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção*. 3 ed., Campinas: Fundação Cargill Ed. 424 pp.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. 2000. *Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção*. Jaboticabal, Funep. 588 pp.
- CASEIRO, R.F.; MARCOS FILHO, J. 2000. Métodos alternativos do teste de frio para avaliação do vigor de sementes de milho. *Scientia Agrícola*, 57(3):110-117. Disponible en: <http://www.scielo.br>
- CASEIRO, R.F.; MARCOS FILHO, J. 2002. Procedimiento para condução do teste de frio em sementes de milho: pre resfriamento e distribuição do substrato no interior da câmara fria. *Revista Brasileira de Sementes*, 24(2):53-56. Disponible en: <http://www.scielo.br>.
- CASINI, C. 2003. Conservación de granos: almacenamiento en bolsas plásticas. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_reservas](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas)
- CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Ed.). *Germinação: Do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, Cap. 9, p. 146-162.

- CHRISTIANSEN, M.N. 1964. Influence of chilling upon subsequent growth and morphology of cotton seedlings. *Crop Science*, 4:584-586.
- CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. 1969. Grain storage. The role of fungi in quality loss. University of Minnesota Press. Minneapolis, MN, USA. 153 pp.
- CHRISTIANSEN, M.N.; THOMAS, R.O. 1969. Season long effects of chilling treatments applied to germinating cottonseed. *Crop Science*, 8: 672-673.
- CIC. CONSEJO INTERNACIONAL DE CEREALES. 2015. Producción Mundial 2014/2015. Disponible en: [WWW.rpp.com.pe](http://WWW.rpp.com.pe).
- CIC. CONSEJO INTERNACIONAL DE CEREALES. 2018. Informe Mercado de Cereales. <https://www.igc.int/downloads/gmrsummary/gmrsumms.pdf>
- CÍCERO, S. M.; VIEIRA, R. D. 1994. Teste de frio. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP. p.151-164.
- COIMBRA, R.A.; MARTINS, C.CH.; TOMAZ, C.A.; NAKAGAWA, J. 2009. Testes de vigor utilizados na avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de milho-doce (*sh2*). *Ciência Rural*, Santa Maria, 39(9):2402-2408.
- COPELAND, T.G.; BRUCE, C.F.; MIDYETTE Jr., J.W. 1959. The unofficial application of tetrazolium tests as an aid in checking germination claims. *Proceedings of the Association of Official Seed Analysts*, East Lansing, 49:134-141.
- CRAVIOTTO, R.M.; VARELA, H.G.; FRANCONI, C.R. 1991. Prueba de Tetrazolio. Manual de Evaluación para Semilla de Soja. Publicación Miscelánea Laboratorio de Semillas EEA Oliveros. 32 pp.
- CRAVIOTTO, R.M.; CASTELLARIN, J.M.; PEDROL, H.M. 1992. Utilización de una Prueba de Frío modificada para la evaluación de germinación en maíz (*Zea mays* L.) XIV Seminario Panamericano de Semillas, 19-23 de Octubre 1992, Santa Cruz de la Sierra (Bolivia). p. 15-19.

- CRAVIOTTO, R.M.; ARANGO, M.R.; FARED, M., RAMOS, H. 1998. Factores que influyen en la medición de la Conductividad Eléctrica de Semillas Individuales con el Analizador Automático de Semillas SAD 2007. XVI Seminario Panamericano de Semillas- Buenos Aires Argentina. Actas. p. 26.
- CRAVIOTTO, R.M.; SALINAS, A.R.; ARANGO, M.R.; FERRARI, S.A. 2001. Influencia de propiedades físicas sobre la conductividad eléctrica de semillas individuales de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. INFORMATIVO ABRATES. Asociación Brasileña de Tecnología de Semillas. XII Congreso Brasileño de Semillas. 17 al 20 de setiembre de 2001. Curitiba, Paraná. Brasil. p. 243.
- CRAVIOTTO, R.M. 2006. Influencia de la condición de viabilidad de la capa de células de aleurona sobre la germinación y vigor de semillas híbridas de maíz (*Zea mays* L.). Tesis Doctoral Pacific Western University. 199 pp.
- CRAVIOTTO, R.M.; ARANGO, M.R. 2006. Patrones de trabajo para la Prueba topográfica por Tetrazolio en Poáceas y planillas de registro. Publicación de Capacitación Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros. INTA. 3 pp.
- CRAVIOTTO, R.M.; ARANGO PEREARNAU, M.R.; GALLO, C. 2008. Prueba Topográfica por Tetrazolio en soja. Ed. Guillermo Rolando. 96 pp.
- CRAWFORD, R.M.M. 1978. Metabolic adaptations to anoxia. In: Hook, D.D.; Grawford, R.M.M. (Ed.). Plant life in anaerobic environments. Ann Arbor, Ann Arbor Sciences, p. 119-136.
- CUSTÓDIO, C.C; MACHADO NETO, N.B.; ITO, H.M.; VIVAN, M.R. 2002. Efeito da submersão em agua de sementes de feijão na germinação e no vigor. Revista Brasileira de Sementes, 24(2):49-54.
- CUSTÓDIO, C.C; MACHADO NETO, N.B.; MORENO, E.L.C.; VUOLO, B.G. 2009. Water submersion of bean seeds in the vigour evaluation. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, 4(3):261-266.

- DANTAS, B.F.; ARAGÃO, C.A.; CAVARIANI, C.A.; NAKAGAWA, J.; RODRIGUES, J.D. 2000. Efeito da duração e da temperatura de alagamento na germinação e no vigor de sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, 22(1):88-96.
- DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. 1973. Accelerating ageing technique for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sc. & Technology*, 1:427-452.
- DESAI, B.B.; KOTECHA, P.M.; SALUNKHE, D.K. 1997. *Seed Handbook*. Marcel Dekker. New York, USA, p. 475-477, 528-529, 587-588.
- DeVRIES, M.; GOGGI, A.S.; MOORE, K.J. 2007. Determining seed performance of frost damaged maize seed lots. *Crop Science*, 47:2089-2097.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. 1995. Avaliação da qualidade de sementes de milho. Circular 88. Londrina: IAPAR. 43 pp.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. 1999. Metodología do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: *Vigor de Sementes: Conceitos e Tests*. Ed. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.; FRANÇA NETO, J. Cap. 8.4 p.1-10.
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. *InfoStat versión 2012*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
- DUTRA, A.S.; VIEIRA, R.D. 2004. Envelhecimento acelerado como teste de vigor para sementes de milho e soja. *Ciência Rural*, 34 (3):715-721.
- EARLE, F.R. 1977. Protein and oil content in corn: variation by crops years from 1907 to 1970. *Cereal Chemistry*, 54:70-79.
- ECKHOFF, S.R.; PAULSEN, M.R. 1996. Maize. p. 77-112. In: R.J. Henry y P.S. Kettlewell (eds.) *Cereal Grain Quality*. Chapman and Hall, UK. 324 pp.

- EDMOND, J.B.; DRAPALA, W. 1957. The effect of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. Proceeding of the American Society for Horticultural Science, 71:728-734.
- ELDER, R.H.; OSBORNE, D.J. 1993. Function of DNA synthesis and DNA repair in the survival of embryos during early germination and in dormancy. Seed Science Research 3:43-53.
- ELIAS, S. 2010. Seed quality testing. In: Handbook of Seed Science and Technology. Chapter 20. Basra A.S. Ed. 561-601. 795pp.
- ESPINOSA, V.J.; VALDEZ, L.L.; REYES, V.M.; DE LEON, C.H. 2004. Calidad Nutricional del grano en poblaciones de maíz poliembriónicas. Avances de Investigación, Sección maíz. p. 288-299.
- FAO. 1993. El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición, N° 25. Depósito de documentos de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org>
- FESSEL, S.A.; DELÉO RODRIGUES, T. J.; FAGIOLI, M.; VIEIRA, R.D. 2000. Temperatura e período de exposição no teste de Envelhecimento acelerado em sementes de milho. Revista Brasileira de Sementes, 22(2):163-170.
- FIALA, F. 1981. Aleurone tetrazolium test. In: PERRY, D.A. (ed.). Handbook of vigour test methods. Zürich: International Seed Testing Association, p. 61-65.
- FIALA, F. 1987. Report of the Vigour Test Committee 1983-1986. Seed Science and Technology, 15:507-522.
- FIRA. 2016. Panorama Agroalimentario. Maiz 2016. 40 pp. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama\\_Agroalimentario\\_Ma\\_z\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2016.pdf)

- FOX, S.R, JOHNSON, C.R.; HURBURGH, Jr.; DOESEY-REDDING, C.; BAILEY, T.B. 1992. Relation of grain proximate composition and physical properties to wet-milling characteristics of maize. *Cereal Chemistry*, 69(2):191-197.
- FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A.; KRZYZANOWSKI, F.C. 1994. Seed Production and Technology for the Tropic. In: EMBRAPA-CNPSo. (Ed.) *Tropical Soybean: Improvement and Production*. Rome. FAO. p. 217-240.
- FRANÇA NETO, J.B; KRZYZANOWSKI, F.C.; PEREIRA DA COSTA, N. 1998. El Test de Tetrazolio en Semillas de Soja. EMBRAPA.-CNPSo. Documentos, 117: 72.
- FRANÇA NETO, J.B. 1999. Testes de Tetrazolio para Determinação do Vigor de Sementes: In: *Vigor de Sementes: Conceitos e Testes* Ed. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.; FRANÇA NETO, J. Cap. 8, p.1-7.
- GALINAT, W.C. 2005. Multi-layered expression of aleurone-specific genes. Disponible en: <http://grain.jouy.inra.fr>
- GEAR, J.R.E. 2006. El cultivo de maíz en la Argentina. p. 4-8. En: *Maíz y Nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Recopilación del ILSI Argentina. II*, 80 pp.
- GEAR, J.R.E. 2007a. El Maíz ha recuperado el protagonismo que había perdido. *Horizonte A. Magazine de las Ciencias Agrarias*. Año 3(15). 23 pp.
- GEAR, J.R.E. 2007 b. ESPECIAL MAIZ, CRECIMIENTO EXPLOSIVO. El mundo le juega un pleno al maíz. Disponible en: [www.lanacion.com.ar/destacados/07/maiz/link2.asp](http://www.lanacion.com.ar/destacados/07/maiz/link2.asp).
- GEORGE, D.L.; GUPTA, M.L.; TAY, D.; PARWATA, I.G.M.A. 2003. Influence of planting date, method of handling and seed size on super sweet corn seed quality. *Seed Science & Technology*, 31:351-366.
- GERM, H.; KEITREIBER, M. 1953. Vitalität des Endosperms and Feldaufgang von *Zea mays*. [Viabilidad de los endospermas y calidad en *Zea mays*]. *Bodenkultur* 4. Sonderheft, p.14-16.

- GERM, H.; KEITREIBER, M. 1954. Die Prüfung der Vitalität des Maiskornes. [El ensayo de viabilidad del cariopses de maíz]. Bondenkultur 4. Sonderheft, p. 29-47.
- GLENNER, G.C. 1990. Formazans and tetrazolium salts. In: Biological Stains. Edited by R.D. Lillie, M.D. Sigma Chemical Company. p. 225-235.
- GOGGI, A.S.; POLLAK, L.; GOLDEN, J.; DeVRIES, M.; McANDREWS, G.; MONTGOMERY, K. 2007. Impact of early seed quality selection on maize inbreds and hybrids. *Maydica*, 52: 223-233. Disponible en: <http://www.maydica.org>
- GOGGI, A.S.; CARAGEA, P.; POLLAK, L.; McANDREWS, G.; DeVRIES, M.; MONTGOMERY, K. 2008. Seed quality assurance in maize breeding programs: Tests to explain variations in maize inbreds and populations. *Agronomy Journal*, 100(2):337-343.
- GOODSELL, S.F.; HUEY, G.; ROYCE, R. 1955. The Effect of Moisture and Temperature During Storage and Cold Test Reaction of *Zea mays* Seed Stored in Air, Carbon Dioxide or Nitrogen. *Agronomy Journal*, 47:61-64.
- GRANADOS, G. 2001. Manejo poscosecha. En: *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Depósito de Documentos de la FAO. Disponible en: [www.fao.org/docrep](http://www.fao.org/docrep)
- GRZYBOWSKI, C.R.S. 2012. Respostas de sementes de milho a testes alternativos de vigor. Tesis Mestre en Ciências. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 46 pp.
- GÜEMES, V.N.; HERNANDEZ, F.A.D.; REYES, S.M.I.; AQUINO, B.E.N.; ESPINDOLA, M; DAVILA, O.G.; MERCADO, S.E. 2003. Caracterización física, química y estructural de 4 variedades de elotes de color de la región del Valle de Tulancingo Hidalgo. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y II Foro de Ciencia y Tecnología de alimentos, Guanajuato, México.
- GUTORMSON, T.J. 1992. Fast Green Test for Corn. Soybean Seed Quality Evaluation Workshop. Seed Testing Laboratory, Seed Science Center. Iowa State University, University Extension. p. 50.

- GUTORMSON, T.J. 1995. Soil Cold Test – USA Perspective. Vigour Test Comittee. Seed Vigour Testing Seminar. Copenhagen, Denmark. Ed. H. A. van der Venter. ISTA p. 29-33.
- HAMPTON, J.G.; COOLBEAR, P. 1990. Potential versus actual seed performance can vigour testing provide and answer? *Seed Science and Technology*, 18:215-228.
- HAMPTON, J.G.; JOHSTONE, K.A.; EUA-UMPON, V. 1992. Ageing Vigour Test for Mungbean and French bean seed lots. *Seed Science & Technology*, 20:643-653.
- HAMPTON, J.G.; TEKRONY, D.M. 1995. Handbook of Vigour Test Methods. ISTA Vigour Test Committee. 3er. Edition. 117 pp.
- HARRINGTON, J.K. 1972. Seed storage and longevity. In: *Seed biology Vol III* (T.T. Kozlowski, Ed.). Academic Press, New York. 145 pp.
- HEIN, N.E.; MOSCONI, F.P.; PANIGATTI, J.L. 1980. Mapa detallado de suelos de la EEA Oliveros (Santa Fe). Publicación miscelánea N°6. INTA. EEA RAFAELA. 40 pp.
- HEPBURN, H.A.; POWELL, A.A.; MATTHEWS. S. 1984. Problems associated with the routine application of electrical conductivity measurements of individual seeds in the germination testing of pea and soybean. *Seed Science & Technology*, 12:403-413.
- HERNÁNDEZ, X. 2018. Caen las estimaciones de la cosecha 2017/2018, se prevén 46,5 Mt de soja y 35 Mt de maíz. <http://www.infocampo.com.ar/cen-las-estimaciones-de-la-cosecha-20172018-se-preven-465-mt-de-soja-y-35-mt-de-maiz/>
- HIBBARD, R.P.; MILLER, E.V. 1928. Biochemical Studies on Seed Viability. I. Measurements of Conductance and Reduction. *Plant Physiology*, 3:335-352.
- HOPE, E.P. 1953. Infection of corn seedlings. In: *The yearbook of Agriculture United States Department of Agriculture*. Ed. USA p. 377-392.
- HOPPE, P.E. 1956. Correlation between corn germination in laboratory cold tests and stand in the field. *Plant Disease Reporter*, 40. p. 887-889.

- HUELSEN, W.A.; BROWN, W.N. 1952. Physical damage to sweet corn caused by mechanical harvesting and subsequent processing. III. Agr. Exp. Sta. Bul. 561. 48 pp.
- IBRAHIM, A.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. 1994. Accelerating Ageing Techniques for Evaluating Sorghum Seed Vigour. Journal of Seed Technology, 17:29-37.
- ILBI, H.; KAVAK, S.; ESER, B. 2009. Cool germination test can be an alternative vigour test for maize. Seed Science & Technology, 37(2):516-519.
- ILSI Argentina. 2006. Perfil de la composición de la producción del maíz cultivado en la Argentina. p. 51-55 En: Maíz y Nutrición. Informe sobre usos y las propiedades del maíz para la alimentación humana y animal. Recopilación de ILSI Argentina. Serie de Informes Especiales. II, 80 pp.
- INASE. Instituto Nacional de Semillas. 2009. Protocolos de trabajo para Laboratorios Acreditados. Comunicación institucional.
- INTA. 2009. Boletín Metereológico de la EEA Oliveros. Disponible en: [www.inta.gob.ar/Oliveros/meterología](http://www.inta.gob.ar/Oliveros/meterología).
- INTA. 2010. Boletín Metereológico de la EEA Oliveros. Disponible en: [www.inta.gob.ar/Oliveros/meterología](http://www.inta.gob.ar/Oliveros/meterología).
- IRAM. 2001. Norma IRAM 15850-2. Cereales. Determinación del contenido de humedad. Parte 1. Método de rutina para maíz. Ed.1. 10 pp.
- IRAM. 2001. Norma IRAM 15851. Cereales. Trigo y subproductos. Determinación de Cenizas. Ed.3. 9 pp.
- ISELY, D. 1950. The cold test for corn. Proceedings of International Seed Testing Association, 16:299-311.
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 1981. Handbook of Vigour Test Methods. Ed. Perry, D.A. P.O. Box 308, 8303, Bassersdorf. 71 pp.

- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 1987. Handbook of Vigour Test Methods. Ed. Fiala, F. P.O. Box 308, 8303, Bassersdorf. 90 pp.
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 1995. Handbook of Vigour Test Methods. Ed. Fiala, F. P.O. Box 308, 8303, Bassersdorf. 100 pp.
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2003. ISTA Handbook on Seedling Evaluation. 3<sup>a</sup> Edition by Ronnie Don. ISTA Bassersdorf, CH- Switzerland. 300 pp.
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2003. ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing. v. I. Agricultural, Vegetable y Horticultural Species. Eds. Leist, N.; Kramer, S.; Jonitz, A. Bassersdorf, CH-Switzerland. 200 pp.
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2007. International Rules for Seed Testing. Zurich. 300 pp.
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2015. International Rules for Seed Testing. Zurich. 276 pp.
- IZQUIERDO, N.G.; CIRILO, A.G. 2013. Usos del maíz. Efectos del ambiente y del manejo sobre la composición del grano. Jornada de Actualización Calidad del grano de maíz para la industria y la producción en bovinos. Balcarce. 83-92.  
[http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/47599/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/47599/Documento_completo.pdf?sequence=1)
- JELLUM, M.D.; MARION, J.E.1966. Factors affecting oil content and oil composition of corn (*Zea mays*) grain. Crop Science, 6:41-42.
- JENNINGS, S. D.; MYERS, D. J; JOHNSON, L. A.; POLLAK, L. M. 2002. Effect of maturity on grain quality and wet-milling properties of two selected corn hybrids. Cereal Chemistry, 79(5):697-702.
- JUSTICE, O.L.; BASS, L.N. 1978. Principles and practices of seed storage. Agriculture Handbook N° 506. Science and Education Administration's Federal Research. 289 pp.

- KATO YAMAKAKE, T.A.; MAPES SANCHEZ, C.; MERA OVANDO, L.M.; SERRATOS HERNANDEZ, J.A.; BYE BOETTLER, R.A. 2009. Origen y diversificación del maíz. Una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma De México. UNAM. 119 pp. Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/>.
- KEITREIBER, M. 1975. Vitalitätsprüfung der Aleuronzellen des Endosperms von *Zea mays* (Aleuron-Tetrazolium Test). [Ensayo de Viabilidad de las células de aleurona de endospermas de maíz]. *Seed Science & Technology*, 3: 803-809.
- KOEHLER, B. 1957. Pericarp Injuries in Seed Corn. III. *Agr. Esp. Sta. Bull.* p. 617- 71.
- KOZLOWSKI, T.T.; PALLARDY, S.G. 1997. Growth control in woody plant. American Press: San Diego. 254 pp.
- KOZLOWSKI, T.T. 1999. Responses of woody plants to flooding and salinity. Disponible en: <http://www.heteronpublishing.com>
- KRZYZANOWSKY, F.C.; FRANÇA NETO, J.B; HENNING, A. A. 1991. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. *Informativo ABRATES*, 1(2):15-50.
- LEIBOVITS, Z.; RUCKENSTEIN, C. 1983. Our experiences in processing maize (corn) germ oil. *Journal of American Chemistry Society*, 60:395-399.
- LEY 19587.1972. Sobre Higiene y Seguridad en el Trabajo. p. 53. [http://www.fcnym.unlp.edu.ar/uploads/docs/ley\\_19587\\_sobre\\_higiene\\_y\\_seguridad\\_en\\_el\\_trabajo.pdf](http://www.fcnym.unlp.edu.ar/uploads/docs/ley_19587_sobre_higiene_y_seguridad_en_el_trabajo.pdf)
- LEY 24557. 1995. Riesgo de Trabajo. <http://infoleg.mecon.gov.ar>
- LOVATO, A.; BALBONI, N. 2003. Seed Vigour in Maize (*Zea mays* L.): Two-Year Laboratory and Field Test Compared. *Italian Journal Agronomy*, 1(1):1-6.
- LOVATO, A.; NOLI, E., LOVATO, A.F.S. 2005. The relationship between cold test temperatures, accelerated ageing test and field emergence of maize seed. *Seed Science & Technology*, 33(1):249-253.

- MANCERA RICO, A.; GARCÍA DE LOS SANTOS, G.; CARBALLO CARBALLO, A.; VILLASEÑOR PEREA, C.A.; MARTINEZ GARZA, A.; ESTRADA TREJO, V. 2007. Calidad Fisiológica y Daño Físico en semilla de maíz sometida a Impacto. *Agricultura Técnica México*, 33(2):125-133.
- MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W.R. 1987. *Avaliação da qualidade das sementes.* Piracicaba: ESALQ. 230 pp.
- MARCOS FILHO, J. 1999 a. Teste de Vigor: Importância e Utilização. In: *Vigor de Sementes: conceitos e testes.* (Ed.) KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES. Cap. 1, p. 1-21.
- MARCOS FILHO, J. 1999 b. Teste de Envelhecimento acelerado. In: *Vigor de Sementes: conceitos e testes.* (Ed.) KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES. Cap. 3, p.1-24.
- MARTIN, B.A.; CERWICK, S.F.; REDING, L.D. 1991. Physiological basis for inhibition of maize seed germination by flooding. *Crop Science*, 31:1052-1057.
- MARTINELLI-SENEME, A.; ZANOTTO, M.D.; NAKAGAWA, J. 2000. Efeito da forma e do tamanho da semente na produtividade do milho cultivar AL-34. *Revista Brasileira de Sementes, Brasilia*, 22(1):323-238.
- MATTHEWS, S.; BRADNOCK, W.T. 1967. The Detection of Seed Sample of Wrinkled-seeded peas (*Pisum sativum* L.) of Potentially Low Planting Value. *Proceedings of the International Seed Testing Association*, 32:553-563.
- McDONALD, M.B. 1988. Challenges in seed Technology. In: *Seed Technology Conference.* 10, Ames, Proceedings. Ames: Iowa State University. p. 11-31.
- McDONALD, M.B.; NELSON, C.J. Eds. 1986. *Physiology of seed deterioration: USA*, Md. Wisconsin. 123 pp.

- McDONALD, M.; GUTORMSON, T.; TURNIPSEED, B. 2001. SEED TECHNOLOGIST TRAINING MANUAL. "Proficiency and professionalism Through Training". Society of Commercial Seed Technologists. 385 pp.
- MENDEZ-MONTEALVO, G.; SOLORZA, F.J.; VELASQUEZ, V.M.; GOMEZ, M.N.; PAREDES, L.O.; BELLO, P.L.A. 2005. Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades de maíz cultivadas en México. *Agrociencia*, 39:267-274.
- MÉNDEZ-NATERA, J.R.; YSAVIT-MARCANO, L.; MERAZO-PINTO, J.F. 2007. Efecto de la inmersión de semillas de maíz (*Zea mays* L.) en agua a 100 °C sobre la germinación y crecimiento de plántulas bajo condiciones de laboratorio. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 10(2):56-64.
- MENEZES, D.; GOMES, A.C.S.; GUIMARÃES, R.M. 1991. Influência do tamanho da sementes de milho (*Zea mayz* L.) na sua qualidade fisiológica. In *Informativo ABRATES*, Londrina, 1(4): 36. Edição do VII Congresso Brasileiro de Sementes, Foz do Iguaçú, PR.
- MESTRES, C.A.; LOUIS-ALEXANDRE, M.F.; LAHLOU, A. 1991. Dry-Milling properties of maize. *Cereal Chemistry*, 68(1):51-56.
- MOES, J.; VYN, T.J. 1988. Management effects on kernel breakage susceptibility of early maturing corn hybrids. *Agronomy Journal*, 80:699-704.
- MOLINA, J.C.; IRIGON, D.L.; ZONTA, E.P. 1987. Comparação entre metodologías do teste de frio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho (*Zea mays* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, 9(3):77-85.
- MONTGOMERY, D.C. 2004. *Diseño y Análisis de Experimentos*. 2° Edición. 692 pp. Disponible en: <https://wwwyyy.files.wordpress.com>.
- MOORE, R.P. 1973. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: Heydecker, W. Ed. *Seed Ecology*. London: Butterworth, p. 347-366.

- MOORE, R.P. 1985. Handbook on Tetrazolium Testing. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland. 99 pp.
- MOREIRA, C.N; NAKAGAWA, J. 1979. Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção. Fundação Cargill. Campinas. SP. Brasil. 424 pp.
- MUNSELL. 1975. Standart Soil Color Charts. [www.academia.edu/5194213/tabla-munsell-digital](http://www.academia.edu/5194213/tabla-munsell-digital)
- MUÑOZ, H.J.A. 2007. Rendimiento de grano y su relación con el tamaño de semilla y la profundidad de siembra en seis variedades de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 81 pp.
- NAFZIGER, E. D. 2003. Chapter 9. Seed. Diponible en: [http://iah.aces.uiuc.edu/pdf/Agronomy\\_HB/09chapter.pdf](http://iah.aces.uiuc.edu/pdf/Agronomy_HB/09chapter.pdf).
- NAKAGAWA, J. 1999. Testes de Vigor Baseados no Desempenho das Plantas. In Vigor de Sementes conceitos e testes. (Ed.) KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES, p. 21- 24.
- NIJENSTEIN, J.H. 1995. Cold Test – European Perspective. Vigour Test Committee. Seed Vigour Testing Seminar Copenhagen, Denmark. Ed. H. A. van de Venter. ISTA. p. 34-52.
- ORTÍZ PRUDENCIO, S. 2006. Determinación de la composición química proximal y fibra dietaria de 43 variedades criollas de maíz de 7 municipios del Sureste del Estado de Hidalgo. México. Universidad Autónoma, Pachuca de Soto, México. Tesis de Licenciado en Nutrición. 79 pp. Disponible en: <http://repository.uaeh.edu.mx>
- OSBORNE, D.J. 1982. Deoxyribonucleic acid integrity and repair in seed germination: the importance in viability and survival. In: A. A. Khan Ed., The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. 435-463. Elsevier Biomedical press, Amsterdam.
- OSBORNE, D.J. 1983. Biochemical control of systems operating in de early hours of germination. Candian Jornal of Botany. 61:3568-3577.

- OSPINA MACHADO, J, E. 2001. Características físico mecánicas y análisis de calidad de granos. Facultad de Ingeniería Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Disponible en: <https://books.google.com.ar/books.c>
- PALIWAL, R.L.; GRANADOS, G.; LAFITTE H.R.; VIOLIC, A.D. 2001. EL maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Depósito de Documentos de la FAO. Disponible en: [www.fao.org/docrep](http://www.fao.org/docrep)
- PERES, W. L. R. 2010. Testes de Vigor em sementes de milho. Tesis de Mestre em Agronomia- Área de Concentração em Produção e Tecnologia de Sementes. UNESP, Campus de Jaboticabal, SÃO PAULO - BRASIL. 50 pp. Disponible en: <http://www.agrolink.com.br/downloads>
- PEREZ DE LA CERDA, F.; CARBALLO, A.C.; VARELA, A.S; LIVERA, A.H.; MORENO, C.M. 2007. Calidad Fisiológica en Semillas de maíz con diferencias estructurales. Agricultura Técnica en México, 33(1):53-61.
- PERRY, D. A. 1987. Topographical Tetrazolium Test. In: Handbook of Vigour Test Methods, 2<sup>nd</sup>. Ed. International Seed Testing Association, Zurich, p. 57-60.
- PETERSON, J.M.; PERDOMO, J.A.; BURRIS, J.S. 1995. Influence of kernel position, mechanical damage and controlled deterioration on estimates of hybrid maize seed quality. Seed Science & Technology, 23: 647-657.
- POPINIGIS, F. 1985. Fisiologia de Sementes. Brasília: Agriplan. 289 pp.
- POWELL, A.A. 1988. Seed vigour and field establishment. Advances in Research and Technology of Seed, 11:29-61.
- POWELL, A.A. 2010. Seed vigor and its assessment. In: Handbook of Seed Science and Technology. Chapter 21. Basra A.S. Ed. 603-648. 795pp.

- RESOLUCIÓN MERCOSUR/GMC/RES N° 60/97. 1997. "Estándar para Acreditación, Habilitación, Funcionamiento, Inspección, Auditoría y Pruebas de referencia de Laboratorios de Análisis de Semillas", en lo referente a Laboratorios de Análisis de Semillas (LAS) y al Boletín de Análisis de Semillas/Certificado de Análisis de Semillas (BAS/CAS). Disponible en: <http://www.inase.gov.ar>.
- RICHARD, B.; RIVOAL, J.; SPITERI, A.; PRADET, A. 1991. Anaerobic stress induce the transcription and translation of sucrose synthase in rice. *Plant Physiology*, 95(3):669-674.
- RITCHIE, S.; HANWAY, J. J. 1982. How a corn plant develops? Iowa State Univ. Technol. Spec. Rep., 48 pp.
- ROBERTS, E.H. 1972 a. Viability of seeds. Chapman and Hall, London. 448 pp.
- ROBERTS, E.H. 1972 b. Cytological, genetical and metabolic changes associated with loss of viability. In E.H. Roberts Ed. Viability of seeds, 253-306. Chapman and Hall, London.
- ROBUTTI, J. 2004. Calidad y Usos del Maíz. Cereales: Maíz. Revista IDIA XXI. Año IV, N° 6: 100-104. Disponible en: [www.inta.gov.ar/ediciones/idia/cereales/maiz03.pdf](http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/cereales/maiz03.pdf).
- ROSS, E. E.; MOORE III, F.F. 1975. Effect of seed coating on performance of lettuce seeds in greenhouse soil test. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 100(5):573-576.
- ROSSI, D. 2007. Evolución de los cultivares de maíz utilizados en la Argentina. REVISTA AGROMENSAJES N° 22, 08/2007. Facultad de Ciencias Agrarias UNR. Disponible en: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/22/1AM22.htm>.
- SAGPyA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 1997. Resolución 557/97. Norma de calidad para la comercialización de maíz. Norma XII. Disponible en: <http://viejaweb.senasa.gov.ar/Archivos/File/File4230-ry-1075-94.pdf>.
- SAGPyA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 2008. Disponible en: <http://www.sagpya.gov.ar>> MAIZ Informe General <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/>

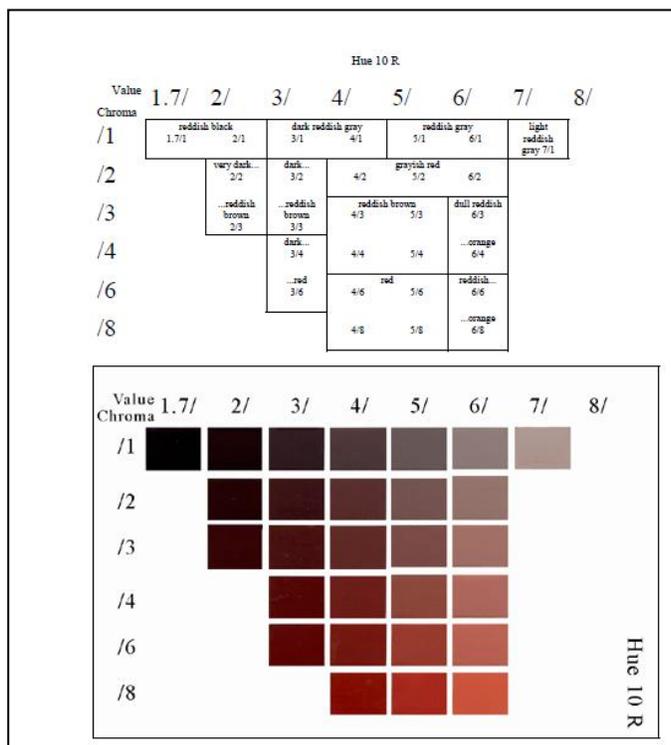
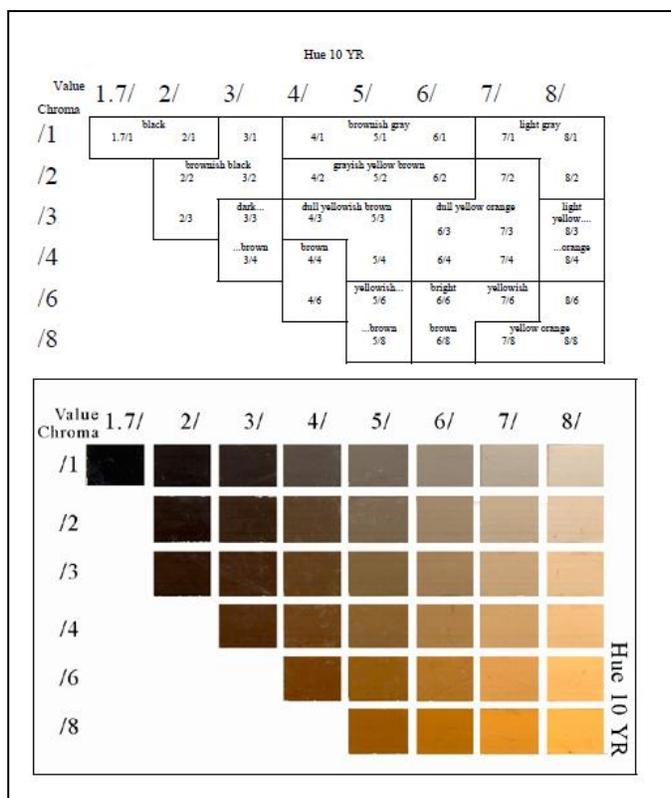
- SALINAS, A.R. 1996. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) durante o armazenamento. Tese Doutor em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas. 115 pp.
- SALINAS, A.R.; SANTOS, D.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS F<sup>o</sup>, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. 1998. "Fisiologia da deterioração em sementes de soja durante o armazenamento". *Revista Científica Rural, Bagé, RS-Brasil*, 3(2):106-118.
- SALINAS, A.R.; YOLDJIAN, A.M.; CRAVIOTTO, R.M.; BISARO, V. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja (*Glycine max* L. Merr.). *Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Brasilia. Brasil*, 36(2):371-379.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica S.A de C.V. Nebraska 199. Col. Nápoles, C.P. 03810 México, D.F. 759 pp.
- SATORRE, E.H.; BENECH ARNOLD, R.; SLAFER, G.A.; DE LA FUENTE, E.B.; MIRALLES, D.J.; OTEGUI, M.E.; SAVIN, R. 2003-2004. *Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo*. Ed. Pascale, A. J. Editorial Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires. 783 pp.
- SERRATOS HERNANDEZ, J.A. 2012. *El origen y la diversidad del maíz en el continente Americano*. 2° Ed. Greenpeace MÉXICO. 40 pp. Disponible en: <http://www.greenpeace.org/mexico>.
- SHAH, F.S.; WATSON, C.E.; CABRERA, E.R. 2002. Seed vigor testing of subtropical corn hybrids. *Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station*, 23:1-6.
- SHIEH, W.J.; MC DONALD, M.B. 1982. The influence of seed size, shape and treatment on inbred seed corn quality. *Seed Science & Technology*, 10:307-313.
- SILVA, J.B.C.; NAKAGAWA, J. 1995. Estudo de fórmulas para cálculo da velocidade de germinação. *Informativo ABRATES*, 5(1):62-74.

- SMITH, M.T.; BERJAK, P. 1995. Deteriorative Changes Associated with the Loss of Viability of Stored Desiccation-Tolerant and Desiccation –Sensitive Seeds. p. 701-745. In: Kigel, J.; Galili, G. 1995. Eds. Seed Development and Germination. New York: Marcel Decker, Inc. 852 pp.
- STEERE, W.C.; LEVENGOOD, W.C.; BONDIE, J.M. 1981. An Electronic Analyzer for Evaluating Seed Germination and Vigour. *Seed Science and Technology*, 9:567-576.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2006. *Fisiología Vegetal*. Vol.2. Castello de la Plana. Publicaciones de la Universitat Jaume I. DL. 1343 pp.
- TEKRONY, D.M. 1993. Accelerated ageing test. *Journal of Seed Technology*, 17:110-120.
- TERRAZAS, L.F. 2007. Deterioro de semillas de maíz por insectos de almacén: Oportunidad de cosecha y condiciones de manejo en almacenamiento. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colección de Postgraduados Montecillo. México. 129 pp.
- THEODORO, J. V. C. 2013. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de soja pelos testes de pH do exsudato, alagamento e índice de resistência ao enrugamento. Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul Câmpus De Chapadão Do Sul. Programa De Pós-Graduação Em Agronomia. Mestrado Em Produção Vegetal. Tesis. 52 pp.
- TORRES, S.B. 1998. Testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, 20(1):55-59.
- USTARROZ, F.; SAAVEDRA, A.; ERRASQUIN, L.; BRAGACHINI, M.; CASINI, C.; MENDEZ, J. 2010. MAÍZ Cadena de Valor Agregado. Alternativas de transformación e industrialización. Actualización Técnica N° 54. Ediciones INTA PRECOP II. 33 pp.
- VAZQUEZ, E.; MONTIEL, F.; VAZQUEZ-RAMOS, J.M. 1991. DNA ligase activity in deteriorated maize embryonic axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seeds to loss of germinability. *Seed Science Research* 1:269-273.

- VENANCIO, L.P.; LOPES, J.C.; MACIEL, K.S.; COLA, M.P.A. 2012. Teste do envelhecimento acelerado para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 8(14):899-906.
- VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. 1999. Teste de Condutividade Eléctrica. In: Vigor de Sementes: conceitos e testes. (Ed.) KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES. Cap. 4, p. 1-20.
- VILORIA, H; MÉNDEZ NATERA, J.R. 2011. Relación entre la conductividad eléctrica, pH del agua de remojo, germinación de semillas y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mayz* L.) bajo dos condiciones experimentales. Scientia Agropecuaria, 2:213-228.
- VILLIERS, T.A. 1974. Seed ageing: chromosome stability and extended viability of seed stored fully imbibed. Plant Physiology 53:875-878.
- WATSON, S.A. 1987. Structure and composition. In: S.A. Watson y P.E. Ramstad. Eds. Corn: chemistry and technology, p. 53-82. St. Paul, EE.UU., Am. Assoc. Cereal Chem.
- WILSON, D.O., Jr.; ALLEYNE, J.C.; SHAFIL, B.; MOHAN, S.K. 1992. Combining Vigour Test Results for Prediction of Final Stand of shrunken-2 Sweet Corn Seed. Crop Science, 32: 1496-1502.
- WHITE, P.J., JOHNSON, L.A. 2003. Corn chemistry and technology. 2° Ed. American Association of Cereal Chemists. Inc. St, Paul, Minnesota, USA. 892 pp.
- ZEPEDA, J.E.B. 2010. Calidad física y fisiológica en semilla de híbridos de maíz de los Valles Altos Centrales de México y su relación con el establecimiento en campo. Tesis de Maestría. Montecillo Texcoco, México. 108 pp. Disponible en: <http://www.biblio.colpos.mx:8080>.

## **ANEXOS**

### ANEXO 1: Tabla MUNSSELL DIGITAL



[https://www.academia.edu/5194213/tabla\\_munsell\\_digital](https://www.academia.edu/5194213/tabla_munsell_digital)

**Anexo 2: Datos climáticos**

Boletín mensual Estación Meteorológica Convencional EEA Oliveros							
Datos climáticos de <b>noviembre 2009</b>							
Día	Temperaturas en abrigo			Temperaturas del suelo			Pluviómetro mm
	máxima	mínima	media	5 cm	10 cm	20 cm	
1	30,5	22,8	26,7	23,2	22,9	X	
2	36,8	20,0	28,4	22,0	22,3	X	0,3
3	23,5	15,0	19,3	19,8	20,4	X	
4	23,6	17,5	20,6	19,7	20,0	X	
5	26,8	12,8	19,8	19,3	19,4	X	
6	28,0	18,8	23,4	22,1	21,5	X	8,4
7	23,0	13,9	18,5	17,3	18,6	X	
8	24,0	10,2	17,1	16,6	17,2	X	
9	27,0	10,8	18,9	18,1	17,7	X	
10	25,4	10,8	18,1	18,8	18,4	X	
11	27,5	11,8	19,7	18,8	18,5	X	
12	31,0	15,5	23,3	20,5	19,6	X	
13	33,9	21,2	27,6	23,4	22,7	X	4,5
14	29,8	19,9	24,9	21,9	22,1	X	
15	24,1	19,0	21,6	21,7	21,7	X	2,2
16	29,5	18,9	24,2	20,2	19,6	X	
17	29,0	22,5	25,8	23,7	23,2	X	3,7
18	27,5	21,2	24,4	21,7	22,0	X	49,5
19	26,5	18,0	22,3	21,4	21,7	X	
20	28,3	16,8	22,6	20,8	21,1	X	
21	25,8	19,9	22,9	21,4	21,6	X	
22	27,5	20,5	24,0	22,5	22,5	X	4,9
23	30,0	22,1	26,1	22,7	23,0	X	
24	30,5	23,0	26,8	23,7	23,8	X	
25	30,7	23,2	27,0	25,9	25,2	X	1,0
26	28,5	21,0	24,8	24,0	24,3	X	
27	23,9	21,8	22,9	24,0	23,7	X	0,5
28	27,3	17,9	22,6	21,4	21,9	X	
29	29,8	22,8	26,3	24,8	24,4	X	17,6
30	27,0	14,0	20,5	20,9	21,4	X	
31							
<b>Media</b>	<b>27,9</b>	<b>18,1</b>	<b>23,0</b>	<b>21,4</b>	<b>21,4</b>	<b>X</b>	<b>92,6</b>

Boletín mensual Estación Meteorológica Convencional EEA Oliveros							
Datos climáticos de <b>setiembre 2010</b>							
Día	Temperaturas en abrigo			Temperaturas del suelo			Pluviómetro mm
	máxima	mínima	media	5 cm	10 cm	20 cm	
1	11,0	10,0	10,5	12,5	12,5	13,0	1,8
2	11,9	6,5	9,2	10,0	10,3	10,7	8,6
3	11,0	8,3	9,7	11,0	11,4	11,8	
4	19,2	7,9	13,6	10,2	10,5	11,4	
5	25,2	3,0	14,1	8,6	9,5	11,1	
6	25,0	7,5	16,3	10,5	11,0	12,2	
7	26,0	8,0	17,0	11,6	12,0	12,9	
8	26,8	10,0	18,4	12,7	12,9	13,7	
9	28,3	13,0	20,7	14,0	14,0	14,4	
10	25,5	16,8	21,2	16,1	16,0	15,6	10,5
11	23,0	12,0	17,5	14,0	14,3	15,2	
12	19,8	8,9	14,4	11,7	12,2	14,0	
13	16,0	11,1	13,6	13,0	13,4	14,1	
14	21,0	6,9	14,0	10,3	10,9	12,6	
15	24,0	7,9	16,0	10,0	11,0	13,0	
16	25,1	9,9	17,5	12,2	12,4	13,6	
17	18,8	12,0	15,4	13,4	14,0	15,0	
18	22,4	7,9	15,2	11,7	12,2	13,9	
19	26,0	10,8	18,4	13,2	13,4	14,6	
20	28,8	12,5	20,7	14,5	14,6	15,4	
21	18,5	15,8	17,2	16,5	16,5	16,8	5
22	20,0	12,2	16,1	14,3	14,3	15,3	7,1
23	21,5	11,5	16,5	13,0	13,6	15,0	
24	21,0	9,9	15,5	13,0	13,4	15,0	
25	23,9	12,4	18,2	15,7	15,2	15,4	
26	26,2	13,8	20,0	16,5	15,8	16,0	
27	19,2	13,8	16,5	16,1	16,3	17,0	12,3
28	18,1	11,0	14,6	14,4	14,5	16,0	
29	19,8	12,9	16,4	14,3	14,5	15,2	
30	21,5	4,0	12,8	10,8	11,1	13,5	
31							
<b>Media</b>	<b>21,5</b>	<b>10,3</b>	<b>15,9</b>	<b>12,9</b>	<b>13,1</b>	<b>14,1</b>	<b>45,3</b>

### Anexo 3: Análisis Estadísticos

#### ANEXO CAPÍTULO 1: Descripción de la calidad inicial de semillas de seis lotes de híbridos comerciales de maíz

Todos los resultados siguientes se obtuvieron con el software Infostat.

##### Identificación de los híbridos (LOTE)

- |               |                |
|---------------|----------------|
| 1- L1: AX 820 | 4- L4: AX 892  |
| 2- L2: AX 882 | 5- L5: AX 894  |
| 3- L3: AX 886 | 6- L6: AX 1013 |

#### 1- PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS HÍBRIDOS

##### 1.1 Determinación del Contenido de Humedad %

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	LOTE	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Respuesta	1,00	2	14,65	0,35	14,65	10,48	0,0618
Respuesta	2,00	2	13,60	0,09	13,60		
Respuesta	3,00	2	14,83	0,11	14,83		
Respuesta	4,00	2	13,13	0,06	13,13		
Respuesta	5,00	2	15,32	0,08	15,32		
Respuesta	6,00	2	12,69	0,07	12,69		

No significativo.

##### 1.2 Peso de 1000 cariopses

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso de mil	respuesta	48	0,99	0,99	1,10

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	93302,79	5	18660,56	1665,75	<0,0001
Lote	93302,79	5	18660,56	1665,75	<0,0001
Error	470,50	42	11,20		
Total	93773,29	47			

### 1.3 Prueba de verde rápido

#### 1.3.1 Daño mecánico leve

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% DAÑO leve	respuesta	24	0,83	0,78	25,11

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13979,33	5	2795,87	17,16	<0,0001
Lote	13979,33	5	2795,87	17,16	<0,0001
Error	2932,00	18	162,89		
Total	16911,33	23			

#### 1.3.2 Daño mecánico moderado

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% DAÑO Moderado	respuesta	24	0,84	0,79	49,21

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7622,00	5	1524,40	18,39	<0,0001
Lote	7622,00	5	1524,40	18,39	<0,0001
Error	1492,00	18	82,89		
Total	9114,00	23			

#### 1.3.3 Daño mecánico severo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% DAÑO Severo	respuesta	24	0,74	0,67	32,32

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5005,33	5	1001,07	10,19	0,0001
Lote	5005,33	5	1001,07	10,19	0,0001
Error	1768,00	18	98,22		
Total	6773,33	23			

## 1.4- Pruebas de Germinación. Conteo anticipado, Primer conteo y Conteo final

### 1.4.1 Conteo anticipado (3 días)

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Conteo anticipado	respuesta	24	0,83	0,79	14,06

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7644,00	5	1528,80	18,03	<0,0001
Lote	7644,00	5	1528,80	18,03	<0,0001
Error	1526,00	18	84,78		
Total	9170,00	23			

### 1.4.2 Primer conteo (4 días)

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Primer conteo	respuesta	24	0,79	0,73	10,30

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4243,33	5	848,67	13,61	<0,0001
Lote	4243,33	5	848,67	13,61	<0,0001
Error	1122,00	18	62,33		
Total	5365,33	23			

### 1.4.3 Conteo final (7 días) Prueba de germinación estándar

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

**1.5- Prueba topográfica por tetrazolio**

**1.5.1 Viabilidad**

Análisis de la varianza

Prueba	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
% Viabilidad	24	0,99	0,99	3,47	

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	17096,83	5	3419,37	387,10	<0,0001
Lote	17096,83	5	3419,37	387,10	<0,0001
Error	159,00	18	8,83		
Total	17255,83	23			

**1.5.2 Vigor**

Análisis de la varianza

Prueba	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
% Vigor	24	0,99	0,99	3,86	

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18467,33	5	3693,47	353,63	<0,0001
Lote	18467,33	5	3693,47	353,60	<0,0001
Error	188,00	18	10,44		
Total	18655,33	23			

**1.5.3 Viabilidad: Nivel semillas viables sin defectos**

Análisis de la varianza

Prueba	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
% Viable sin defectos	24	0,98	0,97	6,89	

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20008,83	5	4001,77	151,65	<0,0001
Lote	20008,83	5	4001,77	151,65	<0,0001
Error	475,00	18	26,39		
Total	20483,83	23			

## 1.6 Prueba de tetrazolio de aleurona

### 1.6.1 PTZA análisis por superficie teñida

#### Superficie teñida a >75%

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
>75%	24	0,96	0,95	17,15

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	36182,83	5	7236,57	92,45	<0,0001
Lote	36182,83	5	7236,57	92,45	<0,0001
Error	1409,00	18	78,28		
Total	37591,83	23			

#### Superficie teñida entre 75 - 50%

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
75 - 50%	24	0,97	0,96	22,75

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14779,33	5	2955,87	106,41	<0,0001
Lote	14779,33	5	2955,87	106,41	<0,0001
Error	500,00	18	27,78		
Total	15279,33	23			

### Superficie teñida < 50%

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
<50 %	24	0,89	0,86	43,53

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13004,83	5	2600,97	28,15	<0,0001
Lote	13004,83	5	2600,97	28,15	<0,0001
Error	1663,00	18	92,39		
Total	14667,83	23			

### Superficie sin teñir %

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
sin teñir%	24	0,61	0,51	165,95

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	819,26	5	163,85	5,73	0,0025
Lote	819,26	5	163,85	5,73	0,0025
Error	514,67	18	28,59		
Total	1333,93	23			

## 1.6.2 PTZA análisis por color

### Sin teñir

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
st100	24	0,61	0,51	166,68

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	819,21	5	163,84	5,73	0,0025
Lote	819,21	5	163,84	5,73	0,0025**
Error	514,75	18	28,60		
Total	1333,96	23			

### Naranja pálido

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Naranja pálido	24	0,71	0,63	66,89

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20925,21	5	4185,04	8,97	0,0002
Lote	20925,21	5	4185,04	8,97	0,0002**
Error	8397,75	18	466,54		
Total	29322,96	23			

### Naranja

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Naranja	24	0,40	0,23	140,87

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7043,00	5	1408,60	2,39	0,0794
Lote	7043,00	5	1408,60 (1)	2,39	0,0794
Error	10629,50	18	590,53 (2)		
Total	17672,50	23			

### Naranja Intenso

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Naranja Intenso	24	0,43	0,27	123,29

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7173,83	5	1434,77	2,71	0,0539
Lote	7173,83	5	1434,77	2,71	0,0539
Error	9533,50	18	529,64		
Total	16707,33	23			

## Rojo

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Rojo	24	0,65	0,55	106,73

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15126,38	5	3025,28	6,56	0,0012
Lote	15126,38	5	3025,28	6,56	0,0012
Error	8304,25	18	461,35		
Total	23430,63	23			

## Rojo Intenso

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
TZA rojo intenso	arco seno raíz	24	0,53	0,40	170,23

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,49	5	0,30	4,03	0,0125
Lote	1,49	5	0,30	4,03	0,0125
Error	1,33	18	0,07		
Total	2,83	23			

## Rojo oscuro Transformación arco sen $\sqrt{x}$

(Para esta variable más del 50% de las observaciones son 0)

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
TZA rojo oscuro	arco seno raíz	24	0,42	0,26	301,28

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	5	0,02	2,64	0,0582
Lote	0,08	5	0,02	2,64	0,0582
Error	0,11	18	0,01		
Total	0,18	23			

## 1.7 Conductividad eléctrica

### 1.7.1 CE $\mu\text{s.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
CE $\mu\text{s.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$	24	0,96	0,94	9,24

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	174212,52	5	34842,50	77,49	<0,0001
Lote	174212,52	5	34842,50	77,49	<0,0001
Error	8093,01	18	449,61		
Total	182305,54	23			

### 1.7.2 VIGOR estimado por el equipo

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
VIGOR %	24	0,94	0,93	10,00

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19627,33	5	3925,47	61,12	<0,0001
Lote	19627,33	5	3925,47	61,12	<0,0001
Error	1156,00	18	64,22		
Total	20783,33	23			

### 1.7.3 Potencial de germinación estimado por el equipo

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Arco seno raíz potgerm	24	0,91	0,89	8,37

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,36	5	0,47	38,55	<0,0001
Lote	2,36	5	0,47	38,55	<0,0001
Error	0,22	18	0,01		
Total	2,58	23			

## 2- PRUEBAS DE EMERGENCIA A CAMPO

### 2.1- Emergencia a campo 1° fecha de siembra

#### 2.1.1 Emergencia a campo 1° fecha de siembra (9/11/09) 1° recuento (7 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
EC 1º fecha 1º recuento	18	0,99	0,99	4,38

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21762,94	5	4352,59	361,04	<0,0001
Lote	21762,94	5	4352,59	361,04	<0,0001
Error	144,67	12	12,06		
Total	21907,61	17			

#### 2.1. 2 Emergencia a campo 1° fecha de siembra (9/11/09) 2° recuento (9 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
EC 1º fecha 2º recuento	18	1,00	0,99	3,34

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22965,61	5	4593,12	621,63	<0,0001
Lote	22965,61	5	4593,12	621,63	<0,0001
Error	88,67	12	7,39		
Total	23054,28	17			

## 2.2. Emergencia a campo 2° fecha de siembra (20/09/10)

### 2.2.1 Emergencia a campo 2° fecha de siembra (20/09/10) 1° recuento (25 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
EC 2° fecha 1° recuento	18	0,97	0,96	11,75

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21569,11	5	4313,82	77,57	<0,0001
Lote	21569,11	5	4313,82	77,57	<0,0001
Error	667,33	12	55,61		
Total	22236,44	17			

### 2.2.1 Emergencia a campo 2° fecha de siembra (20/09/10) 2° recuento (29 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
EC 2° fecha 2° recuento	18	0,95	0,92	14,55

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22185,11	5	4437,02	42,92	<0,0001
Lote	22185,11	5	4437,02	42,92	<0,0001
Error	1240,67	12	103,39		
Total	23425,78	17			

## **ANEXO CAPÍTULO 2: Evaluación de distintas pruebas de laboratorio para estimar el vigor en seis lotes de híbridos comerciales de maíz.**

### **2.1. Prueba de germinación en frío (PGF)**

#### **2.1.1 Índice de velocidad de germinación (IVG)**

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IVG	23	0,98	0,97	8,51

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4171,10	5	834,22	163,34	<0,0001
Lote	4171,10	5	834,22	163,34	<0,0001
Error	86,82	17	5,11		
Total	4257,92	22			

#### **2.1.2 Tiempo medio de germinación (TMG)**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
TMG	respuesta	23	0,91	0,88	55,74

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4145,08	5	829,02	33,29	<0,0001
Lote	4145,08	5	829,02	33,29	<0,0001
Error	423,32	17	24,90		
Total	4568,40	22			

## 2.2 Prueba de inmersión en agua (PIA)

### 2.2.1 PIA 23 °C 24 h

#### a-Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

#### b- Tratamiento

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PIA 23°C 24h	respuesta	24	0,91	0,88	11,79

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13623,33	5	2724,67	35,03	<0,0001
Lote	13623,33	5	2724,67	35,03	<0,0001
Error	1400,00	18	77,78		
Total	15023,33	23			

### 2.2.2 PIA 23 °C 48 h

#### a- Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

**b- Tratamiento**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PIA 23°C 48h	respuesta	24	0,96	0,95	13,83

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19515,33	5	3903,07	89,16	<0,0001
Lote	19515,33	5	3903,07	89,16	<0,0001
Error	788,00	18	43,78		
Total	20303,33	23			

**2.2.3 PIA 23 °C 72 h**

**a-Testigo**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

## b- Tratamiento

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PIA 23°C 72hs	arco seno raíz	24	0,85	0,81	25,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,70	5	0,34	21,15	<0,0001
Lote	1,70	5	0,34	21,15	<0,0001
Error	0,29	18	0,02		
Total	2,00	23			

### 2.2.4 PIA 10 °C 24 h

#### a-Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

#### b- Tratamiento

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PIA 10°C 24 h	arco seno raíz	24	0,98	0,97	10,36

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,65	5	1,33	159,24	<0,0001
Lote	6,65	5	1,33	159,24	<0,0001
Error	0,15	18	0,01		
Total	6,80	23			

## 2.2.4 PIA 10 °C 48 h

### a-Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

### b- Tratamiento

Transformación logaritmo natural

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PIA 10°C 48hs	ln	24	0,99	0,99	5,06

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	65,69	5	13,14	458,19	<0,0001
Lote	65,69	5	13,14	458,19	<0,0001
Error	0,52	18	0,03		
Total	66,21	23			

## 2.2.5 PIA 7,5 °C 24 h

### a- Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

### b- Tratamiento

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PIA 7,5°C 24h arco seno raíz		24	0,98	0,97	10,41

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,62	5	1,32	165,31	<0,0001
Lote	6,62	5	1,32	165,31	<0,0001
Error	0,14	18	0,01		
Total	6,76	23			

## 2.2.5 PIA 7,5 °C 48 h

### a-Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

**b-Tratamiento**

Transformación logaritmo natural.

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PIA 7,5°C 48h	ln	24	0,99	0,98	7,19

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	70,32	5	14,06	249,60	<0,0001
Lote	70,32	5	14,06	249,60	<0,0001
Error	1,01	18	0,06		
Total	71,34	23			

**2.2.6 PIA 7,5 °C 72 h**

**a-Testigo**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

## b- Tratamiento

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PIA 7,5°C 72h	arco seno raíz	22	0,99	0,98	10,65

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,06	5	1,21	252,97	<0,0001
Lote	6,06	5	1,21	252,97	<0,0001
Error	0,08	16	4,8E-03		
Total	6,13	21			

## 2.3 Prueba de envejecimiento acelerado (PEA)

### 2.3.1 PEA 41 °C 72 h

#### a- Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

## b- Tratamiento

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PEA 41°C 72 h	arco seno raíz	24	0,98	0,97	5,78

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,96	5	0,79	171,33	<0,0001
Lote	3,96	5	0,79	171,33	<0,0001
Error	0,08	18	4,6E-03		
Total	4,05	23			

### 2.3.2 PEA 45 °C 72 h

#### a- Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

#### b- Tratamiento

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PEA 45°C 72 h	respuesta	24	0,97	0,96	12,95

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29749,33	5	5949,87	107,96	<0,0001
Lote	29749,33	5	5949,87	107,96	<0,0001
Error	992,00	18	55,11		
Total	30741,33	23			

## 2.4 Prueba de frío modificada (PFM)

### 2.4.1 PFM 10 ° C, 1ºrecuento (3 días)

#### a- Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

#### b- Tratamiento

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFM 10°C 1ºrecuento	respuesta	24	0,99	0,98	7,62

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	30837,50	5	6167,50	297,63	<0,0001
Lote	30837,50	5	6167,50	297,63	<0,0001
Error	373,00	18	20,72		
Total	31210,50	23			

### 2.4.2 PFM 10 ° C, 2ºrecuento (5 días)

#### a- Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

**b- Tratamiento**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFM 10°C	2ºrecuento	respuesta	24	0,99	0,98 7,31

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	30179,33	5	6035,87	270,26	<0,0001
Lote	30179,33	5	6035,87	270,26	<0,0001
Error	402,00	18	22,33		
Total	30581,33	23			

**2.4.3 PFM 7,5 ° C, 1ºrecuento (3 días)**

**a- Testigo**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

## **b- Tratamiento**

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFM 7,5°C 1°recuento	arco seno raíz	24	0,98	0,98	9,14

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,66	5	1,13	192,54	<0,0001
Lote	5,66	5	1,13	192,54	<0,0001
Error	0,11	18	0,01		
Total	5,77	23			

### **2.4.3 PFM 7,5 ° C, 2°recuento (5 días)**

#### **a- Testigo**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

## **b- Tratamiento**

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFM 7,5°C 2°recuento	arco seno raíz	24	0,98	0,98	8,40

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,21	5	1,24	197,33	<0,0001
Lote	6,21	5	1,24	197,33	<0,0001
Error	0,11	18	0,01		
Total	6,33	23			

**PFM 7,5 ° C, 2°recuento (5 días) (sin transformar)**

**a- Testigo**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

**b- Tratamiento**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFM 7,5°c 2° recuento	respuesta	24	0,98	0,98	8,49

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31460,00	5	6292,00	212,89	<0,0001
Lote	31460,00	5	6292,00	212,89	<0,0001
Error	532,00	18	29,56		
Total	31992,00	23			

#### 2.4.4 PFM 5 ° C , 1°recuento (3 días)

##### a- Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

##### b- Tratamiento

Transformación arco sen  $\sqrt{x}$

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFM 5°C 1° recuento arco seno raíz		24	1,00	0,99	5,99

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,82	5	1,16	776,63	<0,0001
Lote	5,82	5	1,16	776,63	<0,0001
Error	0,03	18	1,5E-03		
Total	5,84	23			

#### 2.4.5 PFM 5 ° C, 2° recuento (5 días)

##### a- Testigo

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

**b- Tratamiento**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFM 5°C 2° recuento	respuesta	24	0,99	0,99	7,46

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29338,83	5	5867,77	547,25	<0,0001
Lote	29338,83	5	5867,77	547,25	<0,0001
Error	193,00	18	10,72		
Total	29531,83	23			

**2.5 Prueba de frío saturada (PFS)**

**2.5.1 PFS 7,5 °C, 1° recuento (4 días)**

**a- Testigo**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

**b- Tratamiento**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFS 1°recuento	respueta	24	0,95	0,93	23,10

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20522,00	5	4104,40	66,56	<0,0001
Lote	20522,00	5	4104,40	66,56	<0,0001
Error	1110,00	18	61,67		
Total	21632,00	23			

**2.5.2 PFS 7,5 °C, 2° recuento (7 días)**

**a- Testigo**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Germinación estándar	respuesta	24	0,85	0,81	6,61

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Lote	3177,50	5	635,50	20,25	<0,0001
Error	565,00	18	31,39		
Total	3742,50	23			

**b- Tratamiento**

Análisis de la varianza

Prueba	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFS 2° recuento	respuesta	24	0,96	0,95	18,27

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24642,83	5	4928,57	94,28	<0,0001
Lote	24642,83	5	4928,57	94,28	<0,0001
Error	941,00	18	52,28		
Total	25583,83	23			

### **ANEXO CAPÍTULO 3: Cambios en la composición química de cariopses de dos lotes de híbridos de maíz luego del estrés provocado por distintas pruebas de vigor.**

#### **3.1 Humedad (%)**

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	107.1587467	11.9065274	3840.82	<.0001
Error	20	0.0620000	0.0031000		
Corrected Total	29	107.2207467			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	hum Mean
0.999422	0.703415	0.055678	7.915333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	4	104.8075133	26.2018783	8452.22	<.0001
Lote	1	0.4762800	0.4762800	153.64	<.0001
Tratamiento*híbrido	4	1.8749533	0.4687383	151.21	<.0001

#### **3.2 Cenizas totales (%)**

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.31380333	0.03486704	6.07	0.0004
Error	20	0.11493333	0.00574667		
Corrected Total	29	0.42873667			

R-Square    Coeff Var    Root MSE    cen Mean  
                  0.731926    6.027573    0.075807    1.257667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	4	0.09382000	0.02345500	4.08	0.0141
Lote	1	0.20667000	0.20667000	35.96	<.0001
Tratamiento*híbrido	4	0.01331333	0.00332833	0.58	0.6811

### 3.3 Proteínas (%)

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	16.93416333	1.88157370	24.78	<.0001
Error	20	1.51886667	0.07594333		
Corrected Total	29	18.45303000			

R-Square    Coeff Var    Root MSE    prot Mean  
                  0.917690    3.042709    0.275578    9.057000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	4	0.83351333	0.20837833	2.74	0.0572
Lote	1	14.29680333	14.29680333	188.26	<.0001
Tratamiento*híbrido	4	1.80384667	0.45096167	5.94	0.0026

### 3.4 Lípidos (%)

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.27220333	0.03024481	1.89	0.1127
Error	20	0.31973333	0.01598667		
Corrected Total	29	0.59193667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	lip Mean
0.459852	2.945680	0.126438	4.292333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	4	0.01562000	0.00390500	0.24	0.9097
Lote	1	0.23763000	0.23763000	14.86	0.0010
Tratamiento*híbrido	4	0.01895333	0.00473833	0.30	0.8768

### 3.5 Fibras totales (%)

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.53418667	0.05935407	6.30	0.0003
Error	20	0.18840000	0.00942000		
Corrected Total	29	0.72258667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	fib Mean
0.739270	4.347119	0.097057	2.232667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	4	0.46658667	0.11664667	12.38	<.0001
Lote	1	0.00085333	0.00085333	0.09	0.7665
Tratamiento*híbrido	4	0.06674667	0.01668667	1.77	0.1742

### 3.6 Extractivos no nitrogenados (%)

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	17.75300000	1.97255556	11.25	<.0001
Error	20	3.50820000	0.17541000		
Corrected Total	29	21.26120000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	enn Mean
0.834995	0.503752	0.418820	83.14000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	4	2.05723333	0.51430833	2.93	0.0465
Lote	1	13.60133333	13.60133333	77.54	<.0001
Tratamiento*híbrido	4	2.09443333	0.52360833	2.99	0.0439

VARIABLE	P-VALUE INTERACCIÓN	P-VALUE LOTE	P-VALUE TRATAMIENTO
% HUMEDAD	<.0001 **	-	-
% CENIZA	0.6811	<.0001 **	0.0141 *
% PROTEÍNA	0.0026 **		
% LÍPIDOS	0.9097	0.0010 **	0.8768
% FIBRAS	0.1742	0.7665	<.0001 **
% EXTRACTIVO NO NITROGENADO	0.0439 *	-	-

\*: Significativo al 5%; \*\*: Significativo al 1%, NS: No significativo

<b>Desglose Interacción</b>		
Variable	Diferencia entre Tratamientos/A882	Diferencia entre Tratamientos/A886
Humedad	<0,001 **	<0,001 **
Proteínas	NS	<0,001 **
ENN	NS	0,02 *

\*: Significativo al 5%; \*\*: Significativo al 1%, NS: No significativo